Istruzioni per l'uso

BCR-ABL Dx ELITe MGB® Kit

---

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e la Real-Time PCR

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTSG07ING

UDI 08033891487485

CE 0123

IVD

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Revisione	Notifiche dei cambiamenti	Data (dd/mm/yy)
03	Aggiornamento dei paragrafi 11.10 e 11.11: correzione refusi Estensione della validità del prodotto dopo apertura Aggiornamento del paragrafo “Avvertenze per gli utilizzatori”	27/08/25
02	Aggiornamento del paragrafo “Symboli” con il simbolo “Consultare le istruzioni per l’uso” Aggiornamento dei paragrafi 9.2 e 10.2: durata sessione di analisi del controllo positivo Aggiornamento dei paragrafi 11.4 e 11.5: indicazioni in merito alla concentrazione degli interferenti nel test Aggiornamento dei paragrafi 11.10 e 11.11: differente esposizione dei risultati	30/01/25
01	Nuovo sviluppo di prodotto	26/07/24

NOTA
La revisione di questa IFU è compatibile anche con la versione precedente del kit

INDICE

1 USO PREVISTO 4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO 4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO 5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO 6
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO 6
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI 6
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI 8
8 CAMPIONI E CONTROLLI 9
9 PROCEDURA ELITe InGenius 12
10 PROCEDURA ELITe BeGenius 20
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI 26
12 BIBLIOGRAFIA 49
13 LIMITI DELLA PROCEDURA 49
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI 50
15 LEGENDA DEI SIMBOLI 53
16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE 54
17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA 54
Appendix A QUICK START GUIDE 55

1 USO PREVISTO

Il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico diagnostico in vitro destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come test di trascrizione inversa e Real-Time PCR qualitativa multiplex degli acidi nucleici estratti da campioni clinici, per la rilevazione dell'mRNA del riarrangiamento *BCR*:: *ABL* (BCR-ABL) e l'identificazione delle principali varianti.

Il saggio permette di rilevare e identificare **p190 e1a2**, **p195 e6a2**, **p200 e8a2**, **p210 e13a2** ed **e14a2** (discriminazione attraverso l'analisi di melting), **p230 e19a2** nella prima reazione e **p190 e1a3**, **p195 e6a3**, **p200 e8a3**, **p210 e13a3** ed **e14a3** (discriminazione attraverso l'analisi di melting), **p230 e19a3** nella seconda reazione.

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da campioni di leucociti da sangue periferico (PBL, peripheral blood leukocyte).

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi di leucemia *BCR*::*ABL* positiva in pazienti con sospetto di leucemia causata dal riarrangiamento *BCR*::*ABL*.

I risultati devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una trascrizione inversa e Real-Time PCR (metodica One-Step) qualitativa multiplex per la rilevazione e identificazione dell'mRNA delle principali isoforme di BCR-ABL, a partire dall'RNA totale isolato dai campioni di PBL, retro-trascritto e amplificato in due reazioni, utilizzando le miscele complete di reazione **BCR-ABL a2** e **BCR-ABL a3** che contengono primers e sonde con tecnologia ELITe MGB.

Tabella 1

Isoforme mRNA BCR-ABL rilevate		
	BCR-ABL a2 PCR Mix	**BCR-ABL a3 PCR Mix**
p190	**e1a2**	**e1a3**
p195	**e6a2**	**e6a3**
p200	**e8a2**	**e8a3**
p210 (discriminazione con analisi melting)	**e13a2**	**e13a3**
	e14a2	**e14a3**
p230	**e19a2**	**e19a3**

Le sonde ELITe MGB sono attivate quando ibridano con i prodotti specifici della PCR. **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm).

Nelle sonde ELITe MGB i fluorofori non emettono segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza. Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può esse utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** fornisce i seguenti componenti:

- **BCR-ABL a2 PCR Mix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata per PCR, che contiene i primers e le sonde specifici per:
  - p190 e1a2 mRNA, rilevato nel canale **p190a2**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo FAM,
  - p195 e6a2 mRNA, rilevato nel canale **p195a2**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor®593 (AP593)
  - p200 e8a2 mRNA, rilevato nel canale **p200a2**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 559 (AP559)
  - p210 e13a2 e e14a2 mRNAs, rilevato nel canale **p210a2**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 639 (AP639),
  - p230 e19a2 mRNA, rilevato nel canale **p230a2**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 690 (AP690),
  - ABL mRNA, controllo interno endogeno, rilevato nel canale **ICa2**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 525 (AP525).

  La **BCR-ABL a2 PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica.
- **BCR-ABL a3 PCR Mix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata per PCR, che contiene i primers e le sonde specifici per:
  - p190 e1a3 mRNA, rilevato nel canale **p190a3**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo FAM,
  - p195 e6a3 mRNA, rilevato nel canale **p195a3**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 593 (AP593),
  - p200 e8a3 mRNA, rilevato nel canale **p200a3**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 559 (AP559),
  - p210 e13a3 e e14a3 mRNAs, rilevato nel canale **p210a3**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 639 (AP639),
  - p230 e19a3 mRNA, detected in Channel **p230a3**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 690 (AP690),
  - ABL mRNA, controllo interno endogeno, rilevato nel canale **ICa3**, la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall' Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor 525 (AP525).

  La **BCR-ABL a3 PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica.
- **RT EnzymeMix,** una miscela ottimizzata e stabilizzata di enzimi per trascrizione inversa

Il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** consente di effettuare **48 test in associazione con ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** utilizzando rispettivamente 20 µL di PCR Mix e 0,3 µL di RT EnzymeMix per reazione.

Il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** può essere anche utilizzato in associazione con strumenti equivalenti.

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 2

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
BCR-ABL a2 PCR Mix cod. RTSG07INGA2	Miscela di reagenti per la trascrizione inversa e Real-Time PCR, in provetta con **tappo BIANCO**	**2 x 600 µL**	-
BCR-ABL a3 PCR Mix cod. RTSG07INGA3	Miscela di reagenti per la trascrizione inversa e Real-Time PCR, in provetta con **tappo GIALLO**	**2 x 600 µL**	-
RT EnzymeMix cod. RTS003-RT	Trascrittasi inversa in provetta con **tappo con inserto NERO**	**2 x 20 µL**	-

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~3,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (intervallo di volume: 0,5-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Provette Sarstedt da 15 mL con tappo a vite (es. Sarstedt cod. 62.554.502).
- Provette Sarstedt da 50 mL con tappo a vite (es. Sarstedt cod. 62.547.254).
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione dell'RNA dai campioni da analizzare, i controlli positivo e negativo di amplificazione e i materiali di consumo **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti:

Tabella 3

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) **ELITe InGenius Software** versione 1.3.0.19 (o successiva) **BCR-ABL a2 ELITe _PC** **BCR-ABL a3 ELITe _PC** Assay Protocols (Protocolli di Saggio) con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo **BCR-ABL a2 ELITe _NC** **BCR-ABL a3 ELITe _NC** Assay Protocols con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo **BCR-ABL a2 ELITe _PBL_200_100** **BCR-ABL a3 ELITe _PBL_200_100** Assay Protocols con i parametri per l'analisi dei campioni di PBL.	**ELITe InGenius SP RNA** (EG SpA, cod. INT034SPRNA). **ELITe InGenius DNase I** (EG SpA, cod. INT034DNASE). **Alternative Caps For Extraction Tubes** (EG SpA, cod. 925-CAP) solo con ELITe InGenius (facoltativi). **ELITe InGenius DNase tube adapter Kit** (EG S.p.A. cod. G6431-000). **BCR-ABL Dx - ELITe Positive Control** (EG SpA, cod. CTRG07ING). **Cell Lysis Solution** (Promega, cod. A7933 o reagente equivalente). **RNA Lysis Buffer** (Promega, cod. Z3051 o reagente equivalente). **Thioglycerol** (Promega, cod. A208B-C o reagente equivalente). Materiali di consumo per **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** (vedere i Manuali di Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
ELITe BeGenius (EG SpA, cod. INT040) **ELITe BeGenius Software** versione 2.2.1 (o successiva) **BCR-ABL a2 ELITe _Be_PC** **BCR-ABL a3 ELITe _Be_PC** Assay Protocols con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo **BCR-ABL a2 ELITe _Be_NC** **BCR-ABL a3 ELITe _Be_NC** Assay Protocols con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo **BCR-ABL a2 ELITe _Be_PBL_200_100** **BCR-ABL a3 ELITe _Be_PBL_200_100** Assay Protocols con i parametri per l'analisi dei campioni di PBL.	

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso *in vitro*.

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

- Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.
- Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).
- Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.
- Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.
- Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.
- Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.
- Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.
- Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
- Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare devono essere eseguite da personale qualificato e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, soprattutto a causa della degradazione degli acidi nucleici contenuti nei campioni o della contaminazione dei campioni stessi da parte di prodotti di amplificazione.

Utilizzare camici, guanti e strumenti per la preparazione delle sessioni di lavoro.

I campioni devono essere idonei e, se possibile, specifici per questo tipo di analisi. Manipolare i campioni sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei campioni solo per questo specifico scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei reagenti unicamente per questo scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i campioni estratti in modo tale da ridurne quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

Gestire le cassette di PCR (PCR Cassette) in modo tale da ridurre quanto più possibile la diffusione dei prodotti di amplificazione nell'ambiente come pure la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 4

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/ scongelamento
BCR-ABL a2 PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro 60 giorni	fino a cinque
BCR-ABL a3 PCR Mix			
RT EnzymeMix	-20 °C o inferiore	entro 60 giorni	fino a dieci volte, per un massimo di dieci minuti a +2 / +8 °C

8 CAMPIONI E CONTROLLI

8.1 Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato su **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** con i seguenti campioni clinici identificati e gestiti secondo le linee guida di laboratorio e raccolti, trasportati e conservati nelle seguenti condizioni:

Tabella 5

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)
Sangue periferico	Raccolto in EDTA o sodio citrato	entro 24 ore e non oltre 48 ore

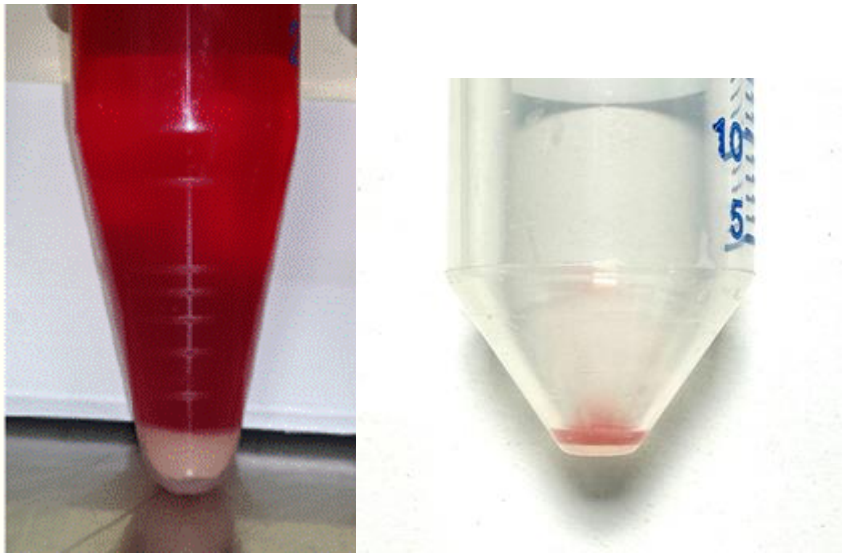
NOTA
Non congelare il sangue periferico per evitare la degradazione del RNA.

Al ricevimento del campione di Sangue Periferico, è necessario separare i leucociti seguendo queste indicazioni.

Tabella 6

	A. Metodo di Pre-trattamento per l'isolamento dei Leucociti mediante Buffy Coat	B. Metodo di Pre-trattamento per l'isolamento dei Leucociti mediante Lisi Diretta
1	Preparare i tubi da 15 mL e da 2 mL necessari, identificandoli con un pennarello indelebile.	Preparare i tubi da 50 mL e da 2 mL necessari, identificandoli con un pennarello indelebile.
2	Non applicabile	Dispensare **Cell Lysis Solution** (Promega, cod. A7933) in un tubo da 50 mL: **15 mL** se si parte da 5 mL di sangue o **30 mL** se si parte da 10 mL di sangue (rapporto 3:1).
3	Miscelare per inversione i campioni di sangue periferico raccolto in EDTA o Sodio Citrato.	
4	Trasferire **5 - 10 mL di sangue periferico** nel tubo da 15 mL.	Trasferire **5 - 10 mL di sangue periferico** nel tubo da 50 mL.
5	Centrifugare per **10 minuti a 3,000 RCF** (senza freno).	Non applicabile
6	Dispensare **5 mL di Cell Lysis Solution** (Promega, ref. A7933) in un nuovo tubo da 15 mL.	Non applicabile

Tabella 6 (segue)

<table>
<tr><th></th><th>A. Metodo di Pre-trattamento per l'isolamento dei Leucociti mediante Buffy Coat</th><th>B. Metodo di Pre-trattamento per l'isolamento dei Leucociti mediante Lisi Diretta</th></tr>
<tr><td>7</td><td>Prelevare con una pipetta da 1 mL il buffy coat ottenuto dopo la centrifugazione e trasferirlo nel tubo da 15 mL contenente Cell Lysis Solution, aspirando e rilasciando fino a quando la pipetta non risulterà priva di materiale residuo.</td><td>Non applicabile</td></tr>
<tr><td>8</td><td colspan="2">Incubare a temperature ambiente per 10 minuti, mescolando per inversione (no vortex) almeno 3-4 volte.</td></tr>
<tr><td>9</td><td colspan="2">Centrifugare per 10 minuti a 3,000 RCF.</td></tr>
<tr><td>10</td><td colspan="2">NOTA
Il quantitativo ideale di cellule è rappresentato, in scala 1:1, nella figura seguente.

• se il deposito di cellule è simile o inferiore a quello in figura, rimuovere il surnatante, risospendere le cellule in 1.5 mL di Cell Lysis Solution e trasferire la sospensione in un tubo da 2.0 mL.
• se il deposito di cellule è superiore a quello in figura, rimuovere il surnatante, risospendere le cellule in 3 mL di Cell Lysis Solution e trasferire 1.5 mL di sospensione in due diversi tubi da 2.0 mL.</td></tr>
<tr><td>11</td><td colspan="2">Centrifugare nuovamente per circa 2 minuti a 3,000 RCF.</td></tr>
<tr><td>12</td><td colspan="2">Rimuovere delicatamente il surnatante (attenzione a rimuovere completamente i residui di globuli rossi sopra al deposito di globuli bianchi).</td></tr>
<tr><td>13</td><td colspan="2">Lisare il deposito di globuli bianchi in 200 µL di Homogenization Solution (1 mL of RNA Lysis Buffer, Promega, ref. Z3051 + 20 µL of 1-Thioglycerol, Promega, Ref. A208B-C) pipettando.</td></tr>
</table>

Il lisato di PBL può essere utilizzato immediatamente oppure conservato nelle seguenti condizioni:

Tabella 7

Campione	Buffer richiesto	Condizioni di conservazione	
		-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
PBL lysate	Homogenization Solution	≤ 1 mese	≤ 1 mese

Per eseguire l'analisi dei campioni su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**, è necessario utilizzare gli Assay Protocols di seguito indicati. Questi protocolli di saggio IVD sono stati validati per l'uso specifico con i kit ELITe MGB e **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** con le matrici indicate.

Tabella 8

Assay Protocols per BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit				
Campione	**Strumento**	**Nome Assay Protocol**	**Report**	**Caratteristiche**
PBL	**ELITe InGenius**	**BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100**	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
		BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100		
	ELITe BeGenius	**BCR-ABL a2 ELITe_Be_PBL_ 200_100**		
		BCR-ABL a3 ELITe_Be_PBL_ 200_100		

Per tutti i protocolli, 200 µL di **campione pretrattato** devono essere utilizzati nel seguente modo:

- per ELITe InGenius, trasferire il PBL lisato dal tubo da 2.0 mL in un **Extraction tube** (evitare la formazione di bolle durante il trasferimento),
- per ELITe BeGenius, utilizzare direttamente la provetta da 2.0 mL contenente PBL lisato.

NOTA

Prima di introdurre i campioni pretrattati sullo strumento, centrifugare per 5 secondi e tenere in ghiaccio o in blocco refrigerato. Quando si utilizza l'**Extraction tube** è raccomandato anche l'utilizzo del tappo dedicato (EG SpA, ref. 925-CAP).

NOTA

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell'**Extraction Tube** potrebbe **generare contaminazione**. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni riportate nella sezione 7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI pagina 8.

Gli acidi nucleici purificati possono essere lasciati a temperatura ambiente per 16 ore e conservati a -20 °C o temperatura inferiore per periodi non più lunghi di un mese.

I dati relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo 11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione pagina 30 al capitolo 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 26.

8.2 Controlli di PCR

È obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- come Controllo Positivo di PCR, utilizzare i **BCR-ABL a2 Positive Control** e **BCR-ABL a3 Positive Control**, componenti del prodotto **BCR-ABL Dx - ELITe Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione rispettivamente con gli Assay Protocols **BCR-ABL a2 ELITe_PC** o **BCR-ABL a2 ELITe_Be_PC** e **BCR-ABL a3 ELITe_PC** o **BCR-ABL a3 ELITe_Be_PC**.
- come Controllo Negativo di PCR, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita con in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **BCR-ABL a2 ELITe_NC** o **BCR-ABL a2 ELITe_Be_NC** e **BCR-ABL a3 ELITe_NC** o **BCR-ABL a3 ELITe_Be_NC**.

NOTA

ELITe InGenius ed **ELITe BeGenius** richiedono risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR.

La validazione dei risultati dei controlli di PCR, approvati e memorizzati nel database, scade dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi.

Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere ritestati nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi 8.3 Controlli di qualità pagina 12) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** deve essere sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

8.3 Controlli di qualità

Si consiglia la verifica programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni d'archivio o materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali.

9 PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** con **ELITe InGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 9

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
		C) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati dei campioni
		3) Refertazione dei risultati dei campioni

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**BCR-ABL a2 Positive Control, BCR-ABL a2 Negative Control, BCR-ABL a3 Positive Control, BCR-ABL a3 Negative Control**) siano approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** (**BCR-ABL a2 PCR Mix** e **BCR-ABL a3 PCR Mix**) da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9).

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

9.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITe InGenius** per eseguire:

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),

C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol.

NOTA

Con il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit**, nella sessione di tipo A o B, devono essere eseguite due reazioni di PCR per ogni campione: una con **BCR-ABL a2 PCR Mix** (per le isoforme a2 di BCR-ABL) e l'altra con **BCR-ABL a3 PCR Mix** (per le isoforme a3 di BCR-ABL). In ciascuna sessione su ELITe InGenius può essere analizzato un massimo di 6 campioni.

NOTA

ELITe InGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

1. Scongelare le provette necessarie di **BCR-ABL a2 PCR Mix** (tappo BIANCO) e **BCR-ABL a3 PCR Mix** (tappo GIALLO) a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente le provette per 10 secondi, ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare in ghiaccio o in blocco refrigerato.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

2. Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o in blocco refrigerato.

NOTA

Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

3. Preparare una provetta da 2 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005, non fornito con il kit) per ciascuna **miscela completa di reazione** e contrassegnarla con un pennarello a inchiostro indelebile.
4. Calcolare i volumi di **BCR-ABL a2 PCR Mix, BCR-ABL a3 PCR Mix** e **RT EnzymeMix** necessari per preparare le **miscele complete di reazione** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Tabella 10

Numero di campioni (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix e BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

5. Preparare le **miscele complete di reazione** aggiungendo nella provetta da 2 mL i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte. Centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o blocco freddo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** deve essere utilizzata entro **7 ore** se conservata nel blocco refrigerato (per 2 sessioni di lavoro da 3.5 ore ciascuna). La miscela completa di reazione **non** può essere conservata per il riutilizzo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

6. Partendo da un lisato di PBL (**setup A**), per ogni campione eseguire una reazione integrata (modalità “Extract + PCR”) con **BCR-ABL a2 PCR Mix** e una reazione di sola amplificazione (modalità “PCR Only”) con **BCR-ABL a3 PCR Mix**.
7. Partendo dal RNA estratto (**setup B**), per ogni campione eseguire due reazioni di sola amplificazione (modalità “PCR Only”) rispettivamente con **BCR-ABL a2 PCR Mix** e **BCR-ABL a3 PCR Mix**.

NOTA

È consigliabile creare un templato sullo strumento per facilitare l’allestimento della sessione (Consultare il manuale dello strumento).

Per l’impostazione dei tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 11

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	**B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)**	**C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)**
1	**Identificare i campioni pretrattati** e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco refrigerato. Per l’analisi, 200 µL di campione devono essere trasferiti in un Extraction tube (tubo di estrazione) precedentemente etichettato.	**Scongelare** a temperatura ambiente gli **Elution tube** (Provetta con eluato) con i campioni di acidi nucleici estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	**Scongelare** le provette di **Controllo Positivo** (a2 e a3) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni).
2	Non applicabile	Non applicabile	**Preparare il Controllo Negativo** (a2 e a3) trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube (Provetta eluato), fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**” (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**” (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**” (Esegui sessione).
4	Verificare che l’“Extraction Input Volume” (volume estrazione input) sia 200 µL e che l’”Extracted Elute Volume” (volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l’“Extraction Input Volume” (volume estrazione input) sia 200 µL e che l’”Extracted Elute Volume” (volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l’“Extraction Input Volume” (volume estrazione input) sia 200 µL e che l’”Extracted Elute Volume” (volume di eluato estratto) sia 100 µL.
5	Per ogni campione, assegnare un “Track” d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un “Track” d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Non applicabile

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
6	Nella colonna “Assay” (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9): per ciascun campione assegnare l’ Assay Protocol a2 e l’ Assay Protocol a3 nel track successivo.	Nella colonna “Assay” (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9): per ciascun eluato assegnare l’ Assay Protocol a2 e l’ Assay Protocol a3 nel track successivo.	Nella colonna “Assay” (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (a2 e a3, si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9) e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di Positive Control e Negative Control (acqua per biologia molecolare).
7	Per l'Assay Protocol a2: verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia “Extract + PCR" e nella colonna “Sample Position” (Posizione campione) selezionare “Extraction Tube”.	Per l'Assay Protocol a2: nella colonna "Protocol" (Protocollo) selezionare il protocollo “PCR Only" e nella colonna “Sample Position” (Posizione campione) selezionare “Eluition Tube”.	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
8	Per l'Assay Protocol a3: nella colonna "Protocol" selezionare il protocollo “PCR Only” e nella colonna “Sample Position” selezionare il track del campione.	Per l'Assay Protocol a3: nella colonna "Protocol" selezionare il protocollo “PCR Only" e nella colonna “Sample Position” selezionare il track dell’eluato.	Verificare nella colonna “Sample Position” che la posizione sia “Elution Tube”.
9	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
10	Caricare le miscele complete di reazione nell’ “Inventory Block” (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare le miscele complete di reazione nell’ “Inventory Block” (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare le miscele complete di reazione nell’ “Inventory Block” (Area reagenti) selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
12	Nell’"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).	Nell’"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).	Nell’"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).
13	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
14	Caricare le PCR cassette, le cartucce di estrazione “ELITe InGenius SP RNA”, i vials di “ELITe InGenius DNase I” (senza tappo) tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le PCR cassette e gli Elution tube con i campioni da analizzare.	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
15	Nella schermata DNase I, inserire “DNase I” come “Reagent Name”, e inserire numero di lotto e data di scadenza.	Non applicabile	Non applicabile
16	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
17	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
18	Premere “Start” (Inizio).	Premere “Start” (Inizio).	Premere “Start” (Inizio).

Dopo il completamento della procedura, **ELITe InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

La **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di lavoro da 3.5 ore ciascuna). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva. La miscela completa di reazione **non** può essere conservata per il riutilizzo.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

NOTA

I **BCR-ABL a2 Positive Control** e **BCR-ABL a3 Positive Control** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

9.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITe InGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

Con il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit**, devono essere eseguite due reazioni di PCR per ogni campione: una con **BCR-ABL a2 PCR Mix** (per le isoforme a2 di BCR-ABL) e l'altra con **BCR-ABL a3 PCR Mix** (per le isoforme a3 di BCR-ABL). Devono essere analizzati i risultati di entrambe le amplificazioni.

NOTA

ELITe InGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITe InGenius genera i risultati del prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

9.3.1 Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

Il **software ELITe InGenius** interpreta i risultati di PCR dei target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri inclusi negli Assay Protocol **BCR-ABL a2 ELITe_PC**, **BCR-ABL a3 ELITe_PC**, **BCR-ABL a2 ELITe_NC** e **BCR-ABL a3 ELITe_NC.** I valori di Ct e Tm ottenuti sono utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del **Controllo Positivo** e **Controllo Negativo**, specifici per il lotto del reagente di PCR, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o “Analyst”, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni.**

I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal **software ELITe InGenius** per impostare i grafici di controllo che monitorano le prestazioni delle fasi di amplificazione. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento.

NOTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata “Controls” appare il messaggio "Fallito" che ne impedisce l’approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo.

NOTA

Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono amplificati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l’amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

9.3.2 Validazione dei risultati dei campioni

Il **software ELITe InGenius** interpreta i risultati di amplificazione dei target (Canali **p190a2**, **p195a2**, **p200a2**, **p210a2**, **p230a2**) e del controllo Interno (Canale **ICa2**) con i parametri inclusi nell’Assay Protocol **BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100,** e dei target (Canali **p190a3**, **p195a3**, **p200a3**, **p210a3**, **p230a3**) e del controllo Interno (Canale **ICa3**) con i parametri inclusi nell’Assay Protocol **BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100.**

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display”.

La sessione del campione può essere approvata quando sono soddisfatte le condizioni riportate nelle tabelle sottostanti.

Tabella 12

Saggio con BCR-ABL a2 PCR Mix	
1) Controllo Positivo	**Status**
BCR-ABL a2 Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	**Status**
BCR-ABL a2 Negative Control	APPROVATO

Tabella 13

Saggio con BCR-ABL a3 PCR Mix	
1) Controllo Positivo	**Status**
BCR-ABL a3 Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	**Status**
BCR-ABL a3 Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dal **software ELITe InGenius** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol. La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se gli RNA target sono stati rilevati o non rilevati.

Tabella 14

Saggio con BCR-ABL a2 PCR Mix	
Risultato di una sessione sul campione	**Interpretazione**
p190a2:RNA Rilevato e1a2	L'**mRNA** di **p190 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e1a2**.
p190a2:RNA Rilevato Typing not determined	L' **mRNA** di **p190 è stato rilevato** ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p190a2:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L' **mRNA** di **p190 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p200a2:RNA Rilevato e8a2	L' **mRNA** di **p200 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e8a2**.
p200a2:RNA Rilevato Typing not determined	L' **mRNA** di **p200** è stato rilevato ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p200a2:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L' **mRNA** di **p200 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p195a2:RNA Rilevato e6a2	L' **mRNA** di **p195 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e6a2**.
p195a2:RNA Rilevato Typing not determined	L'**mRNA** di **p195** è stato rilevato ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p195a2:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L'**mRNA** di **p195 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p210a2:RNA Rilevato e13a2	L'**mRNA** di **p210 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e13a2**.
p210a2:RNA Rilevato e14a2	L'**mRNA** di **p210 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e14a2**.
p210a2:RNA Rilevato e13a2 e14a2	L'**mRNA** di **p210 è stato rilevato** nel campione. Entrambe le isoforme, **e13a2** ed **e14a2**, sono presenti.
p210a2:RNA Rilevato Typing not determined	L' **mRNA** di **p210** è stato rilevato ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p210a2:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L'**mRNA** di **p210 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p230a2:RNA Rilevato e19a2	L' **mRNA** di **p230 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e19a2**.
p230a2:RNA Rilevato Typing not determined	L' **mRNA** di **p230 è stato rilevato** ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p230a2:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L' **mRNA** di **p230 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
Non valido-Ripeti test su campione	Risultato del saggio **non valido** per un errore del controllo interno. Il test deve essere ripetuto.

Tabella 15

Saggio con BCR-ABL a3 PCR Mix	
Risultato di una sessione sul campione	**Interpretazione**
p190a3:RNA Rilevato e1a3	L'**mRNA** di **p190 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e1a3**.
p190a3:RNA Rilevato Typing not determined	L'**mRNA** di **p190** è stato rilevato ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p190a3:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L'**mRNA** di **p190 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p200a3:RNA Rilevato e8a3	L'**mRNA** di **p200 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e8a3**.
p200a3:RNA Rilevato Typing not determined	L'**mRNA** di **p200** è stato rilevato ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p200a3:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L'**mRNA** di **p200 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p195a3:RNA Rilevato e6a3	L'**mRNA** di **p195 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e6a3**.
p195a3:RNA Rilevato Typing not determined	L'**mRNA** di **p195** è stato rilevato ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p195a3:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L'**mRNA** di **p195 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p210a3:RNA Rilevato e13a3	L'**mRNA** di **p210 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e13a3**.
p210a3:RNA Rilevato e14a3	L'**mRNA** di **p210 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e14a3**.
p210a3:RNA Rilevato e13a3 e14a3	L'**mRNA** di **p210 è stato rilevato** nel campione. Entrambe le isoforme, **e13a3** ed **e14a3**, sono presenti.
p210a3:RNA Rilevato Typing not determined	L'**mRNA** di **p210 è stato rilevato** ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p210a3:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L'**mRNA** di **p210 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
p230a3:RNA Rilevato e19a3	L'**mRNA** di **p230 è stato rilevato** nel campione. L'isoforma è **e19a3**.
p230a3:RNA Rilevato Typing not determined	L'**mRNA** di **p230 è stato rilevato** ma l'analisi della Tm non è stata possibile.
p230a3:RNA Non rilevato o inferiore LoD	L'**mRNA** di **p230 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione del saggio (LoD).
Non valido-Ripeti test su campione	Risultato del saggio **non valido** per un errore del controllo interno. Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato "Invalido-Ripetere il campione": in questo caso, l'RNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, pretrattamento, estrazione, retrotrascrizione o amplificazione (es.errato campionamento, degradazione o perdita di RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato tal quale oppure diluito mediante una sessione di amplificazione in modalità “PCR Only”. In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall’estrazione di una nuova aliquota in modalità “Extract + PCR” (vedi 14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 50).

I campioni segnalati come “**pXXXxx: RNA Rilevato Typing not determined**” non sono idonei per la l’analisi di melting. In questo caso un Ct è stato rilevato ma la Tm non è stata rilevata o si trova al di fuori dei limiti prestabiliti, a causa di problemi nella fase di campionamento, pretrattamento, estrazione, retrotrascrizione o amplificazione (es.errato campionamento, degradazione o perdita di RNA durante l’estrazione o presenza di inibitori nell’eluato), che possono generare risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato tal quale oppure diluito mediante una sessione di amplificazione in modalità “PCR Only”. In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall’estrazione di una nuova aliquota in modalità “Extract + PCR” (vedi 14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 50).

I campioni segnalati come “**pXXXxx: RNA Non rilevato o inferiore a LoD**”, sono idonei per l’analisi, ma non è stato possibile rilevare l’RNA di BCR ABL. In tal caso non si può escludere che l’RNA di BCR ABL sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi 14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 50).

NOTA

Nel caso di co-espressione di più isoforme, la variante secondaria dovrebbe essere diagnosticata solo se i livelli di espressione risultano paragonabili all’isoforma principale (vedere N.P.C. Cross et al. 2023), diversamente dovrebbe essere diagnosticata solo l’isoforma principale (Ct inferiore).

NOTA

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri esiti di laboratorio riguardanti il paziente.

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Results Display) da personale avente la qualifica di "Administrator" o “Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Dalla finestra “Results Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

9.3.3 Refertazione dei risultati dei campioni

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati o esportati sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per campione selezionato (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per track selezionato.

Il "Sample Report" e il "Track Report" possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** con **ELITe BeGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 16

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
		C) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tabella 16 (segue)

FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati dei campioni
		3) Refertazione dei risultati dei campioni

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità “**CLOSED**”,
- nella sezione “Controls” della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**BCR-ABL a2 Positive Control**, **BCR-ABL a2 Negative Control**, **BCR-ABL a3 Positive Control**, **BCR-ABL a3 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** (**BCR-ABL a2 PCR Mix** e **BCR-ABL a3 PCR Mix**) da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9).

Se l’Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITe BeGenius** per eseguire:

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR),

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only),

C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell’Assay Protocol disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui lo si seleziona.

NOTA

Con il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit**, nella sessione di tipo A o B, devono essere eseguite due reazioni di PCR per ogni campione: una con **BCR-ABL a2 PCR Mix** (per le isoforme a2 di BCR-ABL) e l’altra con **BCR-ABL a3 PCR Mix** (per le isoforme a3 di BCR-ABL). In ciascuna sessione su ELITe BeGenius può essere analizzato un massimo di 12 campioni.

NOTA

ELITe BeGenius può essere collegato al “Laboratory Information System” (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d’istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

1. Scongelare le provette necessarie di **BCR-ABL a2 PCR Mix** (tappo BIANCO) e **BCR-ABL a3 PCR Mix** (tappo GIALLO) a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente le provette per 10 secondi, ripetendo l’operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

2. Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

3. Preparare una provetta da 2 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005, non fornito con il kit) per la **miscela completa di reazione** e contrassegnarla con un pennarello a inchiostro permanente.
4. Calcolare i volumi di **BCR-ABL a2 PCR Mix**, **BCR-ABL a3 PCR Mix** e **RT EnzymeMix** necessari per preparare le **miscele complete di reazione** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Tabella 17

Numero di campioni (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix e BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL
13 ≤ N ≤ 18	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0,3 µL
19 ≤ N ≤ 23	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0,3 µL
N = 24	580 µL	8,7 µL

5. Preparare le **miscele complete di reazione** aggiungendo nella provetta da 2 mL i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte. Centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o blocco freddo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** deve essere utilizzata entro **7 ore** se conservata nel blocco refrigerato (per 2 sessioni di lavoro da 3.5 ore ciascuna). La miscela completa di reazione **non** può essere conservata per il riutilizzo.

NOTA

La **miscela completa di reazione** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

6. Partendo da un lisato di PBL (**setup A**), per ogni campione eseguire una reazione integrata (modalità “Extract + PCR”) **con BCR-ABL a2 PCR Mix** e una reazione di sola amplificazione (modalità “PCR Only”) con **BCR-ABL a3 PCR Mix**.
7. Partendo dal RNA estratto (**setup B**), per ogni campione eseguire due reazioni di sola amplificazione (modalità “PCR Only”) rispettivamente con **BCR-ABL a2 PCR Mix** e **BCR-ABL a3 PCR Mix**.

NOTA

È consigliabile creare un templato sullo strumento per facilitare l’allestimento della sessione (Consultare il manuale dello strumento).

Per l’impostazione dei tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 18

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	**Identificare i campioni pretrattati** e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Per l'analisi, 200 µL di campione pretrattato devono essere in un Tubo Sarstedt da 2 mL.	**Scongelare** a temperatura ambiente gli **"Elution tube"** (Provetta con eluato) con i campioni di acidi nucleici estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	**Scongelare** le provette di **Controllo Positivo** (a2 e a3) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni).
2	Non applicabile	Non applicabile	**Preparare** il **Controllo Negativo** (a2 e a3) trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "**Elution tube**" (Provetta con eluato), fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**" (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**" (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare "**Perform Run**" (Esegui sessione).
4	Rimuovere tutti i **Racks** dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i **Racks** dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i **Racks** dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5	Selezionare il "Run mode": "**Extract + PCR"**.	Selezionare il "Run mode": "**PCR Only**".	Selezionare il "Run mode": "**PCR Only**".
6	**Caricare i campioni** nel "**Sample Rack**" (Rack campioni). Quando si utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack	**Caricare gli eluati** dei campioni estratti nell'**"Elution Rack"** (Rack di eluizione).	**Caricare** le provette di **Controllo Positivo** e di **Controllo Negativo** nell' "Elution Rack" (Rack di eluizione).
7	Inserire il "**Sample Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (ID campione, SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il "Sample ID").	Inserire l'"**Elution Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (ID campione, SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".	Inserire l'"**Elution Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare "Reagent name", "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
8	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
9	Verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.	Non applicabile	Non applicabile
10	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli **Assay Protocol** da utilizzare (si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9): ad ogni campione assegnare entrambi gli Assay Protocol a2 (Extract + PCR) ed a3 (PCR Only).	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli **Assay Protocol** da utilizzare (si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9): ad ogni eluato assegnare entrambi gli Assay Protocol a2 ed a3.	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli **Assay Protocol** da utilizzare (a2 ed a3, si veda paragrafo 8 CAMPIONI E CONTROLLI pagina 9)

Tabella 18 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
12	Caricare gli "**Elution tube**" (Provetta eluato) nell'"**Elution Rack**" (Rack di eluizione).	Non applicabile	Non applicabile
13	Inserire l'"**Elution Rack**" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando "Lane 2" (L2).	Non applicabile	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile	Non applicabile
15	Caricare le miscele complete di reazione nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare le miscele complete di reazione nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare le miscele complete di reazione nel "Reagent/Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Per ogni PCR MIX inserire "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Per ogni PCR MIX inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Per ogni PCR MIX inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "**Tip Rack**" (Rack Puntali).	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "**Tip Rack**" (Rack Puntali).	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "**Tip Rack**" (Rack Puntali).
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il "**PCR Rack**" con le "**PCR Cassette**" nell' Inventory Area.	Caricare il "**PCR Rack**" con le "**PCR Cassette**" nell'Inventory Area.	Caricare il "**PCR Rack**" con le "**PCR Cassette**" nell'Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
22	Caricare l'"**Extraction Rack**" (rack di estrazione) con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP RNA", i vials di "ELITe InGenius DNase I" (senza tappo) e i consumabili richiesti.	Non applicabile	Non applicabile
23	Nella schermata DNase I, inserire "DNase I" come "Reagent Name", e inserire numero di lotto e data di scadenza.	Non applicabile	Non applicabile
24	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
25	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).

Dopo il completamento della procedura, **ELITe BeGenius** permette di visualizzare, approvare e memorizzare i risultati, e di stampare e salvare il rapporto.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

La **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di lavoro da 3.5 ore ciascuna). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva. La miscela completa di reazione non può essere conservata per il riutilizzo.

NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

NOTA

Il **BCR-ABL a2 Positive Control** e **BCR-ABL a3 Positive Control** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITe BeGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

Con il prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit**, devono essere eseguite due reazioni di PCR per ogni campione: una con **BCR-ABL a2 PCR Mix** (per le isoforme a2 di BCR-ABL) e l'altra con **BCR-ABL a3 PCR Mix** (per le isoforme a3 di BCR-ABL). Devono essere analizzati i risultati di entrambe le amplificazioni.

NOTA

ELITe BeGenius può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITe BeGenius genera i risultati del prodotto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

NOTA

Per i dettagli fare riferimento agli stessi paragrafi della "Procedura" dello strumento **ELITe InGenius**.

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

11.1 Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio è stato definito per BCR-ABL p210 e14a2 sullo strumento ELITe BeGenius testando RNA di riferimento negativo per BCR-ABL, positivizzato a basso titolo con RNA di riferimento positivo per p210 e14a2 (Invivoscribe).

L'analisi di regressione Probit dei dati è stata eseguita sui risultati e il LoD è stato stimato come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 19

Target	LoD		Intervallo di confidenza 95%	
			Limite inferiore	Limite superiore
p210 e14a2	Diluizione	0,0000259	0,0000148	0,0000694
	Log Diluizione	-4,6	-4,8	-4,2

Il mRNA di p210 e14a2 nei campioni positivizzati alla concentrazione di LoD calcolata è stato quantificato ed è risultato corrispondente ad 8 copie / reazione (p210% = 0.0066%). Il valore di LoD calcolato è stato verificato per tutti i target testando con ELITe BeGenius e ELITe InGenius campioni di mRNA negativi per BCR-ABL estratti da PBL e positivizzati con DNA plasmidico (GenScript) per p190 e1a2, p195 e6a2, p210 e13a2, p210 e14a2, p200 e8a2, p230 e19a2, p190 e1a3, p195 e6a3, p210 e13a3, p210 e14a3, p200 e8a3, p230 e19a3 alla concentrazione dichiarata. Dove necessario, la concentrazione dei target è stata incrementata. I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 20

BCR-ABL a2 PCR Mix	
Target	**LoD (copie / reazione)**
p190 e1a2	8
p195 e6a2	8
p200 e8a2	50
p210 e13a2	8
p210 e14a2	8
p230 e19a2	20
BCR-ABL a3 PCR Mix	
Target	**LoD (copie / reazione)**
p190 e1a3	8
p195 e6a3	20
p200 e8a3	50
p210 e13a3	8
p210 e14a3	20
p230 e19a3	50

I valori di LoD riportati in tabella sono stati confermati sia su ELITe BeGenius che su ELITe InGenius.

11.2 Inclusività: Efficienza di rilevazione su differenti isoforme di BCR-ABL

L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione sulle principali isoforme di BCR-ABL, è stata valutata mediante analisi in silico. L'analisi ha mostrato un elevato livello di conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative. Quindi si prevede un'efficiente amplificazione e rilevazione delle isoforme di BCR-ABL.

L'inclusività è stata verificata anche mediante l'analisi di RNA di riferimento negativo per BCR-ABL, positivizzato con RNA sintetici (GenScript) per ogni isoforma a bassa concentrazione. I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 21

BCR-ABL a2 PCR Mix			
Target	**Isoforma**	**Pos. / Rep.**	**Esito**
p190	e1a2	4 / 4	p190:RNA Rilevato e1a2
p195	e6a2	4 / 4	p195:RNA Rilevato e6a2
p200	e8a2	4 / 4	p200:RNA Rilevato e8a2
p210	e13a2	4 / 4	p210:RNA Rilevato e13a2
	e14a2	4 / 4	p210:RNA Rilevato e14a2
p230	e19a2	8 / 8	p230:RNA Rilevato e19a2
BCR-ABL a3 PCR Mix			
Target	**Isoforma**	**Pos. / Rep.**	**Esito**
p190	e1a3	4 / 4	p190:RNA Rilevato e1a3
p195	e6a3	4 / 4	p195:RNA Rilevato e6a3
p200	e8a3	4 / 4	p200:RNA Rilevato e8a3
p210	e13a3	4 / 4	p210:RNA Rilevato e13a3
	e14a3	4 / 4	p210:RNA Rilevato e14a3
p230	e19a3	8 / 8	p230:RNA Rilevato e19a3

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati dal BCR-ABL Dx ELITe ELITe MGB Kit.

11.3 Interferenza tra target

La potenziale interferenza tra i target del saggio è stata valutata con un test di co-amplificazione in RNA di riferimento negativo per BCR-ABL positivizzato con i DNA plasmidici (GenScript) delle isoforme più frequenti.

Per ogni target, la concentrazione più bassa rilevabile in tutti i replicati è stata riportata nella seguente tabella.

Tabella 22

BCR-ABL a2 PCR Mix	
Target principale a 100,000 copie / reazione	**Secondo target a bassa concentrazione**
p190 e1a2	p210 e13a2, 100 copie / reazione
	p210 e14a2, 100 copie / reazione
p210 e13a2	p190 e1a2, 100 copie / reazione
	p210 e14a2, 10.000 copie / reazione

Tabella 22 (segue)

BCR-ABL a2 PCR Mix	
Target principale a 100,000 copie / reazione	**Secondo target a bassa concentrazione**
p210 e14a2	p190 e1a2, 100 copie / reazione
	p210 e13a2, 1.000 copie / reazione
BCR-ABL a3 PCR Mix	
Target principale a 100,000 copie / reazione	**Secondo target a bassa concentrazione**
p190 e1a3	p210 e13a3, 100 copie / reazione
	p210 e14a3, 100 copie / reazione
p210 e13a3	p190 e1a3, 100 copie / reazione
	p210 e14a3, 20.000 copie / reazione
p210 e14a3	p190 e1a3, 100 copie / reazione
	p210 e13a3, 5.000 copie / reazione

Il BCR-ABL Dx ELITe ELITe MGB Kit mostra una minima interferenza tra I target in caso di co-espressione di due delle isoforme più frequenti. In particolare, quando il secondo target è rilevato su un differente canale, il target può essere rilevato anche quando presente ad una concentrazione 1.000 volte inferiore al target principale.

11.4 Markers potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività con altri markers che possono essere presenti nei campioni clinici di sangue periferico è stata valutata per il saggio mediante analisi in silico. L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa con altri markers indesiderati (traslocazioni umane indesiderate, virus, batteri, protozoi e funghi) e pertanto non sono attese cross-reattività.

L'assenza di cross-reattività con potenziali marker interferenti è stata verificata anche attraverso l'analisi di RNA di riferimento negativo per BCR-ABL positivizzato con un pannello di markers indesiderati ad alto titolo (Sigma-Aldrich, Invivoscribe, ATCC, ZeptoMetrix).

I risultati riportati nella seguente tabella sono stati ottenuti sia con BCR-ABL a2 PCR Mix che con BCR-ABL a3 PCR Mix.

Tabella 23

Marker	Positivi / Replicati						Esito
	p190	p200	p195	p210	p230	p190	
Human genomic DNA	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
PML-RARα	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Inv(16)	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
EBV	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
CMV	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HHV-6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HHV-7	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HHV-8	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HIV-1	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività

Tutti i markers potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna cross-reattività utilizzando il BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit.

11.5 Markers potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione causata da altri markers che possono essere presenti nei campioni clinici di sangue periferico è stata valutata attraverso l'analisi di RNA di riferimento negativo per BCR-ABL positivizzato con un pannello di markers indesiderati ad alto titolo (Sigma-Aldrich, Invivoscribe, ATCC, ZeptoMetrix) e con DNA plasmidici (GenScript) per tutti i target.

I risultati riportati nella seguente tabella sono stati ottenuti sia con BCR-ABL a2 PCR Mix che con BCR-ABL a3 PCR Mix.

Tabella 24

Marker	Positivi / Replicati						Esito
	p190	p200	p195	p210 e13	p210 e14	p230	
hgDNA	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
PML-RARα	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Inv(16)	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
EBV	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
CMV	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
HHV-6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
HHV-7	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
HHV-8	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
HIV-1	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza

Tutti i markers potenzialmente interferenti testati non hanno mostrato alcuna inibizione nell’amplificazione dei target utilizzando il BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit.

11.6 Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La cross-reattività di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di sangue periferico è stata valutata per il saggio attraverso l'analisi di campioni simulati negativi per BCR-ABL, addizionati con un pannello di sostanze (Sigma-Aldrich) a concentrazioni rilevanti.

I risultati riportati nella seguente tabella sono stati ottenuti sia con BCR-ABL a2 PCR Mix che con BCR-ABL a3 PCR Mix.

Tabella 25

Sostanza	Positivi / Replicati					Positivi / Replicati
	p190	p200	p195	p210	p230	
Hemoglobin	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Bilirubin	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Triglycerides	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
EDTA	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Heparin	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività

Tabella 25 (segue)

Sostanza	Positivi / Replicati					Positivi / Replicati
	p190	p200	p195	p210	p230	
Ganciclovir	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Abacavir sulfate	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Cidofovir	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Ribavirin	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Amoxicillin + clavulanate	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Cefpodoxime	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Azithromycin	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Ciprofloxacin	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Nessuna cross-reattività

Tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate non hanno mostrato alcuna cross-reattività utilizzando il BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit.

11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici di sangue periferico è stata valutata per il saggio attraverso l'analisi di campioni simulati negativi per BCR-ABL, addizionati con un pannello di sostanze (Sigma-Aldrich) a concentrazioni rilevanti e positivizzati con DNA plasmidici (GenScript) per tutti i target.

I risultati riportati nella seguente tabella sono stati ottenuti sia con BCR-ABL a2 PCR Mix che con BCR-ABL a3 PCR Mix.

Tabella 26

Sostanza	Positivi / Replicati						Positivi / Replicati
	p190	p200	p195	p210 e13	p210 e14	p230	
Hemoglobin	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Bilirubin	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Triglycerides	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
EDTA	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Heparin	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Ganciclovir	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Abacavir sulfate	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Cidofovir	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Ribavirin	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Amoxicillin + clavulanate	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Cefpodoxime	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Azithromycin	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza
Ciprofloxacin	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Nessuna interferenza

Tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate non hanno mostrato alcuna inibizione nell'amplificazione dei target utilizzando il BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit.

11.8 Cross-contaminazione

La possibile cross-contaminazione durante l'analisi è stata valutata per il saggio testando 60 campioni simulati negativi per BCR-ABL alternati a 60 replicati di campioni simulati positivizzati con RNA sintetico di p210 e14a2 (GenScript) alla concentrazione di circa $1x10^{10}$ copies / mL in 5 sessioni.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 27

Campioni	N	Positivi	Negativi	%Concordanza
Positive	60	60	0	100%
Negative	60	0	60	100%

In questo test con BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit non sono state rilevate cross-contaminazioni tra le sessioni, né al loro interno.

11.9 Tasso totale di errore di Sistema

Il tasso totale di errore di sistema per il saggio è stato valutato testando 50 campioni di PBL negativi per BCR-ABL positivizzati con RNA di riferimento (Invivoscribe) di p190 e1a2 a bassa concentrazione.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 28

Campioni	N	Positivi	Negativi	Tasso totale di errore di Sistema
PBL positivizzati a bassa concentrazione	50	50	0	0%

In questo test con BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit, 100% dei campioni di PBL è stato confermato positivo e il tasso totale di errore di sistema è risultato pari allo 0%.

11.10 Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius ed ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni simulati negativi per BCR-ABL o positivizzati con RNA sintetici delle diverse isoforme di BCR-ABL (GenScript) nel modo seguente:

- NEG: campione simulato negativo.
- GROUP A: campione simulato positivo per p190 e1a2, p210 e14a2, p190 e1a3, p210 e14a3.
- GROUP B: campione simulato positivo per p195 e6a2, p210 e13a2, p195 e6a3, p210 e13a3.
- GROUP C: campione simulato positivo per p200 e8a2, p230 e19a2, p200 e8a3, p230 e19a3.

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) su ELITe BeGenius è riportato nella tabella seguente.

Tabella 29

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	29,19	0,38	1,31	69,2	0,23	0,33	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	29,99	0,25	0,85	70,0	0,34	0,48	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	28,73	0,46	1,58	67,5	0,42	0,63	100%
NEG	P210 e13a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	32,11	0,44	1,38	56,5	0,18	0,31	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	29,51	0,62	2,12	66,2	0,16	0,25	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	6	-	-	-	-	-		100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	30,57	0,70	2,29	71,3	0,50	0,70	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	29,83	0,14	0,46	64,0	0,08	0,12	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 29 (segue)

NEG	P195 e6a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	29,85	0,32	1,06	67,5	0,30	0,44	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	28,41	0,27	0,95	67,9	0,17	0,25	100%
NEG	P210 e13a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	29,81	0,53	1,79	57,0	0,20	0,35	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	29,36	0,64	2,19	65,0	0,21	0,32	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	28,94	0,41	1,43	64,9	0,13	0,19	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) con ELITe InGenius è riportato nella tabella seguente.

Tabella 30

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	28,30	0,37	1,31	69,8	0,08	0,12	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	29,13	0,13	0,43	70,8	0,00	0,00	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	28,16	0,26	0,92	68,1	0,11	0,16	100%
NEG	P210 e13a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	31,74	0,26	0,81	57,8	0,41	0,71	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	29,35	0,34	1,15	67,2	0,14	0,21	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	24,09	0,22	0,77	72,0	0,05	0,07	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	28,58	0,53	1,85	64,5	0,06	0,10	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 30 (segue)

NEG	P195 e6a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	28,25	0,10	0,36	68,3	0,10	0,15	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	27,07	0,23	0,86	68,3	0,16	0,24	100%
NEG	P210 e13a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	29,33	0,18	0,60	57,6	0,04	0,07	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	29,19	0,48	1,64	65,1	0,08	0,13	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		6	25,97	0,27	1,04	65,4	0,05	0,08	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) con ELITe BeGenius è riportato nella tabella seguente.

Tabella 31

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	29,38	0,47	1,81	69,2	0,19	0,27	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	30,13	0,31	1,03	70,1	0,62	0,89	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	28,89	0,39	1,36	67,7	0,37	0,55	100%
NEG	P210 e13a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	32,23	0,37	1,16	56,9	0,63	1,10	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	29.52	0.58	1.98	66.1	0.29	0.43	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	30,44	0,53	1,74	71,5	0,44	0,62	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	29,90	0,38	1,27	64,0	0,06	0,10	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 31 (segue)

NEG	P195 e6a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	29,57	0,43	1,44	67,8	0,39	0,58	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	28,22	0,33	1,18	68,0	0,15	0,22	100%
NEG	P210 e13a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	29,68	0,48	1,63	57,1	0,21	0,37	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	29,27	0,65	2,22	65,0	0,20	0,31	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	28,53	0,55	1,92	65,0	0,15	0,23	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) con ELITe InGenius è riportato nella tabella seguente.

Tabella 32

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	28,29	0,43	1,51	69,8	0,07	0,11	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	29,19	0,17	0,59	70,8	0,08	0,11	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	27,86	0,47	1,69	68,2	0,12	0,18	100%
NEG	P210 e13a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	31,78	0,25	0,78	58,5	0,11	0,19	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	29,36	0,35	1,20	67,1	0,07	0,10	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	27,85	0,31	1,11	72,0	0,08	0,11	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	28,56	0,48	1,68	64,5	0,06	0,09	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 32 (segue)

NEG	P195 e6a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	28,56	0,37	1,30	68,3	0,07	0,11	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	26,78	0,36	1,34	68,3	0,14	0,21	100%
NEG	P210 e13a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	29,64	0,38	1,28	57,5	0,05	0,09	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	29,12	0,42	1,45	65,1	0,08	0,13	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		12	25,85	0,26	1,02	65,4	0,06	0,10	100%

Nel test di ripetibilità, BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come %CV inferiore al 5%.

11.11 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius e ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni simulati negativi per BCR-ABL o positivizzati con RNA sintetici delle diverse isoforme di BCR-ABL (GenScript) come descritto nel test precedente.

I risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (su sei giorni e tre lotti) con ELITe BeGenius sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 33

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	29,08	0,42	1,44	69,2	0,21	0,30	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	29,62	0,57	1,91	69,9	0,59	0,84	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	28,77	0,49	1,69	67,6	0,28	0,42	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	31,99	0,49	1,52	56,7	0,44	0,78	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	29,25	0,50	1,72	66,1	0,70	1,06	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	29,67	0,76	2,55	71,4	0,36	0,51	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	29,24	0,59	2,00	63,9	0,11	0,17	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 33 (segue)

NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	29,21	0,48	1,63	67,7	0,26	0,39	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	28,20	0,50	1,79	67,8	0,20	0,29	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	29,66	1,07	3,61	57,1	0,17	0,29	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,85	0,66	2,29	65,0	0,19	0,29	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	28,02	0,70	2,51	64,8	0,31	0,47	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (su dodici giorni e tre lotti) con ELITe InGenius sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 34

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	27,85	0,53	1,91	69,7	0,09	0,13	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	28,73	0,41	1,42	70,8	0,07	0,10	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	27,58	0,49	1,77	68,2	0,12	0,18	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	31,36	0,37	1,18	58,2	0,38	0,65	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,66	0,72	2,50	67,1	0,37	0,55	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	27,28	0,53	1,94	71,9	0,08	0,12	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	27,99	0,65	2,32	64,4	0,12	0,19	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 34 (segue)

NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	28,22	0,40	1,43	68,4	0,08	0,12	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	26,76	0,47	1,74	68,3	0,15	0,21	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	29,10	0,63	2,18	57,6	0,10	0,17	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,24	1,07	3,80	65,2	0,13	0,19	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	25,67	0,57	2,21	65,3	0,28	0,42	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Strumento (su sei giorni, tre lotti e tre strumenti) con ELITe BeGenius sono mostrati nella tabella seguente.

Tabella 35

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	29,19	0,39	1,35	69,3	0,22	0,32	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	29,56	0,47	1,58	70,1	0,49	0,70	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	28,71	0,44	1,55	67,7	0,15	0,23	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	31,80	0,46	1,44	56,7	0,58	1,02	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	29,09	0,46	1,58	66,2	0,69	1,04	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	29,03	0,43	1,50	71,5	0,21	0,30	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	29,35	0,66	2,24	63,9	0,14	0,22	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 35 (segue)

NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	29,08	0,48	1,66	67,7	0,30	0,44	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	28,10	0,36	1,29	67,7	0,21	0,31	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	26,69	1,05	3,54	57,1	0,20	0,36	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,36	1,25	4,42	64,9	0,23	0,35	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	27,65	0,60	2,18	64,8	0,31	0,48	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Strumento (su dodici giorni, tre lotti e tre strumenti) con ELITe InGenius sono mostrati nella tabella seguente.

Tabella 36

Campione	Target	N	Media Ct	Ct SD	Ct %CV	Media Tm	Tm SD	Tm %CV	%Concordanza
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,02	0,39	1,40	69,8	0,13	0,19	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	28,85	0,50	1,75	70,8	0,28	0,39	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	27,67	0,44	1,59	68,3	0,16	0,24	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	31,52	0,41	1,30	58,1	0,40	0,68	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,71	0,29	1,01	67,1	0,11	0,17	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	27,20	0,49	1,80	72,0	0,12	0,17	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,24	0,28	0,98	64,4	0,16	0,24	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Tabella 36 (segue)

NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	28,29	0,43	1,52	68,4	0,13	0,19	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	26,79	0,50	1,86	68,3	0,25	0,36	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	29,32	0,54	1,85	57,6	0,08	0,14	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	28,78	0,54	1,88	65,2	0,18	0,28	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GROUP C		36	25,65	0,69	2,68	65,3	0,30	0,46	100%

Nel test di Riproducibilità, BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct come CV% inferiore al 5%.

11.12 Specificità Diagnostica: Conferma dei campioni negativi

La Specificità Diagnostica del saggio, come conferma dei campioni negativi, è stata valutata in associazione ad ELITe InGenius testando campioni clinici di PBL, certificati o presunti negativi per tutti i target. Poiché ELITe BeGenius possiede performance analitiche equivalenti ad ELITeInGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è anche riferibile ad ELITe BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 37

Campioni PBL negativi	N	Positivi	Negativi	% Specificità Diagnostica
p190	60	0	60	100%
p195	60	0	60	100%
p200	60	0	60	100%

Tabella 37 (segue)

Campioni PBL negativi	N	Positivi	Negativi	% Specificità Diagnostica
p210	60	0	60	100%
p230	60	0	60	100%

Tutti i campioni di PBL sono risultati validi per l'analisi e negativi.

Il cut-off del Ct del Controllo Interno è impostato a 31.

11.13 Sensibilità Diagnostica: Conferma dei campioni positivi

La Sensibilità Diagnostica del saggio, come conferma dei campioni positivi, è stata valutata in associazione ad ELITe InGenius testando campioni clinici di PBL, certificati positivi per i target o positivizzati con materiale di riferimento. Poiché ELITe BeGenius possiede performance analitiche equivalenti a ELITe InGenius, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Sensibilità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è anche riferibile ad ELITe BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 38

Campioni PBL positivi o positivizzati		N	Positivi	Negativi	% Sensibilità Diagnostica
p190	Positivo per e1a2	1	1	0	100%
	Positivizzati per e1a2	25	25	0	
	Positivizzati per e1a3	25	25	0	
p195	Positivizzati per e6a2	25	25	0	100%
	Positivizzati per e6a3	25	25	0	
p200	Positivo per e8a2	1	1	0	98%
	Positivizzati per e8a2	25	25	0	
	Positivizzati per e8a3	25	24	1	
p210	Positivi per e13a2	2	2	0	100%
	Positivizzati per e13a2	25	25	0	
	Positivizzati per e13a3	25	25	0	
	Positivi per e14a2	3	3	0	
	Positivizzati per e14a2	25	25	0	
	Positivizzati per e14a3	25	25	0	100%
p230	Positivizzati per e19a2	25	25	0	
	Positivizzati per e19a3	25	25	0	

Un campione positivizzato per p200 e8a3 è risultato discrepante negativo.

NOTA

I dati ed i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto “BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit”, FTP G07ING.

12 BIBLIOGRAFIA

N. C. P. Cross et al. (2023) Leukemia 37: 2150 - 2167

M. Baccarani et al. (2019) Leukemia 33: 1173 - 1183.

J. Gabert et al. (2003) Leukemia. 17: 2318 – 2357

J. J. M. van Dongen et al. (1999) Leukemia. 13: 1901 – 1928

E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: leucociti da sangue periferico Raccolto in EDTA o sodio citrato.

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici.

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: leucociti da sangue periferico Raccolto in EDTA o sodio citrato.

Non utilizzare questo prodotto con campioni di sangue periferico raccolti in eparina: l’eparina inibisce la trascrizione inversa e l’amplificazione mediante PCR degli acidi nucleici, causando risultati invalidi.

Non utilizzare questo prodotto con campioni di RNA contenenti alte concentrazioni di DNA genomico che può inibire la trascrizione inversa e l’amplificazione degli acidi nucleici.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Per evitare risultati errati è necessario, pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

La metodica di amplificazione Real Time utilizzata in questo prodotto ha un’elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a contaminazioni da campioni clinici positivi, da controlli positivi e dagli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è in grado di limitare le cross contaminazioni; tuttavia, questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato e addestrato alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede l’uso di abbigliamento da lavoro e la disponibilità di aree idonee alla lavorazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto deve essere utilizzato da professionisti qualificati e addestrati all'uso di tecniche di biologia molecolare, quali estrazione, trascrizione inversa, PCR e rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

È necessario disporre di aree separate per la preparazione della miscela completa di reazione e per l’estrazione/amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione per prevenire risultati falsi positivi.

A causa di differenze intrinseche tra tecnologie, si raccomanda agli utilizzatori di eseguire studi di correlazione al fine di valutare le differenze a livello tecnologico prima di cambiare prodotto.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'RNA o il DNA target non è stato rilevato negli acidi nucleici estratti dal campione, ma non si può escludere che l'RNA o il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda "Caratteristiche delle Prestazioni"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Nel caso di co-espressione di più isoforme, la sensibilità rispetto ad una variante potrebbe essere influenzata dall'amplificazione della variante secondaria (vedere "Caratteristiche delle Prestazioni").

Nel caso di co-espressione di più isoforme, la variante secondaria dovrebbe essere diagnosticata solo se i livelli di espressione risultano paragonabili all'isoforma principale (vedere N. P. C. Cross et al. 2023), diversamente dovrebbe essere diagnosticata solo l'isoforma principale (Ct inferiore).

Nel caso di espressione p210 e14a2 a basso titolo, in alcuni casi è stato rilevato un secondo picco di Tm aspecifico, risultante in una doppia positività p210 e13a2 e14a2.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

Possibili polimorfismi, inserzioni o delezioni nella regione dell'RNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione dell'RNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente. Comunque, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato valutato in rapporto ai benefici potenziali per il paziente ed è stato considerato accettabile.

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 39

Reazione del Controllo Positivo non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del Controllo Positivo.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di due sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare la RT EnzymeMix a temperatura più alte di -20 °C più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del Controllo Positivo.	Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 40

Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del Controllo Negativo.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 41

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, e del campione. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del campione.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di due sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata) Non lasciare la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare l'RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR)". Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione pretrattato in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Tabella 42

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	**Soluzioni**
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differenti da quelle degli altri campioni e da quelle del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità del prodotto di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 43

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	**Soluzioni**
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione selezionare il rack relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo invalido. Se è richiesto un valore di Ct: • ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR)" oppure • ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 del campione pretrattato in Homogenization Solution, in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

Tabella 44

Errore 20081 (È possibile che non vi sia liquido nella provetta di sonicazione/estrazione)	
Possibili cause	**Soluzioni**
Presenza di bolle o campione molto viscoso.	• Verificare la presenza del campione nel tubo di estrazione per i track indicati. Se il campione non è presente, caricarlo nel tubo di estrazione nei track indicati. Se il campione è presente, cliccare "OK" nella finestra di dialogo per procedere con l'estrazione. • Allo scadere del tempo, se non si interviene, la sessione viene abortita. In questo caso, se il campione è presente ed è possibile far ripartire una nuova sessione immediatamente dopo che è stata abortita, il campione può essere riutilizzato. In alternativa, ripetere la sessione utilizzando una nuova aliquota del campione pretrattato.

Tabella 45

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	**Soluzioni**
Contaminazione da campione a campione durante le fasi preanalitiche.	Pulire la micropipetta, con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA, dopo aver pipettato ciascun campione. Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a spostamento positivo o utilizzate con puntali con filtro per aerosol. Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.
Contaminazione ambientale di laboratorio	Pulire tutte le superfici a contatto con l'operatore e i campioni (comprese le pipette) con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA. Eseguire un ciclo di decontaminazione UV. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione.

15 LEGENDA DEI SIMBOLI

REF	Numero di catalogo
	Limite superiore di temperatura
LOT	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
IVD	Dispositivo medico diagnostico *in vitro* .
CE 0123	Conforme ai requisiti del Regolamento Europeo 2017/746/EC relativo ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*. Certificazione rilasciata da TÜV SÜD Product Service GmbH, Germany.
UDI	Numero Unico Identificativo del dispositivo
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Consultare le istruzioni per l'uso
CONT	Contenuto.
	Tenere lontano dalla luce solare.
	Fabbricante.

16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente. Per informare ELITechGroup S. p. A., fabbricante di questo dispositivo, si prega di utilizzare il seguente indirizzo e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

Una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" (Summary of Safety and Performance) sarà resa disponibile al pubblico attraverso la Banca Dati Europea sui Dispositivi Medici (Eudamed) quando questo sistema informatico sarà operativo. Prima della pubblicazione dell'avviso di piena funzionalità di Eudamed, il "Summary of Safety and Performance" sarà resa disponibile al pubblico su richiesta via e-mail all'indirizzo emd.support@elitechgroup.com, senza indebito ritardo.

17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Thermo Fisher Scientific e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S. p. A. e le sue affiliate e Thermo Fisher Scientific. Il prezzo d'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili, limitati a utilizzare solo questa quantità di prodotto esclusivamente per attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sulla licenza d'acquisto per questo prodotto per fini diversi da quelli dichiarati sopra, rivolgersi a Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U. S. A. numero 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e brevetti EP numero 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti e oggetto di domande di brevetto.

Questa licenza limitata permette all'individuo o alla persona giuridica alla quale il prodotto è stato fornito di utilizzarlo unitamente ai dati generati dal suo utilizzo solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite, per altri scopi.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, il logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.

Appendix A BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit used in association with Genius series® platforms



CAUTION

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

Intended use

The product **BCR-ABL Dx ELITe MGB® Kit** is an in vitro diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as qualitative multiplex nucleic acids reverse transcription and Real-Time PCR assay for the detection of the mRNA of the *BCR*:: *ABL* (BCR-ABL) rearrangement, and the discrimination of the main variants extracted from clinical specimens.

The assay is able to detect and identify **p190 e1a2**, **p195 e6a2**, **p200 e8a2**, **p210 e13a2** and **e14a2** (typing by melting analysis), **p230 e19a2** in the first reaction and **p190 e1a3**, **p195 e6a3**, **p200 e8a3**, **p210 e13a3** and **e14a3** (typing by melting analysis), **p230 e19a3** in the second reaction.

The assay is validated in association with the **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, reverse transcription, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of peripheral blood leukocyte (PBL).

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of *BCR*::*ABL* positive leukemia in patients suspected of having a leukemia linked to *BCR*::*ABL* rearrangement.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.

Amplified sequence

BCR-ABL a2 PCR Mix			
Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target 1	p190 e1a2	FAM	p190a2
Target 2	P210 e13a2 and e14a2	AP639	P210a2
Target 3	P230 e19a2	AP690	P230a2
Target 4	P200 e8a2	AP559	p200a2
Target 5	p195 e6a2	AP593	p195a2
Internal Control	ABL	AP525	ICa2
BCR-ABL a3 PCR Mix			
Sequence	**Gene**	**Fluorophore**	**Channel**
Target 1	p190 e1a3	FAM	p190a3
Target 2	p210 e13a3 and e14a3	AP639	P210a3
Target 3	p230 e19a3	AP690	P230a3
Target 4	P200 e8a3	AP559	p200a3
Target 5	p195 e6a3	AP593	p195a3
Internal Control	ABL	AP525	ICa3

Validated matrix

Peripheral blood collected in EDTA or sodium citrate, pre-treated to isolate peripheral blood leukocytes (PBL).

Kit content and related products

BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit (RTSG07ING)			**BCR-ABL Dx - ELITe Positive Control (CTRG07ING)**	
 x 2	 x 2	 x 2	 x 3	 x 3
BCR-ABL a2 PCR Mix 2 tubes of 600 µL 24 reactions per tube 48 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube	**BCR-ABL a3 PCR Mix** 2 tubes of 600 µL 24 reactions per tube 48 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube	**RT EnzymeMix** 2 tubes of 20 µL 48 reactions per tube 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	**BCR-ABL a2 Positive Control** 3 tubes of 160 µL 4 reactions per tube 12 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles	**BCR-ABL a3 Positive Control** 3 tubes of 160 µL 4 reactions per tube 12 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles
Maximum shelf-life:	**18 months**		Maximum shelf-life	**24 months**
Storage temperature	**≤ -20°C**		Storage temperature	**≤ -20°C**

Other products required not provided in the kit

› ELITe InGenius instrument: INT030. › ELITe BeGenius instrument: INT040. › ELITe InGenius SP RNA: INT034SPRNA. › ELITe InGenius DNase I: INT034DNASE. › ELITe InGenius DNase tube adapter kit: G6431-000. › Alternative Caps For Extraction Tubes: 925-CAP (optional)	› Cell Lysis Solution (Promega, code A7933 or equivalent reagent). › RNA Lysis Buffer (Promega, code Z3051 or equivalent reagent). › Thioglycerol (Promega, code A208B-C or equivalent reagent). › **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** Consumables (see ELITe InGenius and ELITe BeGenius Instruction for Use)

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume › Total elution volume	200 µL 100 µL	› Eluate PCR input volume › PCR Mix volume › Frequency of controls	10 µL 20 µL 15 days

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Target		Limit of Detection	Sensitivity	Specificity
Peripheral blood collected in EDTA or sodium citrate	p190	e1a2	8 copies / reaction	**100%** (26 / 26)	**100%** (60 / 60)
		e1a3	8 copies / reaction	**100%** (25 / 25)	**100%** (60 / 60)
	p195	e6a2	8 copies / reaction	**100%** (25 / 25)	**100%** (60 / 60)
		e6a3	20 copies / reaction	**100%** (25 / 25)	**100%** (60 / 60)
	p200	e8a2	50 copies / reaction	**100%** (26 / 26)	**100%** (60 / 60)
		e8a3	50 copies / reaction	**98%** (24 / 25)	**100%** (60 / 60)
	p210	e13a2	8 copies / reaction	**100%** (27 / 27)	**100%** (60 / 60)
		e13a3	8 copies / reaction	**100%** (25 / 25)	**100%** (60 / 60)
		e14a2	8 copies / reaction	**100%** (28 / 28)	**100%** (60 / 60)
		e14a3	20 copies / reaction	**100%** (25 / 25)	**100%** (60 / 60)
	p230	e19a2	20 copies / reaction	**100%** (25 / 25)	**100%** (60 / 60)
		e19a3	50 copies / reaction	**100%** (25 / 25)	**100%** (60 / 60)

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Sample type	Transport/Storage conditions
	+16 / +26 °C (room temperature)
Peripheral blood collected in EDTA or sodium citrate	within 24 hours and no later than 48 hours
Note: The specimens must be pre-treated to isolate peripheral blood leukocytes (PBL) before use according to the procedure described in the complete IFU.	

ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, reverse transcription, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

NOTE

With the product BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit two reactions should be performed for each sample: one with BCR-ABL a2 PCR Mix (for BCR-ABL a2 isoforms) and the other with BCR-ABL a3 PCR Mix (for BCR-ABL a3 isoforms).

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode "**CLOSED**".	**2.** Verify controls: **BCR-ABL a2 Positive Control / BCR-ABL a3 Positive Control** and **BCR-ABL a2 Negative Control / BCR-ABL a3 Negative Control** in the "Controls" menu. Note: All must have been run, approved and not expired.	**3.** Thaw the **BCR-ABL a2 PCR Mix / BCR-ABL a3 PCR Mix** tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.

4. Prepare the complete reaction mixture

Samples Number (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix and BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL

5. Vortex gently
Spin down 5 sec
Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

Procedure 1 – Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen.	**2.** Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL".	**3.** Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID.
4. Select the "Assay Protocol" of interest: BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100 and BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100	**5.** For a2 Assay Protocol select the method "Extract + PCR" and the sample position "Extraction Tube". For a3 Assay Protocol select the method "PCR Only" and select as sample position the Track of the sample.	**6.** Load the complete reaction mixtures in the Inventory Block.
7. Load: PCR cassette, SP RNA Extraction cartridge, DNase I tubes, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks.	**8.** Close the door. Start the run.	**9.** View, approve and store the results.

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen.	**2.** Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL".	**3.** Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID.
4. Select the "Assay Protocol" of interest: BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100 and BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100 or BCR-ABL a2 ELITe_PC or BCR-ABL a3 ELITe_PC or BCR-ABL a2 ELITe_NC or BCR-ABL a3 ELITe_NC	**5.** Select the method "PCR Only". For controls and a2 Assay Protocol select the sample position "Elution Tube". For a3 Assay Protocol select as sample position the Track of the eluate.	**6.** Load the complete reaction mixtures in the Inventory Block.
7. Load PCR Cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid.	**8.** Close the door. Start the run.	**9.** View, approve and store the results.

ELITe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, reverse transcription, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: (Extract + PCR) or PCR Only.

NOTE

With the product BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit two reactions should be performed for each sample: one with BCR-ABL a2 PCR Mix (for BCR-ABL a2 isoforms) and the other with BCR-ABL a3 PCR Mix (for BCR-ABL a3 isoforms).

Before analysis

1. Switch on ELITe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode "**CLOSED**".	**2.** Verify controls: **BCR-ABL a2 Positive Control / BCR-ABL a3 Positive Control** and **BCR-ABL a2 Negative Control / BCR-ABL a3 Negative Control** in the "Controls" menu. Note: All must have been run, approved and not expired.	**3.** Thaw the **BCR-ABL a2 PCR Mix / BCR-ABL a3 PCR Mix** tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.

4. Prepare the complete reaction mixture

Samples Number (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix and BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL
13 ≤ N ≤ 18	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0.3 µL
19 ≤ N ≤ 23	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0.3 µL
N = 24	580 µL	8.7 µL

5. Vortex gently.
Spin down 5 sec.
Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode "Extract and PCR".	**2.** Insert the Sample Rack with the samples in the Cooler Unit. Scan the sample barcodes or type the sample ID.	**3.** Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay Protocol" of interest: BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100 and BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100	**5.** Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit.	**6.** Load the complete reaction mixture in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit.
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Rack" with the "ELITe InGenius SP RNA" extraction cartridges, "ELITe InGenius DNase I tubes" and the required extraction consumables.	**8.** Close the door. Start the run.	**9.** View, approve and store the results.

NOTE

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, controls)

1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode “PCR Only”.	**2.** Load the extracted nucleic acid or controls barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit”.	**3.** Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “100 µL”.
4. Select the “Assay Protocol” of interest: BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100 and BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100 or BCR-ABL a2 ELITe_PC or BCR-ABL a3 ELITe_PC or BCR-ABL a2 ELITe_NC or BCR-ABL a3 ELITe_NC	**5.** Load the Complete reaction mixture in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit.	**6.** Load “PCR Rack” with “PCR Cassette”.
7. Close the door. Start the run.	**8.** View, approve and store the results.	

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