

# Xpert<sup>®</sup> BCR-ABL Ultra

**REF** GXBCRABL-10

Istruzioni per l'uso

**IVD** CE

## **Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright**

Cepheid<sup>®</sup>, the Cepheid logo, GeneXpert<sup>®</sup>, and Xpert<sup>®</sup> are trademarks of Cepheid, registered in the U.S. and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

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

© 2019–2022 Cepheid.

Cepheid<sup>®</sup>, il logo Cepheid, GeneXpert<sup>®</sup> e Xpert<sup>®</sup> sono marchi di Cepheid, registrati negli USA e in altri Paesi. Tutti gli altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO CONCEDE ALL'ACQUIRENTE IL DIRITTO NON TRASFERIBILE DI UTILIZZARLO IN ACCORDO ALLE PRESENTI ISTRUZIONI PER L'USO. NESSUN ALTRO DIRITTO VIENE CONCESSO ESPRESSAMENTE, IMPLICITAMENTE O PER PRECLUSIONE. INOLTRE, CON L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO NON VIENE CONCESSO NESSUN DIRITTO ALLA RIVENDITA.

© 2019–2022 Cepheid.

Per una descrizione delle modifiche apportate, vedere Sezione 27 Cronologia delle revisioni.

# Xpert<sup>®</sup> BCR-ABL Ultra

---

*Per uso diagnostico in vitro*

## 1 Nome registrato

Xpert<sup>®</sup> BCR-ABL Ultra

## 2 Nome comune o usuale

Xpert BCR-ABL Ultra

## 3 Destinazione d'uso

Xpert BCR-ABL Ultra è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa dei trascritti di mRNA BCR-ABL1 e ABL1 in campioni di sangue periferico prelevati da pazienti con diagnosi di leucemia mieloide cronica (LMC) t(9;22) positiva esprimenti i trascritti di fusione BCR-ABL1 di tipo e13a2 e/o e14a2. Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi dopo retrotrascrizione, automatizzata e in real time, per la determinazione quantitativa (RT-qPCR). Il test Xpert BCR-ABL Ultra ha lo scopo di misurare i rapporti percentuali BCR-ABL1 e ABL1 sulla scala internazionale (*IS*) espressi anche come riduzione molecolare logaritmica (valore MR) da una linea di base del 100% (*IS*), in pazienti con diagnosi positiva di leucemia mieloide cronica (LMC) t(9;22) durante il monitoraggio del trattamento con inibitori della tirosinchinasi (TKI).

Il test non distingue tra trascritti di fusione e13a2/b2a2 o e14a2/b3a2 e non monitora altri trascritti rari di fusione risultanti da t(9;22). Questo test non è destinato alla diagnosi di LMC.

Il test Xpert BCR-ABL Ultra è destinato all'uso solo sui sistemi GeneXpert<sup>®</sup> Dx e GeneXpert Infinity di Cepheid.

## 4 Riepilogo e spiegazione

La leucemia mieloide cronica (CML) è una delle neoplasie ematologiche più comuni e rappresenta il 15-20% di tutti i casi di leucemia.<sup>1</sup> L'incidenza della CML è di circa 1,8/100.000, il che significa che 1 su ogni 55.555 uomini e donne saranno diagnosticati con CML durante la vita.<sup>2</sup> Più del 95% dei pazienti affetti da CML presenta il caratteristico cromosoma di Filadelfia (Ph1) che deriva da una reciproca traslocazione tra le braccia lunghe dei cromosomi 9 e 22.<sup>2</sup> La traslocazione comporta il trasferimento del gene Abelson o ABL1 (di seguito denominato ABL) sul cromosoma 9 alla regione del cluster dei punti di rottura (BCR) del cromosoma 22, con conseguente gene BCR-ABL1 fuso (di seguito denominato BCR-ABL). Il gene della fusione produce il BCR-ABL, una tirosinchinasi con attività deregolata che svolge un ruolo chiave nello sviluppo della CML.<sup>3</sup> Xpert BCR-ABL Ultra rileva i trascritti di mRNA della traslocazione cromosomica per la forma p210 risultanti dalla traslocazione in corrispondenza dei due principali punti di rottura e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2.

L'utilità clinica del monitoraggio dei livelli di mRNA di BCR-ABL mediante RT-PCR è stata dimostrata nello studio randomizzato internazionale di interferone e STI571 (International Randomized Study of Interferon and STI571, IRIS), in cui i pazienti hanno ricevuto la terapia con interferone e/o il trattamento con l'inibitore della tirosinchinasi (TKI). I risultati di BCR-ABL sono stati normalizzati secondo una linea di base standardizzata comune ai tre laboratori partecipanti allo studio.<sup>4</sup> In seguito, è stato proposto che i saggi di monitoraggio BCR-ABL si allineino a una scala internazionale (*IS*), ancorata a due valori definiti nello studio IRIS, consentendo così di esprimere i risultati su scala comune.<sup>5</sup> Il primo di questi valori è dato dalla linea di base standardizzata che rappresenta il 100% (*IS*). Il secondo è la Risposta molecolare maggiore (MMR), definita come una riduzione di 3 log dalla linea di base standardizzata che rappresenta lo 0,10% (*IS*)/MR3. Una riduzione di 3 log è associata a un esito di sopravvivenza favorevole.<sup>6</sup> In questo modo, i test molecolari standardizzati con *IS* forniscono un aiuto essenziale ai medici per gestire la malattia dei pazienti affetti da CML.<sup>6</sup>

Il test Xpert BCR-ABL Ultra quantifica il livello di mRNA di BCR-ABL come % (*IS*) mediante la calibrazione del saggio sul primo pannello genetico di riferimento internazionale dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) per la quantificazione di mRNA di BCR-ABL. Secondo il protocollo raccomandato<sup>7</sup>, Cepheid ha sviluppato e convalidato standard quantitativi secondari che sono allineati al pannello di riferimento primario dell'OMS. Ciò consente la determinazione di un fattore di conversione specifico del lotto, tra cui l'efficienza del saggio (*E*) e il fattore di scala (*SF*) per ciascun lotto dei kit Xpert BCR-ABL Ultra. L'efficacia della calibrazione rispetto agli standard secondari è monitorata su base continuativa.

## 5 Principio della procedura

Xpert BCR-ABL Ultra è un test automatizzato per la quantificazione del trascritto di BCR-ABL, espressa dal rapporto BCR-ABL/ABL. Il test utilizza la reazione a catena della polimerasi dopo retrotrascrizione, automatizzata e in tempo reale, per la determinazione quantitativa (RT-qPCR).

Il test viene eseguito sui sistemi GeneXpert Dx e GeneXpert Infinity di Cepheid. I sistemi GeneXpert consentono di automatizzare e integrare la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici o complessi utilizzando i saggi RT-PCR e PCR. I sistemi comprendono uno strumento, un computer e un software già installato per l'esecuzione dei test e la visualizzazione dei risultati. I sistemi richiedono l'uso di cartucce GeneXpert monouso che contengono i reagenti per la RT-PCR e la PCR e ne ospitano le reazioni. Per una descrizione completa dei sistemi, consultare *GeneXpert Dx System Operator Manual* o *GeneXpert Infinity System Operator Manual*.

Xpert BCR-ABL Ultra include i reagenti per rilevare i geni di fusione BCR-ABL che derivano da due principali punti di rottura p210, traslocazione e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2, e il trascritto di ABL come controllo endogeno in campioni di sangue periferico.<sup>7,8,9,10,11</sup> La quantità di trascritto di BCR-ABL nel campione del paziente viene indicata come il rapporto BCR-ABL/ABL, nonché come riduzione molecolare logaritmica (valore MR) da una linea di base di 100% sulla scala internazionale (*IS*), utilizzando il software GeneXpert.

In ciascun test Xpert BCR-ABL Ultra ci sono due controlli, il controllo endogeno ABL e il controllo per la verifica della sonda (PCC). Il controllo endogeno ABL normalizza il target BCR-ABL e garantisce l'uso di una quantità sufficiente di campione nel test. Il PCC verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta PCR e che tutti i componenti della reazione, comprese le sonde e i coloranti, siano presenti e funzionali nella cartuccia.

## 6 Reagenti e strumenti

### 6.1 Materiale fornito

Il kit Xpert BCR-ABL Ultra (GXBCRABL-10) contiene reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni di analisi o campioni di controllo qualità. Il kit contiene i seguenti articoli:

<b>Xpert BCR-ABL Ultra Reagenti</b>	<b>10 di ciascuno per kit</b>
• Proteinasi K (PK)	10 x 130 µl per flaconcino
• Reagente di lisi (LY) (Cloruro di guanidinio)	10 x 5,3 ml per flaconcino
• Reagente di lavaggio (1)	10 x 2,9 ml per fiala
• Etanolo	
• Tiocianato di guanidinio	
<b>Xpert BCR-ABL Ultra Cartucce con provette di reazione integrate</b>	<b>10 per kit</b>
• Microsfera 1, 2, 3 e 4 (liofilizzate)	1 di ciascuna per cartuccia
• Reagente di risciacquo	2,0 ml per cartuccia
• Reagente di eluizione	2,5 ml per cartuccia

<b>CD</b>	<b>1 per kit</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• File di definizione del saggio (ADF)</li> <li>• Istruzione per l'importazione degli ADF nel software GeneXpert</li> <li>• Istruzioni per l'uso (package insert)</li> </ul>	
Certificato di analisi	1 per kit

**Nota** Le schede dati di sicurezza (SDS) sono disponibili nel sito [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com) o [www.cepheidinternational.com](http://www.cepheidinternational.com) sotto la scheda **SUPPORTO** (SUPPORT).

**Nota** L'albumina di siero bovino (BSA) presente nelle microsfele di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Gli animali non sono stati nutriti con proteine di ruminanti o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante e post mortem. Durante la lavorazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

## 6.2 Materiali necessari ma non forniti

- Sistemi di strumentazione GeneXpert Dx o GeneXpert Infinity (il numero di catalogo varia in base alla configurazione): strumento GeneXpert, computer, lettore di codici a barre e Manuale dell'operatore.
- Per il sistema GeneXpert Dx: Software GeneXpert Dx versione 5.1 o successiva
- Per i sistemi GeneXpert Infinity-80 e Infinity-48s: software Xpertise versione 6.6 o successiva
- Stampante: se fosse necessario l'uso di una stampante, contattare il Supporto Tecnico di Cepheid per predisporre l'acquisto di una stampante consigliata.
- Miscelatore vortex
- Microcentrifuga (almeno 1000 x g)
- Pipette e puntali per pipette con filtro aerosol
- Provette coniche da 50 ml
- Etanolo assoluto di grado reagente

## 6.3 Materiali consigliati ma non forniti

Xpert BCR-ABL IS Panel C130, numero di catalogo C130, è un controllo di qualità prodotto da Maine Molecular Quality Controls, Inc.

## 7 Conservazione e manipolazione

- Conservare il contenuto del kit Xpert BCR-ABL Ultra a 2–8 °C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.
- Aprire il coperchio della cartuccia solo al momento dell'esecuzione del saggio.
- Non usare le cartucce oltre la data di scadenza.
- Il reagente di lavaggio è un liquido trasparente e incolore. Non usare il reagente di lavaggio se appare torbido o scolorito.
- Venti (20) minuti prima di iniziare la procedura, togliere il campione di sangue, la cartuccia e i reagenti di preparazione del campione dal sito di conservazione per consentire loro di raggiungere la temperatura ambiente (20 °C – 30 °C).

## 8 Avvertenze e precauzioni

### 8.1 Avvertenze di carattere generale

Per uso diagnostico *in vitro*.

Tutti i campioni biologici di analisi, comprese le cartucce e i reagenti usati, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché, nella maggior parte dei casi, è impossibile distinguere i potenziali veicoli di infezione, tutti i campioni biologici di analisi devono essere trattati attenendosi alle precauzioni standard. Le linee guida per la manipolazione

dei campioni di analisi sono disponibili presso il U.S. Centers for Disease Control and Prevention (Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie)<sup>12</sup> e il Clinical and Laboratory Standards Institute (Istituto per gli standard clinici e di laboratorio).<sup>13</sup>

Durante il trattamento di sostanze chimiche e la manipolazione di campioni biologici, rispettare le procedure di sicurezza previste dalla struttura sanitaria di appartenenza.

Le caratteristiche prestazionali di questo test sono state stabilite solo con sangue raccolto in provette con EDTA. Le prestazioni di questo test con altri tipi di campioni di analisi non sono state valutate.

L'affidabilità dei risultati dipende dall'uso di adeguate modalità di prelievo, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni di analisi. Un campione di analisi che sia stato prelevato, manipolato o conservato in modo improprio, un errore tecnico, lo scambio di campioni o la presenza di trascritto target nel campione di analisi inferiore al limite di rilevamento del test possono produrre risultati erranei. Per evitare risultati erranei, è necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate nel foglietto illustrativo e nel *GeneXpert Dx System Operator Manual* e nel *GeneXpert Infinity System Operator Manual*.

L'esecuzione del test con intervalli della temperatura di conservazione del kit o dei campioni di analisi e tempi diversi da quelli consigliati può generare risultati erranei o non validi.

I campioni biologici di analisi, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi adottando le precauzioni standard. Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali. Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto smaltimento, i campioni biologici di analisi e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici.<sup>14</sup>

## 8.2 Campione di analisi

Durante il trasporto dei campioni di analisi, mantenere le condizioni di conservazione corrette per garantire l'integrità dei campioni stessi (vedere Sezione 10). La stabilità dei campioni di analisi in condizioni di spedizione diverse da quelle consigliate non è stata valutata.

Non congelare campioni di sangue intero.

Un prelievo, una conservazione e un trasporto corretti del campione sono essenziali ai fini dell'affidabilità dei risultati.

## 8.3 Test/Reagente

Non sostituire i reagenti del test Xpert BCR-ABL Ultra con altri reagenti.

Non aprire il coperchio della cartuccia Xpert BCR-ABL Ultra tranne che per aggiungere il campione di analisi e il reagente di lavaggio.

Non utilizzare una cartuccia che sia caduta dopo essere stata estratta dalla confezione.

Non agitare la cartuccia. Se la cartuccia cade o viene agitata dopo l'apertura del coperchio, si potrebbero ottenere risultati non validi.

Non applicare l'etichetta con l'ID campione (Sample ID) sul coperchio o sull'etichetta del codice a barre della cartuccia.

Non utilizzare una cartuccia che presenta l'etichetta del codice a barre danneggiata.

Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.

Si raccomanda che le cartucce Xpert BCR-ABL Ultra siano a temperatura ambiente (20 °C – 30 °C) quando vengono utilizzate per i test.

Ciascuna cartuccia Xpert BCR-ABL Ultra monouso serve per l'esecuzione di un singolo test. Non riutilizzare le cartucce usate.

Non riutilizzare puntali per pipette.

Non usare la cartuccia se appare umida o se sembra che il sigillo del coperchio sia stato rotto.

Non utilizzare una cartuccia Xpert BCR-ABL Ultra se è stato aggiunto un reagente nell'apertura errata.

Non aprire le cartucce Xpert BCR-ABL Ultra dopo il completamento del test.

Valori troppo alti dei leucociti possono determinare un aumento della pressione nella cartuccia con conseguente interruzione delle sessioni analitiche.

Assegnare un set di pipette e reagenti esclusivamente alla preparazione dei campioni.


Indossare camice da laboratorio e guanti puliti. Cambiare i guanti tra una manipolazione e l'altra di ciascun campione di analisi.

In caso di fuoriuscita di campioni di analisi o di controlli, indossare dei guanti e assorbire la fuoriuscita con salviette di carta. Pulire, quindi, accuratamente l'area contaminata con una soluzione contenente candeggina per uso domestico diluita in rapporto 1:10 appena preparata. La concentrazione finale di cloro attivo deve essere dello 0,5%, indipendentemente dalla concentrazione della candeggina per uso domestico in uso nel proprio Paese. Prevedere un tempo di contatto minimo di due minuti. Accertarsi che l'area di lavoro sia asciutta prima di utilizzare l'etanolo denaturato al 70% per rimuovere i residui di candeggina. Lasciare asciugare completamente la superficie prima di proseguire. Oppure, seguire le prassi standard del proprio istituto previste in caso di contaminazione o fuoriuscita. Per le apparecchiature, seguire le raccomandazioni del produttore per la decontaminazione dell'apparecchiatura.

## 9 Pericoli chimici<sup>15,16</sup>

### Nota

Le informazioni seguenti si applicano all'intero prodotto contenente reagenti Proteinasi K, di lisi, di lavaggio e di risciacquo.

- Pittogramma di pericolo UN GHS: 
- Parola: PERICOLO
- **Indicazioni di pericolo UN GHS**
  - Nocivo se ingerito.
  - Liquido e vapori facilmente infiammabili
  - Provoca irritazione cutanea.
  - Provoca grave irritazione oculare.
  - Può provocare sonnolenza o vertigini
  - Sospettato di provocare alterazioni genetiche.
- **Frase di prudenza UN GHS**
  - **Prevenzione**
    - Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
    - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
    - Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. Non fumare.
    - Tenere il recipiente ben chiuso.
    - Evitare di respirare nebbie/vapori/aerosol.
    - Lavare accuratamente dopo l'uso.
    - Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.
    - Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
    - Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto.
  - **Risposta**
    - In caso di incendio: usare mezzi di estinzione appropriati.
    - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
    - In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
    - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
    - Trattamento specifico (vedere le informazioni supplementari di pronto soccorso).
    - Togliere di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
    - In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

- IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
- Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico.
- In caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico.
- **Stoccaggio/Smaltimento**
  - Conservare in luogo fresco.
  - Conservare in luogo ben ventilato. Tenere il recipiente ben chiuso.
  - Conservare sotto chiave.
  - Smaltire prodotto e/o recipiente in conformità con normative locali, regionali, nazionali e/o normative internazionali.

## 10 Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di analisi

- I campioni di sangue intero devono essere raccolti in provette con EDTA attenendosi alle linee guida della struttura sanitaria. Durante il test di stabilità dei campioni di analisi, i campioni di sangue si sono dimostrati stabili fino a 72 ore se conservati in condizioni di refrigerazione ( $5 \pm 3$  °C). Il plasma proveniente dalle cellule non deve essere separato.
- Un prelievo, una conservazione e un trasporto corretti dei campioni di analisi sono essenziali ai fini delle prestazioni della presente analisi. La stabilità dei campioni di analisi in condizioni di spedizione e conservazione diverse da quelle consigliate nell'elenco riportato qui sotto non è stata valutata con il test Xpert BCR-ABL Ultra.

## 11 Procedura

### 11.1 Operazioni preliminari

Venti (20) minuti prima di iniziare la procedura, rimuovere il campione di sangue e i reagenti di preparazione del campione (comprese le cartucce) dal sito di conservazione refrigerato per consentire loro di raggiungere la temperatura ambiente e centrifugare brevemente la Proteinasi K (PK) in una microcentrifuga.

**Importante** Se si utilizza un GeneXpert Dx System, avviare il test entro 1 ora dall'aggiunta del campione trattato con reagente alla cartuccia. Se si utilizza un GeneXpert Infinity System, accertarsi di avviare il test e mettere la cartuccia sul trasportatore entro 15 minuti dall'aggiunta del campione trattato con reagente alla cartuccia. Il software Xpertise del sistema tiene traccia del periodo di conservazione residuo in modo che i test vengano eseguiti prima della scadenza a bordo di un'ora.

**Importante** Rimuovere la cartuccia dalla confezione di cartone prima della preparazione del campione (vedere la Sezione 11.3.)

### 11.2 Preparazione del campione

1. Sul fondo di una nuova provetta conica da 50 ml, aggiungere 100 µl di PK (Proteinasi K).
2. Accertarsi di miscelare bene il campione di sangue capovolgendo la provetta di raccolta ematica per 8 volte immediatamente prima del pipettaggio. Consultare le istruzioni del produttore per la provetta di raccolta del sangue EDTA.
3. Alla provetta già contenente Proteinasi K, aggiungere 4 ml di campione di sangue.
4. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 3 secondi.
5. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto.
6. Aggiungere 2,5 ml di reagente di lisi (LY) alla stessa provetta.

**Nota** Conservare il reagente di lisi residuo da utilizzare nuovamente nel Passaggio 13.

7. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
8. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
9. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.



10. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
11. Miscelare il campione picchiando 10 volte la parte inferiore della provetta.
12. Trasferire 1 ml del lisato preparato in una nuova provetta conica da 50 ml.

**Nota**

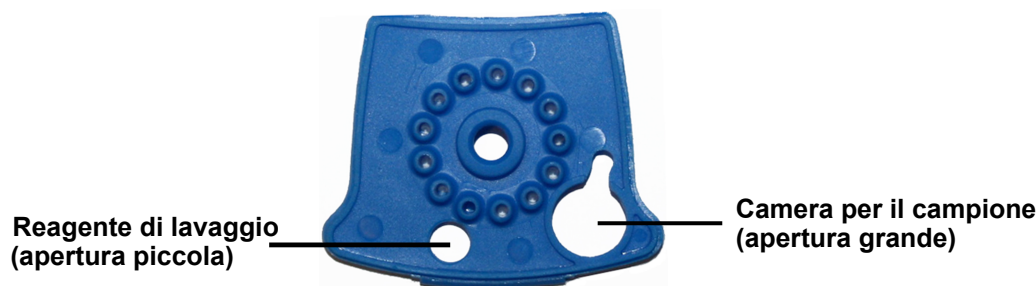
È possibile conservare il lisato residuo a 2–8 °C per un massimo di 4 ore oppure conservarlo a -20 °C o a una temperatura inferiore fino a 24 settimane.

13. Aggiungere 1,5 ml del reagente di lisi (LY) messo da parte in precedenza dal Passaggio 6 alla nuova provetta conica contenente lisato.
14. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
15. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti.
16. Aggiungere 2 ml di etanolo assoluto di grado reagente (fornito dall'utente) alla stessa provetta conica.
17. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi. Mettere da parte il campione.
18. Gettare i reagenti PK o LY rimasti.

### 11.3 Preparazione della cartuccia

Per inserire il campione nella cartuccia Xpert BCR-ABL Ultra:

1. Rimuovere la cartuccia dalla confezione di cartone.
2. Controllare che la cartuccia non sia danneggiata. Se danneggiata, non utilizzarla.
3. Aprire la cartuccia sollevandone il coperchio e trasferire l'intero contenuto della fiala di reagente di lavaggio (1) nella camera del reagente di lavaggio (con apertura piccola). Vedere... Figura 1.
4. Pipettare l'intero contenuto del campione preparato nella camera per il campione (apertura grande). Vedere... Figura 1.



**Figura 1. Cartuccia Xpert BCR-ABL Ultra (vista dall'alto)**

5. Chiudere il coperchio della cartuccia. Accertarsi che il coperchio sia bloccato in posizione. Avviare il test (vedere Avvio del test).

### 11.4 Avvio del test

**Importante**

Il software Xpertise del sistema tiene traccia del periodo di conservazione residuo in modo che i test vengano eseguiti prima della scadenza a bordo di un'ora.

**Importante**

Se si sta utilizzando un sistema *GeneXpert Dx*, prima di iniziare il test verificare che il sistema stia eseguendo il software *GeneXpert Dx* versione 5.1 o superiore e che nel software sia stato importato il file di definizione del saggio corretto. Iniziare il test entro 1 ora dall'introduzione del campione nella cartuccia.

**Importante**

Se si sta utilizzando un sistema *GeneXpert Infinity*, prima di iniziare il test verificare che il sistema stia eseguendo il software *Xpertise* versione 6.6 o superiore e che nel software sia stato importato il file di definizione del saggio corretto. Porre la cartuccia sul dispositivo trasportatore entro 15 minuti dall'aggiunta del campione alla cartuccia stessa.

In questa sezione sono elencati i passaggi principali di esecuzione del test. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*, a seconda del modello utilizzato.

**Nota** I passaggi da seguire possono variare se l'amministratore del sistema modifica il flusso di lavoro predefinito del sistema.

1. Accendere lo strumento GeneXpert.
  - Se si utilizza lo *strumento GeneXpert Dx*, accendere prima lo strumento e poi il computer. Il software GeneXpert si avvia automaticamente. Se ciò non dovesse accadere, fare doppio clic sull'icona del collegamento del software GeneXpert Dx sul desktop di Windows®.
  - oppure
  - Se si utilizza lo *strumento GeneXpert Infinity*, accenderlo. Il software Xpertise si avvia automaticamente. Se non si avvia, fare doppio clic sull'icona del collegamento del software Xpertise sul desktop di Windows®.
2. Connettersi al software del sistema di strumentazione GeneXpert usando il proprio nome utente e la password.
3. Nella finestra del **sistema GeneXpert**, fare clic su **Crea analisi (Create Test)** (GeneXpert Dx) o **Ordini (Orders)** e **Ordina analisi (Order Test)** (Infinity). Viene visualizzata la finestra **Crea analisi (Create Test)**. Si aprirà la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre dell'ID paziente (Scan Patient ID Barcode)**.
4. Eseguire la scansione dell'ID paziente (Patient ID) o digitarlo. Se l'ID paziente (Patient ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID paziente (Patient ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e in tutti i rapporti. Verrà visualizzata la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre dell'ID campione (Scan Sample ID Barcode)**.
5. Inserire l'ID campione (Sample ID) tramite scansione o manualmente. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID del campione sarà associato ai risultati del test e riportato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e su tutti i rapporti. Si aprirà la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre della cartuccia (Scan Cartridge Barcode)**.
6. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia. Utilizzando le informazioni contenute nel codice a barre, il software compila automaticamente le caselle relative ai seguenti campi: Seleziona saggio (Select Assay), ID lotto reagente (Reagent Lot ID), N/S cartuccia (Cartridge S/N) e Data di scadenza (Expiration Date).

**Nota** Se non si riesce a eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia, ripetere il test con una cartuccia nuova. Se è stata eseguita la scansione del codice a barre della cartuccia nel software e il file di definizione del saggio non è disponibile, apparirà una schermata in cui si indica che il file di definizione del saggio non è stato caricato nel sistema. Se compare tale schermata, contattare il Supporto Tecnico di Cepheid.

7. Fare clic su **Avvia analisi (Start Test)** (GeneXpert Dx) o **Inoltra (Submit)** (Infinity). Se richiesto, digitare la propria password nella finestra di dialogo visualizzata.
8. Per il *sistema GeneXpert Infinity*, posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore. La cartuccia viene caricata automaticamente, il test viene eseguito e la cartuccia usata viene quindi collocata nel contenitore dei rifiuti.
 

oppure

Per lo *strumento GeneXpert Dx*:

  - a) Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
  - b) Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde smette di lampeggiare. Al termine del test, la spia si spegne.
  - c) Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo. Quindi rimuovere la cartuccia.
  - d) Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori per rifiuti biologici attenendosi alla prassi standard del proprio presidio.

**Nota** Il tempo necessario per ottenere il risultato è inferiore a 2,5 ore (circa 30 minuti di preparazione del campione esterno alla cartuccia e 1 ora e 45 minuti di tempo di esecuzione del saggio).

## 12 Visualizzazione e stampa dei risultati

In questa sezione sono elencati i passaggi principali per la visualizzazione e la stampa dei risultati. Per istruzioni più dettagliate su come visualizzare e stampare i risultati, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* o il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Infinity*, a seconda del modello utilizzato.

1. Per visualizzare i risultati, fare clic sull'icona **Visualizza risultati (View Results)**.
2. Una volta completato il test, fare clic sul pulsante **Rapporto (Report)** nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** per visualizzare e/o generare un file di rapporto in formato PDF.

---

---

## 13 Controllo qualità

Ciascuna cartuccia contiene un controllo endogeno ABL e un controllo per la verifica della sonda (PCC).

**Controllo endogeno ABL** — Il controllo Endogeno ABL verifica che con il test venga utilizzato un campione sufficiente. Questo controllo rileva inoltre l'inibizione del saggio di PCR in tempo reale associata ai campioni. L'ABL si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione assegnati.

**Controllo per la verifica della sonda (PCC)** — Prima che inizi la reazione PCR, il sistema GeneXpert misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsfeere, il riempimento delle provette di reazione e se tutti i componenti di reazione sono funzionanti nella cartuccia. Il PCC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.

## 14 Interpretazione dei risultati

I risultati vengono interpretati automaticamente dal sistema GeneXpert, utilizzando i segnali di fluorescenza misurati e gli algoritmi di calcolo integrati, e vengono visualizzati chiaramente nella finestra Visualizza risultati (View Results). Nella Tabella 1 sono riportati tutti i possibili risultati con la relativa interpretazione.

Tabella 1. Risultati e interpretazione di Xpert BCR-ABL Ultra

Risultato	Interpretazione
<b>POSITIVO (POSITIVE)</b> Vedere la Figura 2, Figura 3, Figura 4	Rilevamento del trascritto di BCR-ABL. <ul style="list-style-type: none"> <li>BCR-ABL POSITIVO (BCR-ABL POSITIVE) – il trascritto di BCR-ABL è stato rilevato con un ciclo soglia (Ct) che rientra nell'intervallo di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata.</li> <li>Possibili risultati positivi:               <ul style="list-style-type: none"> <li>POSITIVO [# ,##% (IS) e MR# ,##] (POSITIVE [# .##% (IS) and MR# .# .##]); Figura 2.</li> <li>POSITIVO [Sopra il LoQ superiore] (POSITIVE [Above upper LoQ]); Figura 3.</li> <li>POSITIVO [Sotto il LoD; &gt;MR4,52/&lt;0,003% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.003% (IS)]); Figura 4.</li> </ul> </li> <li>ABL AMMESSO (PASS) – il trascritto di ABL è stato rilevato con un ciclo soglia (Ct) che rientra nell'intervallo di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata.</li> <li>Quando il valore Ct ABL è al di sotto di 18, nella reazione è stato individuato un numero di copie di ABL almeno pari a 32.000.<sup>17,18</sup></li> <li>Verifica della sonda AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.</li> </ul>
<b>NEGATIVO (NEGATIVE)</b> Vedere la Figura 5.	Mancato rilevamento del trascritto di BCR-ABL. <ul style="list-style-type: none"> <li>BCR-ABL NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente] (BCR-ABL NEGATIVE [Sufficient ABL transcript]) – Il trascritto di BCR-ABL non è stato rilevato e ha un ciclo soglia (Ct) al di sopra del ciclo soglia valido.</li> <li>ABL AMMESSO (PASS); il trascritto di ABL è stato rilevato con un valore Ct che rientra nel range di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata.</li> <li>Quando il valore Ct ABL è al di sotto di 18, nella reazione è stato individuato un numero di copie di ABL almeno pari a 32.000.<sup>17,18</sup></li> <li>Verifica della sonda AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.</li> </ul>
<b>NON VALIDO (INVALID)</b> Vedere la Figura 6.	Non è possibile determinare il livello di trascritto di BCR-ABL. <ul style="list-style-type: none"> <li>NON VALIDO (INVALID) – Impossibile determinare il livello di trascritto di BCR-ABL a causa del campione contenente trascritti di BCR-ABL e/o di ABL in eccesso. Vedere Sezione 17 per ulteriori istruzioni su come ripetere il test del campione di analisi.</li> <li>ABL RESPINTO (FAIL) – Il valore ciclo soglia (Ct) di ABL non rientrava nell'intervallo di validità oppure l'endpoint era inferiore alla soglia impostata. Vedere Sezione 17 per ulteriori istruzioni su come ripetere il test del campione di analisi.</li> <li>Verifica della sonda AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.</li> </ul>
<b>ERRORE (ERROR)</b> Vedere la Figura 7.	Non è possibile determinare il livello di trascritto di BCR-ABL. Vedere Sezione 17 per ulteriori istruzioni su come ripetere il test del campione di analisi. <ul style="list-style-type: none"> <li>BCR-ABL – NESSUN RISULTATO (BCR-ABL – NO RESULT)</li> <li>ABL – NESSUN RISULTATO (ABL – NO RESULT)</li> <li>Verifica della sonda – RESPINTO (FAIL): uno o tutti i risultati della verifica della sonda non sono validi.</li> <li>Verifica della sonda AMMESSO (PASS) o N/A (non applicabile) e Annulla per pressione (Pressure Abort).</li> </ul> Se la verifica della sonda è stata superata o mostra un risultato N/A (non applicabile), l'errore deriva dal superamento dell'intervallo accettabile del limite massimo di pressione oppure dal guasto di un componente del sistema.
<b>NESSUN RISULTATO (NO RESULT)</b>	Non è possibile determinare il livello di trascritto di BCR-ABL. La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare i risultati del test. Una simile evenienza si verifica, per esempio, se l'operatore ha interrotto l'esecuzione di un test in corso. Vedere Sezione 17 per ulteriori istruzioni su come ripetere il test del campione di analisi. <ul style="list-style-type: none"> <li>BCR-ABL - NESSUN RISULTATO (BCR-ABL NO RESULT)</li> <li>ABL - NESSUN RISULTATO (NO RESULT)</li> <li>Verifica della sonda – NA (non applicabile)</li> </ul>

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

BCR-ABL rilevato a un livello di #.,##% (IS) e MR#.##.

Per un risultato **POSITIVO [#.,##% (IS) e MR#.##] (POSITIVE [#.,##% (IS) and MR#.##])**, BCR-ABL è rilevabile con un Ct BCR-ABL maggiore o uguale a “8” e minore o uguale al valore di cut-off di “32” e un Ct ABL maggiore o uguale a “8” e minore o uguale a “18”. Il software GeneXpert calcola la % (IS) tramite la seguente equazione, in cui il valore Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) si ottiene da Ct ABL meno Ct BCR-ABL:

$$\% (IS) = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{Fattore di scala (SF)}$$

Il fattore di scala (SF) è un parametro specifico del lotto, incorporato nel codice a barre della cartuccia di analisi. Il valore di questo fattore e l'efficienza del saggio specifico del lotto ( $E_{\Delta Ct}$ ) sono determinati nel contesto delle analisi di controllo qualità di ciascun lotto di saggi, eseguite con standard secondari derivati dal pannello di riferimento genetico internazionale dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) per la quantificazione del trascritto di BCR-ABL.<sup>7</sup> Insieme, gli standard secondari e l' $E_{\Delta Ct}$  specifico del lotto e i valori SF allineano l'output quantitativo del test in base alla IS. L' $E_{\Delta Ct}$  è impostata su 1,92 e il valore SF è impostato su 1,22 per l'uso nell'esempio indicato qui.

### Nota

**Esempio:**  $E_{\Delta Ct}$  specifica del lotto = 1,92; SF = 1,22  
 Ct ABL del saggio = 11,3; Ct BCR-ABL = 18,0 ;  $\Delta Ct = -6,7$   
 $\% (IS) = 1,92^{(-6,7)} \times 100 \times 1,22 = 1,54\% (IS)$   
 $MR_{x,xx} = \log_{10}[100/\% \text{ determinata}]$   
 $(IS) = \log_{10}(100) - \log_{10}(1,54) = 2 - \log_{10}(1,54) = MR1,81$

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

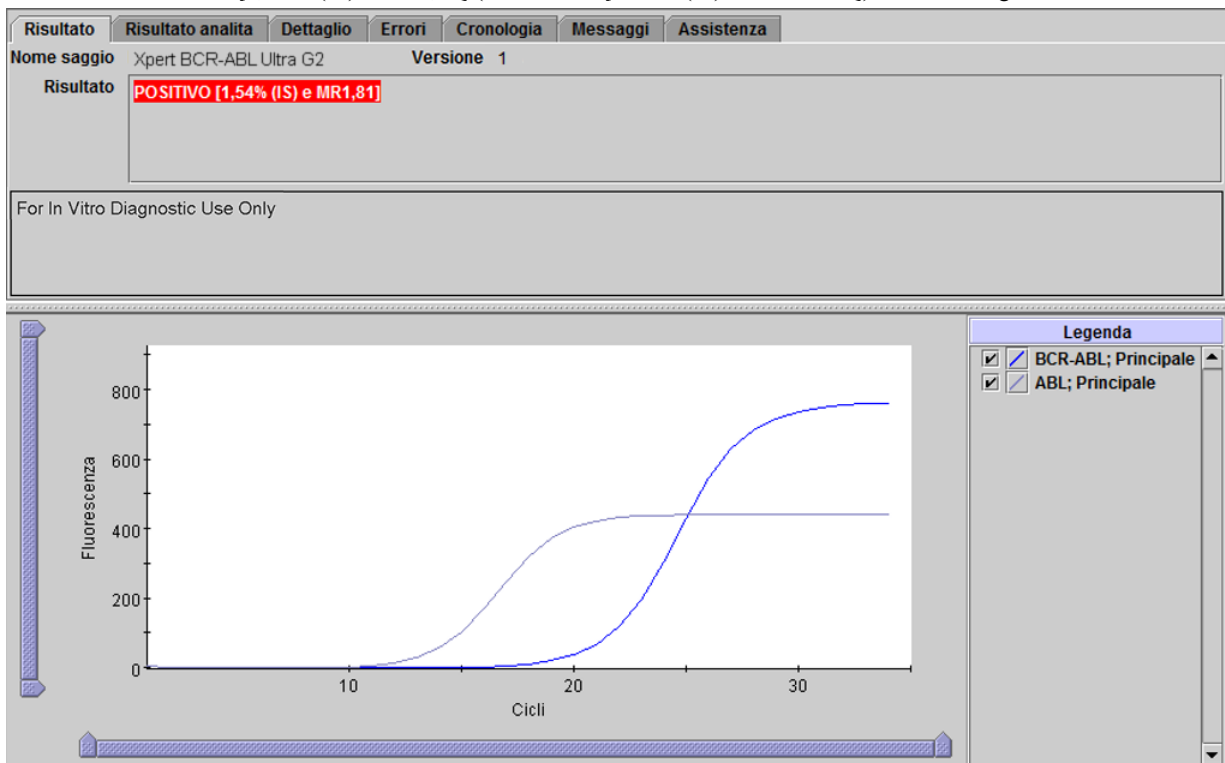


Figura 2. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert Dx: **POSITIVO [1,54% (IS) e MR1,81] (POSITIVE [1.54% (IS) and MR1.81])**

## 14.2 POSITIVO [Sopra il LoQ superiore] (POSITIVE [Above upper LoQ])

BCR-ABL rilevato a un livello di >55% (IS) e <MR0,26.

Per un risultato **POSITIVO [Sopra il LoQ superiore] (POSITIVE [Above upper LoQ])**, BCR-ABL è rilevabile con un Ct BCR-ABL maggiore o uguale a “8” e minore o uguale al cut-off di “32” e un Ct ABL maggiore o uguale a “8” e minore o uguale a “18”. Il software GeneXpert calcola la % (IS) tramite la seguente equazione, in cui il valore Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) si ottiene da Ct ABL meno Ct BCR-ABL:

$$\% (IS) = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{Fattore di scala (SF)}$$

**Nota**

Il fattore di scala (SF) è un parametro specifico del lotto, incorporato nel codice a barre della cartuccia di analisi. Il valore di questo fattore e l'efficienza del saggio specifico del lotto ( $E_{\Delta Ct}$ ) sono determinati nel contesto delle analisi di controllo qualità di ciascun lotto di saggi, eseguite con standard secondari derivati dal pannello di riferimento genetico internazionale dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) per la quantificazione del trascritto di BCR-ABL.<sup>7</sup> Insieme, gli standard secondari e l' $E_{\Delta Ct}$  specifico del lotto e i valori SF allineano l'output quantitativo del test in base alla IS. L' $E_{\Delta Ct}$  è impostata su 1,92 e il valore SF è impostato su 1,10 per l'uso nell'esempio indicato qui.

**Esempio:**

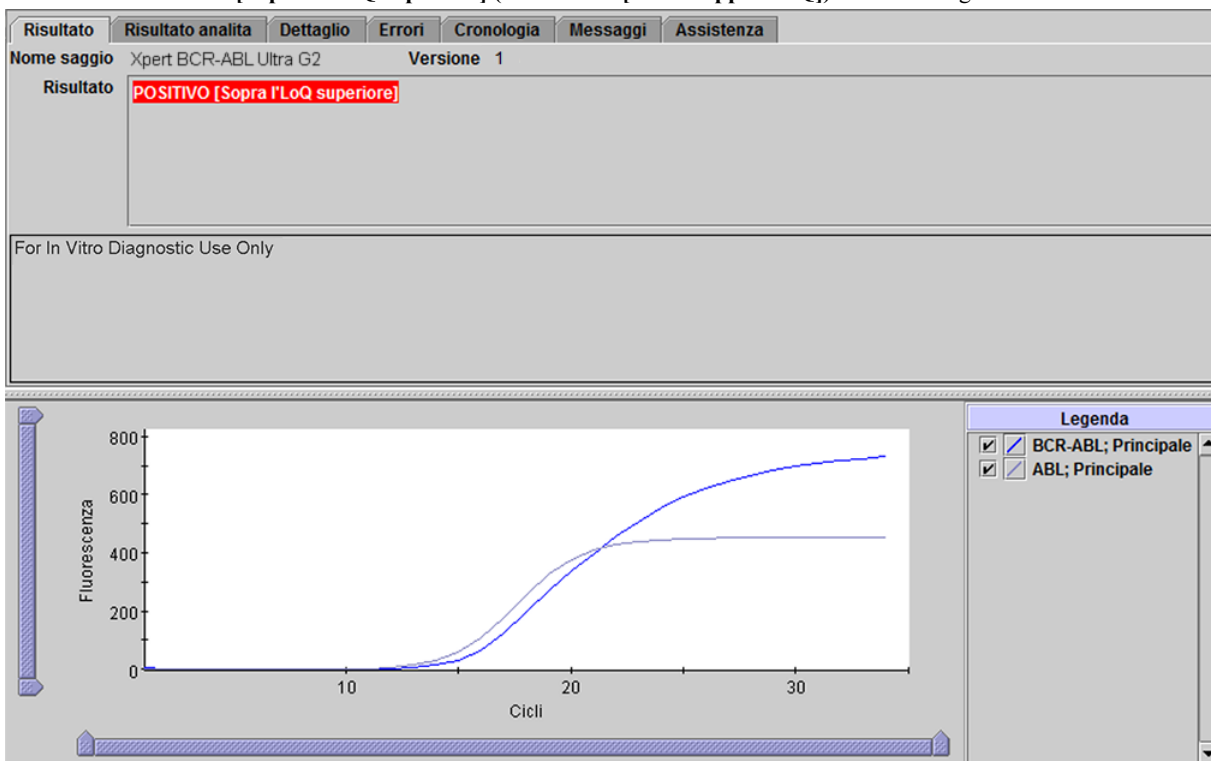
$E_{\Delta Ct}$  specifica del lotto = 1,92; SF = 1,10

Ct ABL del saggio = 13,4; Ct BCR-ABL = 14,2 ;  $\Delta Ct = -0,8$

$\% (IS) = 1,92^{(-0,8)} \times 100 \times 1,10 = 65\%$  è maggiore del LoQ superiore del saggio definito al 55% (IS)

$MR_{x,xx} = \log_{10}[100/\% \text{ determinata (IS)}] = \log_{10}(100) - \log_{10}(65) = 2 - \log_{10}(65) = MR_{0,19}$  è inferiore al LoQ superiore del saggio definito a  $MR_{0,26}$ .

Risultato: **POSITIVO [Sopra il LoQ superiore] (POSITIVE [Above upper LoQ])**. Vedere la Figura 3.



**Figura 3. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert Dx: POSITIVO [Sopra il LoQ superiore] (POSITIVE [Above upper LoQ])**

### 14.3 POSITIVO [Sotto il LoD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])

BCR-ABL rilevato a un livello <0.0030% (IS) and >MR4,52.

Per un risultato **POSITIVO [Inferiore al LoD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])** BCR-ABL è rilevabile con un Ct BCR-ABL maggiore o uguale a “8” e minore o uguale al cut-off di “32” e un CT ABL maggiore o uguale a “8” e minore o uguale a “18”. Il software GeneXpert calcola la % (IS) tramite la seguente equazione, in cui il valore Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) si ottiene da Ct ABL meno Ct BCR-ABL

$$\% (IS) = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{Fattore di scala (SF)}$$

**Nota**

Il fattore di scala (SF) è un parametro specifico del lotto, incorporato nel codice a barre della cartuccia di analisi. Il valore di questo fattore e l'efficienza del saggio specifico del lotto ( $E_{\Delta Ct}$ ) sono determinati nel contesto delle analisi di controllo qualità di ciascun lotto di saggi, eseguite con standard secondari derivati dal pannello di riferimento genetico internazionale dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) per la quantificazione del trascritto di BCR-ABL.<sup>7</sup> Insieme, gli standard secondari e l' $E_{\Delta Ct}$  specifico del lotto e i valori SF allineano l'output quantitativo del test in base alla IS. L' $E_{\Delta Ct}$  è impostata su 1,91 e il valore SF è impostato su 1,14 per l'uso nell'esempio indicato qui.

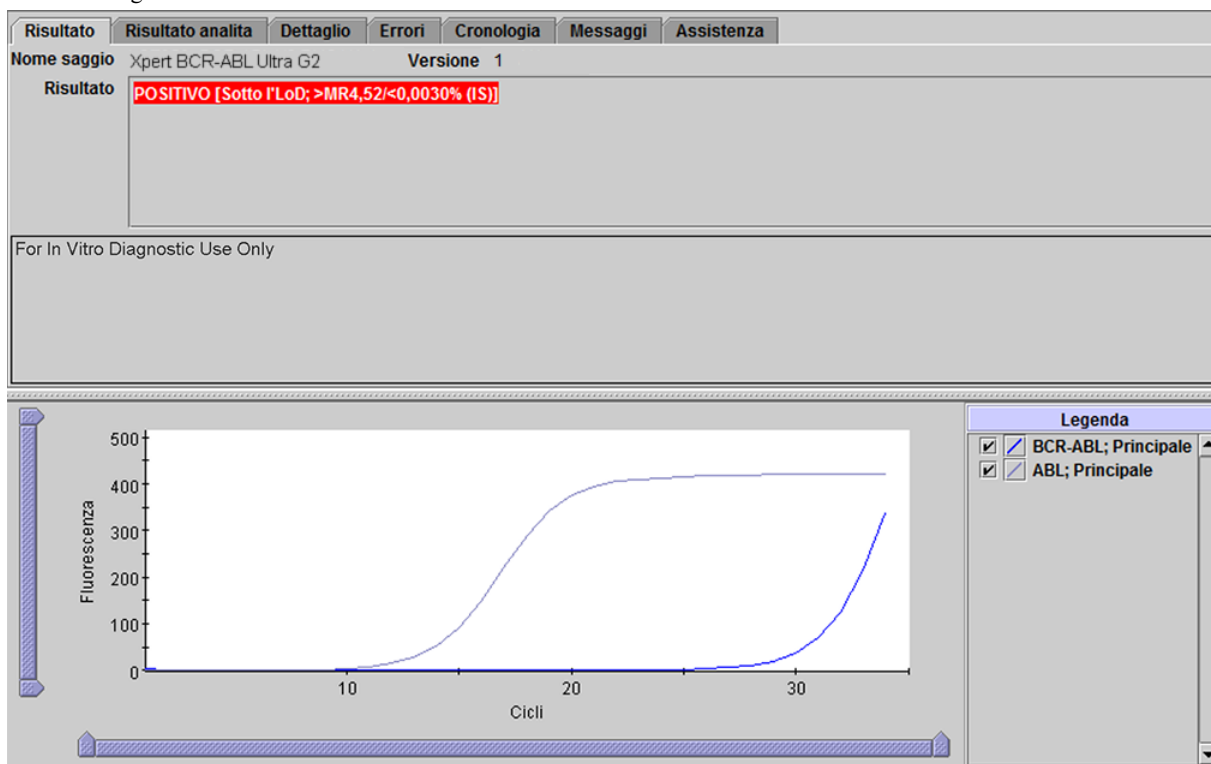
**Esempio:**  $E_{\Delta Ct}$  specifica del lotto = 1,91; SF = 1,14

Ct ABL del saggio = 12,5; Ct BCR-ABL = 29 ;  $\Delta Ct = -16,6$

$\% (IS) = 1,91^{(-16,6)} \times 100 \times 1,14 = 0,0025\%$  è minore del LoD del saggio definito allo 0,0030% (IS)

$MR_{x,xx} = \log_{10}[100/\% \text{ determinata (IS)}] = \log_{10}(100) - \log_{10}(0,0025) = 2 - \log_{10}(0,0025) = MR4,60$  è maggiore del LoD del saggio definito a MR4,52.

Risultato: **POSITIVO [Inferiore al LoD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])**. Vedere la Figura 4.



**Figura 4. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert Dx: POSITIVO [Sotto il LoD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])**

#### 14.4 NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])

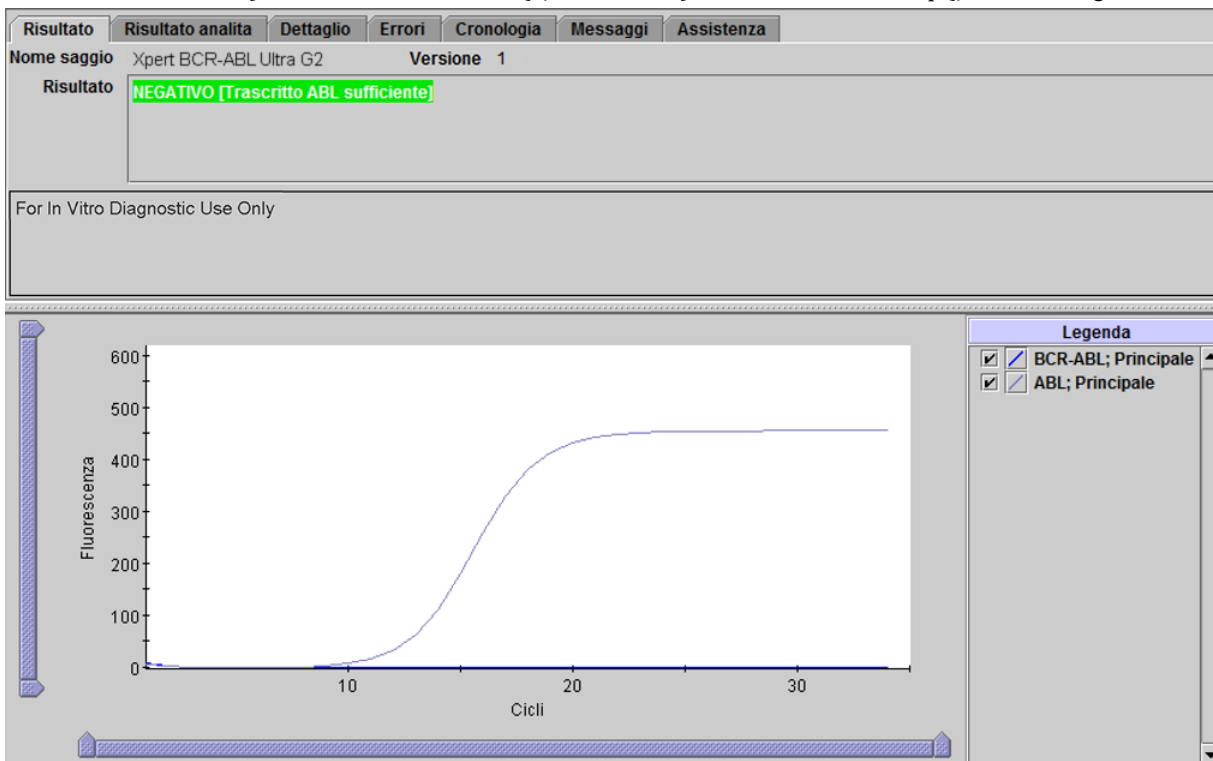
BCR-ABL non è stato rilevato con Ct BCR-ABL uguale a “0” o maggiore del cut-off di “32” e Ct ABL maggiore di “8” e minore o uguale a “18”.

Quando BCR-ABL non è rilevabile con Ct BCR-ABL uguale a “0” o maggiore del cut-off di “32”, il software GeneXpert cerca innanzitutto il Ct ABL per confermare se il Ct ABL è maggiore o uguale a “8” e minore o uguale a “18” e garantire la presenza di “Trascritto ABL sufficiente”. Vedere la Tabella 1.

**Esempio:**

Ct BCR-ABL del saggio = 0; Ct ABL = 11,3 è minore di “18”.

Risultato: **NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**. Vedere la Figura 5.



**Figura 5. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert Dx:  
NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**

## 14.5 NON VALIDO [trascritto ABL insufficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

BCR-ABL è stato rilevato o non rilevato con Ct ABL maggiore di “18”.

Quando BCR-ABL viene rilevato o non rilevato, il software GeneXpert cerca innanzitutto il Ct ABL per confermare se il Ct ABL è minore o uguale a “18” e garantire la presenza di “Trascritto ABL sufficiente”. Fare riferimento a Sezione 17.

**Esempio:**

Ct BCR-ABL del saggio = 0; Ct ABL = 24 è maggiore di “18”.

Risultato: **NON VALIDO [Trascritto ABL insufficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])**. Vedere la Figura 6.



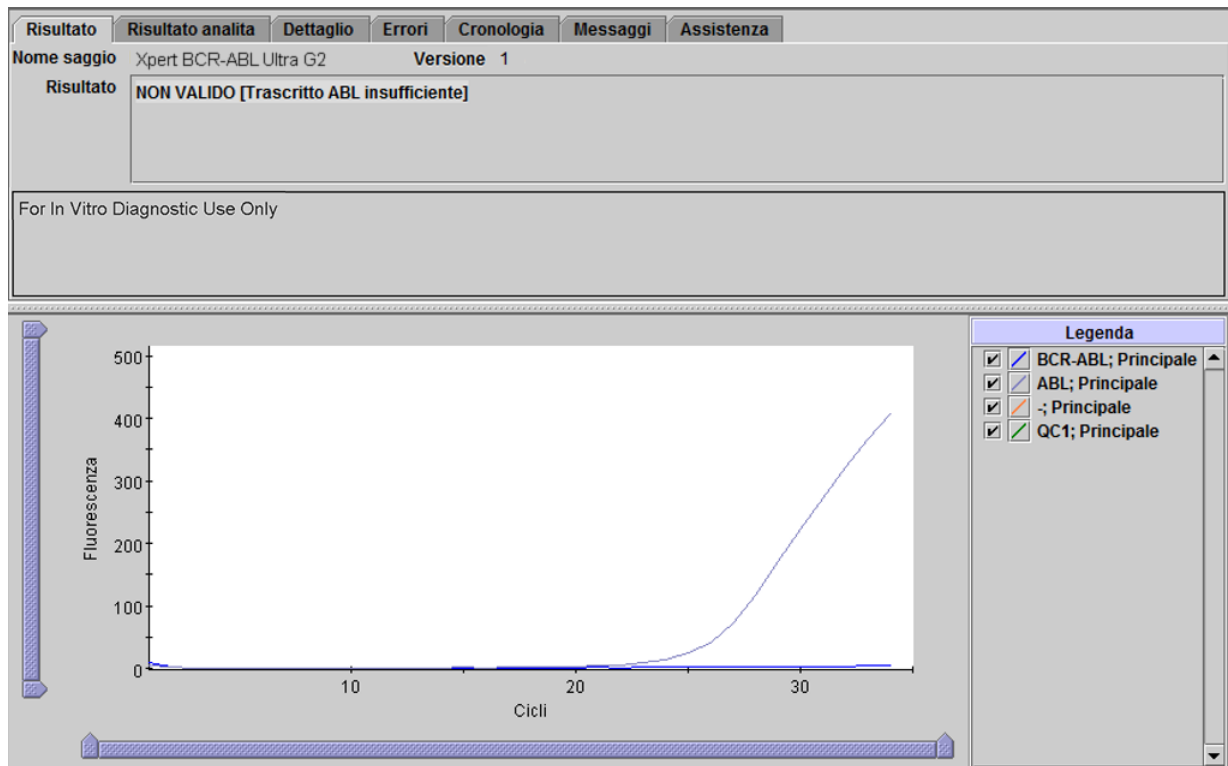


Figura 6. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert Dx: NON VALIDO [trascritto ABL insufficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

## 14.6 ERRORE (ERROR)

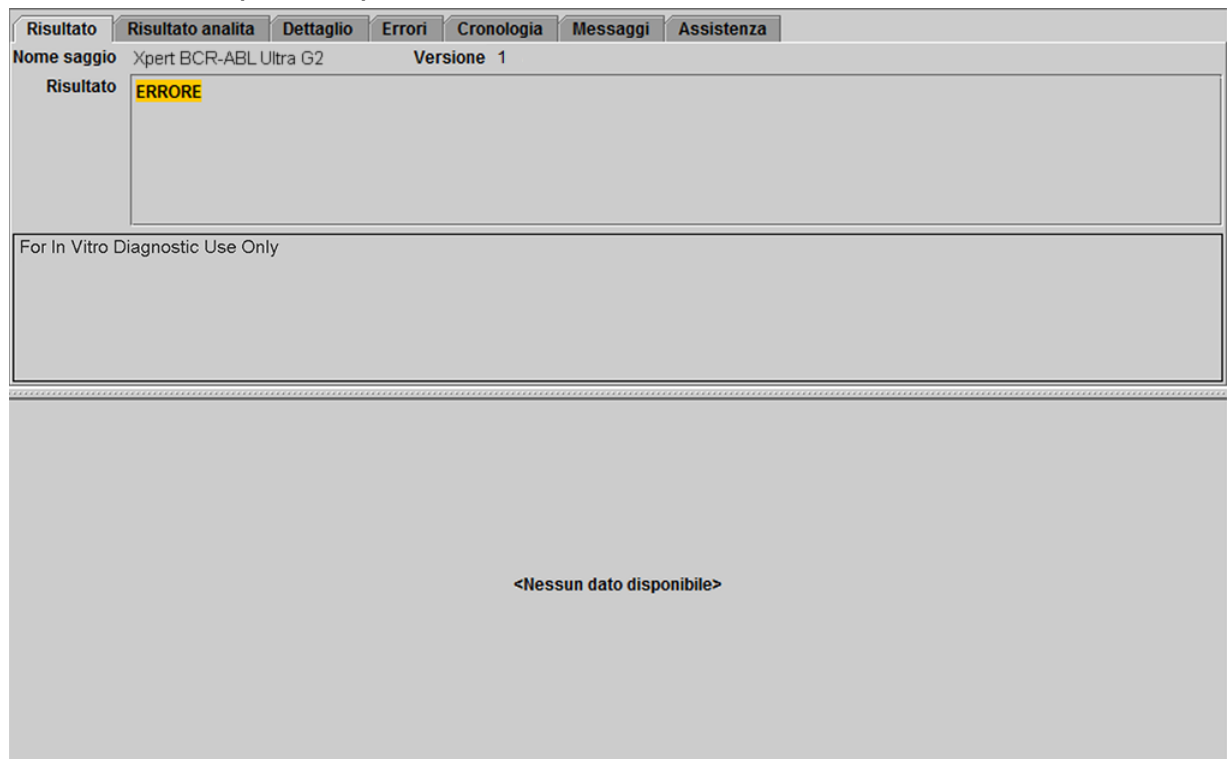


Figura 7. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert Dx: ERRORE (ERROR)

## 15 Risultati quantitativi

Con ciascun kit per il test Xpert BCR-ABL Ultra viene fornito un certificato di analisi contenente una curva standard specifica del lotto per il kit Xpert BCR-ABL Ultra nonché un valore di efficienza ( $E_{\Delta Ct}$ ). Il valore di efficienza è incorporato nel codice a barre della cartuccia Xpert BCR-ABL Ultra. Per informazioni dettagliate sui calcoli del valore di efficienza, consultare il certificato di analisi. Ciascun lotto di kit contiene anche un fattore di scala specifico del lotto ( $SF$ ) incorporato nel codice a barre che collega l'output del test quantitativo alla scala internazionale ( $IS$ ).<sup>7</sup> I risultati del test sono forniti con l'output quantitativo dei test sia in % ( $IS$ ) sia in scale di risposta molecolare (MR) (vedere Tabella 2 e Tabella 3). Questi valori quantitativi vanno interpretati nel contesto della precisione del test Xpert BCR-ABL (vedere Sezione 22, Precisione e riproducibilità).

**Tabella 2. Riduzione logaritmica, Scala internazionale ( $IS$ ) e correlazione della risposta molecolare (MR)**

Riduzione logaritmica in % BCR-ABL/ABL ( $IS$ )	MR	% BCR-ABL/ABL ( $IS$ ) <sup>a</sup>
0	0	100
1	1	10
2	2	1
3	3	0,1
4	4	0,01
4,5	4,5	0,0032
5	5	0,001

<sup>a</sup> % BCR-ABL/ABL ( $IS$ ) = % ( $IS$ ).

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

**Tabella 3. Esempi di Risultati del test Xpert BCR-ABL Ultra**

Analisi	BCR-ABL		ABL		Risultati del test Xpert BCR-ABL Ultra	Note
	Ct	Risultato	Ct	Risultato		
1	7,1	NON VALIDO (INVALID)	7,3	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO (INVALID) [Trascritti di BCR-ABL e ABL troppo alti]	Valore % calcolato: 149,92%
2	8,1	NON VALIDO (INVALID)	7,9	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO (INVALID) [Trascritto di ABL troppo alto]	Valore % calcolato: 121,05%
3	7,9	NON VALIDO (INVALID)	8,1	AMMESSO (PASS)	NON VALIDO (INVALID) [Trascritto di BCR-ABL troppo alto]	Valore % calcolato: 149,92%
4	11,4	POS	10,9	AMMESSO (PASS)	POSITIVO [Sopra il LoQ superiore] (POSITIVE [Above upper LoQ])	Valore % calcolato: 78,92%
5	18,2	POS	13,5	AMMESSO (PASS)	POSITIVO [33,93% ( $IS$ ) e MR0,47] (POSITIVE [33.93% ( $IS$ ) and MR0.47])	Valore % calcolato: 33,93%
6	21,4	POS	13,4	AMMESSO (PASS)	POSITIVO [4,68% ( $IS$ ) e MR1,33] (POSITIVE [4.68% ( $IS$ ) and MR1.33])	Valore % calcolato: 4,68%

Analisi	BCR-ABL		ABL		Risultati del test Xpert BCR-ABL Ultra	Note
	Ct	Risultato	Ct	Risultato		
7	28,6	POS	15,2	AMMESSO (PASS)	POSITIVO [0,012% (IS) e MR3,92] (POSITIVE [0.012% (IS) and MR3.92])	Valore % calcolato: 0,012%
8	30,0	POS	12,7	AMMESSO (PASS)	POSITIVO [Sotto il LoD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])	Valore % calcolato: 0,0008%
9	0	NEG	13,3	AMMESSO (PASS)	NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	0%
10	31,6	NON VALIDO (INVALID)	18,2	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO (INVALID) [Trascritto ABL insufficiente]	NA
11	0	NON VALIDO (INVALID)	18,6	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO (INVALID) [Trascritto ABL insufficiente]	NA
12	0	NON VALIDO (INVALID)	0	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO (INVALID) [Nessun trascritto ABL]	NA
13	0	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	0	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	ERRORE (ERROR)	Ad esempio, Errore5017: Verifica della sonda [ABL] non riuscita.

## 16 Limiti del saggio

- Il prodotto è destinato soltanto all'uso diagnostico *in vitro*.
- Il saggio non è destinato ad essere utilizzato con calibratori esterni.
- La precisione del saggio non è dimostrata o assicurata al di sotto di MR4,5.
- Il saggio non è indicato per determinare l'interruzione dal trattamento TKI né per il monitoraggio dopo l'interruzione.
- Le prestazioni del test Xpert BCR-ABL Ultra sono state valutate solo tramite le procedure fornite nel presente foglietto illustrativo. Qualsiasi modifica apportata a queste procedure può alterare le prestazioni del test.
- Questo prodotto è stato convalidato per il sangue raccolto in provette con EDTA.
- Non utilizzare eparina come anticoagulante perché può inibire la reazione della PCR.
- Non sono stati convalidati campioni di midollo osseo, di buffy-coat o in sodio citrato (NaCitrato).
- È possibile ottenere risultati di test errati se si raccolgono, manipolano, conservano incorrettamente o si scambiano i campioni di analisi. Per evitare risultati erronci, è necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni descritte in questo foglietto illustrativo.
- Il test Xpert BCR-ABL Ultra è previsto solo per rilevare, ma non distinguere, i trascritti di fusione BCR-ABL p210 e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2. La capacità di rilevare altri trascritti di fusione non è stata valutata oltre quanto descritto in queste Istruzioni per l'uso. Il test non rileva piccoli o microscopici punti di rottura, microdelezioni o mutazioni.
- Xpert BCR-ABL Ultra non è previsto per rilevare le traslocazioni e1a2 (p190), e19a2 (p230) o altre traslocazioni minori che possono essere presenti in un campione di sangue periferico prelevato da un paziente con leucemia.
- Xpert BCR-ABL Ultra non rileva i trascritti di fusione aberranti e13a2/b2a2 in cui la delezione di parti della sequenza avviene in posizione adiacente al punto di rottura.
- Per alcuni campioni con conteggi molto elevati di globuli bianchi (superiori a 30 milioni di cellule/ml), Xpert BCR-ABL Ultra può segnalare risultati **NON VALIDO (INVALID)** (Tipo 2) a causa dei livelli in eccesso di BCR-ABL o ABL nel campione. Vedere Tabella 4 per ulteriori informazioni.
- Alcuni campioni di analisi con livelli molto bassi di trascritto di ABL o con globuli bianchi inferiori a 150.000 cellule/ml possono essere segnalati come **NON VALIDO (INVALID)** (Tipo 1). Un risultato indeterminato non esclude la presenza di livelli molto bassi di cellule leucemiche nel paziente.
- Il trascritto di CML p230 con micro punto di rottura e19a2 può segnalare un risultato BCR-ABL positivo inferiore al LoD del saggio (0,0030% (IS)/MR4,52) quando viene testato a livelli target elevati (>3,52 log sopra il LoD).

- Mutazioni o polimorfismi nelle regioni leganti il primer o la sonda possono compromettere il rilevamento di varianti nuove o sconosciute e possono generare risultati falsi negativi.
- I risultati Xpert BCR-ABL Ultra devono essere interpretati insieme all'anamnesi del paziente, comprese le informazioni cliniche e di laboratorio, in conformità con le linee guida NCCN, ELN ed ESMO, se applicabili, al fine di effettuare un'interpretazione clinica completa e per la gestione del paziente.
- Alcuni pazienti con livelli molto bassi di trascritto di BCR-ABL1 (cioè inferiori a LoD 0,0030% (IS) o superiori a MR4,52) possono essere segnalati come **NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**. Pertanto, un risultato non rilevato non esclude la presenza di bassi livelli di cellule leucemiche nel paziente.
- Il saggio è convalidato per l'uso sul GeneXpert Dx System (GX-I, GX-II, GX-IV, GX-XVI) e il GeneXpert Infinity System (Infinity-48s e Infinity-80).

## 17 Guida alla risoluzione dei problemi

Tabella 4. Guida alla risoluzione dei problemi

Risultato dell'analisi	Possibili cause	Suggerimenti
<b>NON VALIDO</b>	Tipo 1: Errore del controllo endogeno dell'ABL: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Campione di scarsa qualità</li> <li>• Inibizione RT-PCR</li> <li>• Se Ct ABL &gt; 18 e /o endpoint &lt;200</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controllare la qualità del campione di analisi (ad esempio, se è stato superato il requisito di conservazione del campione, compresi il tempo e la temperatura).</li> <li>• Ripetere l'analisi con il campione di analisi originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta in Sezione 18.1, Procedura di ripetizione del test per ERRORE o NON VALIDO (Tipo 1).</li> </ul>
	Tipo 2: Il livello di trascritto di BCR-ABL non può essere determinato a causa del campione contenente trascritti di BCR-ABL e/o ABL in eccesso (Ct < 8)	Ripetere l'analisi con il campione di analisi originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 18.2, Procedura di ripetizione del test per ERRORE (Codice 2008) o NON VALIDO (Tipo 2).
<b>ERRORE (Codice 2008)</b>	Superamento del limite di pressione (messaggio di errore 2008)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verificare la qualità del campione</li> <li>• Verificare la presenza di un conteggio di globuli bianchi esageratamente elevato.</li> <li>• Ripetere l'analisi con il campione di analisi originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 18.2, Procedura di ripetizione del test per ERRORE (Codice 2008) o NON VALIDO (Tipo 2).</li> </ul>
<b>ERRORE (codici 5006, 5007, 5008 e 5009<sup>a</sup>)</b>	Errore nella verifica della sonda	Ripetere l'analisi con il campione di analisi originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 18.1, Procedura di ripetizione del test per ERRORE o NON VALIDO (Tipo 1).

Risultato dell'analisi	Possibili cause	Suggerimenti
<b>NESSUN RISULTATO (NO RESULT)</b>	Errore nella raccolta dei dati. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un test che era in esecuzione oppure si è verificata un'interruzione di alimentazione.	Ripetere l'analisi con il campione di analisi originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 18.1, Procedura di ripetizione del test per ERRORE o NON VALIDO (Tipo 1).

<sup>a</sup> Questo non è un elenco esaustivo di codici di errore.

## 18 Ripetizioni del test

### 18.1 Ripetere il test della procedura per ERRORE (ERROR) o NON VALIDO (INVALID) (Tipo 1)

Sottoporre nuovamente a test i campioni con risultati **ERRORE (ERROR)** o **NON VALIDO (INVALID)** a causa della soglia ABL (Ct) che supera il cut-off Ct valido massimo (Ct >18) o con endpoint al di sotto della soglia impostata (<200). Fare anche riferimento a Tabella 4.

1. Se è disponibile un campione di sangue *sufficiente*, ripetere l'analisi dalla provetta di raccolta del campione di sangue originale seguendo la procedura descritta in Sezione 11.2, Preparazione del campione.

-OPPURE-

Se è disponibile un campione di sangue *insufficiente*, è possibile ripetere il test con il lisato messo da parte in precedenza da Sezione 11.2, Preparazione del campione, Passaggio 12.

- a) Se il lisato messo da parte in precedenza da Sezione 11.2, Preparazione del campione, Passaggio 12 viene conservato congelato, scongelare a temperatura ambiente prima dell'uso.
  - b) Accertarsi che il lisato sia ben miscelato mescolando ininterrottamente per 10 secondi il campione in vortex all'impostazione massima e metterlo da parte per 3 minuti affinché le bolle scompaiano. Andare al Passaggio 2.
2. Trasferire 1 ml del lisato preparato in una nuova provetta conica da 50 ml.
  3. Aggiungere 1,5 ml di reagente di lisi (LY) alla nuova provetta conica contenente il lisato.
  4. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
  5. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti.
  6. Aggiungere 2 ml di etanolo assoluto di grado reagente (non fornito) alla stessa provetta conica.
  7. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
  8. Aprire la cartuccia sollevandone il coperchio e trasferire l'intero contenuto della fiala di reagente di lavaggio (1) nella camera del reagente di lavaggio (con apertura piccola). Vedere la Figura 1.
  9. Pipettare l'intero contenuto del campione preparato nella camera per il campione (apertura grande). Vedere la Figura 1.
  10. Chiudere il coperchio della cartuccia. Avviare il test (vedere Sezione 11.4).

### 18.2 Procedura di ripetizione del test per ERRORE (ERROR) (codice 2008) o NON VALIDO (INVALID) (tipo 2)

Analizzare nuovamente i campioni con livelli di trascritto di BCR-ABL e/o ABL inferiori al cut-off Ct minimo valido (Ct <8) e/o quando viene superato il limite di pressione. Fare anche riferimento a Tabella 4.

1. Sul fondo di una nuova provetta conica da 50 ml, aggiungere 100 µl di PK (Proteinasi K).
2. Se è disponibile un campione di sangue *sufficiente*, ripetere l'analisi dalla provetta di raccolta del campione di sangue originale. Accertarsi di miscelare bene il campione di sangue capovolgendo la provetta di raccolta ematica per 8 volte immediatamente prima del pipettaggio. Andare al Passaggio 4.

-OPPURE-

Se è disponibile un campione di sangue *insufficiente*, è possibile ripetere il test con il lisato messo da parte in precedenza da Sezione 11.2, Preparazione del campione, Passaggio 12.

- a) Se il lisato messo da parte in precedenza da Sezione 11.2, Preparazione del campione, Passaggio 12 viene conservato congelato, scongelare a temperatura ambiente prima dell'uso. Se si utilizza il lisato refrigerato, lasciare stabilizzare a temperatura ambiente prima dell'uso.
- b) Accertarsi che il lisato sia ben miscelato mescolando ininterrottamente per 10 secondi il campione in vortex all'impostazione massima e metterlo da parte per 3 minuti affinché le bolle scompaiano. Andare al Passaggio 3.
3. Alla provetta già contenente Proteinasi K, aggiungere 50 µl di campione di sangue, se disponibile, o 80 µl di lisato residuo da Sezione 11.2, Preparazione del campione.
  - a) Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 3 secondi.
  - b) Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto.
4. Aggiungere 2,5 ml di reagente di lisi (LY) alla nuova provetta conica contenente il lisato.
5. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
6. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti.
7. Aggiungere 2 ml di etanolo assoluto di grado reagente (non fornito) alla stessa provetta conica.
8. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
9. Aprire la cartuccia sollevandone il coperchio e trasferire l'intero contenuto della fiala di reagente di lavaggio (1) nella camera del reagente di lavaggio (con apertura piccola). Vedere la Figura 1.
10. Pipettare l'intero contenuto del campione preparato nella camera per il campione (apertura grande). Vedere la Figura 1.
11. Chiudere il coperchio della cartuccia. Avviare il test (vedere Sezione 11.4).

## 19 Valori attesi

L'intervallo di Xpert BCR-ABL Ultra copre i principali punti di decisione clinici per il monitoraggio di CML (con MR da 1 a 4,5)<sup>5</sup> con il rilevamento quantitativo di mRNA di BCR-ABL (trascritti e13a2/b2a2 o e14a2/b3a2) e di mRNA del controllo endogeno ABL. I valori previsti rientrano nell'intervallo Xpert BCR-ABL Ultra compreso tra 0,0030 e 55% (IS) (da MR4,52 a MR0,26).

## 20 Prestazioni cliniche

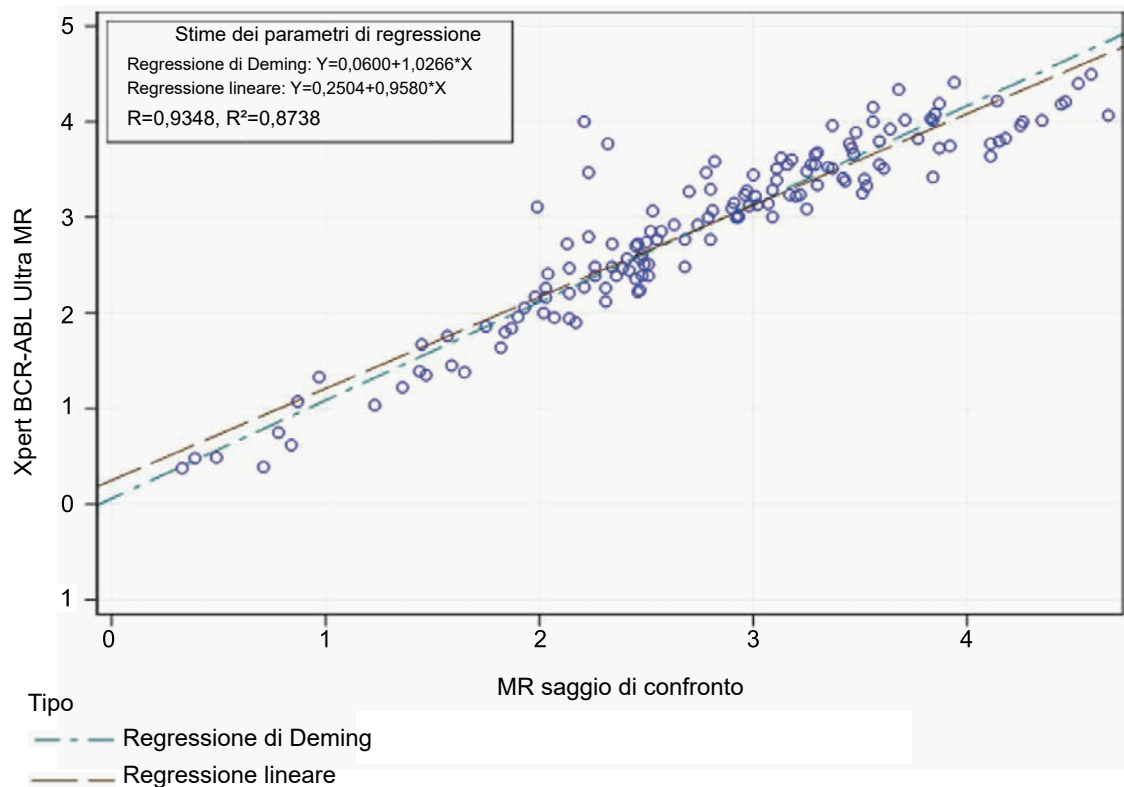
Le prestazioni cliniche del test Xpert BCR-ABL Ultra sono state valutate presso quattro strutture sanitarie negli Stati Uniti come parte di uno studio clinico multicentrico. Tre strutture sanitarie aggiuntive sono state utilizzate solo come centri di raccolta dei campioni di analisi. Lo studio è stato condotto utilizzando campioni di sangue intero in EDTA freschi e raccolti in maniera prospettica da pazienti affetti da CML in qualsiasi fase della malattia, dopo la diagnosi iniziale, con o senza esposizione precedente alla terapia con inibitore della tirosinchinasi o ad altri trattamenti della CML. Inoltre, lo studio ha incluso i campioni residui conservati come lisati congelati che sono stati preparati da sangue intero in EDTA proveniente dalla stessa popolazione di pazienti. Le prestazioni del test Xpert BCR-ABL Ultra sono state confrontate con un saggio molecolare approvato dalla FDA che rileva e quantifica i trascritti di mRNA per i tipi di traslocazione p210 (e13a2/b2a2 o e14a2/b3a2) e utilizza ABL come trascritto di mRNA del controllo endogeno.

Un totale di 266 campioni idonei sono stati inizialmente arruolati nello studio, di cui 57 sono stati esclusi a causa di uso di una procedura obsoleta per il metodo di estrazione (27), il soggetto non ha completato il prelievo di sangue (8), ritardo della spedizione o del test (6), volume insufficiente per il test (6), test di confronto non riuscito (6) o test con un file di definizione del saggio Xpert BCR-ABL Ultra incorretto (4) con i rimanenti 209 campioni che sono stati testati.

Su 209 campioni di analisi, il 97,1% (203/209) dei risultati di Xpert BCR-ABL Ultra sono riusciti al primo tentativo con un tasso iniziale indeterminato del 2,9% (6/209) e il 99,5% (208/209) sono riusciti dopo la ripetizione del test con un tasso finale indeterminato dello 0,5% (1/209).

Dei 208 campioni disponibili per l'analisi, 150 (72,1%) erano campioni da lisato congelato e 58 (27,9%) erano campioni freschi, raccolti in maniera prospettica, per i quali erano disponibili informazioni demografiche. Dei campioni di analisi freschi inclusi nelle analisi dei dati, 24 (41,4%) sono stati prelevati da soggetti di sesso femminile e 34 (58,6%) da soggetti di sesso maschile. L'età media del soggetto per i campioni freschi era di 60,5 anni (intervallo di 28-85 anni).

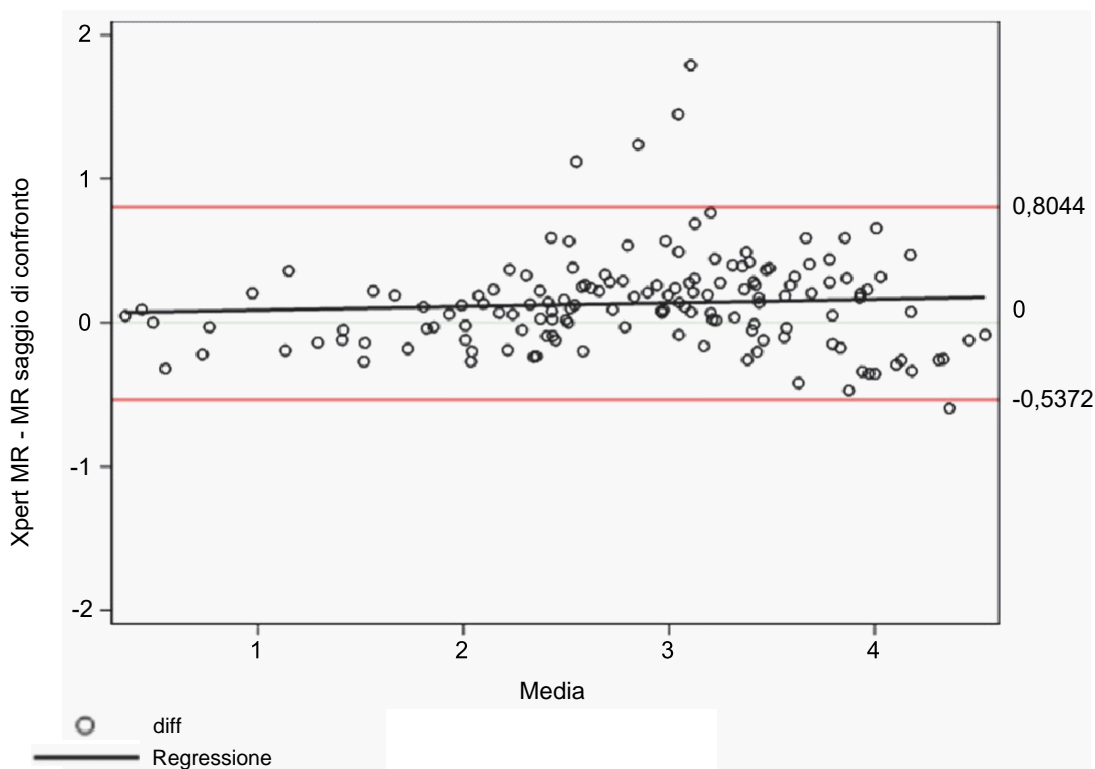
Dei 208 risultati disponibili per l'analisi, 147 rientravano nell'intervallo refertabile quantitativo per entrambi i saggi [0,0030% - 55% (IS)/MR4,52 - MR0,26 per Xpert BCR-ABL Ultra e 0,0020% - 50% (IS)/MR4,72 - MR0,30 per il saggio di confronto]; di questi, 117 provenivano da lisati residui congelati e 30 erano campioni di analisi freschi raccolti in maniera prospettica. Le prestazioni del test Xpert BCR-ABL Ultra rispetto al saggio di confronto sono state valutate utilizzando una regressione di Deming per determinare la pendenza e l'intercetta. Figura 8 mostra l'analisi di regressione di Deming e di regressione lineare dei 147 risultati del saggio (valori MR).



**Figura 8. Analisi di regressione di Deming e lineare**

La pendenza e l'intercetta dalla regressione di Deming erano rispettivamente 1,0266 e 0,0600. Da questi risultati, il bias previsto all'MMR (MR3) è stato calcolato come MR0,1244 (intervallo di confidenza al 95% di 0,0969 – 0,1519).

È stata anche eseguita un'analisi della differenza Bland-Altman utilizzando i 147 risultati quantitativi che rientravano nell'intervallo refertabile sia per il test Xpert BCR-ABL Ultra sia per il saggio di confronto. Il grafico Bland-Altman (vedere Figura 9) mostra 2DS al di sopra e al di sotto della differenza media osservata. È inoltre indicata la linea di tendenza del bias in tutto l'intervallo MR.



**Figura 9. Xpert BCR-ABL Ultra Analisi della differenza Bland-Altman di MR BCR-ABL - MR del test vs. MR del saggio di confronto**

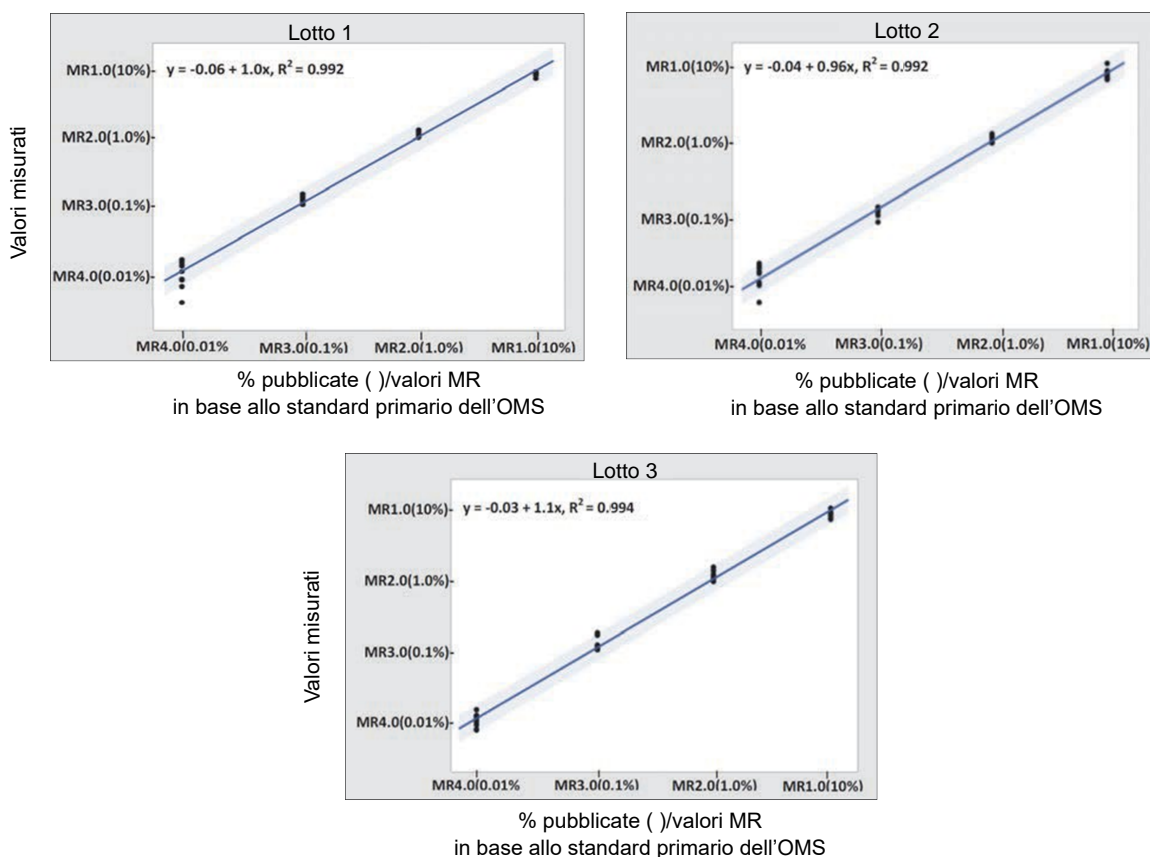
La differenza media (bias) calcolata è stata di 0,1336 con una DS di 0,3354. La maggior parte (96,6%, 142/147) dei risultati rientrava nell'intervallo 2DS (tra -0,5372 e 0,8044).

## 21 Prestazioni analitiche

### 21.1 Tracciabilità rispetto al pannello OMS

La tracciabilità rispetto al 1<sup>st</sup> World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel (Primo pannello di riferimento dell'OMS) per la quantificazione della traslocazione BCR-ABL tramite RQ-PCR (codice NIBSC: 09/138) è stata dimostrata misurando il pannello di riferimento dell'OMS con 3 lotti del test Xpert BCR-ABL Ultra e confrontando i valori misurati con i valori pubblicati nelle Istruzioni per l'uso del pannello di riferimento.<sup>19</sup> Ciascuno dei 4 componenti del pannello di riferimento è stato testato con un minimo di 10 replicati per lotto di kit del saggio. I valori MR misurati per ciascun livello del pannello primario dell'OMS sono stati calcolati mediante regressione per ciascun lotto del test Xpert BCR-ABL Ultra (cioè, i componenti del pannello OMS sono stati trattati come campioni clinici e interpolati con il modello di regressione lineare della curva standard del saggio). Inoltre, i valori MR misurati sono stati confrontati con i valori MR pubblicati tramite un'ulteriore analisi di regressione per determinare i valori di pendenza e intercetta. La pendenza della linea era quasi 1 (da 0,96 a 1,1) e l'intercetta calcolata quasi 0 (da -0,03 a -0,06).





**Figura 10. Valori misurati rispetto a quelli pubblicati per il pannello di riferimento primario dell'OMS, da lotto a lotto.**

I valori MR generati dal kit Xpert BCR-ABL Ultra (asse y) vengono tracciati in funzione dei valori MR pubblicati nelle Istruzioni per l'uso del pannello di riferimento primario dell'OMS (asse x). I tre lotti sono rappresentati da punti di dati (neri). Le analisi di regressione e gli intervalli di confidenza si basano separatamente sui dati per ciascun lotto.

## 21.2 Intervallo di linearità/dinamico

La linearità è stata valutata in modo indipendente per ciascuno dei due punti di rottura principali, e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2, utilizzando campioni clinici CML specifici per un alto livello del punto di rottura e13a2/b2a2 o e14a2/b3a2. Il lisato di ciascun livello alto di campione di CML di trascritto di BCR-ABL è stato diluito in un lisato di background preparato da campioni clinici CML-negativi a intervalli target da ~50% (IS)/MR0,30 a 0,000625% (IS)/MR5,20. I componenti del pannello, compreso il livello negativo, sono stati testati su due lotti di kit del saggio in replicati di 4 per lotto di kit.

I test e le analisi statistiche sono stati condotti in conformità con la norma CLSI EP06-A. Le analisi di regressione lineare sono state eseguite con polinomi di primo, secondo e terzo grado. I risultati per ciascun punto di rottura sono stati considerati lineari se i coefficienti di regressione polinomiale non erano significativi (valori  $p > 0,05$ ). Le curve di regressione lineare per entrambi i trascritti sono mostrate in Figura 11 e Figura 12 qui sotto.

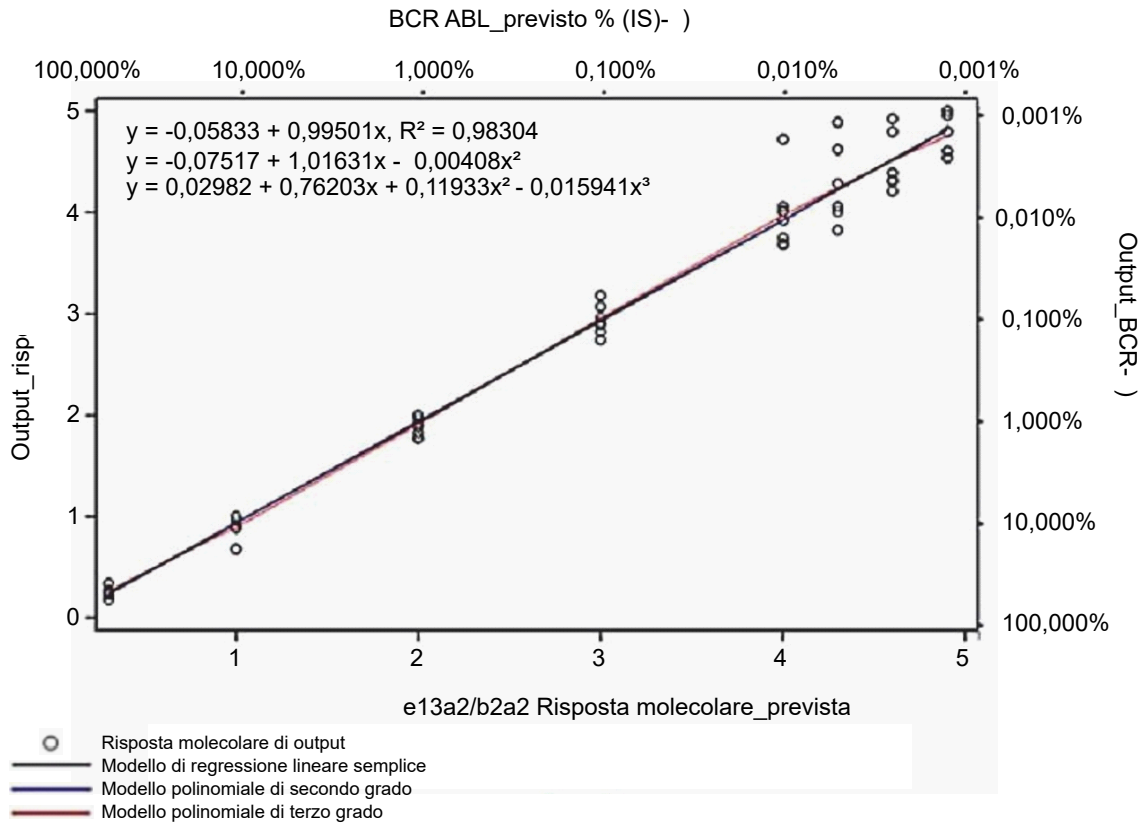


Figura 11. Curve di regressione lineare per il trascritto di punti di rottura e13a2/b2a2

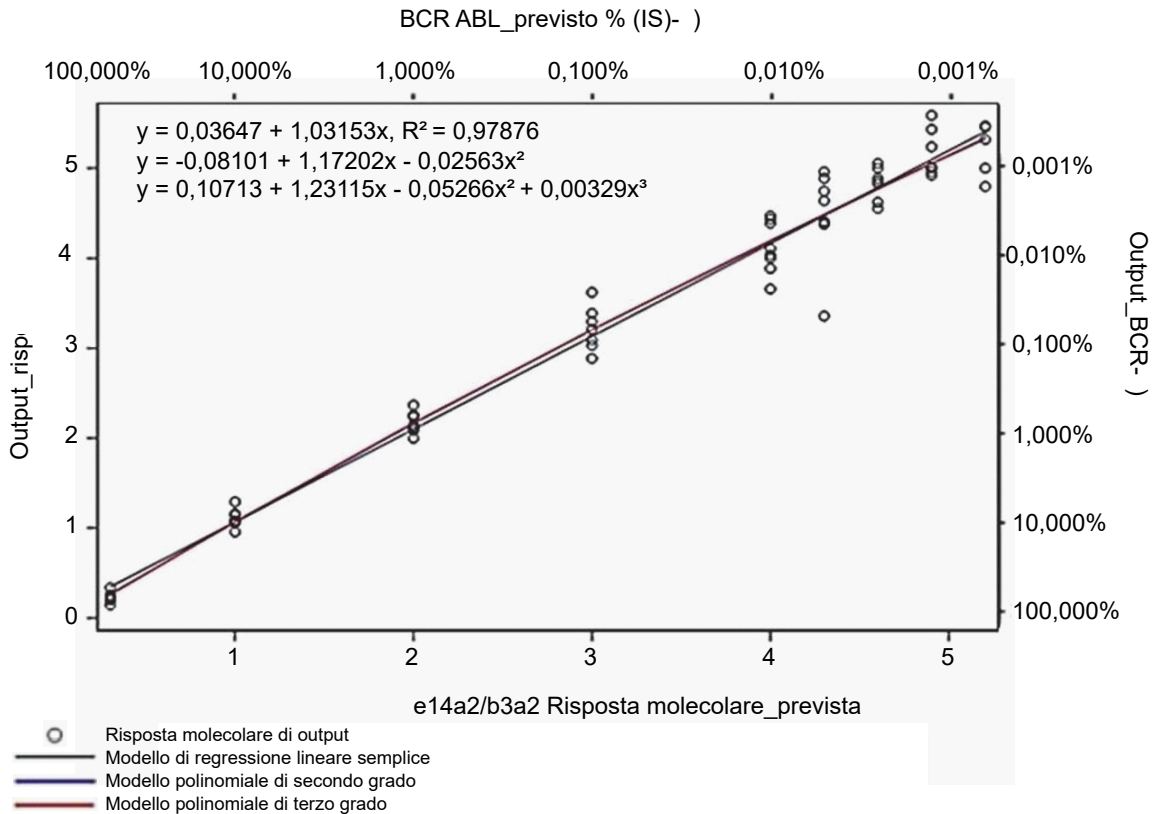


Figura 12. Curve di regressione lineare per il trascritto di punti di rottura e14a2/b3a2

Le intercette, pendenze e valori  $R^2$  della regressione stimati dal modello lineare sono mostrati nella Tabella 5.

**Tabella 5. Coefficienti di regressione dal modello lineare**

Punto di rottura	Intercetta	Pendenza	$R^2$
e13a2/b2a2	-0,05833	0,99501	0,98304
e14a2/b3a2	0,03647	1,03153	0,9788

Collettivamente, i dati supportano un'osservazione di linearità da almeno 55% (IS)/MR 0,26 a ~0,0019% (IS)/MR4,75 con una DS massima di 0,26. L'intervallo refertabile si estende dai limiti di linearità a 55% (IS)/MR0,26 al LoQ a 0,0030% (IS)/MR4,52.

### 21.3 Sensibilità analitica (Limite di rilevamento, Limite di quantificazione, Limite del bianco)

Il limite di rilevamento (LoD) è stato stimato sia per i punti di rottura e13a2/b2a2 sia per i punti di rottura e14a2/b3a2 testando le diluizioni seriali di campioni positivi a CML alti [ $>10\%$  (IS)/MR1] e anche testando campioni positivi a CML bassi [ $<0,1\%$  (IS)/MR3]. I dati per ciascun punto di rottura tra diluizioni e campioni sono stati compilati separatamente e il LoD è stato stimato utilizzando l'analisi di regressione probit. L'analisi risultante ha prodotto un LoD stimato di 0,0035% (IS)/MR4,45 per il punto di rottura e13a2/b2a2 e 0,0030% (IS)/MR4,52 per il punto di rottura e14a2/b3a2.

Il LoD è stato verificato adattando il metodo non parametrico descritto nelle linee guida CLSI, EP17-A2 (Tabella 6). Due campioni positivi CML unici che rappresentano ciascun punto di rottura sono stati diluiti a un livello target 0,0030% (IS)/MR4,52. Per e13a2/b2a2, 94 replicati sono stati testati da 2 operatori in 4 lotti di kit di test nell'arco di 4 giorni. Per e14a2/b3a2, 101 replicati sono stati testati da 2 operatori in 4 lotti di kit di test nell'arco di 7 giorni.

**Tabella 6. Limite di rilevamento verificato in % (IS)/MR**

Punto di rottura	Positivi/replicati	% di positivi	Mediana % (IS)/MR
e13a2/b2a2	90/94	95,74%	0,0030% (IS)/MR4,52
e14a2/b3a2	97/101	96,04%	0,0029% (IS)/MR4,55

Poiché il test Xpert BCR-ABL Ultra non distingue tra i due punti di rottura, e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2, il più alto dei due è dichiarato come il LoD del saggio. Pertanto, il LoD Xpert BCR-ABL Ultra complessivo sia per e13a2/b2a2 sia per e14a2/b3a2 è di 0,0030% (IS)/MR4,52.

Il limite di quantificazione (LoQ) è stato stimato con i dati ottenuti dagli studi LoD. La media e la deviazione standard per i valori % (IS) e MR sono state calcolate per i replicati a livelli uguali al LoD, 0,0030% (IS)/MR4,52 o maggiori con positività maggiore o uguale al 95%. Il LoQ del saggio è vincolato dal LoD del saggio; pertanto, il LoQ è stato determinato come uguale al LoD, 0,0030% (IS)/MR 4,52. I risultati sono stati valutati anche rispetto ai criteri di accettazione della deviazione standard (DS)  $\leq 0,36$ . La deviazione standard di MR sia per e13a2/b2a2 (intervallo DS osservato MR0,27-MR0,34) sia per e14a2/b3a2 (intervallo DS osservato MR0,29-MR0,31) rientrava nei criteri di accettazione.

Il limite del bianco (LoB) è stato determinato con 50 campioni di sangue presunti non-CML, di donatori normali sani, raccolti in provette con EDTA. Per nessuno dei test sono stati osservati valori BCR-ABL misurabili. Pertanto, il LoB complessivo è stato determinato come 0,00% (IS).

### 21.4 Specificità analitica

L'esclusività della specificità analitica e clinica di Xpert BCR-ABL Ultra è stata valutata analizzando campioni di sangue intero in EDTA prelevati da cinquanta (50) donatori sani (non CML) e venti (20) campioni leucemici (LMA/LLA). La specificità dei punti di rottura è stata determinata analizzando il sangue EDTA di donatore sano normale con l'aggiunta di cinque (5) diverse linee cellulari leucemiche che rappresentano 3 diversi tipi di leucemia (CML, LLA e APL) e 5 punti di rottura della malattia: K562 (CML/e14a2/b3a2) e BV173 (CML/e13a2/b2a2) fungevano da controlli positivi; SUP-B15 (LLA/e1a2), AR230 (CML/e19a2) e NB4 (APL/PML-RARA) sono stati valutati per la specificità.

Nessun segnale BCR-ABL è stato rilevato da Xpert BCR-ABL Ultra in nessuno dei campioni sani non-CML o campioni leucemici LMA/LLA valutati in questo studio.

Tra le linee cellulari di leucemia testate, le linee cellulari CML (K562 e BV173) con punti di rottura principali p210 hanno prodotto i risultati positivi attesi. La linea cellulare CML (AR230) con il punto di rottura p230 e19a2 ha riportato **POSITIVO [Sotto il LoD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])** per 1 su 4 replicati analizzati al livello 10% (IS)/MR1,00 target in base al numero di cellule K562. Il risultato positivo per la linea cellulare AR230 è stato per un livello target di log 3,52 superiore al LoD del saggio e non è stato osservato ai livelli più bassi di 1% (IS)/MR2,00 e 0,1% (IS)/MR3,00.

Xpert BCR-ABL Ultra è specifico per il trascritto di fusione BCR-ABL p210 associato alla CML e ha una specificità analitica del 100% per i campioni di sangue con EDTA non CML.

## 21.5 Contaminazione da carry-over

È stato condotto uno studio per dimostrare che le cartucce chiuse monouso GeneXpert impediscono la contaminazione da carry-over da cartucce eseguite sequenzialmente nello stesso modulo. Per dimostrare quest'ipotesi i campioni negativi sono stati esaminati dopo campioni altamente positivi nello stesso modulo GeneXpert. Questo studio è consistito nel trattamento di un campione normale EDTA **NEGATIVO** (sangue CML-negativo) all'interno dello stesso modulo GeneXpert immediatamente dopo un campione altamente **POSITIVO** (sangue positivo alla CML simulato) con  $4,5 \times 10^5$  cellule/ml di cellule K562 addizionate in sangue negativo alla CML per produrre ~10% (IS)/MR1,00. La sequenza di analisi è stata ripetuta cinque volte su ciascuno dei quattro moduli GeneXpert. Tutti i venti campioni positivi BCR-ABL sono stati riportati correttamente come **POSITIVO [#.,###% (IS) e MR#,###]** (POSITIVE [#.,###% (IS) and MR#,###]), mentre tutti i venti campioni negativi BCR-ABL sono stati riportati come **NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente]** (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript]).

## 21.6 Sostanze potenzialmente interferenti

Questo studio ha valutato cinque sostanze che possono essere presenti nei campioni di sangue intero in EDTA e possono interferire con le prestazioni del test Xpert BCR-ABL Ultra. I composti e i livelli testati (vedere Tabella 7) si basavano sulle linee guida del documento CLSI EP07-A2. Le sostanze interferenti sono state testate nel background di campioni di sangue intero in EDTA clinici di CML che rappresentano tre livelli con cinque campioni per livello: >1% (IS)/<MR2, 0.1-1% (IS)/MR3-MR2, and <0.1% (IS)/>MR3. I controlli dei test consistevano in campioni clinici CML in sangue intero in EDTA al rispettivo livello di trascritto di BCR-ABL senza la sostanza interferente. Ciascun campione CML è stato testato in assenza e in presenza delle cinque sostanze interferenti individuali a 4 replicati per condizione.

Una sostanza è stata considerata non interferente se in sua presenza la media del rapporto % (IS)/MR osservata era entro la differenza tripla rispetto al controllo.

Non sono stati osservati effetti inibitori clinicamente significativi sul test Xpert BCR-ABL Ultra con le sostanze interferenti valutate in questo studio. Benché siano state osservate alcune variabilità e differenze statisticamente significative (valore  $p < 0,05$ ) in alcune condizioni testate, i rapporti % (IS)/MR segnalati per le condizioni del test e di controllo rientravano nell'intervallo accettabile della differenza tripla.

**Tabella 7. Sostanze potenzialmente interferenti analizzate con Xpert BCR-ABL Ultra**

Sostanze interferenti	Concentrazione analizzata
Bilirubina non coniugata	20 mg/dl
Colesterolo totale	500 mg/dl
Trigliceridi totali (lipidi)	1800 mg/dl
Eparina	3500 U/l
EDTA (prelievo breve)	750 mg/dl (5X)

## 22 Precisione e riproducibilità

La precisione e la riproducibilità del test Xpert BCR-ABL Ultra sono state valutate in uno studio multicentrico in conformità con la norma CLSI EP05-A3, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline" e CLSI EP15-A3, "User Verification of Performance for Precision and Trueness, Approved Guideline".

È stato preparato un pannello di undici campioni che comprendeva quanto segue: Un campione negativo per BCR-ABL, due campioni al limite di rilevamento (LoD) e otto campioni ai livelli 1-4 di risposta molecolare (MR), utilizzando i due target rilevati dal test Xpert BCR-ABL Ultra: e13a2/b2a2 ed e14a2/b3a2. Il pannello di campioni è stato composto diluendo un lisato sfuso di campioni con elevata % BCR-ABL/ABL da pazienti con CML in pool di sangue intero raccolto da donatori sani per ottenere il livello desiderato.

Tabella 8 mostra gli undici campioni inclusi in questo studio.

**Tabella 8. Pannello di riproducibilità per Xpert BCR-ABL Ultra**

N. campione	Descrizione	% (IS)
1	MR1,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~ 10% (IS)
2	MR1,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~ 10% (IS)
3	MR2,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~ 1% (IS)
4	MR2,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~1% (IS)
5	MR3,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~ 0,1% (IS)
6	MR3,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~0,1% (IS)
7	MR4,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~ 0,01% (IS)
8	MR4,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~0,01% (IS)
9	Vicino al LoD e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~ 0,005% (IS)
10	Vicino al LoD e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~ 0,005% (IS)
11	Negativi	BCR-ABL non rilevato

Ciascuno degli undici componenti del pannello è stato testato in duplicato due volte al giorno in quattro giorni diversi da ciascuno dei tre diversi operatori in tre siti diversi. Sono stati utilizzati tre lotti di kit Xpert BCR-ABL Ultra e ciascun operatore ha eseguito i test con un lotto (3 siti x 3 lotti x 1 operatore/lotto x 4 giorni x 2 sessioni/operatore x 2 replicati/ sessione = 144 replicati/componente del pannello).

I risultati quantitativi sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) e sono stati identificati i principali componenti della varianza.

L'analisi ANOVA per ciascun componente del pannello è mostrata in Tabella 9.

**Tabella 9. Studio di riproducibilità: Risultati dell'analisi della varianza**

Campione	N	Media (MR)	DS sito/ strumento	DS operatore/ lotto	DS giorno	DS entro la sessione	DS totale <sup>a</sup>
Target MR1,0 e13a2/b2a2	144	0,96	0	0,05	0,01	0,06	0,08
Target MR1,0 e14a2/b3a2	144	0,99	0	0,06	0	0,08	0,1
Target MR2,0 e13a2/b2a2	143	2,04	0	0,06	0,02	0,10	0,11
Target MR2,0 e14a2/b3a2	144	2,09	0,03	0,07	0,02	0,10	0,13
Target MR3,0 e13a2/b2a2	144	2,89	0,06	0,04	0,03	0,10	0,12
Target MR3,0 e14a2/b3a2	144	3,12	0,06	0,08	0	0,11	0,15
Target MR4,0 e13a2/b2a2	143 <sup>b</sup>	3,67	0,03	0,02	0	0,15	0,15
Target MR4,0 e14a2/b3a2	144	3,91	0,05	0,08	0,04	0,14	0,17
Target MR>4,0 e13a2/b2a2	140 <sup>c</sup>	4,36	0,04	0,04	0	0,33	0,33

Campione	N	Media (MR)	DS sito/ strumento	DS operatore/ lotto	DS giorno	DS entro la sessione	DS totale <sup>a</sup>
Target MR>4,0 e14a2/b3a2	143 <sup>d</sup>	4,22	0,03	0,08	0	0,17	0,19

<sup>a</sup> Il test Xpert BCR-ABL Ultra eseguito sui sistemi GeneXpert Dx e GeneXpert Infinity integra la purificazione dei campioni e l'amplificazione degli acidi nucleici. La variabilità complessiva del test osservata in questo studio (espressa in termini di DS totale) include la variabilità derivata sia dalla preparazione del campione a bordo sia dai passaggi RT-qPCR.

<sup>b</sup> Un replicato che soddisfa i requisiti di anomalia al livello del 99% per CLSI EP15-A3 è stato rimosso dall'analisi.

<sup>c</sup> 4 campioni dei 144 risultati del test hanno prodotto un risultato NEGATIVO.

<sup>d</sup> 1 campione dei 144 risultati del test ha prodotto un risultato NEGATIVO.

La deviazione standard totale osservata per i campioni a MR1, MR2 e MR3 è stata  $\leq 0,15$ . La deviazione standard totale massima osservata per i campioni vicini al LoD e MR4 è stata di 0,33.

## 23 Riferimenti bibliografici

- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics 2008; CA Cancer J Clin. 2008;58:71-96.
- NIH/NCI – Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER). Cancer Stat Facts: Chronic Myeloid Leukemia (CML). Accessed December 21, 2018. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmlyl.html>
- Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. Mayo Clin Proc. 2015;90(10):1440-1454.
- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood. 2006;108(1):28-37.
- NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology; Chronic Myelogenous Leukemia (Access Version 1, 2019).
- White H, Matejtschuk P, Rigsby P, et al. Establishment of the first World Organization International Generic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. Blood. 2010; 116:e1111-e1117.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2318-2357.
- Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) – a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2474-2486.
- van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, et al. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease—a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2004;18:884-886.
- van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17:1013-1034.
- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories (fare riferimento all'ultima edizione). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (fare riferimento all'ultima edizione).
- Organizzazione Mondiale della Sanità. Safe management of wastes from health-care activities. Bollettino dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (fare riferimento all'ultima edizione).
- REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga, Elenco delle frasi di rischio, direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE (che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006).
- Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
- Baccarani M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. Blood. 2013 Jun;122(6):872-884.
- Hochhaus A. et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2017 May; 28(4):iv41-iv51.

19. WHO International Standard 1st WHO International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation NIBSC code: 09/138. Istruzioni per l'uso. (Versione 4.0., con data 13/12/2012).

## 24 Ubicazione delle sedi Cepheid

### Sede centrale globale

Cepheid  
904 Caribbean Drive  
Sunnyvale, CA 94089  
USA

Telefono: + 1 408 541 4191 Fax: + 1 408 541 4192 [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com)

### Sede centrale europea

Cepheid Europe SAS  
Vira Solelh  
81470 Maurens-Scopont  
France

Telefono: + 33 563 825 300 Fax: + 33 563 825 301 [www.cepheidinternational.com](http://www.cepheidinternational.com)

## 25 Assistenza Tecnica

### Prima di contattarci

Prima di contattare il Supporto Tecnico di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:

- Nome del prodotto
- Numero di lotto
- Numero di serie dello strumento
- Messaggi di errore (se presenti)
- Versione del software e, se pertinente, codice riportato sull'etichetta di servizio (Service Tag) del computer

### Stati Uniti





Telefono: + 1 888 838 3222 E-mail: [techsupport@cepheid.com](mailto:techsupport@cepheid.com)

### Francia













Telefono: + 33 563 825 319 E-mail: [support@cepheideurope.com](mailto:support@cepheideurope.com)

Le informazioni di contatto di tutti gli uffici di Assistenza Tecnica di Cepheid sono disponibili nel sito: [www.cepheid.com/en/support/contact-us](http://www.cepheid.com/en/support/contact-us)

## 26 Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Marchio CE - Conformità europea
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Codice lotto



Simbolo	Significato
	Non riutilizzare
	Data di scadenza
	Attenzione
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Fabbricante
	Paese di produzione
	Contenuto sufficiente per <i>n</i> test
<b>CONTROL</b>	Controllo
	Limiti di temperatura
	Rischi biologici
	Liquidi infiammabili
	Tossicità riproduttiva e per gli organi
<b>EC REP</b>	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
<b>CH REP</b>	Rappresentante autorizzato in Svizzera
	Importatore



Cepheid  
904 Caribbean Drive  
Sunnyvale, CA 94089  
USA

Telefono: + 1 408 541 4191 Fax: + 1 408 541 4192 [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com)



Cepheid Europe SAS  
Vira Solelh  
81470 Maurens-Scopont  
France

Telefono: + 33 563 825 300 Fax: + 33 563 825 301



Cepheid Switzerland GmbH  
Zürcherstrasse 66  
Postfach 124, Thalwil  
CH-8800  
Switzerland



Cepheid Switzerland GmbH  
Zürcherstrasse 66  
Postfach 124, Thalwil  
CH-8800  
Switzerland



## 27 Cronologia delle revisioni

**Descrizione delle modifiche:** 302-0742, da Rev. C a Rev. D

**Finalità:** per aderire alla Swiss IVDO (ordinanza svizzera sui dispositivi per uso diagnostico in vitro)

Sezione	Descrizione della modifica
6.3	Aggiunta di materiali consigliati ma non forniti.
26	Aggiunta dei simboli REP e Importatore per la Svizzera e descrizioni nella tabella dei simboli. Aggiunta dei simboli REP e Importatore per la Svizzera e indirizzo in Svizzera.