

Xpert[®] NPM1 Mutation

REF GXNPM1-CE-10

Käyttöohjeet

IVD CE

Tavaramerkki, patentit ja tekijänoikeuslausekkeet

Trademark, Patents, and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®], and Xpert[®] are trademarks of Cepheid, registered in the U.S. and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

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

© 2022–2023 Cepheid.

See Section 28, Revision History for a description of changes.

Cepheid[®], Cepheid-logo, GeneXpert[®] ja Xpert[®] ovat Cepheidin tavaramerkkejä, jotka on rekisteröity Yhdysvalloissa ja muissa maissa.

Kaikki muut tavaramerkit ovat vastaavien omistajiensa omaisuutta.

TÄMÄN TUOTTEEN HANKINTA VÄLITTÄÄ OSTAJALLE EI SIIRRETTÄVISSÄ OLEVAN OIKEUDEN KÄYTTÄÄ SITÄ NÄIDEN KÄYTTÖOHJEIDEN MUKAAN. MITÄÄN MUITA OIKEUKSIA EI MYÖNNETÄ SUORAAN, EPÄSUORASTI TAI ESTOPPEL-PERIAATTEEN MUKAAN. TÄMÄN LISÄKSI TÄMÄN TUOTTEEN HANKINNAN YHTEYDESSÄ EI MYÖNNETÄ MITÄÄN UDELLEENMYyntIOIKEUKSIA.

© 2022–2023 Cepheid.

Lue versiohistoriasta (Osa 28) muutosten kuvaukset.

Xpert[®] NPM1 Mutation

In vitro -diagnostiseen käyttöön.

1 Patentoitu nimi

Xpert[®] NPM1 Mutation

2 Yleinen tai tavallinen nimi

Xpert NPM1 Mutation

3 Käyttötarkoitus

3.1 Käyttötarkoitus

Xpert NPM1 Mutation -testi, joka tehdään Cepheidin GeneXpert[®] Dx System -järjestelmällä, on mutantti-NPM1-mRNA-transkriptien kvantitointiin (tyypit A, B ja D eksonissa 12) tarkoitettu *in vitro* -diagnostinen testi akuuttia myelooista leukemiaa (AML) sairastavien potilaiden ääreisverenäytteistä. Testissä käytetään automaattista reaaliaikaista käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktiota (RT-PCR). Tulokset ilmoittavat mutantti -NPM1:n ja endogeenisen kontrolli-ABL1:n mRNA-transkriptien prosenttisuhteen. Testi on tarkoitettu avuksi NPM1-mutaatioon liittyvää AML:ää sairastavien potilaiden monitoroimiseen mutantti-NPM1-mRNA-transkriptin määrän osalta. Testiä on käytettävä yhdessä muiden kliinisten patologisten tekijöiden kanssa.

Xpert NPM1 Mutation -testi ei erottele NPM1-transkriptien A-, B- tai D-tyypin välillä eikä havaitse tai monitoroi muita mutantti-NPM1:n harvinaisia tyyppieitä. Tätä testiä ei ole tarkoitettu AML:n diagnoosia varten.

3.2 Kohdekäyttäjä/ympäristö

Xpert NPM1 Mutation -testi on tarkoitettu koulutettujen käyttäjien käyttöön laboratorioympäristössä.

4 Yhteenveto ja selitys

Akuutti myeloininen leukemia (AML) on myelooisten veren hematopoeettisten kantasolujen syöpä luuytimessä^{1,2}, ja siinä tiedetään olevan useita nukleofosmiini (NPM1) -eksonin 12 mutaatioita³. Nukleotidien insertio eksonissa 12 johtaa lukkehysmutaatioon ja luo tumasta ulosviemisen signaalin (Nuclear Export Signal, NES). NPM1-geenin mutaatiot johtavat NPM1-proteiinin ja NPM1:n kanssa vuorovaikutuksessa olevien proteiinien poikkeavaan sytoplasmiseen sijaintiin. NPM1 on yksi yleisimpiä mutatoituneita geenejä AML-leukemiassa, ja kyseisiä mutaatioita esiintyy 28–35 %:ssa kaikkia AML-tapauksia. Vaikka tällä hetkellä tutkitaan useita lääkkeitä, joiden kohteena on mutatoitu NPM1, tällä hetkellä ei ole saatavana mitään Yhdysvaltojen lääke- ja elintarvikeviraston (FDA) hyväksynnän saaneita täsmähoitoja.⁴

NPM1-geeni koodaa tumakuljetusproteiinia, jolla on merkitys sentrosomien ja ribosomien biologiassa sekä muiden sellulaaristen järjestelmien, kuten kasvainten suppressorireittien säätelyssä. NPM1 on nukleolaarinen fosfoproteiini, joka toimii kuljettajana tumaa ja sytoplasman välillä. Se säätelee ribosomaalisten partikkelien kuljetusta tumakalvon läpi. NPM1-mutaatiot löydettiin ensin AML-potilailta sen jälkeen, kun havaittiin poikkeava sytoplasmisen sijainnin normaalin tumasijainnin sijasta. Leukemiasolublastien geneettinen arviointi yhdessä NPM1:n sytoplasmisen sijainnin kanssa on johtanut tunnettujen eksoni 12:n lukkehysmutaatioiden ymmärtämiseen.³ Yleisimpiä NPM1-mutaatioita ovat tyyppi A

(noin 75–80 %), tyyppi B (noin 10 %) ja tyyppi D (noin 5 %), kaikki eksonissa 12, mikä johtaa lukukehysmutaatioon neljän nukleotidin insertiosta johtuen. Mutaatio aiheuttaa nukleolaarisen sijainnin signaalin menettämisen ja proteiinin poikkeavan sytoplasman sijainnin AML-potilailla.⁵

5 Toimenpiteen periaate

Xpert NPM1 Mutation -testi on automatisoitu määrittäminen NPM1-mutaation transkriptien määrän kvantitointiin NPM1-mutaation ja ABL1:n suhteena. Testi tehdään Cepheid GeneXpert Dx System -järjestelmällä, joka automatisoi ja integroi yksinkertaisen tai kompleksisen näytteen puhdistamisen, nukleiinihappomonistuksen ja kohdesekvenssin havaitsemisen reaaliaikaisten RT-PCR- ja sisäkkäisten PCR-määrittysten avulla. Järjestelmä koostuu instrumentista, tietokoneesta ja valmiiksi asennetusta ohjelmistosta määrittysten ajamista ja tulosten näyttämistä varten. Järjestelmässä on käytettävä näytekohtaisia, kertakäyttöisiä GeneXpert-kasetteja, jotka sisältävät RT-PCR- ja sisäkkäiset PCR-reagenssit ja jotka isännöivät RT-PCR- ja sisäkkäisiä PCR-prosesseja. Järjestelmän yksityiskohtainen kuvaus, ks. asianmukainen *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Xpert NPM1 Mutation -testi sisältää reagenssit ääreisverenkierron NPM1-mutaation transkriptin havaitsemiseen ja ABL1-transkriptin havaitsemiseen endogeenisenä kontrollina. NPM1-mutaation transkriptin määrä kvantitoidaan NPM1-mutaatio/ABL1-suhteen prosenttisuhteena. Xpert NPM1 Mutation -testi sisältää kaksi kontrollia - endogeenisen kontrollin (ABL1) ja koettimen tarkistuskontrollin (PCC). Endogeeninen ABL1-kontrolli normalisoi NPM1-mutaatiokohteen ja varmistaa, että määrittämisessä käytettävä näytemäärä on riittävä. Koettimen tarkistuskontrolli (PCC) varmistaa reagenssin nesteytyksen, PCR-putken täyttyminen ja vahvistaa, että kaikki reaktiokomponentit, koettimet ja väriaineet mukaan lukien, ovat kasetissa ja toimivat.

6 Reagenssit ja instrumentit

6.1 Toimitetut materiaalit

Xpert NPM1 Mutation -määrittämisspakkaukset (GXNPM1-CE-10) sisältää riittävästi reagensseja 10 määritettävän näytteen tai laadunvalvontanäytteen käsittelemiseen. Pakkauksessa on seuraavat:

Xpert NPM1 Mutation -reagenssit

10 kutakin pakkausta kohti

Proteinaasi K (PK)	10 x 130 µl pulloa kohti
Aineosa	Reagenssin ainesosa
Proteinaasi K	<5 %

Lyysireagenssi (LY) (guanidiniumkloridi)	10 x 5,3 ml pulloa kohti
Aineosa	Reagenssin ainesosa
Guanidiniumkloridi	25–50 %
Urea	25–50 %
Natriumdodesyylisulfaatti	<2 %

Pesureagenssi	10 x 2,9 ml ampullia kohti
Aineosa	Reagenssin ainesosa
Etanoli	<50 %
Guanidiniumtiosyanaatti	<50 %

Xpert NPM1 Mutation kasetit, joissa integroidut reaktioputket		10 pakkausta kohti
Aineosa	Reagenssin ainesosa	Määrä
Helmi 1 (pakastekuivattu)	Entsyymi: Taq-DNA-polymeraasi <50 U/ helmi	1 kasettia kohti
	dNTP:t <0,05 %	
Helmi 2 (pakastekuivattu)	Alukkeet ja koettimet <0,005 %	1 kasettia kohti
Helmi 3 (pakastekuivattu)	Alukkeet ja koettimet <0,005 %	1 kasettia kohti
Helmi 4 (pakastekuivattu)	Entsyymi: Taq-DNA-polymeraasi <50 U/ helmi	1 kasettia kohti
	dNTP:t <0,05 %	
Huuhtelureagenssi	Kaliumkloridi <4 %	2 ml kasettia kohti
	Natriumatsidi <0,1 %	
	Polyeteeniglykoli < 40 %	
	Tween-20 <0,2 %	
Eluutioreagenssi	Trizma-emäs <0,3 %	2,5 ml kasettia kohti
	Trizma-hydrokloridi <0,1 %	
	Natriumatsidi <0,05 %	

CD**1 pakkausta kohti**

- Analyysin määrittelytiedosto (Assay Definition File, ADF)
- Määrittelytiedoston (ADF) tuontiohje GeneXpert-ohjelmistoon
- Käyttöohjeet

Huomautus

Tämän valmisteen helmissä oleva naudan seerumialbumiini (bovine serum albumin, BSA) on tuotettu ja valmistettu yksinomaan Yhdysvalloista peräisin olevasta naudan plasmasta. Eläimille ei syötetty märentijä- tai muita eläinproteiineja; eläimet läpäisivät testauksen ennen lopettamista ja sen jälkeen. Prosessoinnin aikana ei materiaalia sekoitettu mihinkään muuhun eläinmateriaaliin.

Huomautus

Analyyssertifikaatit ja eräkohtaiset tiedot ovat saatavana Cepheidin teknisestä tuesta.

7 Tarvittavat materiaalit, joita ei toimiteta

- GeneXpert Dx System- (luettelonumero vaihtelee kokoonpanon mukaan): GeneXpert-instrumentti, tietokone, viivakoodinlukija ja käyttöopas.
- GeneXpert Dx System: GeneXpert Dx -ohjelmistoversio 6.2 tai uudempi.
- Tulostin: Jos tulostinta tarvitaan, ota yhteyttä Cepheidin tekniseen tukeen, joka voi järjestää suositellun tulostimen hankinnan.
- Koeputkiravistelijä
- Mikrosentrifugi (vähintään 1000 x g)
- Pipettejä ja pipetin aerosolisuojatinkärkiä
- 50 ml:n kartioputkia
- Absoluuttista etanolia, reagenssilaatu
- 1X PBS-puskuria, pH 7,4

8 Varastoiminen ja käsitleminen

- Säilytä Xpert NPM1 Mutation -pakkauksen sisältöä 2–8 °C:ssa merkinnöissä olevaan viimeiseen käyttöpäivään saakka.
- Kasetin kantta ei saa avata ennen kuin testi ollaan valmiit tekemään.
- Viimeisen käyttöpäivän ohittaneita kasetteja ei saa käyttää.
- Vuotanutta kasettia ei saa käyttää.
- Pesureagenssi on kirkasta, väritöntä nestettä. Sameaa tai värjäätynyttä pesureagenssia ei saa käyttää.
- Ota verinäyte, kasetti ja näytteen valmistelureagenssit säilytyksestä kaksikymmentä (20) minuuttia ennen toimenpiteen aloittamista ja anna niiden tasaantua huoneenlämpöön (20–30 °C).

9 Varoitukset ja varotoimet

9.1 Yleistä

- *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- Kaikkia biologisia näytteitä, myös käytettyjä kasetteja ja reagensseja, on käsiteltävä tartuntavaarallisina aineina. Koska on usein mahdotonta tietää, mitkä ovat tartuntavaarallisia, kaikkia biologisia näytteitä on käsiteltävä vakiovarotoimenpiteitä noudattaen.
- Näytteiden käsittelyohjeistus on saatavana Yhdysvaltain tautien torjunta- ja ehkäisykeskuksista (U.S. Centers for Disease Control and Prevention⁶) ja CLSI-instituutista (Clinical and Laboratory Standards Institute).⁷
- Kemikaalien kanssa työskennellessä ja biologisia näytteitä käsitellessä on noudatettava laitoksen asettamia turvallisuustoimenpiteitä.
- Tämän testin suorituskykyominaisuudet on määritetty vain EDTA-putkiin otetuilla verinäytteillä. Määrittäminen ei ole arvioitu muun tyyppisillä näytteillä.
- Luotettavat tulokset riippuvat asianmukaisesta näytteenotosta, kuljetuksesta, säilytyksestä ja prosessoinnista. Virheellisiä määritystuloksia voi esiintyä, jos näytteet on otettu tai niitä on käsitelty ja säilytetty virheellisesti, teknisen virheen takia, jos näytteet ovat sekoittuneet keskenään tai jos näytteessä oleva kohdetranskriptin määrä on määrittämissä havaitsemisrajan alapuolella. Näiden käyttöohjeiden ja *GeneXpert Dx System Operator Manual* -oppaan huolellinen noudattaminen on välttämätöntä virheellisten tulosten välttämiseksi.
- Xpert NPM1 Mutation -testin tekeminen pakkauksen tai näytteen suositellun säilytyslämpötila-alueen ja säilytysajan ulkopuolella saattaa tuottaa virheellisiä tai kelpaamattomia tuloksia.
- Biologisia näytteitä, siirtolaitteita ja käytettyjä kasetteja on pidettävä tartuntavaarallisina ja ne edellyttävät vakiovarotoimenpiteitä. Käytettyjen kasettien ja käyttämättömien reagenssien asianmukaisessa hävittämisessä on noudatettava laitoksen ympäristöä suojelevia jätteenkäsittelytoimenpiteitä. Nämä materiaalit voivat olla kemiallista vaarallista jätettä ja voivat edellyttää erityisiä kansallisia tai alueellisia hävitystoimenpiteitä. Jos kansalliset tai alueelliset säännökset eivät anna selvää ohjeistusta asianmukaisesta hävittämisestä, biologiset näytteet ja käytetyt kasetit on hävitettävä WHO:n (Maailman terveysjärjestö) lääkinnällisen jätteen käsittelyä ja hävittämistä koskevan ohjeistuksen mukaan.⁸

9.2 Näyte

- Noudata asianmukaisia säilytysolosuhteita näytteen eheyden varmistamiseksi (ks kohta Osa 11, Näytteen ottaminen ja säilytys). Näytteen stabiliteettia muissa kuin suositelluissa kuljetusolosuhteissa ei ole arvioitu.
- EDTA-ääreiverinäytettä ei saa pakastaa.
- Näytteen asianmukainen ottaminen, varastoiminen ja kuljettaminen ovat oleellisen tärkeitä oikeiden tulosten kannalta.


9.3 Testi/reagenssi

- Xpert NPM1 Mutation -reagensseja ei saa korvata muilla reagensseilla.
- Xpert NPM1 Mutation -kasetin kantta ei saa avata muuten kuin vain näytettä ja pesureagenssia lisättäessä.
- Sellaista kasettia ei saa käyttää, joka on pudotettu sen jälkeen, kun se on poistettu pakkauksesta.
- Kasettia ei saa ravistaa. Kasetin pudottaminen tai ravistaminen kasetin kannan avaamisen jälkeen voi aiheuttaa kelpaamattomia tuloksia.
- Näytteen tunnistetarraa ei saa asettaa kasetin kanteen tai kasetin viivakooditarraan.
- Kasettia ei saa käyttää, jos sen viivakooditarra on vaurioitunut.

- Kasettia ei saa käyttää, jos sen reaktioputki on vaurioitunut.
- On suositeltavaa, että Xpert NPM1 Mutation -kasetit ovat huoneenlämpötilassa (20–30 °C), kun niitä käytetään testaukseen.
- Jokaista kertakäyttöistä Xpert NPM1 Mutation -kasettia käytetään vain yhden määrityksen prosessointiin. Prosessoituja kasetteja ei saa käyttää uudelleen.
- Siirrä yhden (1) pesureagenssiampullin koko sisältö kammioon pesureagenssisäiliöön. Jos pesureagenssia ei huomata lisätä, seurauksena voi olla virheellinen **EI HAVAITTU (NOT DETECTED)** -tulos.
- Pipettikärkiä ei saa käyttää uudelleen.
- Kasettia ei saa käyttää, jos se näyttää märältä tai jos kannen tiiviste näyttää rikkoutuneelta.
- Xpert NPM1 Mutation -kasettia ei saa käyttää, jos reagenssia on lisätty väärään aukkoon.
- Xpert NPM1 Mutation -kasetteja ei saa avata sen jälkeen, kun testi on valmistunut.
- Varaa yksi pipetti- ja reagenssisarja pelkästään näytteenvalmistukseen.
- Laboratoriotakkien ja käsineiden on oltava puhtaita. Vaihda käsineet jokaisen näytteen käsittelyn välillä.
- Jos näytteitä tai kontroleja roiskuu, pidä käsineitä ja imeytää roiskunut neste paperipyyhkeisiin. Puhdista sen jälkeen kontaminoitunut alue juuri valmistellun kotitalousvalkaisuaineen 1:10-laimennoksella. Vaikuttavan kloorin lopullisen pitoisuuden pitää olla 0,5 % maassasi käytettävän kotitalousvalkaisuaineen pitoisuudesta riippumatta. Anna aineen vaikuttaa vähintään kaksi minuuttia.
- Varmista, että työalue on kuiva ennen kuin 70-prosenttista denaturoitua etanolia käytetään valkaisuainejäämän poistamiseen. Työpintojen on annettava kuivua kokonaan ennen jatkamista. Kontaminaatio- tai roiskumistilanteessa on vaihtoehtoisesti noudatettava laitoksen vakiotoimenpiteitä. Kun kyseessä on laitteisto, noudata valmistajan suosituksia dekontaminaation suhteen.

10 Kemialliset vaarat

Huomautus Seuraavat tiedot soveltuvat koko tuotteeseen, johon sisältyvät proteinaasi K, lyysi-, pesu- ja huuhtelureagenssit.

- CLP/GHS-järjestelmän varoitusmerkki: 
- Huomiosana: VAARA
- **YK:n GHS-järjestelmän vaaralausekkeet**
 - Helposti syttyvä neste ja höyry H225.
 - Ärsyttää ihoa H315.
 - Ärsyttää voimakkaasti silmiä H319.
 - Saattaa aiheuttaa uneliaisuutta ja huimausta H336.
 - Epäillään aiheuttavan perimävaurioita H341.
- **YK:n GHS-järjestelmän turvalausekkeet**
 - **Ennaltaehkäisy**
 - Katso käyttöä edeltävät erityisohjeet käyttöturvallisuustiedotteesta.
 - Lue erityisohjeet ennen käyttöä.
 - Lue varoitukset huolellisesti ennen käsittelyä.
 - Suojaa lämmöltä, kipinöiltä, avotulelta ja/tai kuumilta pinnoilta. Tupakointi kielletty.
 - Säilytä tiiviisti suljettuna.
 - Vältä sumun, höyryjen tai suihkeen hengittämistä.
 - Pese huolellisesti käsittelyn jälkeen.
 - Käytä ainoastaan ulkona tai tiloissa, joissa on hyvä ilmanvaihto.
 - Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.
 - Käytä vaadittuja henkilönsuojaimia.
 - **Pelastustoimenpiteet**
 - TULIPALON sattuessa: Käytä palon sammuttamiseen asianmukaista ainetta.
 - JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää.
 - Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.
 - JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE (tai hiuksiin): Riisu saastunut vaatetus välittömästi. Huuhdo /suihkuta iho vedellä.
 - Erityiskäsittely, lisätietoa ensiapua koskevassa osassa.

- Riisu ja pese saastunut vaatetus ennen uudelleenkäyttöä.
- Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.
- JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.
- Jos silmä-ärsytys jatkuu: Hakeudu lääkäriin.
- Altistumisen tapahduttua tai jos epäillään altistumista: Hakeudu lääkäriin.
- **Varastoiminen/hävittäminen**
 - Säilytä viileässä.
 - Varastoi paikassa, jossa on hyvä ilmanvaihto.
 - Säilytä tiiviisti suljettuna.
 - Varastoi lukitussa tilassa.
 - Hävitä sisältö ja/tai säiliö paikallisten, alueellisten, kansallisten ja/tai kansainvälisten säännösten mukaan.

11 Näytteen ottaminen ja varastoiminen

- Ääreisverinäytteet on otettava EDTA-putkiin laitoksen ohjeistusta noudattaen. Plasmaa ei saa erottaa soluista.
- Näytteitä on säilytettävä 2–8 °C:ssa ennen testausta enintään kolmen päivän (72 tunnin) ajan.
- Näytteen asianmukainen ottaminen ja säilytys ovat ratkaisevan tärkeitä testin toiminnan kannalta. Näytteen stabiliteetti on arvioitu vain jäljempänä kohdassa Osa 12, Toimenpide, lueteltuja säilytysolosuhteita käyttäen Xpert NPM1 Mutation -testillä.

12 Toimenpide

12.1 Ennen käyttöä

Ota verinäyte, näytteen valmistelureagenssit ja kasetit jääkaappisäilytyksestä kaksikymmentä (20) minuuttia ennen toimenpiteen aloittamista ja anna niiden tasaantua huoneenlämpöön. Sentrifugoi proteinaasi K:ta (PK) hetken ajan mikrosentrifugissa.

Tärkeää Alota määritys yhden tunnin kuluessa siitä, kun näyttereagenssilla käsitelty näyte lisätään kasettiin.

Tärkeää Poista kasetti pahvipakkauksesta ennen näytteen valmistamista. (Katso kohta Osa 12.3, Kasetin valmistelu.)

12.2 Näytteen valmisteleminen

12.2.1 Tunteuttoman valkosolun määrän sisältävän näytteen tai alle 30 miljoonaa valkosolua/ml sisältävien näytteiden valmisteleminen

1. Lisää uuden, merkityn 50 ml:n kartioputken pohjalle 100 µl proteinaasi K:ta (PK).
2. Varmista verinäytteen hyvä sekoittuminen kääntämällä verinäyteputkea 8 kertaa ylösalaisin välittömästi ennen pipetointia. Katso EDTA-verinäyteputken valmistajan antamat ohjeet.
3. Lisää 4 ml verinäytettä PK:ta jo sisältävään putkeen.
4. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 3 sekuntia.
5. Inkuboi huoneenlämmössä 1 minuutin ajan.
6. Lisää samaan putkeen 2,5 ml lysesireagenssia (LY).

Huomautus Ota jäljelle jäänyt lysesireagenssi talteen käytettäväksi uudelleen vaiheessa 13.

7. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia.
8. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
9. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia.
10. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
11. Sekoita näyte napauttamalla putken pohjaa 10 kertaa.
12. Siirrä 1 ml valmistettua lyaattia uuteen, merkittyyn 50 ml:n kartioputkeen.

Huomautus

Jäljelle jäänyttä lysaattia voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 48 tuntia tai -20 °C:ssa tai alhaisemmassa lämpötilassa enintään yhden kuukauden ajan.

13. Lisää lysaattia sisältävään uuteen kartiotutkeen 1,5 ml vaiheessa 6 talteen otettua LY-reagenssia.
14. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia.
15. Inkuboi huoneenlämmössä 10 minuuttia.
16. Lisää samaan kartiotutkeen 2 ml reagenssilaatuista absoluuttista etanolia (käyttäjän hankkima).
17. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia. Laita sivuun.
18. Hävitä kaikki jäljelle jäänyt PK- tai LY-reagenssi.

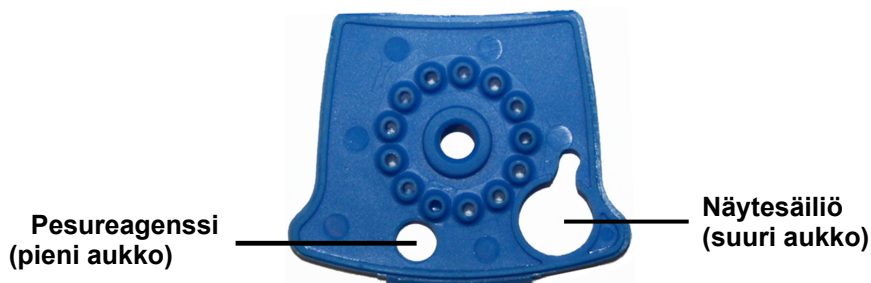
12.2.2 Näytteen valmistaminen, jonka valkosolumäärä on yhtä suuri tai suurempi kuin 30 miljoonaa valkosolua/ml

1. Lisää uuden 50 ml:n kartiotutken pohjalle 100 µl PK:ta.
2. Varmista verinäytteen hyvä sekoittuminen kääntämällä verinäyteputkea 8 kertaa ylösalaisin välittömästi ennen pipetointia. Katso EDTA-verinäyteputken valmistajan antamat ohjeet.
3. Lisää putkeen, jossa on jo PK:ta, 250 µl verinäytettä ja 3,75 ml 1xPBS-puskuria (pH 7,4, käyttäjän hankkima).
4. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 3 sekuntia.
5. Inkuboi huoneenlämmössä 1 minuutin ajan.
6. Noudata kohdan Osa 12.2.1 vaiheita 6–17 lopullisen lysaatin valmistamiseksi.
7. Hävitä kaikki jäljelle jäänyt PK- tai LY-reagenssi.

12.3 Kasetin valmisteleminen

Näytteen lisääminen Xpert NPM1 Mutation -kasettiin:

1. Ota kasetti pahvipakkauksesta.
2. Tarkasta kasetti vaurion varalta. Jos se on vaurioitunut, sitä ei saa käyttää.
3. Avaa kasetti kasetin kantta nostamalla ja siirrä yhden (1) pesureagenssiampullin koko sisältö pesureagenssisäiliöön (jossa on pieni aukko). Ks. Kuva 1.
4. Pipetoi valmistettu näyte kokonaisuudessaan (4,5 ml) näytekammioon (suuri aukko). Ks. Kuva 1.



Kuva 1. Xpert NPM1 Mutation -kasetti (kuva ylhäältä)

5. Sulje kasetin kansi. Varmista, että kansi napsahtaa kunnolla paikoilleen. Aloita määrittys (ks. Osa 12.4, Määrittymisen aloittaminen).

12.4 Määrittymisen aloittaminen

Tärkeää Varmista ennen määrittymisen aloittamista, että järjestelmässä on GeneXpert Dx -ohjelmistoversio 6.2 tai sitä uudempi ja että ohjelmistoon on tuotu oikea analyysin määrittelytiedosto. Tässä osassa luetaan GeneXpert Dx System -järjestelmän käytön oletusvaiheet.

Huomautus

Noudatetut vaiheet voivat olla erilaisia, jos järjestelmänvalvoja on muuttanut järjestelmän oletustyönkulun.

1. Käynnistä GeneXpert-järjestelmä kääntämällä ensin GeneXpert Dx -instrumentti päälle ja sen jälkeen tietokone. GeneXpert Dx-ohjelmisto käynnistyy automaattisesti tai se on mahdollisesti avattava kaksoinapsauttamalla GeneXpert Dx -ohjelmiston pikakuvaketta Windows®-työpöydällä.
2. Kirjautu sisään GeneXpert -ohjelmistoon käyttäjänimelläsi ja salasasanallasi.

3. Valitse **GeneXpert System** -ikkunasta **Luo testi (Create Test)** (GeneXpert Dx). Näyttöön avautuu **Luo testi (Create Test)** -ikkuna.
4. Skannaa tai kirjoita Potilastunniste (Patient ID). Jos Potilastunniste (Patient ID) kirjoitetaan, varmista, että Potilastunniste (Patient ID) kirjoitetaan oikein. Potilastunniste (Patient ID) liitetään testituloksiin ja se näytetään **Näytä tulokset (View Results)** -ikkunassa ja kaikissa raporteissa. **Skannaa näytetunnisteen viivakoodi (Scan Sample ID Barcode)** -valintaikkuna avautuu.
5. Skannaa tai näppäile Näytetunniste (Sample ID). Jos Näytetunniste (Sample ID) näppäillään, varmista, että Näytetunniste (Sample ID) kirjoitetaan oikein. Näytetunniste (Sample ID) näytetään **Näytä tulokset (View Results)** -ikkunassa vasemmalla puolella ja kaikissa raporteissa. **Skannaa kasetin viivakoodi (Scan Cartridge Barcode)** -valintaikkuna avautuu.
6. Skannaa Xpert NPM1 Mutation -kasetissa oleva viivakoodi. Ohjelmisto käyttää viivakoodin tietoja ja täyttää automaattisesti seuraavien kenttien tiedot: Reagenssierän tunniste (Reagent Lot ID), Kasetin sarjanro (Cartridge SN) ja Viimeinen käyttöpäivä (Expiration Date).

Huomautus

Jos Xpert NPM1 Mutation -kasetin viivakoodi ei skannaudu, toista testi uudella kasetilla. Jos olet skannannut kasetin viivakoodin ohjelmistoon eikä analyysin määrittelytiedosto ole saatavilla, esiin ilmestyvä näyttö osoittaa, että analyysin määrittelytiedostoa ei ole ladattu järjestelmään. Jos tällainen näyttö ilmestyy, ota yhteys Cepheidin tekniseen tukeen.

7. Valitse **Aloita testi (Start Test)**. Sinun on ehkä kirjoitettava salasanasi näkyviin tulevaan valintaikkunaan.
8. Avaa vihreällä vilkkuvalla valolla varustettu instrumenttimoduulin luukku ja lataa kasetti.
9. Sulje luukku. Testi käynnistyy ja vihreä valo lakkaa vilkkumasta. Kun määrittäminen on valmis, valo sammuu.
10. Odota, kunnes järjestelmä avaa luukun lukon ennen moduulin luukun avaamista ja kasetin poistamista.
11. Hävitä käytetyt kasetit asianmukaiseen näytejättesäiliöön laitoksen vakiomenetelmiä noudattaen.

Huomautus

Aika tulokseen on alle 3 tuntia (noin 30 minuuttia järjestelmän ulkopuolista näytteen valmistelua ja määrittämisen ajoaika alle 2,5 tuntia).

13 Tulosten näyttäminen ja tulostaminen

Tässä osassa luetellaan kaikki tulosten näyttämisen ja tulostamisen perusvaiheet. Yksityiskohtaiset tulosten näyttämisen- ja tulostamisohjeet, ks. *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

- Näytä tulokset valitsemalla kuvake **Näytä tulokset (View Results)**.
- Kun määrittäminen on tehty, näytä tulokset ja/tai laadi PDF-raporttiedosto valitsemalla **Raportti (Report)** -painike **Näytä tulokset (View Results)** -näytöstä.

14 Laadunvalvonta

Jokainen kasetti sisältää endogeenisen ABL1-kontrollin ja koettimen tarkistuskontrollin (PCC).

Endogeeninen ABL1-kontrolli — Endogeeninen ABL1-kontrolli varmistaa, että määrittämisessä käytetään riittävää määrää näytettä. Lisäksi tämä kontrolli havaitsee reaaliaikaisen PCR-analyysin näytteeseen liittyvän estymisen. ABL1-kontrolli läpäistään, jos se täyttää määritetyt hyväksymiskriteerit.

Koettimen tarkistuskontrolli (PCC) — Ennen PCR-reaktion aloittamista GeneXpert-järjestelmä mittaa fluoresenssisignaalin koettimista ja monitoroi helmen nesteytystä, reaktioputken täyttymistä ja sitä, ovatko kaikki kasetissa olevat reaktiokomponentit toimintakykyisiä. Koettimen tarkistuskontrolli (PCC) läpäistään, jos se täyttää määritetyt hyväksymiskriteerit.

15 Tulosten tulkitseminen

GeneXpert-järjestelmä tulkitsee automaattisesti tulokset mitatuista fluoresenssisignaaleista ja sisällytetyistä laskenta-algoritmeista, ja tulokset näytetään **Näytä tulokset (View Results)** -ikkunassa. Mahdolliset tulokset ja tulkinnat esitetään kohdassa Taulukko 1.

Taulukko 1. Xpert NPM1 Mutation -testitulokset ja tulkinta

Tulos	Tulkinta
NPM1-mutaatio HAVAITTU (NPM1 Mutation DETECTED) Ks Kuva 2, Kuva 3, Kuva 4	NPM1-mutaation transkripti havaittiin. <ul style="list-style-type: none"> NPM1-mutaatio HAVAITTU (NPM1 Mutation DETECTED) – NPM1-mutaation transkripti havaittiin, ja sen syklin kynnysarvo (Ct) on kelpaavalla vaihteluvälillä ja päätepiste kynnysasetuksen yläpuolella. Mahdollisia havaittuja tuloksia: <ul style="list-style-type: none"> NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [# ,## %] (NPM1 Mutation DETECTED [# .##%]); Kuva 2. NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [ylittää LoQ:n ylärajan] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ]); Kuva 3. NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [alittaa LoD:n; <# ,### %] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; # .###%]); Kuva 4. ABL LÄPÄISTY (PASS) – ABL-transkripti havaittiin, ja sen syklin kynnysarvo (Ct) on kelpaavalla vaihteluvälillä ja päätepiste kynnysasetuksen yläpuolella. Koettimen tarkistus LÄPÄISTY (PASS) – kaikki koettimen tarkistuksen tulokset läpäisivät testin.
NPM1-mutaatiota EI HAVAITTU (NPM1 Mutation NOT DETECTED) Ks. Kuva 5	NPM1-mutaation transkriptia ei havaittu. <ul style="list-style-type: none"> NPM1-mutaatiota EI HAVAITTU (NPM1 Mutation NOT DETECTED) – NPM1-mutaation transkriptia ei havaittu, ja sen syklin kynnysarvo (Ct) on nolla tai kelpaavan vaihteluvälin ylärajan yläpuolella ja/tai päätepiste kynnysasetuksen alapuolella. ABL LÄPÄISTY (PASS) – ABL-transkripti havaittiin, ja sen syklin kynnysarvo (Ct) on kelpaavalla vaihteluvälillä ja päätepiste kynnysasetuksen yläpuolella. Koettimen tarkistus LÄPÄISTY (PASS) – kaikki koettimen tarkistuksen tulokset läpäisivät testin.
MITÄTÖN (INVALID) Katso Kuva 6, Kuva 7, Kuva 8, Kuva 9, Kuva 10	NPM1-mutaation transkriptin määrää ei voidan määrittää, koska näyte sisältää liikaa NPM1-mutaation transkriptia ja/tai liikaa tai liian vähän ABL-transkriptia. Katso lisäohjeita näytteen testaamiseksi uudelleen: kohta Osa 18, Vianmääritysopas. <ul style="list-style-type: none"> NPM1-mutaatio EI KELPAA (NPM1 Mutation INVALID) – NPM1:n syklin kynnysarvo (Ct) oli yli nollan ja alle kelpaavan vaihteluvälin alarajan alapuolella (Kuva 8, Kuva 9) ABL EI LÄPÄISTY (FAIL) – ABL-syklin kynnysarvo (Ct) ei ollut kelpaavalla vaihteluvälillä tai päätepiste oli kynnysarvon alapuolella (Kuva 6, Kuva 7, Kuva 8, Kuva 10) Koettimen tarkistus – LÄPÄISTY (PASS); kaikki koettimen tarkistuksen tulokset läpäisty.
VIRHE (ERROR) Ks. Kuva 11	NPM1-mutaation transkriptitasoa ei voida määrittää. Katso lisäohjeita näytteen testaamiseksi uudelleen: kohta Osa 18, Vianmääritysopas. <ul style="list-style-type: none"> NPM1-mutaatio EI TULOSTA (NO RESULT) ABL EI TULOSTA (NO RESULT) Koettimen tarkistusta EI LÄPÄISTY (FAIL) – kaikki tai yksi koettimen tarkistuksen tuloksista ei läpäissyt testiä. Koettimen tarkistus LÄPÄISTY (PASS) tai – (NA) (ei sovellu) ja Painehylkäys (Pressure Abort)*. *Jos koettimen tarkistus läpäistiin, virheen aiheutti se, että enimmäispaineraja ylitti hyväksyttävän vaihteluvälin, tai kyseessä oli järjestelmäkomponentin toimintahäiriö.
EI TULOSTA (NO RESULT)	NPM1-mutaation transkriptitasoa ei voida määrittää. Tietoja ei kerätty riittävästi määrittämisen tuloksen saamiseksi. Näin voi käydä esimerkiksi, jos käyttäjä pysäytti meneillään olevan määrittämisen. Katso lisäohjeita näytteen testaamiseksi uudelleen: kohta Osa 18, Vianmääritysopas. <ul style="list-style-type: none"> NPM1-mutaatio EI TULOSTA (NO RESULT) ABL EI TULOSTA (NO RESULT) Koettimen tarkistus – (NA) (ei sovellu)

16 Kvantitatiiviset tulokset

Kvantitatiiviset Xpert NPM1 Mutation -tulokset esitetään NPM1-mutaatio/ABL1:n prosenttisuhteena. Pakkauksille annetaan eräkohtaiset tehokkuuden ($E_{\Delta Ct}$) ja skaalauskerroimen (SF) arvot, jotka sitovat NPM1-mutaation (A, B ja D) ja ABL1:n transkriptien kvantitoinnin synteettisen NPM1-mutaation ja ABL1:n kopiomääriin *in vitro* -transkriptoidun RNA:n (IVT-RNA:n) primaarisissa standardeissa.

Taulukko 2. Xpert NPM1 Mutation -testitulosten esimerkit

Määrittäminen	NPM1-mutantti		ABL		Xpert NPM1 Mutation Testitulokset	Huomautukset
	Ct	Tulos ^a	Ct	Tulos ^a		
1	5.2	MITÄTÖN (INVALID)	5.8	EI LÄPÄISTY (FAIL)	MITÄTÖN [NPM1-mutaatio- ja ABL-transkriptit liian korkeat] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcripts])	–
2	9	MITÄTÖN (INVALID)	5.5	EI LÄPÄISTY (FAIL)	MITÄTÖN [ABL-transkriptit liian korkeat] (INVALID [Too high ABL transcripts])	–
3	5.5	MITÄTÖN (INVALID)	8.5	LÄPÄISTY (PASS)	MITÄTÖN [NPM1-mutaatiotranskriptit liian korkeat] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcripts])	–
4	25,0	MITÄTÖN (INVALID)	21,8	EI LÄPÄISTY (FAIL)	MITÄTÖN [ABL-transkripti riittämätön] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	–
5	0	MITÄTÖN (INVALID)	0	EI LÄPÄISTY (FAIL)	MITÄTÖN [ei ABL-transkriptia] (INVALID [No ABL transcript])	–
6	8.5	POS	13,6	LÄPÄISTY (PASS)	NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [ylittää LoQ:n ylärajan] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ])	–
7	22,5	POS	14,8	LÄPÄISTY (PASS)	NPM1-mutaatio HAVAITTU [1,05 %] (NPM1 Mutation DETECTED [1.05%])	Raportoitu arvo: 1,05 %
8	27,9	POS	14,0	LÄPÄISTY (PASS)	NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [alittaa LoD:n; <0,030 %] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <0.030%])	–
9	0	NEG	14,6	LÄPÄISTY (PASS)	NEGATIIVINEN [ABL-transkripti riittävä] NEGATIVE [Sufficient ABL transcript]	–
10	0	EI TULOSTA (NO RESULT)	0	EI TULOSTA (NO RESULT)	VIRHE (ERROR)	Esimerkiksi virhe 5017 [ABL] koettimen tarkistus epäonnistui ([ABL] probe check failed)

^a Katso yksityiskohtaiset tiedot GeneXpert Dx -järjestelmän ohjelmiston analyysitulosten välilehdestä.

16.1 NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [#,## %] (NMP1 Mutation DETECTED [#,##%])

NPM1-mutaatio on havaittu tasolla #,## %.

Tuloksen ”NPM1-mutaatio HAVAITTU [#,## %] (NMP1 Mutation DETECTED [#,##%])” osalta NPM1-mutaatio on havaittavissa ja NPM1-mutaation Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 32, ja ABL:n Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20. GeneXpert -ohjelmisto laskee prosenttiosuuden % käyttämällä seuraavaa yhtälöä, jossa Delta Ct -arvo (ΔCt) saadaan kaavasta ABL Ct miinus NPM1-mutaation Ct:

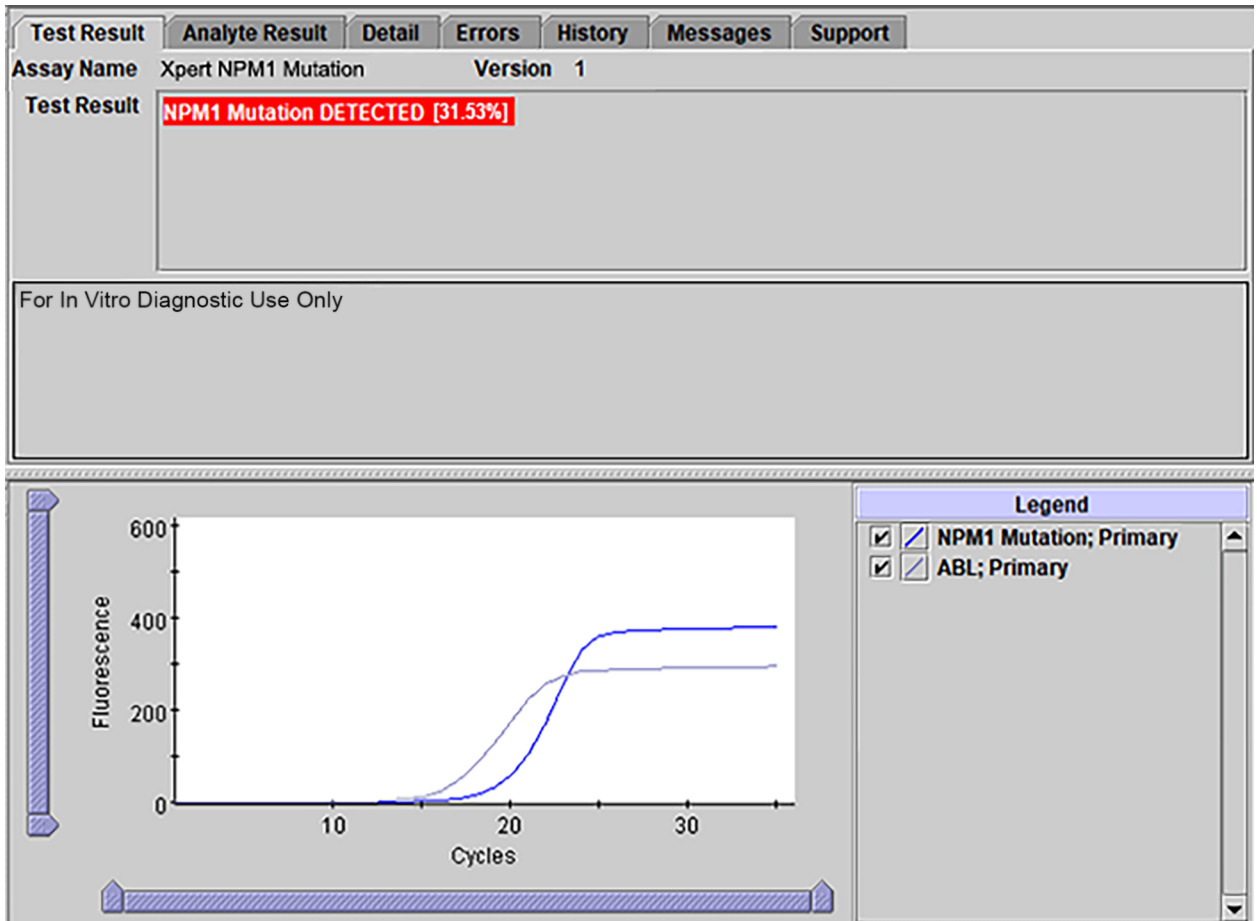
$$\% = E_{\Delta Ct}^{\Delta Ct} \times 100 \times \text{skaalauskerroin}$$

Huomautus

Skaalauskerroin (SF) on eräkohtainen parametri, joka sisältyy testikasetin viivakoodiin. Tämän tekijän arvo ja eräkohtainen määrittelyn tehokkuus ($E_{\Delta Ct}$) määritetään kunkin määrityserän laadunvalvontatestauksessa käyttäen primaarisia standardeja, jotka on kalibroitu synteettisen NPM1-mutaation ja ABL1:n kopiomääriin *in vitro* -transkriptoiduissa (IVT) RNA-kalibraattoreissa NPM1-mutaation transkriptin kvantitointia varten. $E_{\Delta Ct}$ -arvoksi on asetettu 1,95 ja SF -arvoksi on asetettu 1,79 tässä esitettyssä esimerkissä käyttämistä varten.

Esimerkki: Eräkohtainen $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
Määrittelyn ABL-Ct = 14,5; NPM1-mutaation Ct = 17,1; $\Delta Ct = -2,6$
 $\% = 1,95^{(-2,6)} \times 100 \times 1,79 = 31,53 \%$

Tulos: NPM1-mutaatio HAVAITTU [31,53 %] (NMP1 Mutation DETECTED [31.53%]). Ks. Kuva 2.



Kuva 2. GeneXpert Dx Tulosten näyttöikkuna: NPM1-mutaatio HAVAITTU [31,53 %] (NMP1 Mutation DETECTED [31.53%])

16.2 NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [ylittää LoQ:n ylärajan] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ])

NPM1-mutaatio on havaittu tasolla >500 %.

Tuloksen ”NPM1-mutaatio HAVAITTU [ylittää LoQ:n ylärajan] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])” osalta NPM1-mutaatio on havaittavissa ja NPM1-mutaation Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 32, ja ABL:n Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20. GeneXpert -ohjelmisto laskee prosenttiosuuden % käyttämällä seuraavaa yhtälöä, jossa Delta Ct -arvo (ΔCt) saadaan kaavasta ABL Ct miinus NPM1-mutaation Ct:

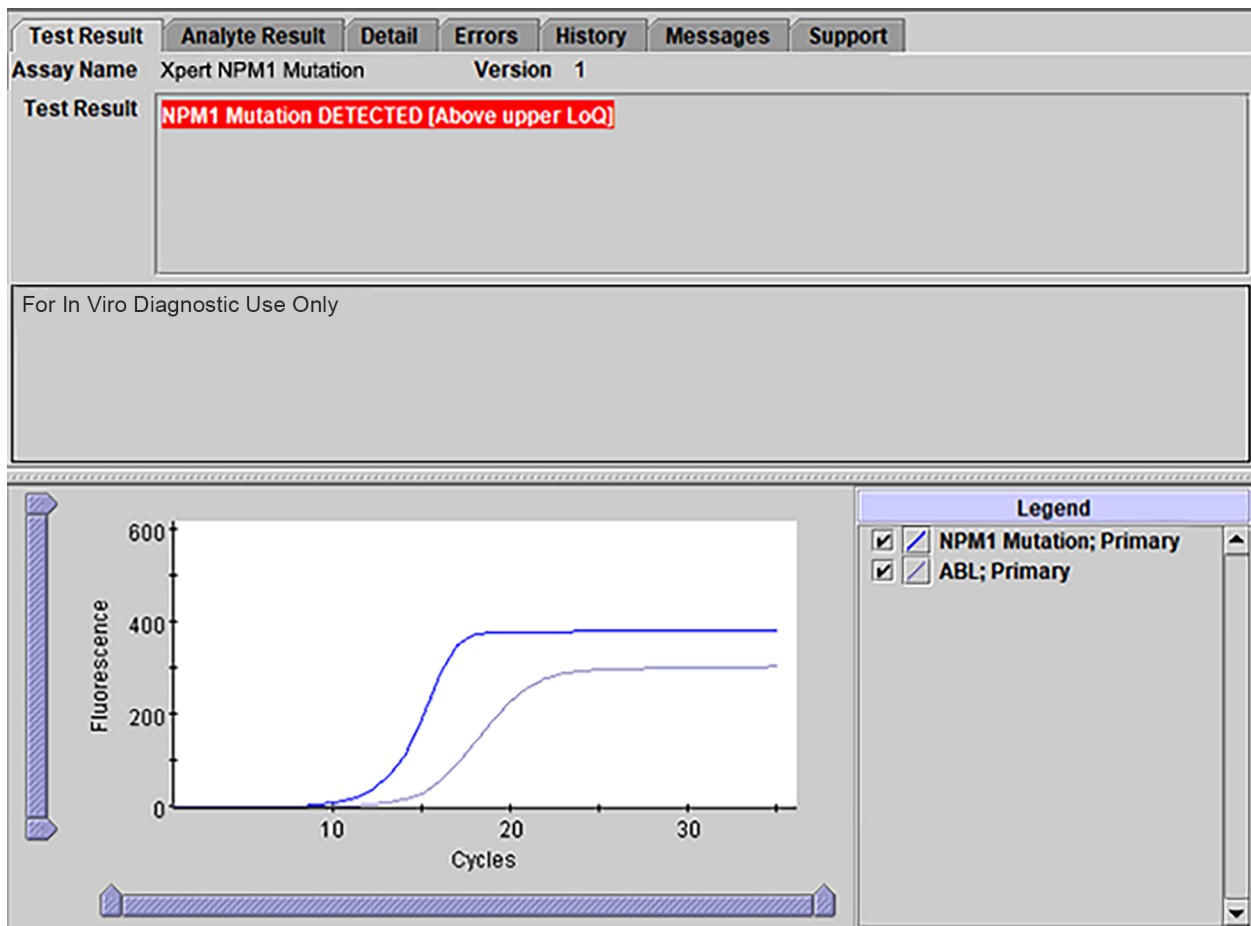
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{skaalauskerroin (SF)}$$

Skaalauskerroin (SF) on eräkohtainen parametri, joka sisältyy testikasetin viivakoodiin. Tämän tekijän arvo ja eräkohtainen määrittelyn tehokkuus ($E_{\Delta Ct}$) määritetään kunkin määrittelyserän laadunvalvontatestauksessa käyttäen primaarisia standardeja, jotka on kalibroitu synteettisen NPM1-mutaation ja ABL1:n kopiomääriin *in vitro* -transkriptoiduissa (IVT) RNA-kalibraattoreissa NPM1-mutaation transkriptin kvantitointia varten. $E_{\Delta Ct}$ -arvoksi on asetettu 1,95 ja SF-arvoksi on asetettu 1,79 tässä esitettyssä esimerkissä käyttämistä varten.

Huomautus

Esimerkki: Eräkohtainen $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
Määrittelyn ABL-Ct = 13,4; NPM1-mutaation Ct = 10,2; $\Delta Ct = 3,2$
 $\% = 1,95^{(3,2)} \times 100 \times 1,79 = 1516,92 \%$ on suurempi kuin määritetty määrittelyn LoQ-yläraja 500 %

Tulos: NPM1-mutaatio HAVAITTU [ylittää LoQ:n ylärajan] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ]). Ks. Kuva 3.



Kuva 3. GeneXpert Dx Tulosten näyttöikkuna: NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [ylittää LoQ:n ylärajan] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ])

16.3 NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [alittaa LoD:n; <0,030 %] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <0.030%])

NPM1-mutaatio on havaittu tasolla <0,030 %.

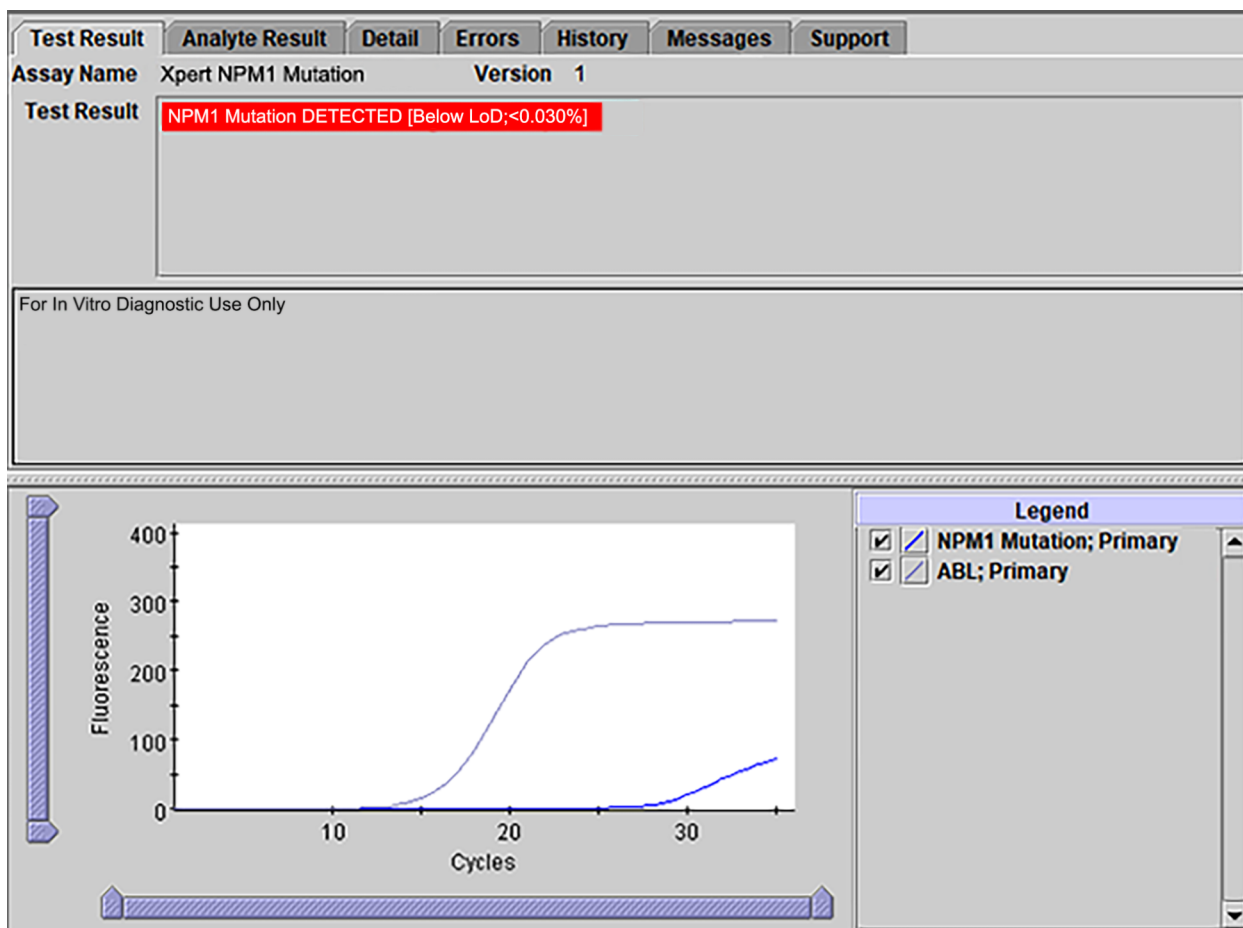
Tuloksen ”NPM1-mutaatio HAVAITTU [alittaa LoD:n; <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD, <0.030%])” osalta NPM1-mutaatio on havaittavissa ja NPM1-mutaation Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 32, ja ABL:n Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20. GeneXpert -ohjelmisto laskee prosenttiosuuden % käyttämällä seuraavaa yhtälöä, jossa Delta Ct -arvo (ΔCt) saadaan kaavasta ABL Ct miinus NPM1-mutaation Ct:

$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{skaalauskerroin (SF)}$$

Huomautus Skaalauskerroin (SF) on eräkohtainen parametri, joka sisältyy testikasetin viivakoodiin. Tämän tekijän arvo ja eräkohtainen määrityksen tehokkuus ($E_{\Delta Ct}$) määritetään kunkin määrityserän laadunvalvontatestauksessa käyttäen primäärisiä standardeja, jotka on kalibroitu synteettisen NPM1-mutaation ja ABL1:n kopiomäärin *in vitro* -transkriptoiduissa (IVT) RNA-kalibraattoreissa NPM1-mutaation transkriptin kvantitointia varten. $E_{\Delta Ct}$ -arvoksi on asetettu 1,95 ja SF-arvoksi on asetettu 1,79 tässä esitettyssä esimerkissä käyttämistä varten.

Esimerkki: Eräkohtainen $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
Määrityksen ABL-Ct = 14,3; NPM1-mutaation Ct = 28,8; $\Delta Ct = -14,5$
 $\% = 1,95^{(-14,5)} \times 100 \times 1,79 = 0,011 \%$ on suurempi kuin määritetty määrityksen LoD 0,030 %

Tulos: NPM1-mutaatio HAVAITTU [alittaa LoD:n; <0,030 %] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <0.030%]). Ks. Kuva 4.



Kuva 4. GeneXpert-ohjelmiston Näytä tulokset -ikkuna: NPM1-MUTAATIO HAVAITTU [alittaa LoD:n; <0,030 %] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <0.030%])

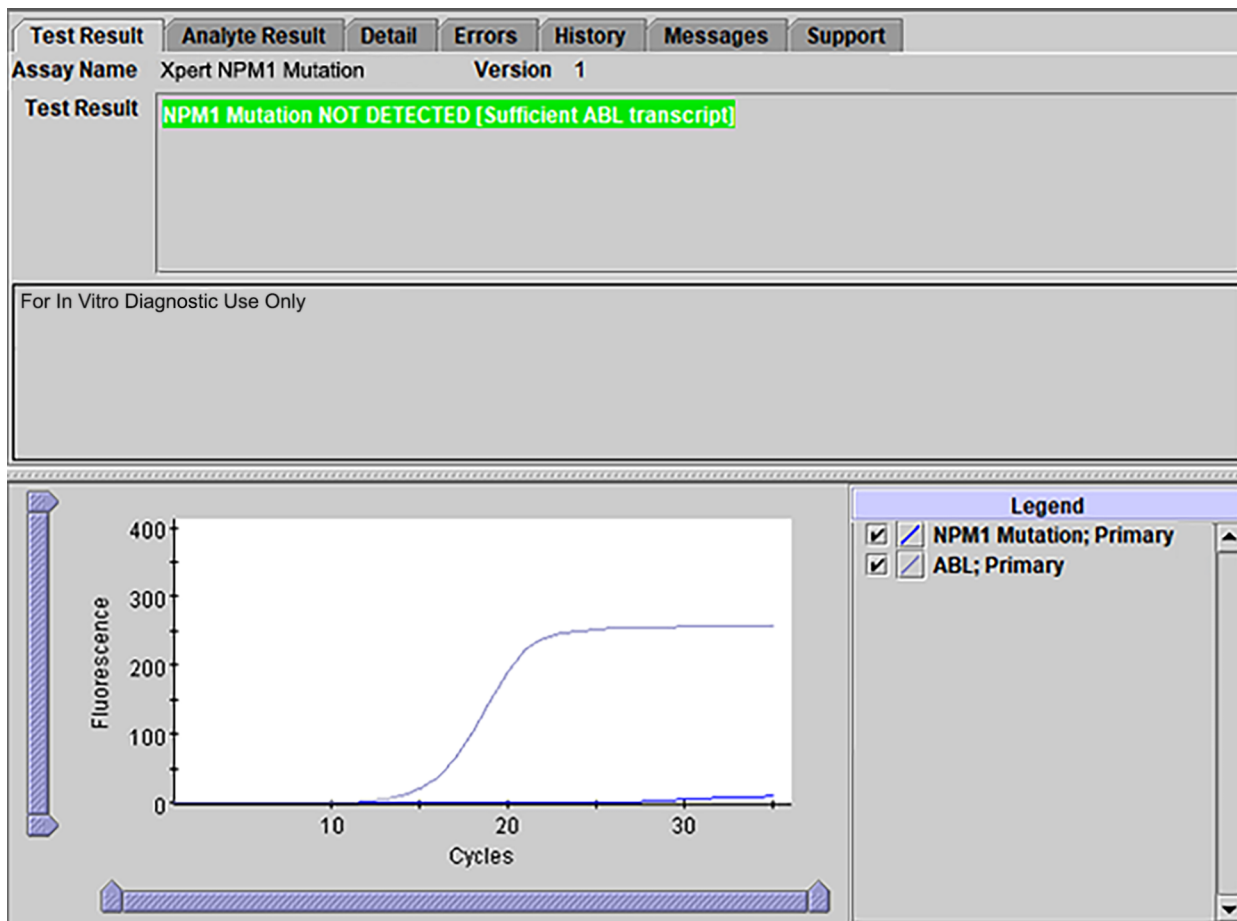
16.4 NPM1-mutaatiota EI HAVAITTU [ABL-transkripti riittävä] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

NPM1-mutaatiota ei havaittu ja NPM1-Ct oli yhtä suuri kuin 0 ja suurempi kuin 32 ja ABL:n Ct oli suurempi kuin 0 ja pienempi tai yhtä suuri kuin 20.

GeneXpert -ohjelmisto edellyttää, että ABL-Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20, jotta Xpert NPM1 Mutation -testi varmistaisi tuloksen ”ABL-transkripti riittävä (Sufficient ABL transcript)”. Ks. Osa 15, Tulosten tulkinta, taulukko 1.

Esimerkki: Määrittöksen NPM1-mutaation Ct = 0; ABL-Ct = 14,0, joka on 6:n ja 20:n välillä.

Tulos: NPM1-mutaatiota EI HAVAITTU [ABL-transkripti riittävä] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]). Ks. Kuva 5.



Kuva 5. GeneXpert-ohjelmiston Näytä tulokset -ikkuna: NPM1-mutaatiota EI HAVAITTU [ABL-transkripti riittävä] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

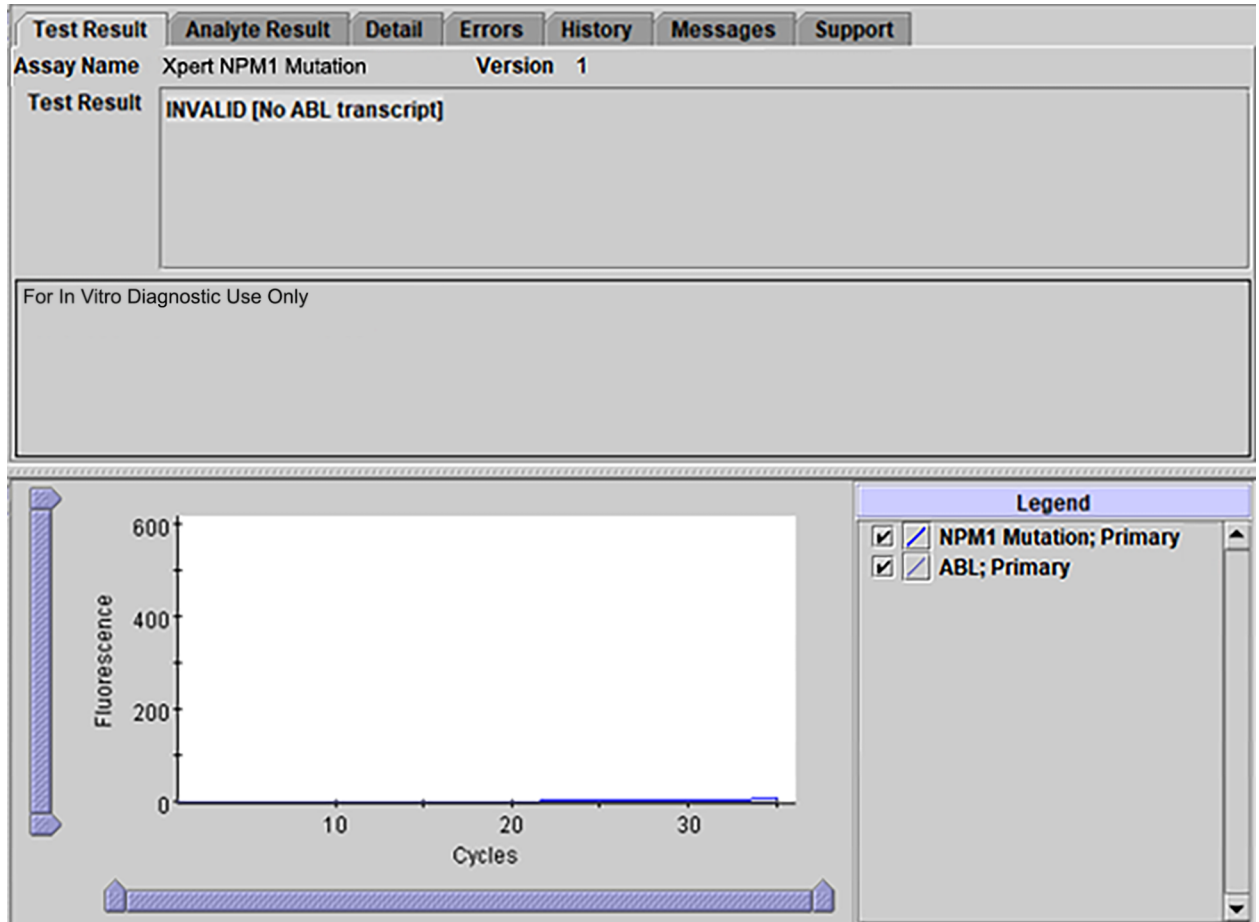
16.5 MITÄTÖN [ei ABL-transkriptia] (INVALID [No ABL transcript])

NPM1-mutaatio havaittiin tai sitä ei havaittu ja ABL-Ct oli yhtä suuri kuin 0.

GeneXpert -ohjelmisto edellyttää, että ABL-Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20, jotta Xpert NPM1 Mutation -testi varmistaisi tuloksen ”ABL-transkripti riittävä (Sufficient ABL transcript)”. Ks. Osa 18, Vianmäärittämisopas.

Esimerkki: Määrittäksen NPM1-mutaation Ct = 0; ABL-Ct = 0.

Tulos: MITÄTÖN [ei ABL-transkriptia] (INVALID [No ABL transcript]). Ks. Kuva 6.



Kuva 6. GeneXpert-ohjelmiston Näytä tulokset -ikkuna:
MITÄTÖN [ei ABL-transkriptia] (INVALID [No ABL transcript])

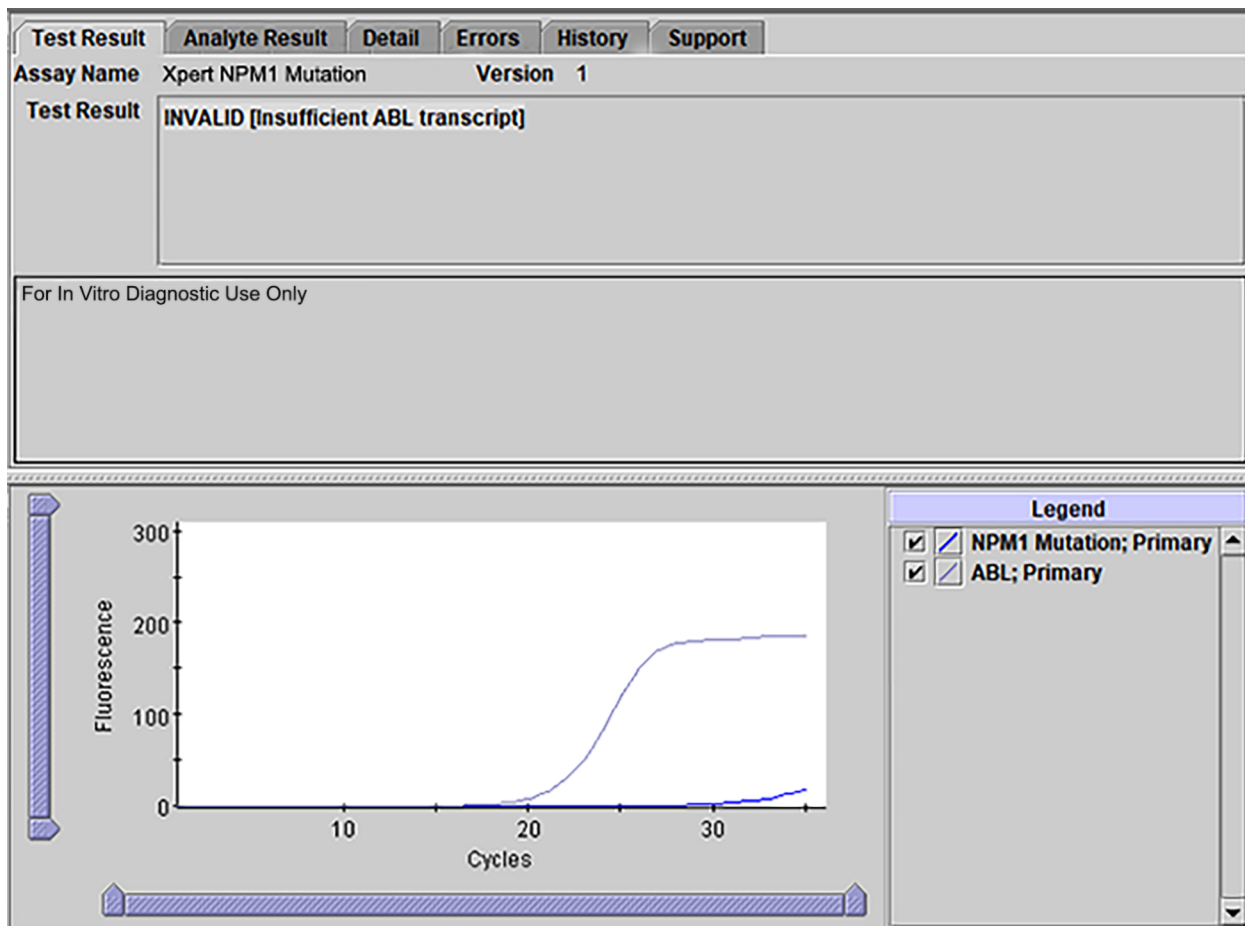
16.6 MITÄTÖN [ABL-transkripti riittämätön] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

NPM1-mutaatio havaittiin tai sitä ei havaittu ja ABL-Ct oli suurempi kuin 20.

GeneXpert -ohjelmisto edellyttää, että ABL-Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20, jotta Xpert NPM1 Mutation -testi varmistaisi tuloksen ”ABL-transkripti riittävä (Sufficient ABL transcript)”. Ks. Osa 18, Vianmääritysopas.

Esimerkki: Määrityksen NPM1-mutaation Ct = 33,3; ABL Ct = 20,2 on suurempi kuin 20.

Tulos: MITÄTÖN [ABL-transkripti riittämätön] (INVALID [Insufficient ABL transcript]). Ks. Kuva 7.



Kuva 7. GeneXpert-ohjelmiston Näytä tulokset -ikkuna: MITÄTÖN [ABL-transkripti riittämätön] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

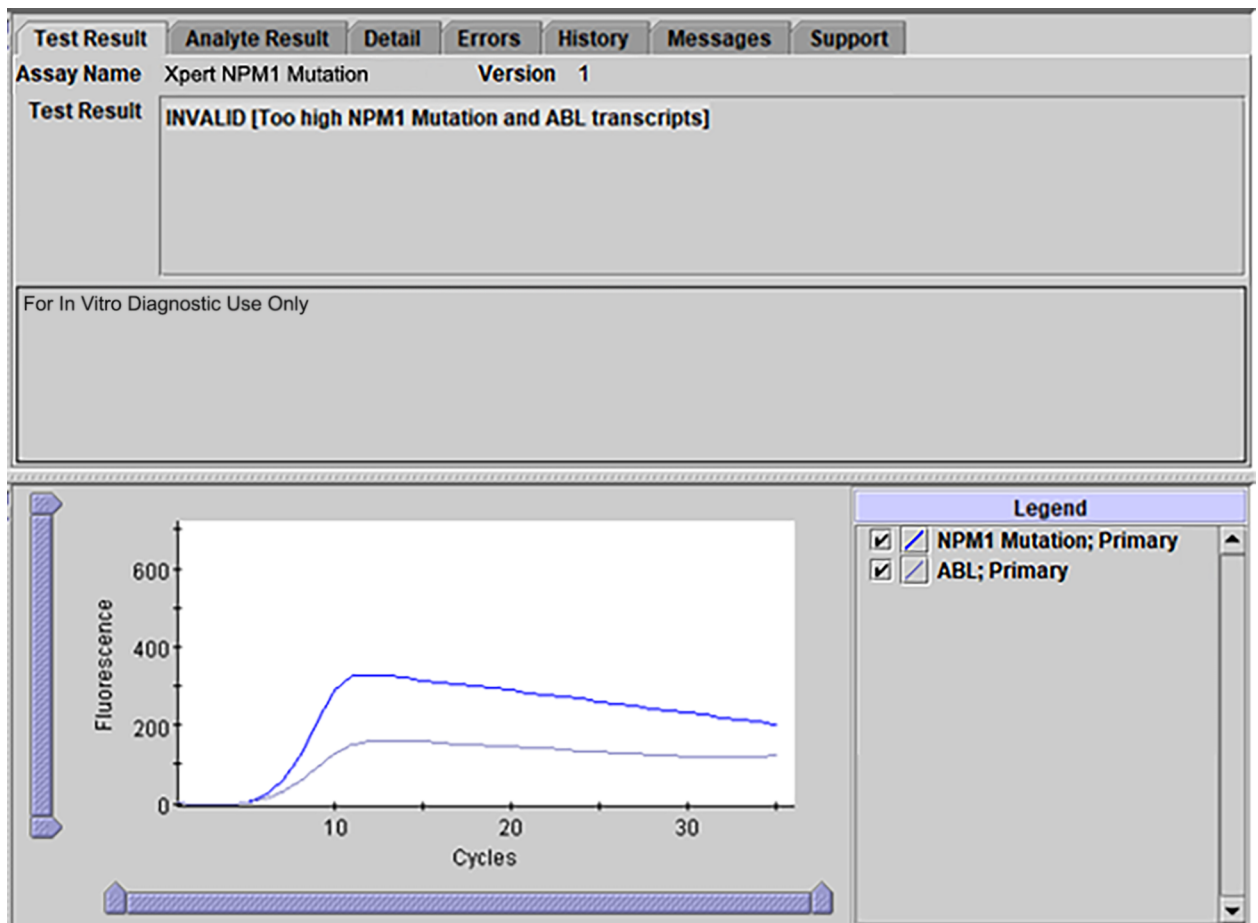
16.7 MITÄTÖN [NPM1-mutaatio- ja ABL-transkripti liian korkea] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

NPM1-mutaatio havaittiin ja sekä NPM1-mutaation että ABL:n Ct:t olivat suuremmat kuin 0 ja pienemmät kuin 6.

GeneXpert -ohjelmisto edellyttää, että ABL-Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20, jotta Xpert NPM1 Mutation -testi varmistaisi tuloksen ”ABL-transkripti riittävä (Sufficient ABL transcript)”. Ks. Osa 18, Vianmääritysopas.

Esimerkki: Määrittelyn NPM1-mutaation Ct = 5,4, joka on suurempi kuin 0 ja pienempi kuin 6; ABL-Ct = 5,9, joka on pienempi kuin 6.

Tulos: **MITÄTÖN [NPM1-mutaatio- ja ABL-transkripti liian korkea] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])**. Ks. Kuva 8.



Kuva 8. GeneXpert Dx Tulosten näyttöikkuna: MITÄTÖN [NPM1-mutaatio- ja ABL-transkripti liian korkea] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

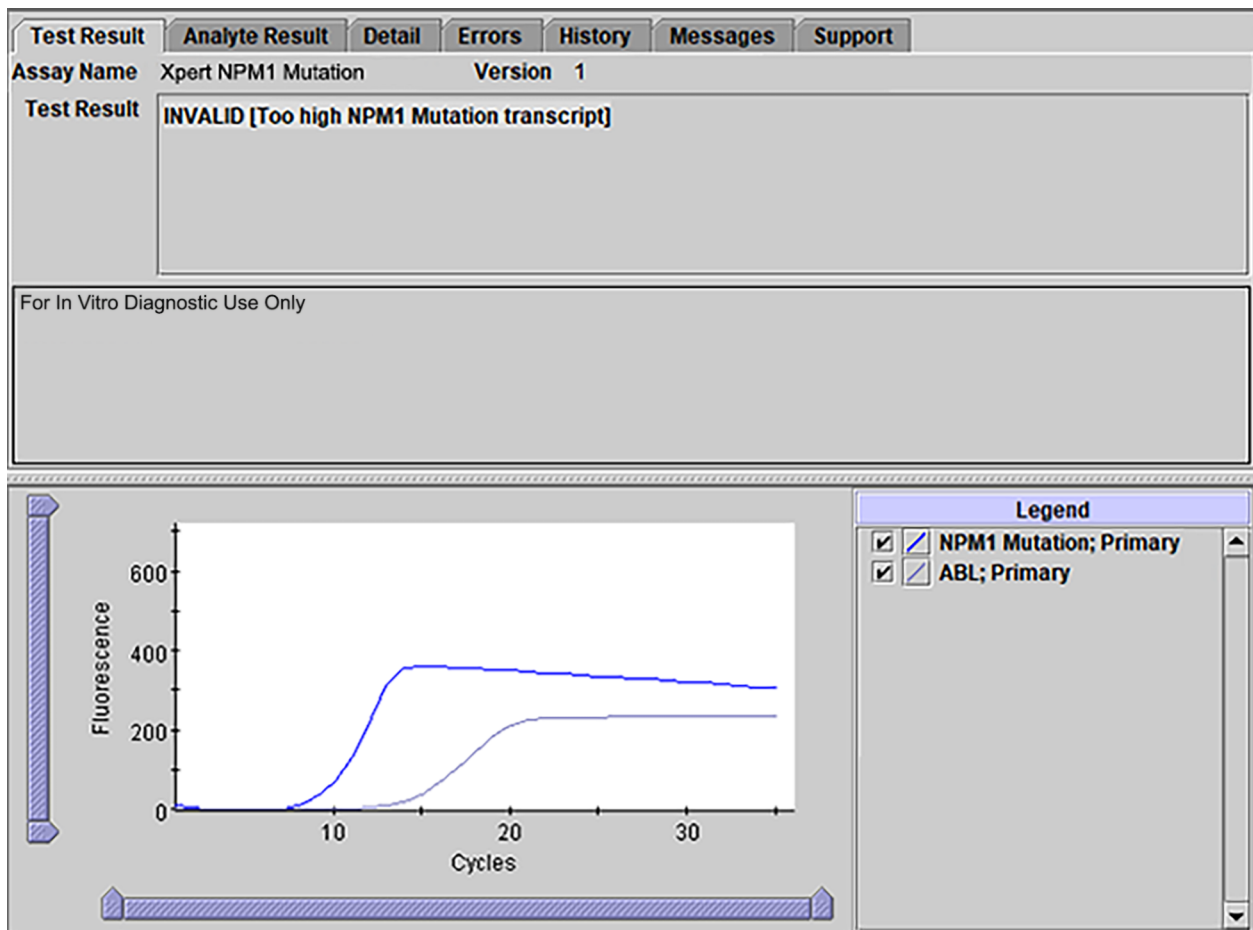
16.8 MITÄTÖN [NPM1-mutaatiotranskripti liian korkea] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

NPM1-mutaatio havaittiin ja NPM1-mutaation Ct oli suurempi kuin 0 ja pienempi kuin 6 ja ABL:n Ct oli suurempi kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20.

GeneXpert -ohjelmisto edellyttää, että ABL-Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20, jotta Xpert NPM1 Mutation -testi varmistaisi tuloksen ”ABL-transkripti riittävä (Sufficient ABL transcript)”. Ks. Osa 18, Vianmääritysopas.

Esimerkki: Määrittämisen NPM1-mutaation Ct = 5,8, joka on suurempi kuin 0 ja pienempi kuin 6; ABL-Ct = 13, joka on 6:n ja 20:n välillä.

Tulos: **MITÄTÖN [NPM1-mutaatiotranskripti liian korkea] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript]).** Ks. Kuva 9.



Kuva 9. GeneXpert-ohjelmiston Näytä tulokset -ikkuna: MITÄTÖN [NPM1-mutaatiotranskripti liian korkea] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

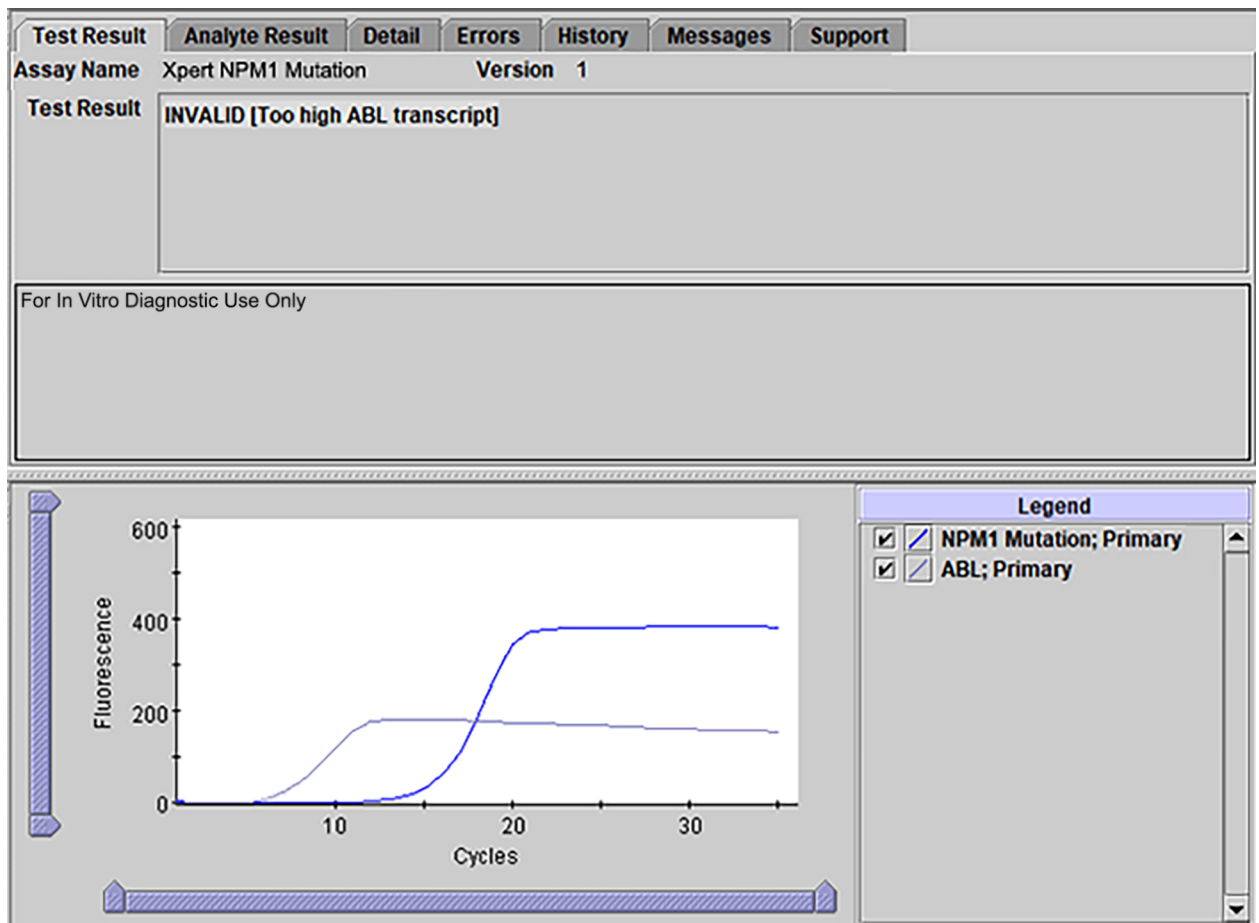
16.9 MITÄTÖN [ABL-mutaation transkripti liian korkea] (INVALID [Too high ABL Mutation transcript])

NPM1-mutaatio havaittiin ja NPM1-mutaation Ct oli suurempi kuin 6 ja pienempi tai yhtä suuri kuin 32 ja ABL:n Ct ei ollut yhtä suuri kuin 0 ja oli pienempi kuin 6.

GeneXpert -ohjelmisto edellyttää, että ABL-Ct on suurempi tai yhtäsuuri kuin 6 ja pienempi tai yhtäsuuri kuin 20, jotta Xpert NPM1 Mutation -testi varmistaisi tuloksen ”ABL-transkripti riittävä (Sufficient ABL transcript)”. Ks. Osa 18, Vianmäärittämissä.

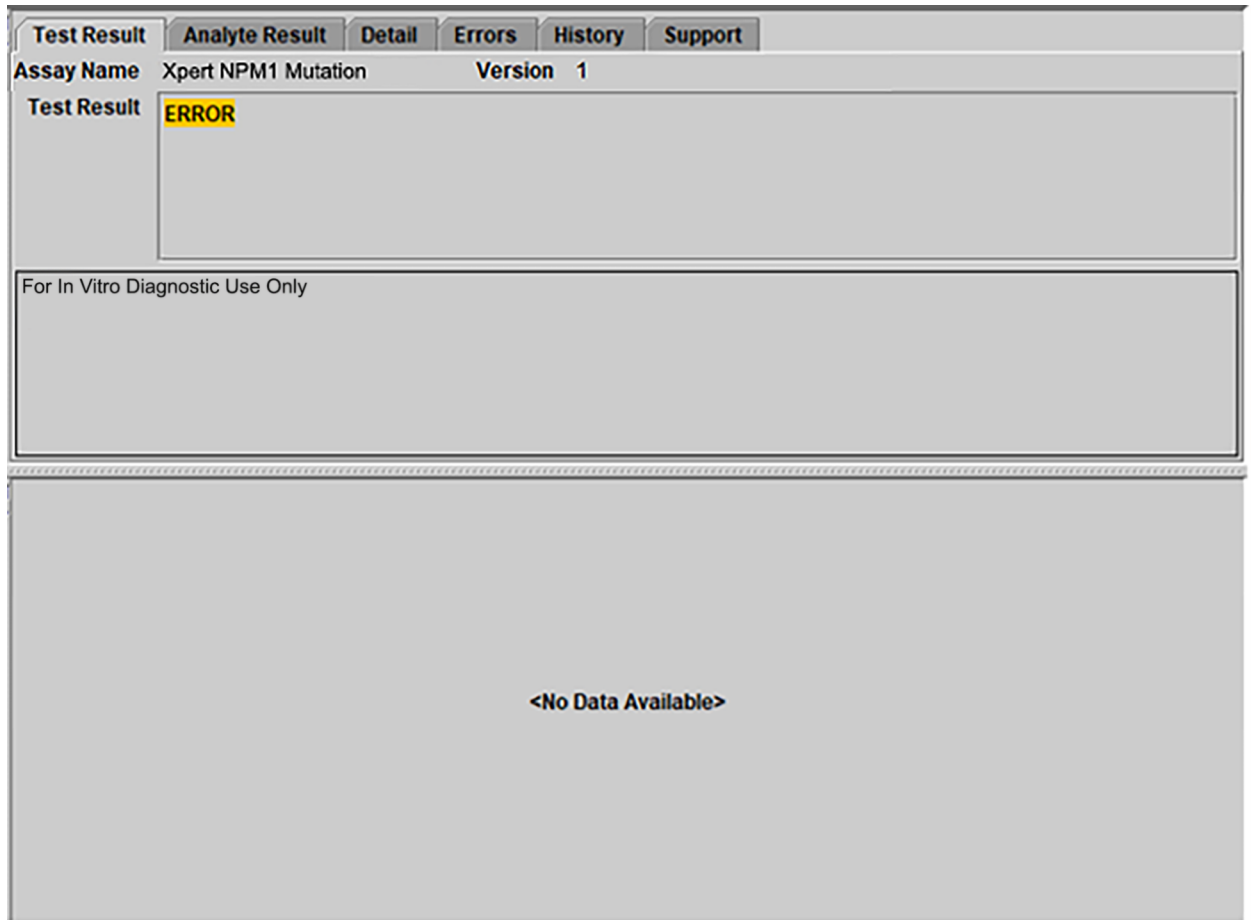
Esimerkki: Määrittäksen NPM1-mutaation Ct = 13,2; ABL Ct = 5,8 on pienempi kuin 6.

Tulos: **MITÄTÖN [ABL-transkripti liian korkea] (INVALID [Too high ABL transcript])**. Ks. Kuva 10.



Kuva 10. GeneXpert-ohjelmiston Näytä tulokset -ikkuna: MITÄTÖN [ABL-transkripti liian korkea] (INVALID [Too high ABL transcript])

16.10 VIRHE (ERROR)



Kuva 11. GeneXpert-ohjelmiston Näytä tulokset -ikkuna: VIRHE (ERROR)

17 Määrittämisen rajoitukset

- Määrittämistä ei ole tarkoitettu käytettäväksi ulkoisten kalibraattoreiden kanssa.
- Näihin menetelmiin tehdyt muutokset voivat muuttaa määrittämisen toimintakykyä.
- Tämä tuote on suunniteltu käyttöön vain EDTA-putkiin kerätyn veren kanssa.
- Hyytymisenestoaineena ei saa käyttää hepariinia, sillä se voi estää PCR-reaktion.
- Natriumsitraatti-, leukosyyttikerros (buffy coat -kerros)- ja luuydinnäytetyyppejä ei ole validoitu.
- Virheellisiä määrittämistuloksia saattavat aiheuttaa näytteen virheellinen ottaminen, käsittely tai säilytys tai näytteiden sekoittuminen. Käyttöohjeiden huolellinen noudattaminen on virheellisten tulosten välttämisen edellytys.
- Alukkeen tai koettimen sitoutuvilla alueilla olevat mutaatiot tai polymorfismit voivat vaikuttaa uusien tai tuntemattomien varianttien havaitsemiseen, mikä saattaa aiheuttaa virheellisen negatiivisen tuloksen.
- Valkosolujen liian suuret määrät voivat lisätä paineen kertymistä kasettiin ja aiheuttaa ajojen keskeytymisiin tai virheellisiin tuloksiin.
- Joidenkin erittäin vähäisiä ABL-transkriptitasoja tai alle 150 000 valkosolua/ml sisältävien näytteiden tulokseksi voidaan raportoida **MITÄTÖN (INVALID)** (tyyppi 1). Määrittämätön tulos ei sulje pois erittäin pienten leukemiasolumäärien esiintymistä potilaassa.

18 Vianetsintäopas

Taulukko 3. Vianetsintäopas

Määrittystulos	Mahdollisia syitä	Ehdotuksia
MITÄTÖN (INVALID)	<p>Tyyppi 1: Endogeenisen ABL-kontrollin häiriö:</p> <ul style="list-style-type: none"> Näytteen huono laatu RT-PCR:n estyminen ABL:n Ct >20 ja/tai pääte piste <100 	<ul style="list-style-type: none"> Tarkista näytteen laatu (esim. näytteen säilytyksen vaatimus on ylitetty, kuten esim. aika ja lämpötila). Uusi testi alkuperäisellä näytteellä (jos käytettävissä) tai talteen otetulla lysaatilla ja uudella kasetilla noudattaen menettelyä, joka kuvataan kohdassa Osa 19.1, Uusintatestitoimenpide testituloksen VIRHE (ERROR) tai MITÄTÖN (INVALID) (tyyppi 1) kyseessä ollen.
	<p>Tyyppi 2: NPM1-mutaation transkriptiotasoa ei voida määrittää johtuen näytteen sisältämistä liiallisista NPM1-mutaation tai ABL:n transkripteista (Ct <6)</p>	<p>Uusi testi alkuperäisellä näytteellä (jos käytettävissä) tai talteen otetulla lysaatilla ja uudella kasetilla noudattaen menettelyä, joka kuvataan kohdassa Osa 19.2, Uusintatestitoimenpide testituloksen VIRHE (ERROR) (koodi 2008) tai MITÄTÖN (INVALID) (tyyppi 2) kyseessä ollen.</p>
VIRHE (ERROR) (koodi 2008)	Paine ylittää raja-arvon (virheviesti 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Tarkista näytteen laatu Tarkista rajusti koholla oleva WBC-tulos Uusi testi alkuperäisellä näytteellä (jos käytettävissä) tai talteen otetulla lysaatilla ja uudella kasetilla noudattaen menettelyä, joka kuvataan kohdassa Osa 19.2, Uusintatestitoimenpide testituloksen VIRHE (ERROR) (koodi 2008) tai MITÄTÖN (INVALID) (tyyppi 2) kyseessä ollen.
VIRHE (ERROR) (koodi 5006, 5007, 5008 ja 5009*) *Tämä ei ole kattava VIRHE (ERROR) -koodien luettelo.	Koettimen tarkistushäiriö	Uusi testi alkuperäisellä näytteellä (jos käytettävissä) tai talteen otetulla lysaatilla ja uudella kasetilla noudattaen menettelyä, joka kuvataan kohdassa Osa 19.1, Uusintatestitoimenpide testituloksen VIRHE (ERROR) tai MITÄTÖN (INVALID) (tyyppi 1) kyseessä ollen.
EI TULOSTA (NO RESULT)	Tiedonkeruuhäiriö. Esimerkiksi käyttäjä pysäytti meneillään olevan testin tai ilmeni sähkökatko.	Uusi testi alkuperäisellä näytteellä (jos käytettävissä) tai talteen otetulla lysaatilla ja uudella kasetilla noudattaen menettelyä, joka kuvataan kohdassa Osa 19.1, Uusintatestitoimenpide testituloksen VIRHE (ERROR) tai MITÄTÖN (INVALID) (tyyppi 1) kyseessä ollen.

19 Testien uusinnat

19.1 Uusintatestitoimenpide testituloksen VIRHE (ERROR) tai MITÄTÖN (INVALID) (tyyppi 1) kyseessä ollen

Sellaisten näytteiden testi on uusittava, joiden tulos on **VIRHE (ERROR)** tai **MITÄTÖN (INVALID)**, koska ne ylittävät suurimman kelpaavan Ct-arvon (Ct >20) tai päätepiste alittaa kynnyksasetuksen (<100). Ks. myös kohta Osa 18, Vianmääritysopas.

1. Jos verinäytettä on saatavana riittävästi, uusi testi alkuperäisestä verinäytteen ottoputkesta noudattaen menettelyä kohdasta Osa 12.2.
- TAI -
Jos verinäytettä ei ole riittävästi, uusi testi voidaan tehdä käyttäen kohdan Osa 12.2.1 vaiheessa 12 talteen otettua lyaattia.
 - a. Jos kohdan Osa 12.2.1 vaiheessa 12 talteen otettua lyaattia on säilytetty pakastettuna, anna sen huoneenlämpöön ennen käyttöä.
 - b. Varmista lyaatin hyvä sekoittuminen sekoittamalla näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia, ja aseta näyte sivuun 3 minuutin ajaksi kuplien asettumista varten.
2. Siirrä uuteen 50 ml:n kartioputkeen 1 ml valmistettua lyaattia.
3. Noudata kohdan Osa 12.2.1 vaiheita 13–17 lopullisen lyaatin valmistamiseksi.
4. Avaa kasetti kasetin kantta nostamalla ja siirrä yhden (1) pesureagenssiampullin koko sisältö pesureagenssisäiliöön (jossa on pieni aukko). Ks. Kuva 1.
5. Pipetoi valmistettu näyte kokonaisuudessaan näytekammioon (suuri aukko). Ks. Kuva 1.
6. Sulje kasetin kansi. Aloita määrittys (ks. Osa 12.4, Määrittäksen aloittaminen).

19.2 Uusintatestitoimenpide testituloksen VIRHE (ERROR) (koodi 2008) tai MITÄTÖN (INVALID) (tyyppi 2) kyseessä ollen

Testaa näytteet uudelleen, jos NPM1-mutaation ja/tai ABL:n transkriptitasot ovat kelpaavan pienimmän Ct-arvon (Ct >0 ja Ct <6) alapuolella ja/tai kun paineraja ylitetään. Ks. myös kohta Osa 18, Vianmääritysopas.

1. Lisää 100 µl PK:ta (proteinaasi K) uuteen 50 ml:n kartioputkeen.
2. Varmista, että verinäyte tai talteen otettu lyaatti kohdasta Osa 12.2, vaihe 12, sekoitetaan hyvin kääntämällä putkea 8 kertaa ylösalaisin välittömästi ennen pipetointia.
3. Lisää jo proteinaasi K:ta sisältävään putkeen 250 µl verinäytettä ja 3,75 ml PBS-puskuria (pH 7,4, käyttäjän hankkima), jos käytettävissä, tai 60 µl talteen otettua lyaattia kohdasta Osa 12.2.1, vaihe 12.
 - a. Jos kohdan Osa 12.2.1 vaiheessa 12 talteen otettua lyaattia on säilytetty pakastettuna, anna sen huoneenlämpöön ennen käyttöä.
 - b. Varmista lyaatin hyvä sekoittuminen sekoittamalla näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia, ja aseta näyte sivuun 3 minuutin ajaksi kuplien asettumista varten.
4. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 3 sekuntia.
5. Inkuboi huoneenlämmössä 1 minuutin ajan.
6. Noudata verinäytteen ja PBS:n uudelleentestaamisen osalta kohdan Osa 12.2.1 vaiheita 6–17 lopullisen lyaatin valmistamiseksi. Noudata talteen otetun lyaatin uudelleentestaamisen osalta seuraavia vaiheita a–g lopullisen lyaatin valmistamiseksi.
 - a. Lisää putkeen, jossa on talteen otetun lyaatin uudelleentestattava näyte, 2,5 ml LY:tä.
 - b. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia.
 - c. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
 - d. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia.
 - e. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
 - f. Lisää samaan putkeen 2 ml reagenssilaatuista absoluuttista etanolia (käyttäjän hankkima)
 - g. Sekoita näytettä koeputkiravistelijalla maksimiasetuksella yhtäjaksoisesti 10 sekuntia. Laita sivuun.
7. Avaa kasetti kasetin kantta nostamalla ja siirrä yhden (1) pesureagenssiampullin koko sisältö pesureagenssisäiliöön (jossa on pieni aukko). Ks. Kuva 1.
8. Pipetoi valmistettu näyte kokonaisuudessaan näytekammioon (suuri aukko). Ks. Kuva 1.

9. Sulje kasetin kansi. Aloita määrittys (ks. Osa 12.4, Määrittäksen aloittaminen).

20 Odotusarvot

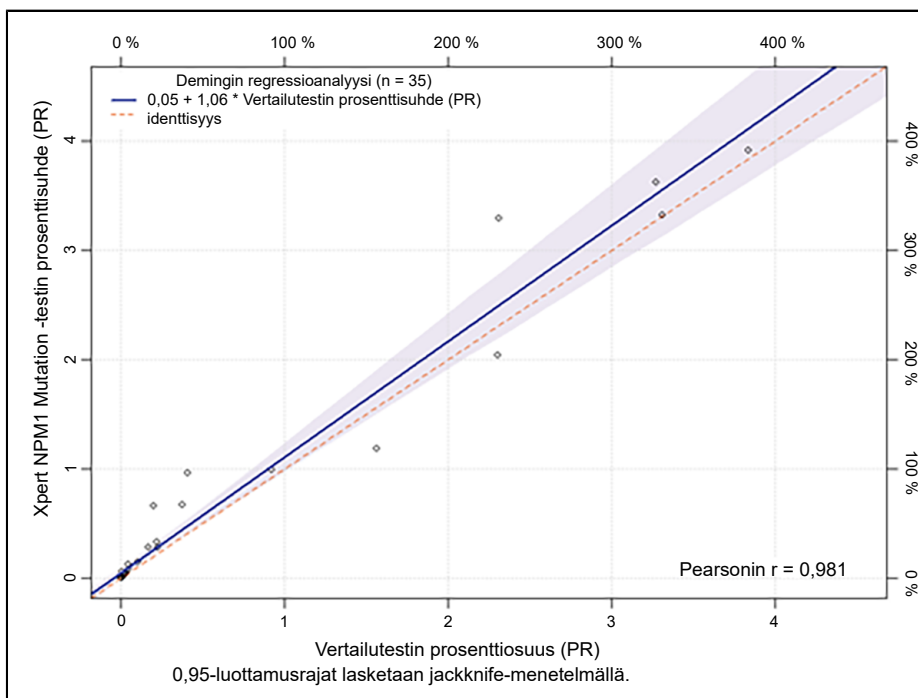
Xpert NPM1 Mutation -testin alue kattaa tärkeimmät kliiniseen päätöksentekoon vaikuttavat kohdat AML-leukemian monitorointia varten. Odotusarvot ilmaistaan NPM1-mutaation mRNA:n ja ABL:n mRNA:n välisenä prosenttisuhteena, ja vaihteluväli on 0,030–500 %. Tämän vaihteluvälin alittavat mittaukset raportoidaan havaitsemattomina tai havaitsemisrajan (LoD) alittavina arvoina. Tämän vaihteluvälin ylittävät mittaukset raportoidaan kvantitointirajan (LoQ) ylittävinä arvoina. Yksityiskohtaiset tiedot, ks. Osa 15.

21 Kliininen suorituskyky

Kolmessa tutkimuskeskuksessa Yhdysvalloissa ja yhdessä tutkimuskeskuksessa Yhdysvaltojen ulkopuolella toteutettiin monta tutkimuskeskusta käsittävä havainnoiva vertailumenetelmätutkimus. Tutkimukseen otettiin mukaan 40 yksittäisen AML-potilaan, joilla oli NPM1-mutaatio, näytteet yhdestä aikapisteestä ja koko Xpert NPM1 Mutation -testin dynaamiselta vaihteluväliltä. Näytteitä antavien potilaiden osalta kerättiin ikä- ja sukupuolietiedot. Sukupuolijakauma oli 11 miestä (27,5 %) ja 29 naista (72,5 %). Kaikki näytteet olivat potilailta, joiden ikä oli 16–81 vuotta, keskimääräisen iän ollessa 59,7 vuotta.

Kaikista 40 näytteestä saatiin kelpaavat testitulokset. Kolmekymmentäkuusi näytettä 40 näytteestä antoi tulokset, jotka olivat molempien testien kvantitatiivisella alueella. Neljä näytettä suljettiin pois Demingin regressiosta, sillä näytteet olivat negatiivisia Xpert NPM1 Mutation -testissä ja/tai vertailutestissä. Lisäksi yksi poikkeavan havaintoarvon näyte suljettiin pois. Yhteensä 35 näytettä otettiin mukaan Demingin regressioanalyysiin.

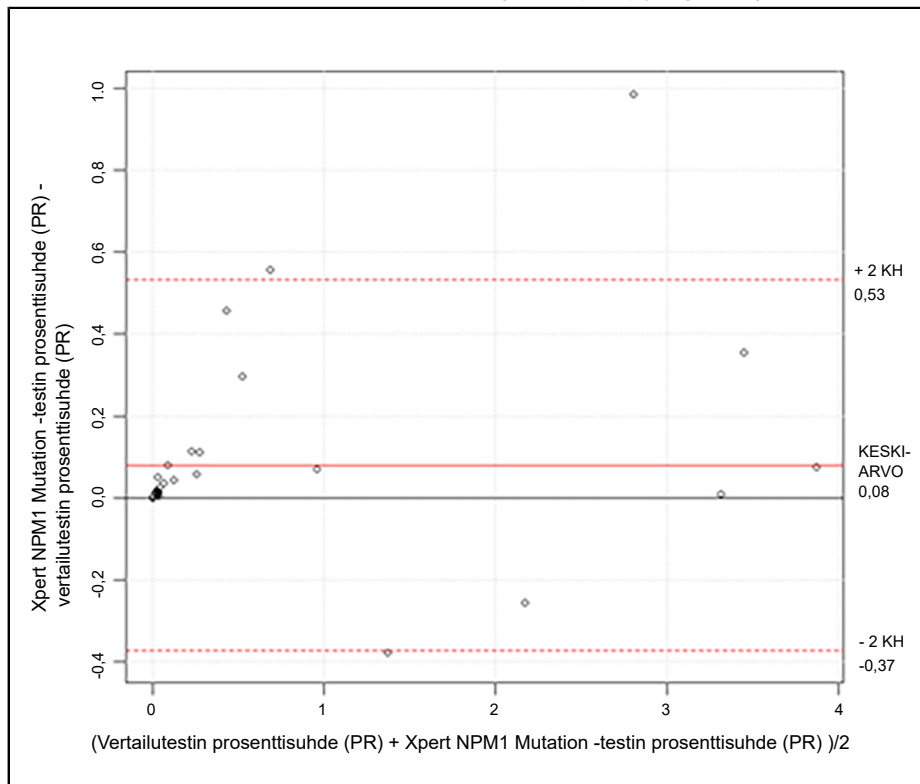
Xpert NPM1 Mutation -testin suorituskykyä vertailumäärittäykseen verrattuna arvioitiin käyttäen Demingin regressiota kulmakertoimen ja leikkauspisteen määrittämiseen. Kuva 12 esittää 35 näytteen Demingin regressioanalyysin tulokset, kulmakerroin, poikkileikkaus ja identtisyysviiva mukaan lukien. 95 %:n luottamusrajat laskettiin jackknife-menetelmällä, ja Pearsonin korrelaatiokerroin esitetään.



Kuva 12. Demingin regressio prosenttisuhteelle

Demingin regressioanalyysistä saatu prosenttisuhteen kulmakerroin oli 1,06 ja leikkauspiste 0,05, ja Xpert NPM1 Mutation -testin ja vertailutestin mittausten välinen Pearsonin korrelaatio oli 0,981.

Bland-Altmanin analyysi prosenttisuhteen erolle arvioitiin näille 35 näytteelle, joiden kvantitatiiviset tulokset olivat Xpert NPM1 Mutation -testin ja vertailutestin lineaarisella alueella. Kuva 13 esittää Bland-Altmanin kuvaajan näiden kahden testin välisen prosenttisuhteen erosta verrattuna keskimääräisiin prosenttisuhdetuloksiin kullekin näytteelle. Kuvaajassa näytetään myös tutkimuksessa havaittu keskimääräisen eron kahden keskihajonnan (2KH) ylä- ja alaraja.



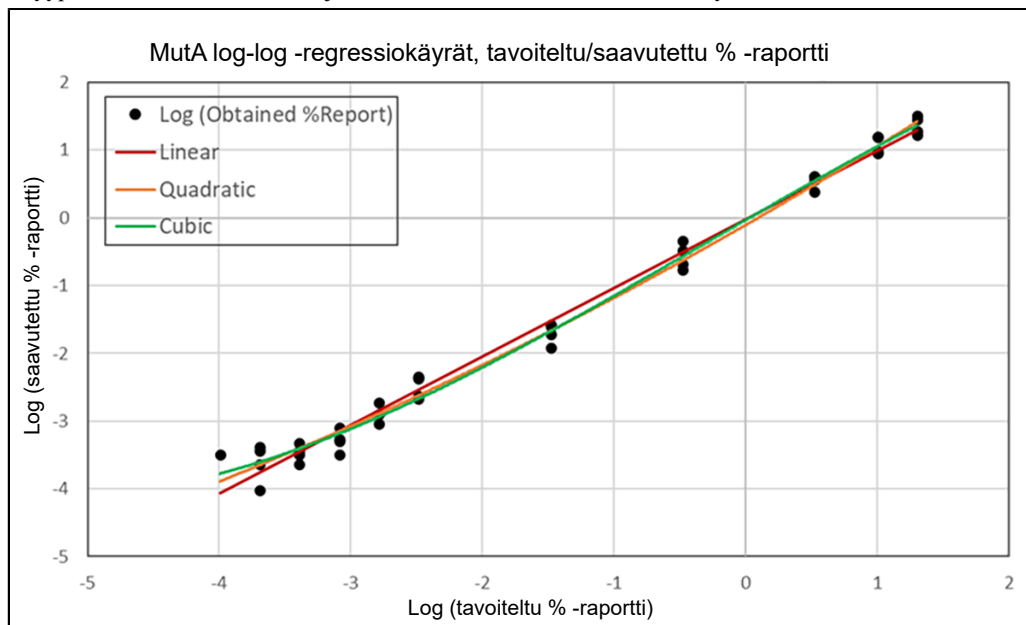
Kuva 13. Bland-Altmanin kuvaaja Xpert NPM1 Mutation- ja vertailutestin prosenttisuhteelle

Keskimääräinen prosenttisuhteen ero oli 0,08 Xpert NPM1 Mutation -testin ja vertailutestin tuloksen välillä. Suurin osa tuloksista (91,4 %, 32/35) oli keskimääräisen eron 2KH-rajojen sisällä.

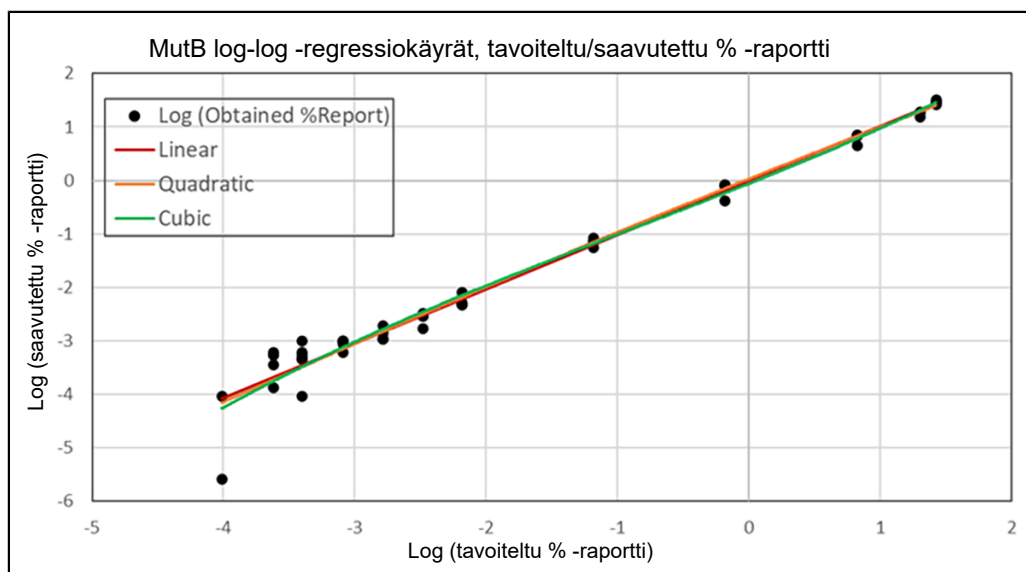
22 Analyttiset tiedot

22.1 Linearisuus/dynaaminen vaihteluväli

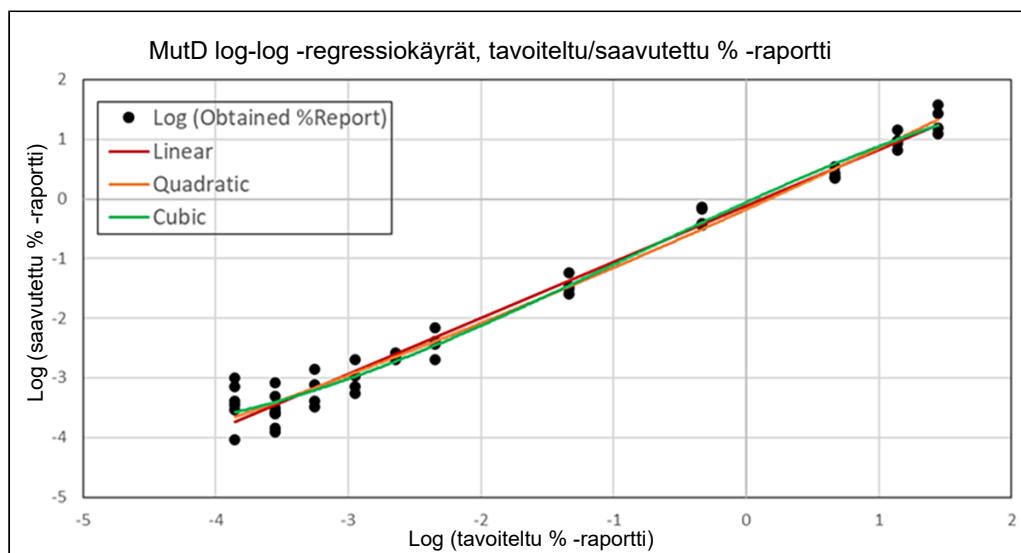
Linearisuus määritettiin kullekin kolmesta NPM1-mutanttien alatyypistä, mutA, mutB ja mutD, käyttämällä solulyysaatteja, jotka sisältävät suuret määrät kunkin alatyypin transkriptia. Tällaiset lysaatit laimennettiin taustalyysaattiin, joka oli valmistettu NPM1-mutaation suhteen oletettavasti negatiivilta luovuttajilta, NPM1-mutaatio/ABL-tavoitealueille noin 0,01–2500 %. Kaikki tasot testattiin yhdellä reagenssierällä neljänä rinnakkaisnäytteenä. Testaus ja tilastolliset analyysit tehtiin CLSI-ohjeistuksen EP06-A⁹ mukaisesti. Kunkin alatyypin regressiokäyrät näytetään kohdissa Kuva 14, Kuva 15 ja Kuva 16. Kunkin alatyypin lineaarinen vaihteluväli ja lineaarisen mallin kertoimet esitetään yhteenvetona kohdassa Taulukko 4.



Kuva 14. MutA:n regressiokäyrät



Kuva 15. MutB:n regressiokäyrät



Kuva 16. MutD:n regressiokäyrät

Taulukko 4. Lineaariset vaihteluvälit ja lineaarisen mallin kertoimet

Alatyyppi	Lineaarinen vaihteluväli	Leikkauskohta	Kulmakerroin	R ²
mutA	0,010–2020 %	-0,0223	1,0134	0,989
mutB	0,010–2673 %	-0,0061	1,0174	0,978
mutD	0,014–2783 %	-0,1163	0,9389	0,981

Kokonaisuudessaan Xpert NPM1 Mutation -testi osoitti lineaarisuutta alueella 0,014–2020 % NPM1-mutaatio/ABL. LoQ:n ja ohjelmiston ylärajan rajaama raportoitava dynaaminen alue on 0,030–500 %.

22.2 Analyttinen herkkyys (havaitsemisraja, kvantitointiraja, nollanäyteraja)

Havaitsemisraja (LoD) on pienin NPM1-mutaatio/ABL-taso, jolla 95 % näytteistä raportoidaan yhtenevästi tuloksella ”NPM1-mutaatio havaittu [##,## %] (NPM1 Mutation DETECTED) [##.##%]”. LoD-raja määritettiin mutA-, mutB- ja mutD-alatyypeille yksitellen testaamalla NPM1-mutaatioposiitivisia solulyysäättejä ja kliinisiä lysäättejä, jotka sisälsivät mutaation kutakin alatyyppiä. Vastaavat LoD-rajat arvioitiin ja todennettiin CLSI-ohjeistuksen EP17-A2¹⁰ mukaan. Tuloksena saadut analyysit antoivat tulokseksi LoD-arvon 0,025 % mutA:lle, 0,023 % mutB:lle ja 0,030 % mutD:lle (Taulukko 5). Näiden kolmen alatyyppin joukon suurin LoD-arvo 0,030 % otetaan Xpert NPM1 Mutation-testin kokonais-LoD-arvoksi.

Kvantitointiraja (LoQ) on pienin NPM1-mutaatio/ABL-taso, jonka yläpuolella näytteet voidaan kvantitoida ja log-reduktion (LR) keskihajonta on $\leq 0,36$ keskimääräisille yli 3,5:n LR:ille. CLSI-ohjeistuksen EP17-A2¹⁰ mukaisesti LoQ:t arvioitiin ja todennettiin tasolla 0,025 % mutA-alatyypille, 0,023 % mutB-alatyypille ja 0,030 % mutD-alatyypille (Taulukko 5). Näiden kolmen alatyyppin joukon suurin LoQ-arvo 0,030 % otetaan Xpert NPM1 Mutation -testin kokonais-LoQ-arvoksi.

Nollanäyteen raja (LoB) on suurin NPM1-mutaatio/ABL-tulos, jota 95 %:lla nollanäytteistä odotetaan oletettavasti NPM1-mutaationegatiivisilla luovuttajilla. CLSI-ohjeistuksen EP17-A2¹⁰ mukaisesti Xpert NPM1 Mutation -testin LoB arvioitiin ja todennettiin tasolla 0,0085 % (Taulukko 5).

Taulukko 5. Xpert NPM1 Mutation-testin havaitsemisraja, kvantitointiraja ja nollanäytteen raja [% NPM1-mutaatio/ABL]

Alatyypit	LoD [% NPM1-mutaatio/ABL]	LoQ [% NPM1-mutaatio/ABL]	LoB [% NPM1-mutaatio/ABL]
mutA	0,025 %	0,025 %	0,0085 %
mutB	0,023 %	0,023 %	
mutD	0,030 %	0,030 %	

22.3 Analyttinen spesifisyys

Xpert NPM1 Mutation -testin analyttinen spesifisyys määritettiin testaamalla EDTA-käsiteltyjä ääreisverinäytteitä, jotka oli otettu kahdeltakymmeneltä viideltä terveeltä luovuttajalta.

Yhtään **NPM1-mutaatio HAVAITTU (NPM1 Mutation DETECTED)** -tulosta ei saatu mistään oletettavasti NPM1-mutaationegatiivisista näytteistä, jotka arvioitiin tässä tutkimuksessa. Siten Xpert NPM1 Mutation -testi on spesifinen mutanti-NPM1-mRNA-transkripteille (tyypit A, B ja D eksonissa 12), jotka liittyvät AML-leukemiaan, ja testillä on 100 %:n analyttinen spesifisyys EDTA-ääreisverinäytteille.

22.4 Näytteiden välisen kontaminaation arviointi

Toteutettiin tutkimus sen osoittamiseksi, että kertakäyttöiset, itsessään kaiken sisältävät GeneXpert-kasetit estävät näytteiden välisen kontaminaation, kun ne ajetaan peräkkäin samassa instrumenttimoduulissa. Oletettavasti NPM1-mutaationegatiivinen näyte testattiin korkean NPM1-mutaatiopositivisen arvon näytteen jälkeen samassa GeneXpert-moduulissa. Testausjärjestely toistettiin 10 kertaa kahdella GeneXpert-moduulilla (yhteensä 22 negatiivista ja 20 positiivista). Kaikki positiivisen näytteen ajot antoivat odotetun tuloksen ”**NPM1-mutaatio HAVAITTU [### %] (NPM1 Mutation DETECTED [###%])**” ja kaikki negatiivisten näytteiden ajot antoivat odotetun tuloksen ”**NPM1-mutaatiota EI HAVAITTU [ABL-transkripti riittävä] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])**”.

22.5 Mahdollisesti haittaavat aineet

Tutkimuksessa arvioitiin viisi EDTA-ääreisverinäytteissä mahdollisesti esiintyvää ainetta, jotka voivat mahdollisesti haitata testin suorituskykyä. Testatut yhdisteet ja tasot (ks. Taulukko 6) perustuivat CLSI-ohjeistuksen asiakirjaan EP07-ED3¹¹. Haittaavat aineet testattiin EDTA-ääreisverinäytteistä, joihin oli keinotekoisesti lisätty viljeltyjen NPM1-mutaatiopositivisten solujen lysaatteja ja jotka edustivat kolmea tasoa: >1 %, 0,1–0,5 % ja negatiivinen. Testien kontrollina toimivat samat näytteet ilman mahdollisesti haittaavia aineita. Kukin taso testattiin viiden erillisen haittaavan aineen esiintymisen ja puuttumisen osalta 4 rinnakkaisnäytteenä olosuhdetta kohti. Aineen katsottiin olevan haittaamaton, jos havaittu keskimääräinen prosenttisuhte oli 3-kertaisen eron sisällä kontrolliin verrattuna.

Mitään kliinisesti merkittävää haittaavaa vaikutusta Xpert NPM1 Mutation -testiin ei havaittu minkään tässä tutkimuksessa arvioidun haittaavan aineen suhteen. Missään testiolosuhteissa ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja (p-arvo <0,05) ja raportoidut prosenttisuhteet testi- ja kontrolliolosuhteiden välillä olivat hyväksytyin 3-kertaisen vaihteluvälin sisällä.

Taulukko 6. Xpert NPM1 Mutation -testiä käyttämällä testatut mahdollisesti haittaavat aineet

Haittaavat aineet	Testattu pitoisuus
Konjugoimaton bilirubiini	20 mg/dl
Kokonaiskolesteroli	500 mg/dl
Triglyseridit, yhteensä (lipidit)	3 000 mg/dl
Hepariini	3500 U/l
EDTA (pieni näyte)	930 mg/dl

23 Toistettavuus ja tarkkuus

Tutkimus suunniteltiin CLSI-ohjeistuksen EP05-A3-standardin tukemien, monitekijäisten tutkimusten yleisten periaatteiden mukaisesti. Se toteutettiin kolmessa tutkimuskeskuksessa. Tutkimusasetelma käsitti näytepaneelin jäseniä, jotka sisälsivät mutaatioita A, B ja D kahtena pitoisuutena. Seitsemän paneelin jäsentä testattiin kahtena rinnakkaisnäytteenä, kaksi ajoa päivää kohti, yhteensä kuuden päivän ajan kumpikin kahden käyttäjän toimesta kolmessa eri tutkimuskeskuksessa (3 tutkimuskeskusta x 2 käyttäjää x 3 erää x 2 päivää x 2 ajoa x 2 rinnakkaisnäytettä = 144 testitulosta / paneelin jäsen). Toistettavuus- ja tarkkuuspaneelit valmisti Cepheid, ja ne koostuvat seitsemästä paneelin jäsenestä, ks. Taulukko 7. Paneelit olivat simuloituun EDTA-ääreisveri (PB) -matriisiin keinotekoisesti lisättyjä.

Taulukko 7. Toistettavuus- ja tarkkuuspaneelit

Paneelijäsen	Kohde	Prosenttisuhteen taso (PR)
1	Negatiivinen	–
2	NPM1-mutaatio A	Kohtalainen positiivinen (noin 5 %)
3	NPM1-mutaatio A	Matala positiivinen (noin 0,2 %)
4	NPM1-mutaatio B	Kohtalainen positiivinen (noin 5 %)
5	NPM1-mutaatio B	Matala positiivinen (noin 0,2 %)
6	NPM1-mutaatio D	Kohtalainen positiivinen (noin 5 %)
7	NPM1-mutaatio D	Matala positiivinen (noin 0,2 %)

Niiden näytteiden määrä, joilla oli kelpaavat tulokset kullekin paneelin jäsenelle kummankin kahden käyttäjän analysoimana kaikissa kolmessa tutkimuskeskuksessa, esitetään kohdassa Taulukko 8.

Taulukko 8. Toistettavuus ja tarkkuus: Kelpaavat tulokset saaneiden näytteiden lukumäärä

Paneelijäsen		Tutkimuskeskus 1			Tutkimuskeskus 2			Tutkimuskeskus 3			Näytteitä yhteensä
		Käytt. 1	Käytt. 2	Tutkimuskeskus	Käytt. 1	Käytt. 2	Tutkimuskeskus	Käytt. 1	Käytt. 2	Tutkimuskeskus	
1	Negatiivinen	24/24 ^a	(24/24)	(48/48) ^a	(24/24) ^b	(24/24)	(48/48) ^b	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
2	LR1.3: mut A (suhde noin 5 %)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
3	LR2.7: mut A (suhde noin 0,2 %)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
4	LR1.3: mut B (suhde noin 5 %)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
5	LR2.7: mut B (suhde noin 0,2 %)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
6	LR1.3: mut D (suhde noin 5 %)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
7	LR2.7: mut D (suhde noin 0,2 %)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24) ^c	(24/24)	(48/48) ^c	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)

^a Kahdella negatiivisella näytteellä oli kelpaava, mutta havaittu tulos (FP)

^b Yhdellä negatiivisella näytteellä oli kelpaava, mutta havaittu tulos (FP)

^c Yhdellä LR 2.7: mut D (suhde noin 0,2 %) -näytteellä oli kelpaava, mutta ei havaittu tulos (FN)

Kvantitatiiviset tulokset analysoitiin sisäkkäisellä varianssianalyysillä (ANOVA) satunnaisten vaikutusten ja variaatiokertoimen (CV) kanssa. ANOVA-laskelmien tulokset keskihajonnan ja varianssin osalta kullekin positiiviselle näytteelle esitetään kohdassa Taulukko 9. Kunkin komponentin (tutkimuskeskus/instrumentti, käyttäjä, erä, päivä, ajo) vaikutus varianssiin ja kokonaisvarianssin prosenttimäärään osoitetaan keskihajontana ja kunkin koostumuksen prosenttivaikutuksena.

Taulukko 9. Variaatiokertoimesta (CV) saadut tulokset: Prosenttisuhde (PR)

Paneelijäsen	N	Keski-arvo	Tutkimuskeskus		Käytt.		Erä		Päivä		Ajo		Määrittelyn sisäinen		Yhteensä	
			KH	VK (%)	KH	VK (%)	KH	VK (%)	KH	VK (%)	KH	VK (%)	KH	VK (%)	KH	VK (%)
LR1.3: mut A (suhde noin 5 %)	144	4,3 %	0,00	6,14	0,00	0,00	0,00	4,29	0,00	8,91	0,00	4,36	0,01	17,83	0,01	21,74
LR2.7: mut A (suhde noin 0,2 %)	144	0,2 %	0,00	0,00	0,00	12,43	0,00	0,00	0,00	23,71	0,00	0,00	0,00	74,56	0,00	79,22
LR1.3: mut B (suhde noin 5 %)	144	5 %	0,00	8,24	0,00	0,00	0,01	11,50	0,00	7,19	0,00	0,00	0,01	20,88	0,01	26,23
LR2.7: mut B (suhde noin 0,2 %)	144	0,2 %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,28	0,00	20,68
LR1.3: mut D (suhde noin 5 %)	144	4,2 %	0,00	5,15	0,00	0,00	0,01	12,91	0,00	8,78	0,00	0,00	0,01	18,30	0,01	24,60
LR2.7: mut D (suhde noin 0,2 %)	143 ^a	0,2 %	0,00	10,86	0,00	0,00	0,00	12,91	0,00	6,77	0,00	0,00	0,00	22,83	0,00	29,18

^a Xpert NPM1 ei havainnut yhtä näytettä, ja se suljettiin pois analysista, sillä kvantitatiivista mittausta ei ollut.

Variaation kokonaiskerroimen (CV) prosenttimäärä prosenttisuhteelle, jolla raportoitin kvantitatiiviset arvot kohtalaisen positiivisille näytteille LR1.3:mut A, -mut B ja -mut D (suhde noin 5 %), oli 21,74–26,23, ja matalan positiivisille näytteille LR2.7:mut A, -mut B ja -mutD (suhde noin 0,2 %) 20,68–79,22.

24 Viitteet

1. Saultz JN, Garzon R. Acute myeloid leukemia: A concise review. *J Clin Med*. 2016; 5(3). doi:10.3390/jcm5030033
2. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015; 373(12): 1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184
3. Diagnostic Molecular Pathology. A Guide to Applied Molecular Testing. <https://www.medic4arab.com/2017/01/diagnostic-molecular-pathology-guide-to.html>. Haettu 16. syyskuuta 2020.
4. Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2018; 32(3): 167-183. doi:10.1016/j.blre.2017.11.001
5. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017; 31(4): 798-807. doi:10.1038/leu.2017.30
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories (viimeisin painos). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (viimeisin painos).
8. Health-care Waste. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste>
9. CLSI EP06-A:2003 Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach, 1st Edition
10. CLSI EP17-A2:2012 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, 2nd Edition
11. CLSI EP07-ED3:2018 Interference Testing in Clinical Chemistry, 3rd Edition
12. CLSI EP05-A3:2014 Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition

25 Cepheidin pääkonttorien sijainnit

Konsernin pääkonttori

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

Puhelin: + 1 408 541 4191
Faksi: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Euroopan pääkonttori

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Puhelin: + 33 563 825 300
Faksi: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

26 Tekninen tuki

Seuraavien tietojen on oltava käsillä ennen yhteydenottoa Cepheidin tekniseen tukeen:

- tuotteen nimi
- eränumero
- instrumentin sarjanumero
- virheviestit (jos niitä on)
- ohjelmistoversio ja soveltuviissa tapauksissa tietokoneen huoltotunnisteen numero

Yhdysvallat





















Puhelin: + 1 888 838 3222
Sähköposti: techsupport@cepheid.com

Ranska

Puhelin: + 33 563 825 319
Sähköposti: support@cepheideurope.com

Kaikkien Cepheidin teknisen tuen toimipaikkojen yhteystiedot ovat saatavana verkkosivustollamme: www.cepheid.com/en_US/support/contact-us.

27 Symbolien taulukko

Symboli	Merkitys
	Luettelonumero
	CE-merkintä – Vaatimustenmukaisuus Euroopan talousalueella
	<i>In vitro</i> -diagnoosiin tarkoitettu lääkinällinen laite
	Eräkoodi
	Ei saa käyttää uudestaan
	Lue käyttöohjeet
	Valmistaja
	Valmistusmaa
	Sisältö riittää <i>n</i> testiin
	Kontrolli
	Viimeinen käyttöpäivä
	Lämpötilarajoitus
	Biologiset riskit
	Huomio
	Tulenarat nesteet
	Lisääntymis- ja elinmyrkyllisyys
	Varoitus
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä
	Valtuutettu edustaja Sveitsissä
	Maahantuoja



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
Yhdysvallat
Puhelin: + 1 408 541 4191
Faksi: + 1 408 541 4192



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



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



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Ranska
Puhelin: + 33 563 825 300
Faksi: + 33 563 825 301

28 Versiohistoria

Osa	Muutoksen kuvaus
23	Korjattu virhe osassa "Toistettavuus ja tarkkuus".