

NOTICE of CHANGE dated 28/11/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«BCR-ABL P190 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTSG07PLD190

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Updated calibration curve validity (60 days)*
- *Updated transport and storage conditions for primary sample*

The product can be used with the previous versions of the IFU as well.

Composition, use and performance of the product remain unchanged

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit

reagentes para a transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTSG07PLD190



IVD



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 4
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 4
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 4
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 5
ELITE INGENIUS®	página 7
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 7
PROCEDIMENTO	página 8
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 17
OUTROS SISTEMAS	página 19
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 19
PROCEDIMENTO	página 20
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 28
REFERÊNCIAS	página 30
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 31
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 32
SÍMBOLOS	página 34
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 35

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit» consiste num ensaio de transcrição reversa e amplificação de ácidos nucleicos, qualitativo e quantitativo para a **deteção de mARN da reordenação BCR-ABL, translocação t(9;22), cromossoma Philadelphia, variante P190 (P190)** e para a quantificação de mARN de P190 em comparação com mARN do gene que codifica a proteína quinase Abelson (ABL) em amostras de ARN total extraídas de suspensões de linfomonócitos e suspensões de leucócitos de amostras clínicas do sangue periférico ou da medula óssea.

O produto destina-se a ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos do paciente e outros testes laboratoriais, como um auxílio no diagnóstico e monitorização de casos de leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA) positivas para o marcador P190.

BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTSG07PLD190

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste numa transcrição reversa e uma reação de amplificação em tempo real (método de um passo) com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência (termociclador de amplificação em tempo real).

Para cada amostra de ARN extraído, o ensaio envolve **uma reação específica duplicada para a região de mARN do P190 (alvo) e uma região específica em duplicado para uma região de mARN do ABL (controlo)**.

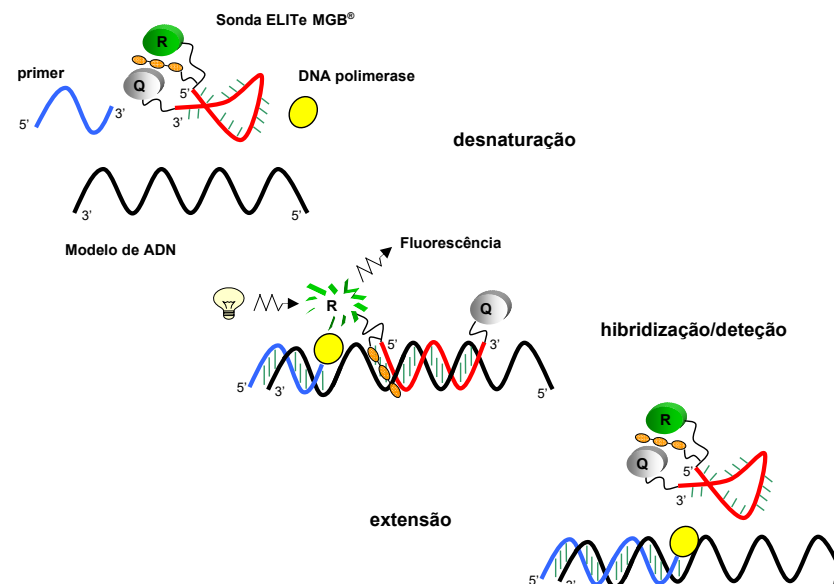
A sonda específica de cADN de P190 com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação de cADN de P190.

A sonda específica de cADN de ABL com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do cADN de ABL.

À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento dos dados determina a presença e o título de mARN de P190 e ABL na amostra inicial.

O ensaio está validado para ser usado em conjunto com os sistemas descritos neste manual do utilizador.

Na imagem seguinte é mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia ELITE MGB®. Tenha em atenção que a sonda não é hidrolisada durante os ciclos de amplificação.



DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit» fornece os seguintes componentes:

- P190 PreMix**

Uma mistura de oligonucleótidos, específicos para a transcrição reversa e amplificação em tempo real de P190, numa solução estabilizada **aliquotada num tubo de teste** (tampa ROXA), contendo **270 µL** de solução, suficiente para pelo menos **36 testes** em associação com «**ELITe InGenius®**» e **50 testes** em associação com outros sistemas.

Oligonucleótidos do primer e sonda específica do P190 (estabilizados pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente), que são específicos para uma região de mARN gerada pelo **P190, variante de reordenação BCR-ABL (e1a2)**.

A mistura de reação fornece fluoróforo AP593, usado em vez de ROX ou CY5 como referência passiva para normalização da fluorescência.

- ABL PreMix**

Uma mistura de oligonucleótidos, específicos para a transcrição reversa e amplificação em tempo real de ABL, numa solução estabilizada **aliquotada num tubo de teste** (tampa NEUTRA), contendo **270 µL** de solução, suficiente para pelo menos **36 testes** em associação com «**ELITe InGenius®**» e **50 testes** em associação com outros sistemas.

Oligonucleótidos do primer e sonda específica do ABL (estabilizados pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente), que são específicos para uma região do mARN do gene humano que codifica o **ABL (exões a2a3)**.

A mistura de reação fornece fluoróforo AP593, usado em vez de ROX ou CY5 como referência passiva para normalização da fluorescência.

- PCR MasterMix**

Uma mistura otimizada e estabilizada de reagentes para transcrição reversa e amplificação em tempo real **aliquotada em 2 tubos de teste** (tampa NEUTRA). Cada tubo contém **820 µL** de solução, que é suficiente para pelo menos **36 testes** em associação com o «**ELITe InGenius®**» e **50 testes** em associação com outros sistemas.

A mistura de reação fornece o tampão, cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleótidos e a enzima de polimerase de ADN Taq de inicialização a quente.

- RT EnzymeMix**

Uma mistura de reagentes otimizados e estabilizados para a transcrição reversa, **aliquotados em 2 tubos de teste** (tampa com inserção PRETA). Cada tubo contém **20 µL** de solução, suficiente para pelo menos **36 testes** em associação com o «**ELITe InGenius®**» e **50 testes** em associação com outros sistemas.

A mistura da reação fornece a enzima da transcriptase reversa.

O produto ativa **18 determinações duplicadas para o mARN de P190 e 18 determinações duplicadas para o mARN de ABL em associação com o ELITe InGenius**, incluindo standards e controlos.

O produto ativa **25 determinações duplicadas para o mARN de P190 e 25 determinações duplicadas para o mARN de ABL em associação com o 7300 Real Time PCR System, o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e o 7900 Real-Time PCR System**, incluindo standards e controlos, ou seja, um número máximo de **19 amostras clínicas** numa sessão (em condições de utilização ótimas).

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação do perigo
P190 PreMix	Mistura de oligonucleótidos do primer/sonda Tampa ROXA	1 x 270 µL	-
ABL PreMix	Mistura de oligonucleótidos do primer/sonda Tampa NEUTRA	1 x 270 µL	-
PCR MasterMix	mistura de reagentes para transcrição reversa e amplificação em tempo real Tampa NEUTRA	2 x 820 µL	-
RT EnzymeMix	Transcriptase reversa tampa com inserção PRETA	2 x 20 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifugadora de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou deslocação positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.
- Tubo contornado Sarstedt de 2,0 mL com tampa de rosca (Sarstedt Ref. 72.694.005).
- Microtubos de 1,5 mL em polipropileno para biologia molecular.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência 7300 Real Time PCR System, 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ou 7900 Real-Time PCR System calibrado de acordo com as instruções do fabricante.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ARN das amostras, as microplacas da amplificação, os standards de ADN em quantidade conhecida e os consumíveis **não estão** incluídos neste produto.

Para a análise automática da amostra com o instrumento «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) são necessários os seguintes produtos genéricos: os cartuchos de extração «**ELITe InGenius® SP RNA**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT034SPRNA), o «**ELITe InGenius DNase I**» (ELITechGroup S.p.A. INT034DNASE), o «**Dnase Tube Adapter Kit**» (ref. G6431-000), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos de amostras biológicas «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS), «**ELITe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000), «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR) e «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

Para a extração de ARN automática, a amplificação e a interpretação da análise da amostra, é necessário o instrumento «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A):

- para os calibradores «**BCR-ABL P190 ELITe STD_P190**» e «**BCR-ABL P190 ELITe STD_ABL**»,
- para o positive control da amplificação «**BCR-ABL P190 ELITe_PC**»,
- para o negative control da amplificação «**BCR-ABL P190 ELITe_NC**»,
- para a análise das amostras «**BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100**».

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN
e amplificação em tempo real de cADN****REF** RTSG07PLD190

Para a extração do ARN das amostras a serem analisadas, utilize um produto com validação laboratorial, tal como o sistema de extração automática «**Maxwell® CSC**» (Promega, ref. AS6000) com reagentes **Maxwell® CSC RNA Blood Kit** (Promega, código AS1410) ou produtos equivalentes.

Quando for usado um 7300 Real-Time PCR System ou um 7900 Real-Time PCR System, é necessário usar o produto genérico «**MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate**» (Life Technologies, ref. N8010560), microplacas com furos de 0,2 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado um 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ou um 7900 Real-Time PCR System, é recomendável usar o produto genérico «**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL**» (Life Technologies, ref. 4346906), microplacas com furos de 0,1 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Para a deteção e a quantificação de mARN de P190 e mARN de ABL, é necessário o produto «**BCR-ABL P190 - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRG07PLD190), o positive control do ADN do plasmídeo.

Para a deteção e a quantificação de mARN de P190 e mARN de ABL, é necessário o produto «**BCR-ABL P190 ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STDG07PLD190), cinco diluições de ADN de plasmídeo em quantidade conhecida para obter as curvas padrão de P190 e ABL.

Para o pré-tratamento do sangue, utilize um produto genérico com validação laboratorial, tal como uma Solução de Lise Celular (Promega, Ref. A7933), RNA Lysis Buffer (Promega, Ref. Z3051) e Tioglicerol (Promega, Ref. A208B-C) ou reagentes equivalentes (tais como uma Solução A (Promega, Ref. MC130A), Solução B (Promega, Ref. MC131A) e Tioglicerol (Promega, Ref. MC132A).

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido exclusivamente para utilização *in vitro*.

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com 3% de hipoclorito de sódio ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os desperdícios devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

Leia atentamente todas as instruções fornecidas no produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas no produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos no produto e os recomendados pelo fabricante.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, transcrição reversa, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN
e amplificação em tempo real de cADN****REF** RTSG07PLD190

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis batas, luvas e ferramentas de laboratório que sejam exclusivamente usadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

As amostras devem ser usadas exclusivamente para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. Os tubos contendo amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de forma a que possam ser usados numa sessão única. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de amplificação devem ser manuseados de modo a reduzir a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação. As pipetas usadas no manuseamento de produtos de amplificação devem ser usadas exclusivamente para este fim.

Avisos e precauções específicos para os componentes

- **P190 PreMix**
A **P190 PreMix** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.
A **P190 PreMix** pode ser congelada e descongelada num máximo de **seis vezes**: quaisquer ciclos de congelamento/descongelamento adicionais podem diminuir o desempenho do produto.
- **ABL PreMix**
A **ABL PreMix** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.
A **ABL PreMix** pode ser congelada e descongelada no máximo **seis vezes**: quaisquer ciclos de congelamento/descongelamento adicionais podem diminuir o desempenho do produto.
- **PCR MasterMix**
A **PCR MasterMix** deve ser guardada a -20 °C.
A **PCR MasterMix** pode ser congelada e descongelada num máximo de **seis vezes**: quaisquer ciclos de congelamento/descongelamento adicionais podem diminuir o desempenho do produto.
- **RT EnzymeMix**
A **RT EnzymeMix** deve ser guardada a -20 °C.
A **RT EnzymeMix** não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos não mais de **seis vezes**.

ELITe InGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Sangue periférico colhido em EDTA ou citrato de sódio

O sangue periférico colhido em EDTA ou citrato de sódio, utilizado para a preparação de suspensões de linfomonócitos e leucócitos para extração de ARN, deve ser colhido de acordo com as directrizes do laboratório, transportado e armazenado à temperatura ambiente (+21 ±5 °C) durante um máximo de 24 horas.

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

Quando iniciar com sangue periférico, é aconselhável separar os leucócitos de acordo com as diretrizes laboratoriais ou seguindo as indicações.

Transfira 10 – 14 mL de sangue periférico fresco colhido em EDTA ou citrato de sódio para um tubo de 15 mL após misturar bem o mesmo por inversão. Centrifugue durante 10 minutos a 3000 RCF; adicione 5 mL de Solução de Lise Celular (Promega, Ref. A7933) num novo tubo de 15 mL; com uma pipeta de 1 mL, remova a camada leuco-plaquetária obtida após a centrifugação e transfira a mesma para o tubo de 15 mL que contém a solução de lise; aspire e liberte até as células estarem no interior do tubo e a pipeta estar sem material; incube à temperatura ambiente durante 10 minutos e misture por inversão (SEM VÓRTICE) pelo menos 3-4 vezes; centrifugue a 3000 RCF durante 10 minutos

Nota: a quantidade ideal de glóbulos brancos é representada, numa escala 1:1, na imagem seguinte



Remova o sobrenadante e ressuspensa em 2 mL de Solução de Lise Celular transferindo-o para um tubo de 2 mL; centrifugue novamente durante cerca de 2 minutos a 3000 RCF; remova cuidadosamente o sobrenadante (atenção à remoção dos vestígios de glóbulos vermelhos por cima do grânulo de células) e ressuspensa o grânulo em 200 µL de Solução de Lise (1 mL de Tampão de Lise de ARN, Promega, Ref. Z3051 + 20 µL de 1-Tioglicerol, Promega, Ref. A208B-C).

Nota: quando a extração de ácido nucleico for realizada com o **ELITe InGenius** e com o software **ELITe InGenius**® versão 1.3 (ou versões mais recentes equivalentes), utilize os protocolos de extração **BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Substâncias interferentes

O ARN extraído não deve conter heparina, hemoglobina, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar a inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

As quantidades de ARN superiores a 2,0 µg por reação podem inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação em tempo real.

As quantidades de ADN genómico humano superiores a 100 ng por reação no ARN extraído da amostra podem inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação em tempo real.

PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** com o sistema **ELITe InGenius** consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema,
- preparação da sessão,
- revisão e exportação de resultados.

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELITe InGenius** e seleccionar o modo "**CLOSED**" (Fechado),
- certificar-se de que os Calibradores (**BCR-ABL P190 Q-PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Se não existirem Calibradores da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,
- certificar-se de que os controlos da amplificação (Controlos, **Controlo positivo BCR-ABL P190**, **Controlo negativo BCR-ABL P190**) são executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Se não existirem controlos da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits **ELITe MGB®**, o instrumento **ELITe InGenius** e a matriz citada.

O Protocolo de ensaio disponível para teste da amostra com o produto **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** está descrito na tabela seguinte.

Protocolo de ensaio para o BCR-ABL P190 ELITe MGB® kit			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100	Leucócito de sangue periférico	%P190	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Sonicação: NÃO Controlo Interno: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL

Se o Protocolo de ensaio de interesse não estiver no sistema, contacte o serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup na sua localidade.

Preparação da sessão

O produto **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** em associação com o **ELITe InGenius** pode ser usado para:

- A. Execução integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR),
- B. Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- C. Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- D. Execução de amplificação para Positive e Negative Control (PCR only) (apenas PCR).

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização – LIS) através do qual é possível enviar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN****REF** RTSG07PLD190

Antes de iniciar a sessão, é obrigatório fazer o seguinte:

1. Descongele durante 30 minutos à temperatura ambiente (+18/25 °C) os tubos de teste **P190 PreMix** (tampa BRANCA) e **ABL PreMix** (tampa NEUTRA) necessários para a sessão, lembrando-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente para **36 reações**. Misture por meio de vórtice durante 10 segundos três vezes, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

2. Descongele durante 30 minutos à temperatura ambiente (+18/25 °C) os tubos de teste **PCR MasterMix** (tampa NEUTRA) necessários para a sessão, lembrando-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente **36 reações**. Misture por meio de vórtice durante 10 segundos três vezes, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

3. Remova os tubos **RT EnzymeMix** (tampa com inserção PRETA) necessários para a sessão, lembrando-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente para preparar **36 reações**. Agite suavemente os tubos, centrifugue durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

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

4. Prepare um tubo de 2 mL com tampa de rosca (Sarstedt Ref. 72.694.005, não incluído no kit) para a **mistura de reação completa** e marque-o de forma reconhecível com um marcador permanente.

5. Calcule os volumes dos três componentes fornecidos pelo kit que são necessários para a preparação da **mistura de reação completa**:

a. Para a Calibração, siga a tabela seguinte:

Alvo	Número de amostras	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
P190	5	30 µL	90 µL	0,9 µL
ABL	3	20 µL	60 µL	0,6 µL

b. para os Controlos e amostras, siga a tabela seguinte:

Número de amostras	P190 PreMix ou ABL PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	15 µL	45 µL	0,5 µL
2	25 µL	75 µL	0,8 µL
3	40 µL	120 µL	1,2 µL

6. Prepare a **mistura de reação completa** adicionando ao tubo de 2 mL dedicado os volumes calculados dos três componentes.

7. Misture por **meio de vórtice a baixa velocidade** durante 10 segundos três vezes, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

Nota: A **mistura de reação completa** deve ser usada em **5 horas** se for mantida no bloco refrigerado. A mistura de reação completa **não pode** ser guardada. Este tempo permite realizar 1 sessão de trabalho de 3,5 horas e iniciar uma segunda sessão de trabalho.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN****REF** RTSG07PLD190

Estão descritas a seguir as operações principais para definir os quatro tipos de deslocação.

A. Execução integrada

Para preparar a execução integrada a partir de amostras previamente tratadas, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
2. Certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 200 µL e que o "Volume de eluição extraído" é de 100 µL.
3. Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
4. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (Ensaio) (isto é, BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100).
5. Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR" (Extração + PCR).
6. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Posição da amostra" é "Tubo de extração (fila inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
7. Carregue a **mistura de reação completa** no "Inventory Block" (Bloco de inventário) selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a "Cassete PCR", os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP RNA" e o "ELITe InGenius DNase I", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 8, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Feche a porta do instrumento.
11. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe InGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no "Elution Tube" deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: No final da execução, a **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado tendo em conta o período máximo de 5 horas.

B. Execução da amplificação

Para preparar a execução de amplificação a iniciar a partir de ARN extraído, realize os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
2. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
3. Para cada Rastreio de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
4. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (Ensaio) (isto é, BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100).
5. Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".
6. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (fila inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
7. Carregue a **mistura de reação completa** no "Inventory Block" (Bloco de inventário) selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Feche a porta do instrumento.
11. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe InGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no "Elution Tube" deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: No final da execução, a **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado tendo em conta o período máximo de 5 horas.

C. Execução de calibração

Para preparar a execução de calibração para os Q-PCR Standards, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele um tubo de cada nível de BCR-ABL P190 Q - PCR Standard para a calibração P190 (Cal1: BCR-ABL Q-PCR Standards 10¹, Cal2: BCR-ABL Q-PCR Standards 10², Cal3: BCR-ABL Q-PCR Standards 10³, Cal4: BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁴, Cal5: BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁵). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele outro tubo de BCR-ABL P190 Q - PCR Standard 10⁵, 10⁴ e 10³ para calibração ABL (Cal3: BCR-ABL Q-PCR Standards 10³, Cal4: BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁴, Cal5: BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁵). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
5. Para a calibração P190, selecione o Protocolo do ensaio "BCR-ABL P190 ELITe_STD_P190" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade do **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard**.
6. Para a calibração ABL, selecione o Protocolo do ensaio "BCR-ABL P190 ELITe_STD_ABL" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade do **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard**.
7. Carregue a **mistura de reação completa** no "Inventory Block" (Bloco de inventário) selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue as "PCR Cassettes" e os tubos **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard** seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Feche a porta do instrumento.
11. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe InGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução, o restante **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: No final da execução, a **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado tendo em conta o período máximo de 5 horas.

D. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

Para preparar a execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

1. Descongele o tubo de Controlo positivo BCR-ABL P190 - ELITe para a sessão. Cada tubo é suficiente para 2 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Transfira pelo menos 80 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution Tube", fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
5. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
6. Para o controlo positivo, selecione o Protocolo do ensaio "BCR-ABL P190 ELITe_PC" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade do Controlo positivo BCR-ABL P190.
7. Para o controlo negativo, selecione o Protocolo do ensaio "BCR-ABL P190 ELITe_NC" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
8. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a **mistura de reação completa** no "Inventory Block" (Bloco de inventário) selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue as "Cassetes PCR", o tubo do Controlo positivo BCR-ABL P190 e o tubo do Controlo negativo seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe InGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução, o restante **Controlo positivo BCR-ABL P190** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. O restante Controlo negativo deve ser eliminado.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: No final da execução, a **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado tendo em conta o período máximo de 5 horas.

Revisão e aprovação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Calibrador/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou "Track Report"). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: O **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Laboratory Information Server" (Servidor de informação do laboratório - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

O **ELITe InGenius** gera resultados utilizando o **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** através do seguinte procedimento:

- A. Validação da Curva de calibração,
- B. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- C. Validação dos resultados da amostra,
- D. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

A. Validação da Curva de calibração

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para P190 (Canal 1 "P190") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "BCR-ABL ELITe_STD_P190".

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para ABL (Canal 1 "ABL") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "BCR-ABL ELITe_STD_ABL".

As curvas de calibração do P190 e ABL específicas para o lote de reagente de amplificação, são guardadas na base de dados (Calibração). Pode ser visualizada e aprovada por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

As Curvas de calibração, específicas para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 60 dias**.

Nota: Se a Curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Falhou" no ecrã "Calibração" e não é possível aprovar a mesma. Têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador.

Nota: Se a curva de calibração for executada em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

B. Validação dos resultados do Controlo Positivo e Controlo Negativo da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para P190 (Canal 1 "P190") na reação de amplificação do Positive Control e do Negative Control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo do ensaio "BCR-ABL P190 ELITe_PC" e "BCR-ABL P190 ELITe_NC".

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação usado, são registados na base de dados (Controls). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 15 dias**.

Os resultados da amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são usados pelo software do instrumento para calcular e preparar os "Gráficos de controlo". São necessários quatro resultados de positive control e negative control, de 4 execuções diferentes, para preparar o "Control Chart" (gráfico de controlo). Após isso, os resultados do Positive Control e Negative Control são usados para monitorização dos desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Controlo positivo ou Controlo negativo da amplificação não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Falhou" no ecrã "Controlos" e não é possível aprovar o mesmo. Neste caso, deve ser repetida a reação do Controlo positivo ou Controlo negativo da amplificação.

Nota: Se o Positive Control ou Negative Control é executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado é inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

C. Validação dos resultados das amostras

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para P190 (Canal 1 "P190") e a sonda para ABL (Canal 1 "ABL") nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no Protocolo de ensaio BCR-ABL P190_PBL_200_100.

Os resultados são mostrados nos relatórios gerados pelo instrumento ("Exibição dos resultados").

A execução da amostra pode ser aprovada quando forem cumpridas as três condições reportadas na tabela abaixo.

1) Curva de calibração	Estado
BCR-ABL P190 Q-PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
Controlo positivo BCR-ABL P190	APROVADO
3) Negative Control	Estado
Controlo negativo BCR-ABL P190	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo do **software ELITE InGenius** e os parâmetros do Protocolo do ensaio e é explicado no parágrafo seguinte.

No caso das reações de amplificação de cada **amostra**, são usados os valores de **P190 Ct** para detetar e quantificar a presença do mARN alvo, enquanto os valores de **ABL Ct** são usados para detetar e quantificar a presença do mARN de controlo (validação da extração e normalização do alvo).

Os valores de **P190 Ct** e **ABL Ct** nas reações de amplificação de cada **amostra** e nas **Curvas Standard** são usados para calcular a Quantidade de mARN de P190 e ABL presentes nas reações de amplificação das amostras. Em seguida, são usadas as quantidades de mARN de P190 e ABL para calcular a **percentagem de cópias de mARN de P190** normalizadas para cópias de mARN ABL (%P190).

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado de uma Amostra.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
P190:percentagem é x,xxxx%	Foi detetado ARN P190. É mostrado o valor %P190 calculado.
P190:percentagem é 0,0000%	ARN P190 não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio. Equivalente a %P190 = 0%.
Inconclusivo - Voltar a testar a amostra	Foi detetado ARN P190 mas não é possível calcular %P190. As diferenças nas quantidades de P190 no duplicado não são aceitáveis. Voltar a testar a amostra.
Inválido - Voltar a testar a amostra	ARN ABL estava abaixo do Corte (10.000 cópias). Voltar a testar a amostra.

Para completar a informação para cada amostra analisada, os resultados de reações únicas (Rastreios) para os alvos P190 e ABL são comunicados da seguinte forma.

Resultado da réplica única	Interpretação
P190: ARN detetado, quantidade igual a xxx cópias/reação	Foi detetado ARN P190. É mostrada a quantidade calculada de mARN de P190.
P190: ARN não detetado ou inferior ao LoD	ARN P190 não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio.
ABL: ARN detetado, quantidade igual a xxx cópias/reação	Foi detetado ARN ABL. É mostrada a quantidade calculada de mARN de ABL.
ABL: ARN não detetado ou inferior ao LoD	ARN ABL não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio.

A tabela seguinte, que mostra os diferentes casos que podem ocorrer numa sessão de amplificação e a abordagem para gerar as mensagens do resultado.

Amostra	P190 (cópias/reação)	ABL (cópias/reação)	Resultado da execução da amostra (%P190)	Interpretação
1.ª réplica	Quantidade ≥ 10.000	Quantidade ≥ 10.000	A percentagem P190 é x,xxxx%	Foi detetado ARN P190. É mostrado o valor %P190 calculado.
2.ª réplica	Quantidade ≥ 10.000	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	Não detetado	Quantidade ≥ 10.000	ARN P190 não detetado ou inferior ao LoD	ARN P190 não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio. Equivalente a %P190 = 0%
2.ª réplica	Não detetado	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	Quantidade < 10 cópias	Quantidade ≥ 10.000	A percentagem P190 é x,xxxx%	Foi detetado ARN P190. É mostrado o valor %P190 calculado.
2.ª réplica	Não detetado	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	Quantidade > 10 cópias	Quantidade ≥ 10.000	Inconclusivo - Voltar a testar a amostra	Foi detetado ARN P190 mas não é possível calcular %P190. As diferenças nas quantidades de P190 no duplicado não são aceitáveis. Voltar a testar a amostra.
2.ª réplica	Não detetado	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	Detetado ou Não detetado	Quantidade < 10.000	Inválido - Voltar a testar a amostra	ARN ABL estava abaixo do Corte (10.000 cópias). Voltar a testar a amostra.
2.ª réplica	Detetado ou Não detetado	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	DETETADO ou NÃO DETETADO	Quantidade < 10.000	Inválido - Voltar a testar a amostra	ARN ABL estava abaixo do Corte (10.000 cópias). Voltar a testar a amostra.
2.ª réplica	DETETADO ou NÃO DETETADO	Quantidade < 10.000		

Nota: se para uma amostra o resultado da reação de amplificação P190 for < 3 cópias/reação, a quantidade será comunicada para 3 cópias/reação.

As amostras reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo software ELITE InGenius não são adequadas para interpretação dos resultados, pois o mARN ABL não foi detetado eficientemente. Neste caso, ocorreram problemas durante a fase de extração (perda de ARN, presença de inibidores ou degradação do ARN extraído, consulte Resolução de problemas) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada para cálculo do %P190, o ensaio é inválido e deve ser repetido no ARN extraído primeiro e, se um problema for confirmado, começando a partir da extração de uma nova amostra.

As amostras reportadas como "Inconclusivo - Voltar a testar a amostra" pelo software ELITE InGenius não são adequadas para interpretação dos resultados, pois o mARN P190 não foi detetado eficientemente. Neste caso, ocorreram problemas durante a fase de extração (perda de ARN, presença de inibidores ou degradação do ARN extraído, consulte Resolução de problemas) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada para cálculo do %P190, o ensaio é inconclusivo e deve ser repetido no ARN extraído primeiro e, se um problema for confirmado, começando a partir da extração de uma nova amostra.

As amostras reportadas como "ARN P190 não detetado ou inferior ao LoD" são adequadas para análise mas não foi possível detetar ARN P190. Neste caso não pode excluir-se que o ARN está presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "Características de desempenho").

Nota: Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

Os resultados da execução da amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) por pessoal qualificado como "Administrador" ou "Analista", seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Exibição dos resultados" é possível imprimir e guardar os resultados da execução da Amostra como "Sample Report" e "Track Report".

D. Elaboração do relatório do resultado das amostras

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser visualizados como "Sample Report" e "Track Report".

O "Relatório da amostra" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho guardada pela amostra selecionada (SID).

O "Track Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho pelo Rastreo selecionado.

O "Sample Report" e o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Limite de detecção

O Limite de detecção de P190 do ensaio com ARN total foi verificado utilizando o material calibrado de referência ARN de controlo clonal IVS-0032 (InVivoScribe, EUA), ARN total extraído de uma linha da célula humana positiva para BCR-ABL P190 e1a2 diluído em ARN total de uma linha de células humanas negativa para a translocação. A diluição $10^{-4.5}$ foi testada em 40 réplicas (300 ng de ARN/reacção), realizando a transcrição reversa e reacção de amplificação pelos produtos ELITechGroup S.p.A. em associação com o sistema ELITe InGenius.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Limite de detecção com amostras de ARN total e ELITe InGenius					
Amostra	Diluição	N	Positivo	Negativo	P190%
P190 RNA	$10^{-4.5}$	40	39	1	0,0032%

Todas as réplicas apresentaram resultado positivo para P190, com uma concentração média de P190% igual a 0,0032%. A quantidade média de ABL registado nos testes para a definição do limite de detecção foi de aproximadamente 120.000 cópias por reacção.

Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear P190 deste ensaio com ARN total foi determinado utilizando o painel de material calibrado de referência ARN de controlo clonal IVS-0032 (InVivoScribe, EUA). O painel consiste no ARN total extraído de uma linha de células humanas positiva para BCR-ABL P190 e1a2 diluído em ARN total a partir de uma linha de células humanas negativa para a translocação. As diluições variaram desde ARN de P190 positivo puro (ARN de P190) até 10^{-5} (Passos de diluição de 1 registo). Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas (300 ng de ARN/reacção), realizando a transcrição reversa e reacção de amplificação pelos produtos ELITechGroup S.p.A. em associação com o sistema ELITe InGenius. A análise estatística foi realizada por regressão linear.

A análise dos dados obtidos demonstrou que o ensaio possui uma resposta linear para os pontos do painel de ARN P190 positivo puro para 10^{-5} com um coeficiente de correlação linear superior a 0,99.

O limite superior da medição linear verificada neste teste é o ARN P190 positivo puro, correspondente a uma concentração de P190% igual a 100%.

O limite inferior da medição linear verificada neste teste é a diluição de 10^{-5} , inferior ao limite de detecção e correspondente a uma concentração de P190% igual a 0,001%.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear com amostras de ARN total e o ELITe InGenius			
Amostra	Média de cópias/reacção P190	Média de cópias/reacção do registo P190	Desv. Std
P190 RNA	346.796	5,540	0,01
Diluição $10^{-1.0}$	34.073	4,532	0,02
Diluição $10^{-2.0}$	3.453	3,530	0,10
Diluição $10^{-3.0}$	474	2,675	0,034
Diluição $10^{-4.0}$	74	1,860	0,094
Diluição $10^{-5.0}$	4	0,590	n.a.

A quantidade média de ABL registada nos testes foi de aproximadamente 180.000 cópias por reacção.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada através da análise de um painel de amostras clínicas positivas para P190.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 24 espécimes frescos de sangue periférico colhido em EDTA a partir de pacientes com leucemia testados positivos para translocação BCR-ABL, variante P190 com um produto de amplificação em tempo real CE-IVD. Cada amostra foi processada com o **ELITe InGenius** no modo "Extração + PCR".

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	positivo	negativo
Amostras de sangue periférico positivas para P190	24	24	0

No teste, foram confirmadas 24 de 24 amostras. Neste teste a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi igual a 100%.

A quantidade média de ABL registada nos testes foi de aproximadamente 70.000 cópias por reacção.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada através da análise de um painel de amostras clínicas negativas para P190.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 espécimes frescos de sangue periférico colhido em EDTA a partir de diferentes sujeitos testados negativos para translocação BCR-ABL, variante P190 com um produto de amplificação em tempo real CE-IVD. Cada amostra foi processada com o **ELITe InGenius** no modo "Extração + PCR".

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	positivo	negativo
Amostras de sangue periférico negativas para P190	30	1	29

No teste, 29 das 30 amostras foram confirmadas, uma amostra deu um resultado positivo discrepante. Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi igual a 96,7%.

A quantidade média de ABL registada nos testes foi de aproximadamente 50 000 cópias por reacção.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit", FTP G07PLD190.

**ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time System**

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser usado com **ARN extraído** das seguintes amostras clínicas: suspensões de linfomonócitos e leucócitos do sangue periférico colhido em EDTA ou citrato de sódio, sangue da medula óssea colhido em EDTA ou citrato de sódio.

Este produto tem de ser usado adicionando 300 ng a 1,5 µg de **ARN extraído** à reação de transcrição reversa e amplificação em tempo real.

Suspensões linfomonocitárias e leucocitárias.

As suspensões linfomonocitárias e leucocitárias (por ex., camada leuco-plaquetária), usadas para a extração de ARN devem ser preparadas a partir de amostras clínicas de sangue periférico ou da medula óssea de acordo com as diretrizes laboratoriais, ressuspensas em solução fisiológica esterilizada ou PBS esterilizada e armazenadas a +2/8 °C durante um período máximo de quatro horas.

A quantidade ótima de linfomonócitos ou leucócitos a partir dos quais extrair ARN total é de cerca de 10.000.000 células.

Não congele suspensões linfomonocitárias ou leucocitárias com o intuito de evitar a degradação do ARN.

O sangue periférico colhido em EDTA ou citrato de sódio, ou o sangue da medula óssea colhido em EDTA ou citrato de sódio, usado para a preparação de linfomonócitos ou leucócitos, deve ser colhido de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportado a +2/8 °C e armazenado a +2/8 °C durante um período máximo de quatro horas.

Não congele sangue periférico ou da medula óssea, para evitar a degradação do ARN.

Substâncias interferentes

O ARN extraído não deve conter heparina, hemoglobina, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar a inibição e os resultados inválidos frequentes.

As quantidades de ARN superiores a 1,5 µg por reação podem inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação em tempo real.

As quantidades de ADN genómico humano superiores a 100 ng por reação no ARN extraído da amostra podem inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação em tempo real.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por antibióticos, fármacos antivirais, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Controlos de amplificação

É absolutamente obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de negative control e uma reação de positive control.

Para o Negative Control (NC), utilize água de grau de biologia molecular (não fornecida com o produto). Esta deve ser adicionada à reação em vez do ARN extraído a partir da amostra.

Como positive control (PC), é usado o produto «**BCR ABL P190 ELITe Standard**».

Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise de cada extração, transcrição reversa e amplificação, através do processamento de uma amostra negativa e uma amostra positiva que já tenha sido testada ou um material de referência calibrado.

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

(Para realizar na área de amplificação/deteção)

Utilização do instrumento **7300 Real-Time PCR System** ou **7900 Real-Time PCR System**.

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, siga as instruções seguintes:

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador de controlo, lançar o software e abrir uma sessão de "quantificação absoluta",
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de P190 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "P190",
- definir (gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de ABL com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "ABL",
- para cada poço em utilização na microplaca, defina (inspetor de poço) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" "ROX" (é usado AP593 em vez de ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação completa e das amostras para os furos.

Nota: para determinar o título de ARN na amostra inicial, prepare em duplicado as reações com o **Q - PCR Standard** e duas misturas de reação completa para obter duas curvas standard, uma para o P190 (10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ cópias/reação) e uma para o ABL (10⁵, 10⁴, 10³ cópias/reação).

Nota: Para otimizar a utilização do produto, a curva standard para o P190 pode ser configurada de forma a omitir o nível Q - PCR Standard 10¹ cópias/reação e usando os outros níveis 4 Q - PCR Standard (10⁵, 10⁴, 10³, 10² cópias/reação) ou usando o nível Q - PCR Standard 10¹ cópias/reação e omitindo o nível Q - PCR Standard 10³ cópias/reação (10⁵, 10⁴, 10², 10¹ cópias/reação).

Nota: calcule, para o P190 do alvo e o ABL de controlo, dois poços para cada amostra a ser analisada (S), dois poços para a amplificação de negative control (NC) para cada Q - PCR Standard (5 ou 4 pontos para o P190 e 3 pontos para o ABL).

Segue-se um exemplo da forma como as 6 amostras podem ser organizadas.

P190 S1	P190 S1	P190 S2	P190 S2	P190 S3	P190 S3	P190 S4	P190 S4	P190 S5	P190 S5	P190 S6	P190 S6
P190 N.F.	P190 N.F.	P190 101	P190 101	P190 102	P190 102	P190 103	P190 103	P190 104	P190 104	P190 105	P190 105
ABL S1	ABL S1	ABL S2	ABL S2	ABL S3	ABL S3	ABL S4	ABL S4	ABL S5	ABL S5	ABL S6	ABL S6
ABL N.F.	ABL N.F.	ABL 103	ABL 103	ABL 104	ABL 104	ABL 105	ABL 105				

Chave:

P190 S1 - P190 S6: Reações de P190 com as amostras testadas,

P190 NC: Reação de P190 com o negative control,

P190 101, P190 102, P190 103, P190 104, P190 105, reações do P190 com o standard de ADN 101, 102, 103, 104 e 105 cópias/reação.

ABL S1 - ABL S6: Reações de ABL com as amostras testadas,

ABL NC: Reações de ABL com a amplificação do negative control,

ABL 103, ABL 104, ABL 105, reações do ABL com o standard de ADN 103, 104 e 105 cópias/reação.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN****REF RTSG07PLD190**

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico**:

- adicione à fase de amplificação um passo (adicionar passo) de **extensão a 72 °C**;

Nota: a aquisição de fluorescência (Instrumento > Protocolo do ciclo térmico > Definições > Recolha de dados) deve ser definida durante o **passo de hibridização a 56 °C**.

- modifique a temporização como indicado na tabela "**Ciclo térmico**",
- defina o número do ciclo para **45**,
- defina o volume de reação para **30 µL**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperatura	Tempo
Transcrição reversa	50 °C	20 min.
Desnaturação inicial	94 °C	5 min.

Amplificação e detecção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	56 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	15 seg.

Quando é usado o **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**.

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, siga as instruções seguintes:

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador de controlo, iniciar o software e abrir uma sessão "quantificação absoluta", bem como definir o "Modo de execução: Rápido 7500",
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de P190 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "P190",
- definir (gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de ABL com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "ABL",
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "CY5" (é usado AP593 em vez de CY5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação completa e das amostras para os furos.

Nota: para determinar o título de ARN na amostra inicial, prepare duas séries de reações com o **Q - PCR Standard** para obter duas **curvas padrão**, uma para o P190 (105, 104, 103, 102, 101 cópias/reações) e uma para o ABL (105, 104, 103 cópias/reação).

Nota: Para otimizar a utilização do produto, a curva padrão para o P190 pode ser configurada de forma a omitir o nível Q - PCR Standard 10¹ cópias/reação e usando os outros níveis 4 Q - PCR Standard (10⁵, 10⁴, 10³, 10² cópias/reação) ou usando o nível Q - PCR Standard 10¹ cópias/reação e omitindo o nível Q - PCR Standard 10³ cópias/reação (10⁵, 10⁴, 10², 10¹ cópias/reação).

Nota: calcule, para o P190 do alvo e o ABL de controlo, dois poços para cada amostra a ser analisada (S), dois poços para a amplificação de negative control (NC) para cada Q - PCR Standard (5 ou 4 pontos para o P190 e 3 pontos para o ABL).

A preparação da análise quantitativa de 6 amostras é mostrada, a título de exemplo, no parágrafo anterior a descrever o procedimento para o instrumento **Sistema de PCR em tempo real 7300**.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN****REF RTSG07PLD190**

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico**:

- adicione à fase de amplificação um passo (Adicionar passo) de **extensão a 72 °C**;

Nota: a aquisição de fluorescência (Instrumento > Protocolo do ciclo térmico > Definições > Recolha de dados) deve ser definida durante o **passo de hibridização a 56 °C**.

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**",
- defina o número do ciclo para **45**,
- defina o volume de reação para **30 µL**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperatura	Tempo
Transcrição reversa	50 °C	20 min.
Desnaturação inicial	94 °C	5 min.

Amplificação e detecção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	56 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	15 seg.

Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação)

Antes de iniciar a sessão, siga as instruções abaixo:

- verifique a disponibilidade dos reagentes requeridos para cada amostra a ser analisada (ver tabela na página 10).
- tire e descongele à temperatura ambiente (+18/ 25 °C) os tubos de teste que contêm as amostras de ARN a serem analisadas. Submeta a vórtice os tubos durante 5 segundos, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha-os num bloco frio,
- tire e descongele os tubos de teste **P190 PreMix** (tampa ROXA) e **ABL PreMix** (tampa NEUTRA) necessários para a sessão durante 30 minutos à temperatura ambiente (+18/25 °C). Lembre-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente para **50 reações**. Submeta a vórtice os tubos durante 10 segundos três vezes, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha-os num bloco frio,
- tire e descongele (+18 / 25 °C) os tubos de **PCR MasterMix** (tampa neutra) necessários para a sessão durante 30 minutos à temperatura ambiente (+18/25 °C). Lembre-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente para preparar até **50 reações**. Submeta a vórtice os tubos durante 10 segundos três vezes, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha-os num bloco frio,
- tire os tubos **RT EnzymeMix** (tampa PRETA) necessários para a sessão lembrando-se que o conteúdo de cada tubo é suficiente para preparar **50 reações**. Centrifugue durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha num bloco frio,

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

- tire e descongele os tubos **P190-ABL Q-PCR Standard** necessários para a sessão (**para ambas as reações do P190 e ABL**) durante 30 minutos à temperatura ambiente (+18 / 25 °C). Lembre-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente para preparar **12 reações**. Submeta a vórtice os tubos durante 10 segundos três vezes, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha-os num bloco frio,
- pegue na **microplaca da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos,
- pegue na **folha vedante da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo o cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não a danificar.
- prepare dois tubos de polipropileno esterilizados de 1,5 mL (não fornecidos com este produto): um para a mistura de reação completa do **P190** e o outro para a mistura de reação completa do **ABL** e marque-os de uma forma reconhecível com marcador permanente,
- prepare duas misturas de reação completa, uma para o **P190** e a outra para o **ABL**, usando os três componentes fornecidos no produto, com base no número de amostras a serem analisadas, como descrito na tabela seguinte.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN
e amplificação em tempo real de cADN****REF** RTSG07PLD190

Nota: Para a preparação de uma reação de transcrição reversa e amplificação em tempo real, é necessário 5 µL de PreMix, 15 µL de PCR MasterMix e 0,3 µL de RT EnzymeMix. Os volumes indicados na tabela são suficientes para a preparação das reações de transcrição reversa e amplificação em tempo real necessárias para o número de amostras a serem testadas, negative control e quatro standards de Q-PCR, em duplicado acrescidos de uma margem de segurança adequada.

Número de amostras	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	65 µL	195 µL	3,9 µL
2	75 µL	225 µL	4,5 µL
3	85 µL	255 µL	5,1 µL
4	95 µL	285 µL	5,7 µL
5	110 µL	330 µL	6,6 µL
6	120 µL	360 µL	7,2 µL
7	130 µL	390 µL	7,8 µL
8	140 µL	420 µL	8,4 µL
9	150 µL	450 µL	9,0 µL
10	160 µL	480 µL	9,6 µL
11	170 µL	510 µL	10,2 µL
12	180 µL	540 µL	10,8 µL
13	190 µL	570 µL	11,4 µL
14	205 µL	615 µL	12,3 µL
15	215 µL	645 µL	12,9 µL
16	225 µL	675 µL	13,5 µL
17	235 µL	705 µL	14,1 µL
18	245 µL	735 µL	14,7 µL
19	255 µL	765 µL	15,3 µL

Submeta a vórtice as duas misturas de reação completa durante 10 segundos três vezes, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha-os num bloco frio,

Nota: As misturas de reação completa preparadas devem ser usadas dentro de um período de 1 hora. As misturas da reação preparadas **não podem** ser armazenadas.

Configure as **reações de P190 e ABL** conforme descrito de seguida, tendo o cuidado de manter a **microplaca de amplificação** num bloco frio (~ +5 °C).

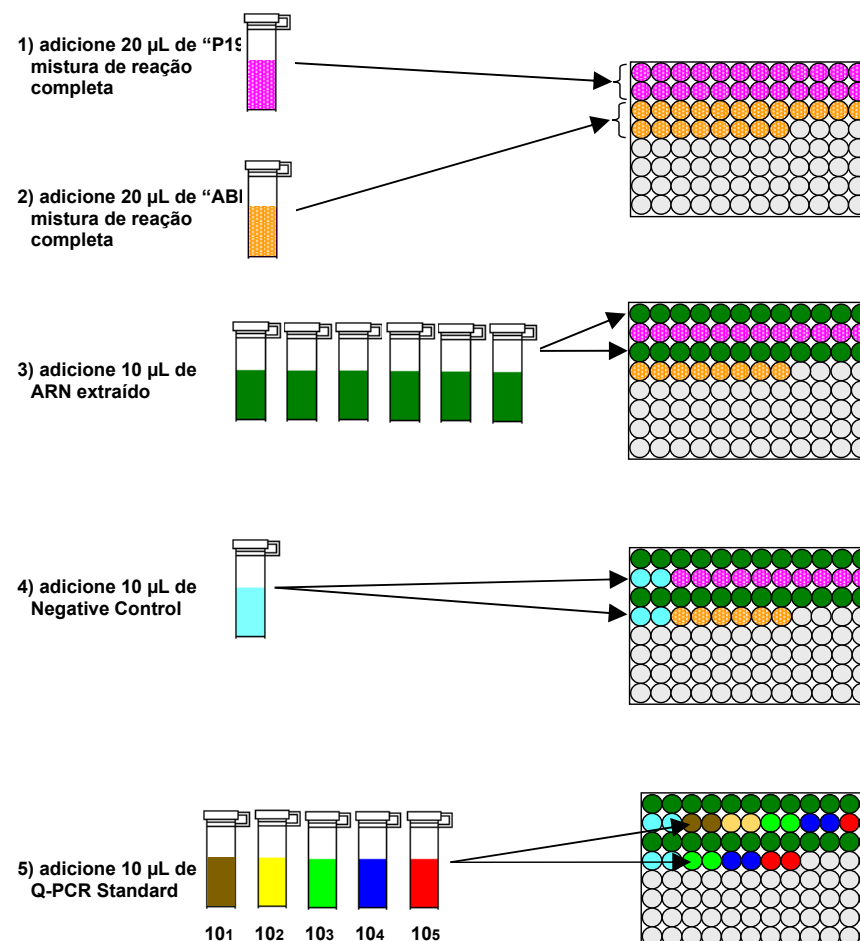
- Com a pipeta, introduza exatamente **20 µL** da **mistura de reação completa** de "**P190**" no fundo dos poços da **microplaca de amplificação "P190"**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.
- Com a pipeta, introduza exatamente **20 µL** da **mistura de reação completa** de "**ABL**" no fundo dos poços da **microplaca de amplificação "ABL"**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.
- Pipete cuidadosamente **10 µL** de **ARN extraído** para a mistura de reação completa a partir da primeira amostra nos dois poços correspondentes de "**P190**" e nos dois poços correspondentes de "**ABL**" da **Microplaca de amplificação**, conforme previamente estabelecido na **Ficha de Trabalho**. Misture bem a amostra, pipetando o **ARN extraído** para a mistura de reação completa três vezes. Evite criar bolhas, tanto na base do furo como na superfície. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ARN extraído**.
- Pipete cuidadosamente **10 µL** de **água de qualidade de biologia molecular** (não fornecida com este produto) para a mistura de reação completa nos dois poços correspondentes de "**P190**" e nos dois poços correspondentes de "**ABL**" da **microplaca de amplificação**, conforme previamente estabelecido na **Ficha de Trabalho**. Misture o negative control introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite criar bolhas, tanto na base do furo como na superfície.
- Pipete cuidadosamente **10 µL** do primeiro **P190-ABL Q-PCR Standard** para a mistura de reação completa em dois poços correspondentes de "**P190**" da **microplaca de amplificação**, conforme previamente estabelecido na **ficha de trabalho**. Misture o poço de standard pipetando o **P190-ABL Q-PCR Standard** para a mistura de reação completa três vezes. Evite criar bolhas, tanto na base do furo como na superfície. Proceda da mesma forma com os outros **P190-ABL Q - PCR Standards**.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit**reagentes para transcrição reversa de ARN
e amplificação em tempo real de cADN****REF** RTSG07PLD190

- Pipete cuidadosamente **10 µL** do primeiro **P190-ABL Q-PCR Standard** para a mistura de reação completa em dois poços correspondentes de "**ABL**" da **microplaca de amplificação**, conforme previamente estabelecido na **ficha de trabalho**. Misture o poço de standard pipetando o **P190-ABL Q-PCR Standard** para a mistura de reação completa três vezes. Evite criar bolhas, tanto na base do furo como na superfície. Proceda da mesma forma com os outros **P190-ABL Q - PCR Standards**.
- Vede com precisão a **microplaca de amplificação** com recurso à **folha vedante da amplificação**.
- Transfira a **microplaca de amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/detecção e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro unívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-BCR-ABL-P190-EGSpa").

Nota: No final do ciclo térmico, a **microplaca de amplificação** com os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminação ambiental. Para evitar derramar os produtos de reação, a **folha vedante da amplificação não deve ser removida da microplaca de amplificação**.

A imagem seguinte resume a configuração das reações de transcrição reversa e amplificação em tempo real para o P190 e o ABL.



Análise dos resultados

Os valores da fluorescência emitida pela sonda específica do P190 (detetor FAM "P190"), pela reação de amplificação de P190 e pela sonda específica de ABL (detetor da FAM "ABL" na reação de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Antes da análise, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- definir manualmente (Resultados > Lote da amplificação > delta Rn vs Ciclo) o intervalo de cálculo para o **nível de fundo de fluorescência (linha de base)** do ciclo 6 ao ciclo 15,

Nota: no caso de uma amostra positiva com um elevado título de P190 ou ABL, a fluorescência FAM da sonda específica do P190 ou ABL pode começar a aumentar antes do 15º ciclo. Neste caso, o intervalo de cálculo para a "linha de base" deve ser definido para ambos os detetores a partir do ciclo 6 até ao ciclo em que a fluorescência FAM da amostra começa a aumentar, como detetado pelo software do instrumento (Resultados > Componente).

- defina manualmente o **Limiar** para o detetor FAM "P190" para **0,1**,
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VCI "ABL" para **0,1**.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que o sinal de fluorescência alcançou o valor do limiar.

Curva standard

No caso da reação de amplificação do P190 e ABL dos **Q - PCR Standards**, os valores da **Ct de P190 e ABL** são usados para calcular as duas **Curvas Standard** (Resultados > Curva Standard) da sessão de amplificação e validar a amplificação e a deteção como mostrado na tabela seguinte:

Reação do P190 - Q - PCR Standard 10s detetor de reação da FAM "P190"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO
Reação do P190 - Detetor da curva standard da FAM "P190"	Intervalo de aceitação*	Amplificação/deteção
Coefficiente de determinação (R2)	0,980 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO
Reação do ABL - PCR Standard 10s detetor FAM "ABL"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO
Reação do ABL - Detetor da curva standard da FAM "ABL"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de determinação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

***Nota:** Se a curva padrão para o P190 tiver sido configurada omitindo o nível Q - PCR Standard 10¹ cópias/reação, o intervalo de aceitação do Coeficiente de Determinação será de 0,990 ≤ R2 ≤ 1,000.

Se o resultado da reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10s** for **Ct > 25** ou **Ct indeterminada** ou se o valor do **Coefficiente de determinação (R2)** não se encontrar dentro dos limites, o ADN do alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (preparação incorreta da mistura de reação completa, dispensação incorreta da mistura de reação completa ou dos standards, degradação da sonda ou dos standards, definição incorreta da posição do standard, definição incorreta do ciclo térmico, ver resolução de problemas) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Negative Control

Em caso de reação de amplificação de P190 e ABL do **Negative Control**, os valores da **Ct de P190 e ABL** (Resultados > Relatório) são usados para validar a amplificação e deteção, conforme mostrado na tabela seguinte:

Reação de P190 - Negative Control detetor FAM "P190"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO
Reação de ABL - Negative Control detetor FAM "ABL"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação do **Negative Control** for diferente de **Ct indeterminado** para P190 e ABL, significa que foi detetada a presença de ADN do alvo na reação de amplificação. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação (contaminação, preparação incorreta da mistura de reação completa, degradação da sonda, definição incorreta da posição do negative control, definição incorreta do ciclo térmico, ver Resolução de Problemas) que pode causar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Amostras

No caso das reações de amplificação de cada **amostra**, são usados os valores de **Ct de P190** para detetar e quantificar a presença do mARN do alvo, enquanto os valores de **Ct do ABL** são usados para detetar e quantificar a presença do mARN de controlo (validação da extração e normalização do alvo).

Nota: Verifique usando as ferramentas de software do instrumento (Resultados > Lote de amplificação > delta Rn vs Ciclo) que a **Ct** foi determinada por um aumento rápido e regular dos valores de fluorescência e não por picos isolados ou por aumentos no sinal de fundo.

Os valores de **Ct de P190** e **Ct de ABL** nas reações de amplificação de cada **amostra** e nas **Curvas padrão** da sessão de amplificação são usados para calcular a Quantidade de mARN de P190 e ABL presentes nas reações de amplificação das amostras.

Reações da amostra		
FAM do detetor	mARN	Quantidade de mARN obtido
Ct determinado	DETETADO	Quantidade
Ct não determinado	NÃO DETETADO	0

As **Quantidades** das reações de amplificação de **P190** e **ABL** para duplicados de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são analisados conforme descrito na tabela seguinte que mostra os diferentes casos que podem ocorrer numa sessão de amplificação e na abordagem recomendada para avaliar os dados:

Amostra	mARN de P190	mARN de ABL*	Quantidade calculada de mARN de P190	Quantidade calculada de mARN de ABL
1.ª réplica	DETETADO	Quantidade ≥ 10.000	Somatório de quantidades	Somatório de quantidades
2.ª réplica	DETETADO	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	NÃO DETETADO	Quantidade ≥ 10.000	0	Somatório de quantidades
2.ª réplica	NÃO DETETADO	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	Quantidade < 10 cópias	Quantidade ≥ 10.000	Quantidade	Somatório de quantidades
2.ª réplica	NÃO DETETADO	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	Quantidade > 10 cópias	Quantidade ≥ 10.000	Voltar a testar a amostra	
2.ª réplica	NÃO DETETADO	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	DETETADO ou NÃO DETETADO	Quantidade < 10000	Voltar a testar a amostra	
2.ª réplica	DETETADO ou NÃO DETETADO	Quantidade ≥ 10.000		
1.ª réplica	DETETADO ou NÃO DETETADO	Quantidade < 10000	Voltar a testar a amostra	
2.ª réplica	DETETADO ou NÃO DETETADO	Quantidade < 10000		

* **Nota:** Se para uma amostra o resultado das reações de amplificação de **ABL** for a **Quantidade de ABL < 10.000** ou **ABL NÃO DETETADO**, isto significa que o mARN de ABL não foi detetado de forma eficaz. Neste caso, ocorreram problemas durante a fase de extração (perda de ARN, presença de inibidores ou degradação do ARN extraído, consulte Resolução de problemas) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos.

Nota: Se, para uma amostra, o resultado das reações de amplificação for **P190 NÃO DETETADO** e **Quantidade de ABL < 10.000** ou **ABL NÃO DETETADO** para pelo menos uma de duas réplicas, o resultado do ensaio é inválido e a amostra não é adequada. O teste deverá ser repetido no ARN extraído primeiro e, se o problema for confirmado, começando pela extração de uma nova amostra.

Nota: Se, para uma amostra, o resultado das reações de amplificação for **P190 DETETADO** e **Quantidade de ABL < 10.000** ou **ABL NÃO DETETADO** para pelo menos uma de duas réplicas, o resultado do ensaio é válido e a amostra é positiva para mARN P190. Contudo, neste caso, não é possível realizar a análise quantitativa. O teste deverá ser repetido no ARN extraído primeiro e, se o problema for confirmado, começando pela extração de uma nova amostra.

Nota: Se para uma amostra o resultado da reação de amplificação for **P190 NÃO DETETADO** e **Quantidade de ABL ≥ 10.000** para ambas as réplicas, o mARN de P190 não foi detetado no ARN obtido a partir da amostra mas não é possível excluir a presença de mARN de P190 a um título mais baixo que o limite de deteção do produto (consulte as Características de desempenho). Neste caso, o resultado seria um falso negativo.

Nota: Se, para uma amostra, o resultado da reação de amplificação for **Quantidade de P190 > 10 cópias** para uma réplica e **P190 NÃO DETETADO** para a outra réplica e **Quantidade de ABL ≥ 10.000** para ambas as réplicas, o mARN P190 não foi corretamente detetado no ARN obtido a partir da amostra. O resultado do ensaio é válido e a amostra é positiva para mARN de P190. Contudo, neste caso, não é possível realizar a análise quantitativa. O teste deverá ser repetido no ARN extraído primeiro e, se o problema for confirmado, começando pela extração de uma nova amostra.

Quando o resultado das reações de amplificação de uma amostra for **P190 DETETADO** e a **Quantidade de ABL ≥ 10.000** , o resultado do ensaio é válido, a amostra é positiva para mARN de P190 e é possível levar a cabo a análise quantitativa.

As **Quantidades calculadas de mARN de P190 e ABL** de cada amostra são usadas para calcular a percentagem de cópias de mARN de P190 normalizadas para as cópias de mARN de ABL (**P190 %**) na amostra inicial, de acordo com esta fórmula:

$$\text{P190 \%} = \frac{\text{Quantidade calculada de mARN de P190}}{\text{Quantidade calculada de mARN de ABL}} \times 100$$

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em consideração todos os outros dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Limite de deteção

O limite de deteção de P190 do ensaio com ARN total foi determinado usando um painel de diluições preparado a partir de material calibrado de referência IVS-0032 Clonal Control RNA (InVivoScribe, US). O painel consiste no ARN total extraído de uma linha da célula humana positiva para BCR-ABL P190 e1a2 diluído em ARN total a partir de uma linha da célula humana negativa para a translocação. As diluições usadas foram desde $10^{-3.5}$ a $10^{-6.0}$ (Passos de diluição de 0,5 Registo). Cada amostra do painel foi testada em 24 réplicas (300 ng de ARN/reação), realizando a transcrição reversa e a reação de amplificação usando os produtos ELITechGroup S.p.A. em associação com o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. A análise estatística foi realizada por regressão Probit. O limite de deteção foi definido como a diluição à qual a probabilidade de um resultado positivo é igual a 95%.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Limite de deteção com amostras de ARN total			
95% de positividade	Diluição $10^{-4.46}$	Intervalo de confiança de 95%	
		Limite inferior	Limite superior
		Diluição $10^{-4.63}$	Diluição $10^{-4.15}$

O limite de deteção foi definido como uma diluição de $10^{-4.46}$ correspondente a uma concentração de P190% entre 0,0005% (diluição de $10^{-4.5}$) e 0,0081% (diluição de $10^{-4.0}$). A quantidade média de ABL registado nos testes para a definição do limite de deteção foi de aproximadamente 200.000 cópias por reação.

Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear P190 deste ensaio com ARN total foi determinado utilizando o painel de material calibrado de referência ARN de controlo clonal IVS-0032 (InVivoScribe, EUA). O painel consiste no ARN total extraído de uma linha da célula humana positiva para BCR-ABL P190 e1a2 diluído em ARN total a partir de uma linha da célula humana negativa para a translocação. As diluições usadas variaram do ARN P190 positivo puro (ARN P190) para $10^{-6.0}$ (Passos de diluição de 1 registo). Cada amostra do painel foi testada em 24 réplicas (300 ng de ARN/reação), realizando a transcrição reversa e a reação de amplificação usando os produtos ELITechGroup S.p.A. em associação com o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. A análise estatística foi realizada por regressão linear.

A análise dos dados obtidos demonstrou que o ensaio possui uma resposta linear para os pontos do painel de ARN P190 positivo puro para 10^{-4} com um coeficiente de correlação linear superior a 0,99.

O limite superior da medição linear verificada neste teste é o ARN P190 positivo puro, correspondente a uma concentração de P190% igual a 69,9%.

O limite inferior da medição linear verificada neste teste é a diluição de $10^{-4,0}$, igual ao Limite de detecção e correspondente a uma concentração de P190% igual a 0,015%.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear com amostras de ARN total			
Amostra	Média de cópias/reacção P190	Registo médio de P190 cópias/reacção	Desv. Std
P190 RNA	226.290,72	5,35	0,07
Diluição $10^{-1,0}$	28.245,34	4,45	0,07
Diluição $10^{-2,0}$	3.715,29	3,57	0,06
Diluição $10^{-3,0}$	535,35	2,72	0,10
Diluição $10^{-4,0}$	26,44	1,38	0,19

A quantidade média de ABL registado nos testes para a definição do intervalo de medição linear foi de aproximadamente 250.000 cópias por reacção.

A quantidade medida de ABL foi verificada usando o material de referência com certificação europeia ERM®-AD623 (IRMM, Bélgica). O material é composto por um painel de diluição (passos de diluição de 1,0 Registo) de ADN do plasmídeo contendo produtos de amplificação de ABL. A concentração de ADN do plasmídeo foi calculada através do método de PCR digital. As diluições usadas variaram de 10⁶ cópias/μL a 10¹ cópias/μL. Cada amostra do painel foi testada em 9 réplicas realizando a reacção de amplificação através dos produtos ELITechGroup S.p.A. «BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit» e «BCR-ABL P190 ELITe Standard» em associação com o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

A análise de dados, realizada de acordo com as recomendações IRMM, demonstrou que os valores medidos de material de referência certificado obtidos através dos produtos ELITechGroup S.p.A encontra-se dentro da incerteza da medição para quantidades de 10⁶ cópias/μL a 10¹ cópias/μL (equivalent a 10.000.000 cópias por reacção e a 100 cópias por reacção, usando 10 μL de reacção) e, por conseguinte, alinham-se com o material de referência certificado europeu ERM®-AD623 (IRMM, Bélgica).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Alinhamento da medição de ABL com o material de referência europeu ERM®-AD623		
Cópias certificadas/μL	Cópias medidas/μL	Desvio padrão
1.108.000	1.121.250	86.262
108.000	111.797	14.429
10.300	12.769	2.119
1.020	1.314	261
104	146	31
10	16	3

Eficiência de detecção e quantificação de possíveis polimorfismos

A sensibilidade analítica do ensaio, como a eficiência de detecção e quantificação com possíveis polimorfismos, foi avaliada por comparação de sequências com bases de dados de nucleótidos.

A verificação de regiões de hibridização dos oligonucleótidos do primer e das sondas fluorescentes (P190 e ABL) através do alinhamento com as sequências dos genes humanos P190 e ABL disponíveis na base de dados revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada através da análise de um painel de amostras clínicas positivas para P190.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada usando 45 amostras de ARN arquivadas extraídas de suspensões de linfomonócitos e leucócitos de pacientes com leucemia que testaram positivo para P190 com um produto de amplificação em tempo real. As amostras foram extraídas com um método validado no laboratório de referência. As reacções de transcrição reversa e amplificação com ARN extraído total (300 ng / reacção) foram levadas a cabo usando produtos ELITechGroup S.p.A. no 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
ARN positivo para P190 a partir de suspensões de linfomonócitos e leucócitos	45	41	4

Quarenta e uma amostras foram confirmadas como sendo positivas (detecção de P190), com uma quantidade de meio de ABL de cerca de 115.000 cópias/reacção. Quando testadas usando o produto de referência, as quatro amostras negativas discordantes continham um título muito baixo (< 3 cópias por reacção) e apenas uma de duas réplicas foi positiva.

Neste teste a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi igual a 91,1%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada através da análise de um painel de amostras clínicas negativas para P190.

A especificidade diagnóstica foi avaliada usando 52 amostras de ARN arquivadas extraídas a partir de suspensões de linfomonócitos e leucócitos obtidas a partir de pacientes que testaram negativo para P190 usando um produto de diagnóstico molecular IVD CE. As amostras foram extraídas com um método validado no laboratório de referência. As reacções de transcrição reversa e amplificação com ARN extraído total (300 ng / reacção) foram levadas a cabo usando produtos ELITechGroup S.p.A. no 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Nº	positivo	negativo
ARN negativo para P190 a partir de suspensões de linfomonócitos e leucócitos	52	12	40

Na primeira instância, quarenta amostras foram confirmadas negativas do ponto de vista qualitativo (P190 não detetado), com uma quantidade de meio de ABL de cerca de 91.000 cópias/reacção. As doze amostras positivas discordantes apresentaram uma quantidade de P190 extremamente baixa (cerca de 1 cópia/reacção e apenas num dos duplicados). A literatura relatou a detecção a um título baixo, semelhante a uma doença residual mínima, da variante de translocação de P190 t(9;22) nas amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (Biernaux C. et. al. and Bose S. et. al.).

Tendo em conta estas evidências, é possível concluir que a especificidade de diagnóstico do ensaio foi igual a 100%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit", FTP RTSG07PLD190.

REFERÊNCIAS

- J. Gabert et al. (2003) *Leukemia* 17: 2318 - 2357
E. Beillard et al. (2003) *Leukemia* 17: 2474 - 2486
H. Pfeifer et al. (2019) *Leukemia* 33: 1910 – 1922
C. Biernaux et. al. (1995) *Blood* 86: 3118 - 3122
S. Bose et al. (1998) *Blood* 92: 3362 -3 367
J. Song et.al (2011) *JMD* 13: 213 - 219
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize unicamente ARN extraído com este produto a partir das seguintes amostras clínicas: suspensões de linfomonócitos ou leucócitos de sangue periférico colhido em EDTA ou citrato, sangue da medula óssea colhido em EDTA ou citrato.

Não use o ARN extraído de amostras que contêm heparina: a heparina inibe as reações de transcrição reversa e amplificação dos ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não use ARN contaminado com hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol: estas substâncias podem inibir as reações de transcrição reversa e amplificação dos ácidos nucleicos e podem causar resultados inválidos.

Quantidades de ARN superiores a 1,5 µg por reação podem inibir as reações de transcrição reversa e amplificação em tempo real dos ácidos nucleicos.

Não use ARN com elevadas quantidades de ADN do genoma humano que possam inibir as reações de transcrição reversa e amplificação dos ácidos nucleicos e causar resultados inválidos.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por antibióticos, fármacos antivirais, fármacos quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Os resultados obtidos com este produto estão sujeitos à correta identificação, recolha, transporte, armazenamento e preparação das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado particular durante estas fases e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos para extração de ácido nucleico.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o ensaio de amplificação em tempo real dos ácidos nucleicos usado neste produto está sujeito a contaminação de amostras clínicas que são positivas para P190, de positive controls e dos próprios produtos da reação de amplificação. A contaminação origina resultados falsos positivos. O produto destina-se a diminuir a contaminação; não obstante, este fenómeno só pode ser prevenido seguindo as boas práticas laboratoriais e cumprindo escrupulosamente as instruções fornecidas neste manual.

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

Este produto requer o uso de vestuário de trabalho e instalações que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, transcrição reversa, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

É necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Este produto requer o uso de vestuário e instrumentos especiais para extração/preparação de reações de amplificação e para amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

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

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o mARN de P190 não é detetado na reação de transcrição reversa do ARN extraído da amostra; mas não pode ser excluído que o mARN de P190 possui um título mais baixo que o limite de deteção do produto (ver Características de Desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido à deteção ineficaz de mARN de ABL e exigem um novo teste, começando pela extração; o que pode causar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos nas regiões do genoma do paciente abrangido pelos primers e sondas do produto podem prejudicar a deteção e a quantificação do mARN de P190 e mARN do ABL.

Tal como acontece com qualquer dispositivo médico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e outros testes laboratoriais efetuados ao doente.

Tal como acontece com qualquer dispositivo médico, existe um risco residual de obtenção de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Nalgumas situações particulares, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com consequências potencialmente perigosas para o paciente.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Alvo não detetado nas reações Q - PCR Standard ou no Controlo positivo ou coeficiente de determinação inválido da Curva standard

Causas possíveis	Soluções
Preparação incorreta da mistura de reação completa	Verifique os volumes de reagente distribuídos durante a preparação da mistura de reação completa
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Tenha cuidado quando distribuir reagentes para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes da mistura de reação completa distribuída. Verifique os volumes de standard distribuído.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius	Verifique a posição da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards. Verifique os volumes da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards.
Degradação da sonda.	Utilize uma nova alíquota da PreMix.
Degradação da MasterMix PCR.	Utilize uma nova alíquota da MasterMix PCR.
Degradação do Controlo positivo ou Standard.	Utilize uma nova alíquota de controlo positivo ou standard.
Erro na configuração do instrumento.	Verifique as definições de posição para as reações standard no instrumento. Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Alvo detetado na reação de Negative Control

Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras, controlo negativo e standards para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius	Verifique a posição da mistura de reação ou do controlo negativo. Verifique os volumes da mistura de reação ou do controlo negativo.
Erro durante a definição do instrumento.	Verifique as definições de posição das amostras, do controlo negativo e dos standards no instrumento.
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Utilize uma nova alíquota de água.
Contaminação da mistura de reação completa.	Prepare uma nova alíquota da mistura de reação completa.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Perfil de amplificação inesperado do alvo, ou alvo não detetado na reação da amostra	
Causas possíveis	Soluções
Preparação incorreta da mistura de reação completa.	Verifique os volumes de reagente distribuídos durante a preparação da mistura de reação completa; verifique se a RT EnzymeMix foi adicionada à mistura de reação completa.
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius	Verifique a posição da mistura de reação ou das amostras. Verifique os volumes da mistura de reação ou das amostras.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only". Repita a extração e amplificação da amostra, realizando um passo de lavagem adicional de grânulo de glóbulos brancos, para remover todos os glóbulos vermelhos antes da lise.
Degradação da RT EnzymeMix.	Utilize uma nova alíquota de RT EnzymeMix.
Problemas durante o armazenamento do reagente.	Verifique se a RT EnzymeMix não foi exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Verifique se a mistura de reação completa não foi exposta a temperatura ambiente durante mais de 30 minutos.
Problemas durante a extração	Verifique a qualidade e a concentração do ARN extraído.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Misture cuidadosamente inserindo a pipeta 3 vezes quando misturar amostras, o controlo negativo e standards na mistura de reação completa. Evite criar bolhas, tanto na base do furo como na superfície.
Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 6 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Linha de base auto".

Erro 30103 no ELITe InGenius	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra numa sessão "Extração + PCR".

SÍMBOLOS

REF	Número do catálogo.
	Limite máximo da temperatura.
LOT	Código do lote.
	Usar até (último dia do mês).
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Contém suficiente para "N" testes.
	Atenção, consulte as instruções de utilização.
CONT	Conteúdo.
	Manter afastado da luz solar.
	Fabricante.

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA
LIMITADA**

Este produto contém reagentes produzidos pela Life Technologies Corporation e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITe® MGB são abrangidos por um ou mais números de patente dos EUA 6.127.121, 6.485.906, 6.660.845, 6.699.975, 6.727.356, 6.790.945, 6.949.367, 6.972.328, 7.045.610, 7.319.022, 7.368.549, 7.381.818, 7.662.942, 7.671.218, 7.715.989, 7.723.038, 7.759.126, 7.767.834, 7.897.736, 8.008.522, 8.067.177, 8.163.910, 8.389.745, 8.969.003, 8.980.855, 9.056.887, 9.085.800, 9.169.256 e números de patente EP 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como os pedidos que estejam atualmente pendentes.

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

"ELITe MGB®" e o logótipo "ELITe MGB®" são marcas comerciais registadas na União Europeia.

O TRI Reagent® consiste numa marca comercial registada da Molecular Research Center, Inc.

Ficol® é uma marca comercial registada da GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Maxwell® 16 são marcas comerciais registadas da Promega Corporation.



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
 This document is available only in English.

A. Intended use

The «BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit» product is a qualitative and quantitative, reverse transcription and amplification of nucleic acids assay for the detection of the mRNA of the BCR-ABL rearrangement, t(9;22) translocation, Philadelphia chromosome, variant P190 (P190) and for the quantification of the mRNA of P190 compared with the mRNA of the gene codifying the kinase protein Abelson (ABL). The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
Control	BCR-ABL (variant P190 e1a2)	FAM
	ABL (exons a2a3)	FAM

C. Validated matrix

- › **PBL isolated by buffycoat***

*Lympho-monocyte and/or leukocyte suspensions must be extracted from buffy coat from Peripheral Blood matrix

D. Kit content

P190 PreMix	ABL PreMix	PCR Master Mix	RT Enzyme Mix*
			
1 tube of 270 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles PURPLE CAP	1 tube of 270 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles NEUTRAL CAP	2 tubes of 820 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube NEUTRAL CAP	2 tubes of 20 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube BLACK CAP

- › Maximum shelf-life: 18 months
- › 18 determinations in duplicate
- › Storage Temperature: -20°C

* The RT EnzymeMix must not be exposed to temperatures higher than -20 °C for more than 10 minutes

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE InGenius SP RNA:** INT034SPRNA
- › **ELITE InGenius DNase I:** INT034DNASE
- › **Dnase Tube Adapter Kit:** G6431-000
- › **Cell Lysis Solution Promega*:** A7933
- › **RNA Lysis Buffer Promega*:** Z3051
- › **Thioglycerol Promega*:** A208B-C
- › **ELITE InGenius PCR Cassette:** INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set:** INT032CS
- › **BCR-ABL P190 - ELITE Positive Control:** CTRG07PLD190
- › **BCR-ABL P190 ELITE Standard:** STDG07PLD190
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **2 mL Sarstedt tube :**72.694.005

* or equivalent

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Report unitage | %P190 |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › PCR eluate input volume | 10 µL for each PCR mix | › Frequency of calibration | 60 days |
| › BCR-ABL Q-PCR Mix volume | 20 µL for each PCR mix | | |

G. Sample pre-treatment

The sample need a blood pre-treatment to separate leukocyte by buffy-coat isolation, according to laboratory use or referring the indications shown in the “Samples and Controls” paragraph of the instruction for use.

H. Procedure

For the Calibration follow the table below:

Target	Number of Samples	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
P190	5	30 µL	90 µL	0.9 µL
ABL	3	20 µL	60 µL	0.6 µL

For Controls and samples follow the table below:

Number of Samples	P190 or ABL PreMix	PCR MasterMix	RT Enzyme Mix
1	15 µL	45 µL	0.5 µL
2	25 µL	75 µL	0.8 µL
3	40 µL	120 µL	1.2 µL

The complete reaction mixtures should be used within 5 hours when kept on board in the refrigerated block. This time allows to carry out 1 working session of 3.5 hours and to start a second working session. It's important to mix them between the runs. The complete reaction mixtures **cannot be stored**.

I. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
(PBL) Peripheral Blood Leukocyte	0.0032%	100% 24/24*	96.7% 29/30*

*confirmed samples/ tested samples

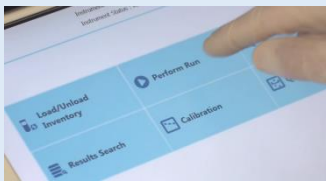
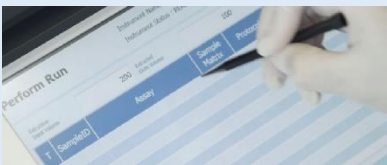
J. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, reverse-transcription, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational modes are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

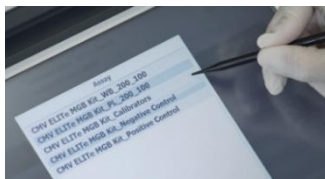
Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed" or "Open"	Verify calibrators: BCR-ABL P190 Q-PCR Standard in the "Calibration menu". Verify controls: BCR-ABL P190 pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired	2. Thaw all the reagents and prepare 2 complete reaction mixture (P190 and ABL Mix) by adding into the dedicated 2 mL tube the calculated volumes of the three components for each Mix. Mix by vortexing at low speed for 10 seconds three times, centrifuge the tube for 5 seconds The complete reaction mixture should be used within 5 hours when kept on board in the refrigerated block
---	---	--

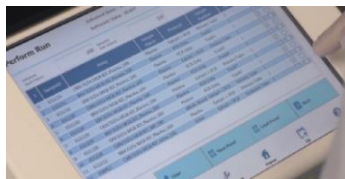
Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes. Input: "200 µL", eluate: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
--	---	--

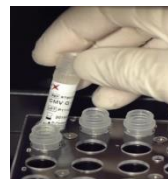
4. Select the “Assay protocol BCR-ABL P190 ELITE_PBL_200_100”



5. Select the sample position: sonication tube



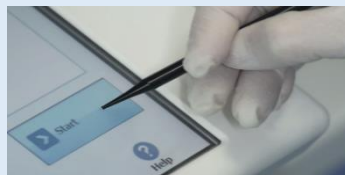
6. Load the complete reaction mixture on the “Inventory Block”



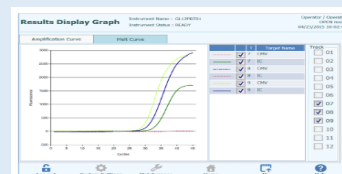
7. Load: PCR cassette, the ELITE InGenius SP RNA extraction cartridges, the ELITE InGenius DNase I and all the required consumables



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

- 1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol “PCR only” and set the sample position “Elution tube”

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the complete reaction mixture in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

- 1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol “Extraction Only” and set the sample position: sonication tube

6. Load: the ELITE InGenius SP RNA extraction cartridges, the ELITE InGenius DNase I and all the required consumables

7. Close the door
Start the run

8. Archive the eluate sample

BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTSG07PLD190



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The **BCR-ABL P190 ELITE MGB Kit** is a qualitative and quantitative, reverse transcription and amplification of nucleic acids assay for the detection of the mRNA of the BCR-ABL rearrangement, t(9;22) translocation, *Philadelphia* chromosome, variant P190 (P190) and for the quantification of the mRNA of P190 compared with the mRNA of the gene coding for the kinase protein Abelson (ABL). The assay is CE-IVD validated in combination with ABI PCR thermal cyclers (Thermo-Fisher) and laboratory validated extraction system such as the «Maxwell® CSC» (Promega) automatic extraction system or other equivalent products.

Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
Internal Control	BCR-ABL rearrangement (variant P190 e1a2)	FAM
	ABL (exons a2a3)	FAM

B. Validated matrix

- › **Peripheral blood collected in EDTA or sodium citrate or bone marrow ***
- › *Lympho-monocyte and/or leukocyte suspensions must be extracted from matrices mentioned above.

C. Kit content

P190 PreMix	ABL PreMix	PCR Master Mix	RT Enzyme Mix*
			
1 tube of 270 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles PURPLE CAP	1 tube of 270 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles NEUTRAL CAP	2 tubes of 820 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube NEUTRAL CAP	2 tubes of 20 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube CAP with BLACK INSERT

- › Maximum shelf-life: 18 months
25 reactions in duplicate
- › Storage Temperature: -20°C

* The RT Enzyme Mix must not be exposed to temperatures higher than -20 °C for more than 10 minutes

D. Material required not provided in the kit

- › **Maxwell® CSC:** AS6000
- › **7500 Fast Dx, 7300 and 7900 PCR Instrument**
- › **BCR-ABL P190 ELITE Standard:** STDG07PLD190
- › **BCR-ABL P190 - ELITE Positive Control:** CTRG07PLD190
- › **Molecular biology grade water**

E. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Maxwell - ABI	Peripheral blood or bone marrow	0,0015% P190% 10 ^{-4.5} Dilution	91.1% (41/45)*	100% (40/40)*

*confirmed samples/ tested samples

F. Procedure

The procedure below summarizes the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Complete reaction mixtures reconstitution

- › Thaw P190 PreMix and ABL PreMix, PCR MasterMix, vortex 10 sec three times, spin down 5 sec
- › RT Enzyme Mix should not be exposed to T° > -20°C more than 10min. Gently shake, spin down 5 sec
- › Prepare two 1.5 ml tube, one for the complete reaction mixture of P190 and the other for complete reaction mixture ABL
- › Calculate the required volume of the 3 components for each complete reaction mixture

Note: the volumes indicated in the table are sufficient for the set up of the reactions for reverse transcription and real time amplification required for the number of samples to be tested, negative control and four Q-PCR Standards, in duplicate plus an adequate safety margin.

Samples	PreMix	PCR MasterMix	RT Enzyme Mix
1	65 µL	195 µL	3.9 µL
2	75 µL	225 µL	4.5 µL
3	85 µL	255 µL	5.1 µL
4	95 µL	285 µL	5.7 µL
5	110 µL	330 µL	6.6 µL
6	120 µL	360 µL	7.2 µL
7	130 µL	390 µL	7.8 µL
8	140 µL	420 µL	8.4 µL
9	150 µL	450 µL	9.0 µL
10	160 µL	480 µL	9.6 µL
11	170 µL	510 µL	10.2 µL
12	180 µL	540 µL	10.8 µL
13	190 µL	570 µL	11.4 µL
14	205 µL	615 µL	12.3 µL
15	215 µL	645 µL	12.9 µL
16	225 µL	675 µL	13.5 µL
17	235 µL	705 µL	14.1 µL
18	245 µL	735 µL	14.7 µL
19	255 µL	765 µL	15.3 µL

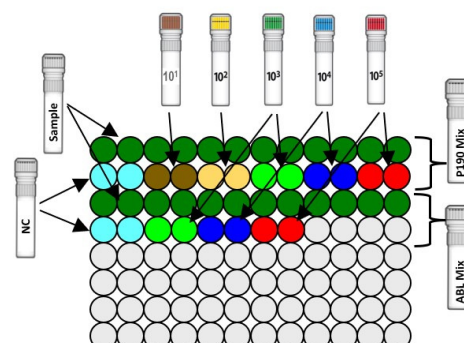
Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300, 7900 PCR instruments

- Switch on the thermal-cycler
- Set "P190" detector with "FAM" and quencher "none"
- Set "ABL" detector with "FAM" and quencher "none"
- Set passive reference as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300, 7900 instruments
- Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 56°C

Stage	Temperature	Timing
Reverse Transcription	50°C	20 min
Initial Denaturation	94°C	5 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	56°C	30 sec
45 cycles	72°C	15 sec

Amplification - PCR Set-up

- Thaw BCR-ABL P190 Q-PCR standard tubes
- Mix gently and spin-down
- Prepare the "P190" and "ABL" complete reaction mixtures by adding the required volume of three components as reported in table above. The complete reaction mixture should be used within 30 min and cannot be stored
- Pipet **20 µL** of "P190" complete reaction mixture after reconstitution in the microplate wells in use
- Pipet **20 µL** of "ABL" complete reaction mixture after reconstitution in the microplate wells in use
- Add, **10 µL** of extracted RNA in sample wells, **10 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **10 µL** of the 5 Q-PCR Standards in standard curve wells
- Extracted RNA samples, Q-PCR Standards and Negative Control must be pipetted in duplicate
- Seal the microplate with the amplification sealing sheet
- Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for quantitative analysis

Instrument	P190 FAM	ABL FAM
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.1	0.1
7300 and 7900 Real Time PCR	0.1	0.1

Interpretation - quantitative results

Detector FAM	mRNA	Quantity of mRNA
Ct determined	Detected	Quantity
Ct Undetermined	Not detected	0

Sample	mRNA of P190	mRNA of ABL	Calculated Quantity of mRNA of P190	Calculated Quantity of mRNA of ABL
1 st replicate	DETECTED	Quantity $\geq 10,000$	Sum Quantity	Sum Quantity
2 nd replicate	DETECTED	Quantity $\geq 10,000$		
1 st replicate	NOT DETECTED	Quantity $\geq 10,000$	0	Sum Quantity
2 nd replicate	NOT DETECTED	Quantity $\geq 10,000$		
1 st replicate	Quantity < 10 copies	Quantity $\geq 10,000$	Quantity	Sum Quantity
2 nd replicate	NOT DETECTED	Quantity $\geq 10,000$		
1 st replicate	Quantity > 10 copies	Quantity $\geq 10,000$	Retest the sample	
2 nd replicate	NOT DETECTED	Quantity $\geq 10,000$		
1 st replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000	Retest the sample	
2 nd replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity $\geq 10,000$		
1 st replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000	Retest the sample	
2 nd replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000		

Percentage of copies of P190 mRNA normalized to ABL mRNA copies (P190 %)

Detector FAM	mRNA	P190 %
P190 Ct determined	Detected	$\frac{\text{Calculated Quantity of mRNA of P190}}{\text{Calculated Quantity of mRNA of ABL}} \times 100$
ABL Ct determined	Detected (Quantity $\geq 10,000$)	