

Xpert[®] NPM1 Mutation

REF GXNPM1-CE-10

Instrukcja użycia

IVD CE

Oświadczenia o znakach towarowych, patentach i prawach autorskich

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[®], logo Cepheid, GeneXpert[®] i Xpert[®] to znaki towarowe firmy Cepheid, zarejestrowane w USA i w innych krajach.

Wszystkie inne znaki towarowe są własnością ich właścicieli.

NABYWCA TEGO PRODUKTU UZYSKUJE NIEZBYWALNE PRAWO DO UŻYWANIA TEGO PRODUKTU ZGODNIE Z NINIEJSZĄ INSTRUKCJĄ UŻYCIA. NABYWCA NIE UZYSKUJE ŻADNYCH INNYCH PRAW W SPOSÓB WYRAŹNY, DOROZUMIANY LUB PRZEZ ESTOPPEL. PONADTO NABYWCA TEGO PRODUKTU NIE UZYSKUJE ŻADNYCH PRAW DO ODSPRZEDAŻY TEGO PRODUKTU.

© 2022–2023 Cepheid.

Opis zmian można znaleźć w części Historia zmianSeksja 28.

Xpert[®] NPM1 Mutation

Do badań diagnostycznych *in vitro*.

1 Nazwa zastrzeżona

Xpert[®] NPM1 Mutation

2 Nazwa powszechna lub zwyczajowa

Xpert NPM1 Mutation

3 Przeznaczenie

3.1 Przeznaczenie

Test Xpert NPM1 Mutation, wykonywany na aparatach Cepheid GeneXpert[®] Dx System, to test diagnostyczny *in vitro* do analizy ilościowej transkryptów mRNA zmutowanego NPM1 (typów A, B i D w eksonie 12) w próbkach krwi obwodowej pobranych od pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML). Test wykorzystuje zautomatyzowaną reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) w czasie rzeczywistym i zgłasza współczynnik procentowy zmutowanego NPM1 względem transkryptów mRNA kontroli endogennej ABL1. Test jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w monitorowaniu pacjentów cierpiących na AML ze zmutowanym NPM1 pod kątem poziomu transkryptów mRNA zmutowanego NPM1. Ten test powinien być stosowany w połączeniu z innymi czynnikami kliniczno-patologicznymi.

Test Xpert NPM1 Mutation nie umożliwia rozróżnienia między transkryptami zmutowanego NPM1 typu A, B lub D ani nie wykrywa i nie monitoruje innych rzadkich typów mutacji NPM1. Ten test nie jest przeznaczony do diagnostyki AML.

3.2 Użytkownik docelowy/środowisko

Test Xpert NPM1 Mutation jest przeznaczony dla przeszkolonych użytkowników pracujących w środowisku laboratoryjnym.

4 Podsumowanie i objaśnienie

Ostra białaczka szpikowa (AML) to nowotwór hematopoetycznych komórek macierzystych krwi linii mieloidalnej w szpiku kostnym^{1,2}, w przypadku której występują różne mutacje nukleofosminy (NPM1) w eksonie 12³. Insercja nukleotydów w eksonie 12 powoduje mutację przesuującą ramkę odczytu i tworzy sygnał eksportu jądrowego (NES). Mutacje genu NPM1 prowadzą do nieprawidłowej lokalizacji cytoplazmatycznej genu NPM1 i białek wchodzących w interakcję z genem NPM1. NPM1 jest jednym z najbardziej zmutowanych genów w przypadku AML, a mutacje występują w 28% do 35% wszystkich przypadków AML. Chociaż kilka leków ukierunkowanych na zmutowany NPM1 jest obecnie w fazie badań, nie są obecnie dostępne żadne terapie ukierunkowane zatwierdzone przez agencję FDA.⁴

Gen NPM1 koduje białko transportu jądrowo-cytoplazmatycznego, które odgrywa rolę w biologii centrosomów i rybosomów, a także w regulowaniu innych układów komórkowych, w tym szlaków supresorowych guza. NPM1 to fosfoproteina jądrowa zapewniająca transport między jądrem a cytoplazmą. Reguluje ona transport cząsteczek rybosomalnych przez błonę jądra. Mutacje genu NPM1 po raz pierwszy odkryto u osób cierpiących na AML w związku z zaobserwowaniem nieprawidłowej lokalizacji cytoplazmatycznej zamiast prawidłowej lokalizacji jądra. Ocena genetyczna blastów białaczkowych w połączeniu z lokalizacją cytoplazmatyczną NPM1 umożliwiła zrozumienie znanych mutacji przesuujących ramkę odczytu w eksonie 12.³ Najczęściej występującymi mutacjami NPM1 są mutacje typu A (ok. 75–

80%), typu B (ok. 10%) i typu D (ok. 5%), wszystkie w eksonie 12, powodujące mutację przesuwającą ramkę odczytu w wyniku insercji czterech nukleotydów. Ta mutacja prowadzi do utraty sygnału lokalizacji jądrowej i nieprawidłowej lokalizacji cytoplazmatycznej białka u pacjentów cierpiących na AML.⁵

5 Zasada procedury

Xpert NPM1 Mutation to zautomatyzowany test do oznaczania ilości transkryptów zmutowanego NPM1 w postaci współczynnika mutacji NPM1/ABL1. Badanie przeprowadza się w aparacie Cepheid GeneXpert Dx System, który automatyzuje i integruje oczyszczenie próbki, amplifikowanie kwasu nukleinowego oraz wykrywanie sekwencji docelowej w prostych lub złożonych próbkach przy użyciu techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym i testów Nested-PCR. System składa się z aparatu, komputera oraz wstępnie zainstalowanego oprogramowania umożliwiających wykonywanie testów i wyświetlanie wyników. Systemy wymagają stosowania jednorazowych kartridży GeneXpert, które zawierają odczynniki do reakcji RT-PCR i odczynniki Nested-PCR oraz w których odbywają się reakcje RT-PCR i Nested-PCR. Pełny opis systemu znajduje się w odpowiednim *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Test Xpert NPM1 Mutation zawiera odczynniki do wykrywania w próbkach krwi obwodowej mutacji NPM1 i transkryptu ABL1 stanowiącego kontrolę endogenną. Ilość transkryptów mutacji NPM1 jest określana jako współczynnik procentowy mutacji NPM1/ABL1. Każdy test Xpert NPM1 Mutation zawiera dwie kontrole — kontrolę endogenną (ABL1) i kontrolę sondy (PCC). Kontrola endogenna ABL1 normalizuje sekwencję docelową mutacji NPM1 i zapewnia wykonanie testu z użyciem odpowiedniej ilości próbki. Kontrola PCC weryfikuje nawadnianie odczynników, napełnienie próbki do PCR oraz obecność i działanie wszystkich składników reakcji w kartridżu, w tym sond i barwników.

6 Odczynniki i aparaty

6.1 Materiały dostarczone

Zestaw testu Xpert NPM1 Mutation (GXNPM1-CE-10) zawiera odczynniki w ilości wystarczającej do przetworzenia 10 próbek testu lub próbek kontroli jakości. Zestaw zawiera następujące elementy:

Odczynniki Xpert NPM1 Mutation

po 10 na zestaw

Proteinaza K (PK)	10 × 130 µl na fiolkę
Element	Składnik odczynnika
Proteinaza K	< 5%

Odczynnik do lizy (LY) (chlorek guanidyny)	10 × 5,3 ml na fiolkę
Element	Składnik odczynnika
Chlorek guanidyny	25–50%
Mocznik	25–50%
Dodecylosiarczan sodu	< 2%

Odczynnik do przemywania	10 × 2,9 ml na ampułkę
Element	Składnik odczynnika
Etanol	< 50%
Tiocyanian guanidyny	< 50%

Xpert NPM1 Mutation Kartridge testu ze zintegrowanymi komorami reakcyjnymi		10 na zestaw
Element	Składnik odczynnika	Ilość
Kulka 1 (liofilizowana)	Enzym: Polimeraza DNA Taq < 50 j./kulkę	1 na kartridż
	dNTPs < 0,05%	
Kulka 2 (liofilizowana)	Startery i sondy < 0,005%	1 na kartridż
Kulka 3 (liofilizowana)	Startery i sondy < 0,005%	1 na kartridż
Kulka 4 (liofilizowana)	Enzym: Polimeraza DNA Taq < 50 j./kulkę	1 na kartridż
	dNTPs < 0,05%	
Odczynnik do płukania	Chlorek potasu < 4%	2 ml na kartridż
	Azydek sodu < 0,1%	
	Glikol polietylenowy < 40%	
	Tween 20 < 0,2%	
Odczynnik do elucji	Bufor zasadowy Trizma < 0,3%	2,5 ml na kartridż
	Bufor HCl Trizma < 0,1%	
	Azydek sodu < 0,05%	

Płyta CD**1 na zestaw**

- Plik definicji testu (ADF)
- Instrukcja importowania pliku ADF do oprogramowania GeneXpert
- Instrukcja użycia

Uwaga

Albumina surowicy bydłowej (BSA) zawarta w kulkach w tym produkcie została uzyskana i wytworzona wyłącznie z osocza wołowego pochodzącego z USA. Zwierząt nie karmiono białkiem pochodzącym od przeżuwaczy ani innym białkiem zwierzęcym; zwierzęta przebadano zarówno przed ubojem, jak i po nim. Podczas przetwarzania nie nastąpiło wymieszanie materiału z innymi materiałami pochodzenia zwierzęcego.

Uwaga

Certyfikaty analizy i specyfikacje partii są dostępne w Centrum wsparcia klienta firmy Cepheid.

7 Materiały wymagane, ale nie dostarczone

- Aparat GeneXpert Dx System (numer katalogowy zależy od konfiguracji): aparat GeneXpert, komputer, skaner kodów kreskowych i instrukcja obsługi.
- W przypadku aparatu GeneXpert Dx System: oprogramowanie GeneXpert Dx w wersji 6.2 lub nowszej.
- Drukarka: jeśli wymagana jest drukarka, informacji o zakupie zalecanej drukarki udzieli Centrum wsparcia klienta firmy Cepheid.
- Wytrząsarka typu vortex
- Mikrowirówka (co najmniej 1000 × g)
- Pipety i końcówki pipet z filtrem aerozolowym
- Probówki stożkowe o pojemności 50 ml
- Bezwodny alkohol etylowy o czystości odczynnika
- 1X PBS, pH 7,4

8 Przechowywanie i obsługa

- Zawartość zestawu Xpert NPM1 Mutation należy przechowywać w temperaturze od 2 °C do 8 °C do upływu daty ważności podanej na etykiecie.
- Wieczko kartridża można otworzyć dopiero wtedy, gdy użytkownik będzie gotowy do wykonania badania.
- Nie używać kartridży po upływie daty ważności.
- Nie używać nieszczelnego kartridża.
- Odczynnik do przemywania to przezroczysty, bezbarwny płyn. Nie używać odczynnika do przemywania, który uległ zmętnieniu lub przebarwieniu.
- Na dwadzieścia (20) minut przed rozpoczęciem procedury należy wyjąć próbkę krwi, kartridż i odczynniki do przygotowania próbki z miejsca przechowywania, aby osiągnęły temperaturę pokojową (od 20 °C do 30 °C).

9 Ostrzeżenia i środki ostrożności

9.1 Ogólne

- Do diagnostyki *in vitro*
- Wszystkie próbki biologiczne, w tym użyte kartridże i odczynniki, należy traktować jako mogące przenosić czynniki zakaźne. Ponieważ często niemożliwe jest określenie, która z próbek biologicznych może być zakaźna, wszystkie należy obsługiwać z zachowaniem standardowych środków ostrożności.
- Wytyczne dotyczące obsługi próbek można uzyskać w amerykańskiej agencji Centers for Disease Control and Prevention⁶ oraz w instytucie Clinical and Laboratory Standards Institute.⁷
- Przestrzegać procedur bezpieczeństwa obowiązujących w placówce w zakresie pracy z substancjami chemicznymi i obsługi próbek biologicznych.
- Charakterystyka robocza tego testu została ustalona wyłącznie dla krwi pobranej do probówek zawierających EDTA. Działania testu nie oceniono z innymi typami próbek.
- Wiarygodne wyniki zależą od odpowiedniego pobierania, transportowania, przechowywania i przetwarzania próbek. Błędne wyniki testu mogą być spowodowane niewłaściwym pobraniem, obsługą lub przechowywaniem próbki, błędem technicznym, pomieszczeniem próbek bądź ilością transkryptów docelowych w próbce będącą poniżej granicy wykrywalności testu. Uważne przestrzeganie niniejszej instrukcji użycia oraz *GeneXpert Dx System Operator Manual* pozwoli uniknąć uzyskania błędnych wyników.
- Użycie testu Xpert NPM1 Mutation poza zalecanymi zakresami czasu i temperatury przechowywania zestawu lub próbki może prowadzić do uzyskania błędnych lub nieważnych wyników.
- Probki biologiczne, wyroby do przenoszenia i użyte kartridże należy traktować jako mogące przenosić czynniki zakaźne i wymagające zachowania standardowych środków ostrożności. Należy przestrzegać obowiązujących w instytucji procedur dotyczących odpadów środowiskowych w zakresie odpowiedniego usuwania zużytych kartridży i niewykorzystanych odczynników. Te materiały mogą stanowić niebezpieczne materiały chemiczne, których usuwanie musi się odbywać zgodnie ze swoistymi krajowymi lub regionalnymi przepisami dotyczącymi usuwania. Jeśli krajowe lub regionalne przepisy nie regulują kwestii dotyczących odpowiedniego usuwania, wówczas próbki biologiczne i użyte kartridże należy usuwać zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO) dotyczącymi obsługi i usuwania odpadów medycznych.⁸

9.2 Próbką

- Należy utrzymywać odpowiednie warunki przechowywania, aby zapewnić integralność próbki (patrz Sekcja 11, Pobieranie i przechowywanie próbek). Nie oceniano stabilności próbki w innych, niż zalecane, warunkach transportu.
- Nie zamrażać próbki krwi obwodowej z EDTA.
- Aby uzyskać prawidłowe wyniki, próbki należy pobierać, przechowywać i transportować w odpowiedni sposób.

9.3 Test/odczynnik


- Nie wolno zastępować odczynników testu Xpert NPM1 Mutation innymi odczynnikami.
- Nie wolno otwierać wieczka kartridża testu Xpert NPM1 Mutation w celu innym niż dodanie próbki i odczynnika do przemywania.
- Nie używać kartridża, który upadł po wyjęciu z opakowania.

- Nie wolno potrząsać kartridżem. Potrząsanie kartridżem lub jego upuszczenie po otwarciu wieczka kartridża może prowadzić do uzyskania nieważnych wyników.
- Nie umieszczać etykiety z identyfikatorem próbki na wieczku kartridża ani na etykiecie z kodem kreskowym.
- Nie używać kartridża z uszkodzoną etykietą z kodem kreskowym.
- Nie wolno używać kartridża, jeśli jego komora reakcyjna jest uszkodzona.
- Zaleca się, aby przed rozpoczęciem badań kartridże testu Xpert NPM1 Mutation osiągnęły temperaturę pokojową (od 20 °C do 30 °C).
- Każdy jednorazowy kartridż testu Xpert NPM1 Mutation służy do wykonania jednego testu. Nie używać ponownie przetworzonych kartridży.
- Przenieść całą zawartość jednej (1) ampułki z odczynnikami do przemywania do komory na odczynnik do przemywania. Niedodanie odczynnika do przemywania może prowadzić do uzyskania fałszywego wyniku **NIE WYKRYTO (NOT DETECTED)**.
- Nie używać ponownie końcówek pipet.
- Nie używać kartridża, jeśli wydaje się wilgotny lub jeśli uszczelka wieczka wygląda na uszkodzoną.
- Nie używać kartridża testu Xpert NPM1 Mutation, jeśli odczynnik został dodany do niewłaściwego otworu.
- Nie wolno otwierać kartridża testu Xpert NPM1 Mutation po zakończeniu testu.
- Należy przygotować zestaw pipet i odczynników wyłącznie do przygotowania próbki.
- Stosować czyste fartuchy laboratoryjne i rękawiczki. Zmieniać rękawiczki między obsługą każdej próbki.
- W przypadku rozlania próbek lub kontroli należy założyć rękawice i usunąć rozlaną substancję za pomocą papierowych ręczników. Następnie należy dokładnie wyczyścić zanieczyszczony obszar przy pomocy świeżo przygotowanego roztworu rozcieńczonego w stosunku 1:10 wybielacza chlorowego. Ostateczne stężenie aktywnego chloru powinno wynosić 0,5%, niezależnie od stężenia wybielacza w danym kraju. Czas kontaktu powinien wynosić co najmniej dwie minuty.
- Upewnić się, że obszar roboczy jest suchy, a następnie usunąć pozostałości wybielacza za pomocą 70% roztworu denaturowanego etanolu. Przed kontynuowaniem pracy należy poczekać, aż powierzchnia całkowicie wyschnie. Ewentualnie można postępować zgodnie z obowiązującymi w instytucji standardowymi procedurami dotyczącymi zanieczyszczenia lub rozlania substancji. W przypadku sprzętu należy postępować zgodnie z zaleceniami producenta dotyczącymi dekontaminacji.

10 Zagrożenia chemiczne

Uwaga

Poniższe informacje dotyczą całego produktu zawierającego proteinazę K oraz odczynniki do lizy, przemywania i płukania.

- Piktogramy CLP/GHS określające rodzaj zagrożenia: 
- Hasło ostrzegawcze: NIEBEZPIECZEŃSTWO
- **Zwroty GHS ONZ wskazujące rodzaj zagrożenia**
 - Wysoce łatwopalna ciecz i pary H225.
 - Działa drażniąco na skórę H315.
 - Powoduje poważne podrażnienia oczu H319.
 - Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy H336.
 - Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne H341.
- **Zwroty GHS ONZ wskazujące środki ostrożności**
 - **Zapobieganie**
 - Przed użyciem należy się zapoznać ze specjalnymi instrukcjami zamieszczonymi w karcie charakterystyki substancji niebezpiecznej.
 - Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
 - Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
 - Przechowywać z dala od źródeł ciepła, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i/lub gorących powierzchni. Palenie wzbronione.
 - Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.
 - Unikać wdychania mgły/par/rozpylonej cieczy.
 - Dokładnie umyć po użyciu.

- Stosować wyłącznie na zewnątrz lub w dobrze wentylowanym pomieszczeniu.
- Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
- Stosować wymagane środki ochrony indywidualnej.
- **Reagowanie**
 - W przypadku POŻARU: Użyć odpowiednich środków gaśniczych.
 - W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie.
 - W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem.
 - W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem.
 - Zastosować określone leczenie (patrz informacje uzupełniające dotyczące pierwszej pomocy).
 - Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.
 - W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
 - W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Kontynuować płukanie.
 - W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
 - W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
- **Przechowywanie/usuwanie**
 - Przechowywać w chłodnym miejscu.
 - Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu.
 - Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.
 - Przechowywać pod zamknięciem.
 - Zawartość i/lub pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi/regionalnymi/krajowymi/międzynarodowymi przepisami.

11 Pobieranie i przechowywanie próbek

- Próbkę krwi obwodowej powinny być pobierane do probówek zawierających EDTA zgodnie z wytycznymi placówki użytkownika. Nie należy oddzielać osocza od komórek.
- Próbkę należy przechowywać w temperaturze od 2 °C do 8 °C nie dłużej niż 3 dni (72 godziny) przed rozpoczęciem badania.
- Właściwe pobieranie i przechowywanie próbek ma krytyczne znaczenie dla działania tego testu. Stabilność próbki w warunkach przechowywania innych niż wymienione w punkcie Sekcja 12 Procedura poniżej nie została oceniona pod kątem testu Xpert NPM1 Mutation.

12 Procedura

12.1 Przed rozpoczęciem

Na dwadzieścia (20) minut przed rozpoczęciem procedury należy wyjąć próbkę krwi, odczynniki do przygotowania próbki i kartridże z miejsca przechowywania, aby osiągnęły temperaturę pokojową. Odwirować krótko proteinazę K (PK) w mikrowirówce.

Ważne Test należy rozpocząć w ciągu 1 godziny od czasu dodania do kartridża próbki przygotowanej z użyciem odczynnika do próbek.

Ważne Przed przygotowaniem próbki wyjąć kartridż z teksturowego opakowania. (Patrz Sekcja 12.3, Przygotowywanie kartridża).

12.2 Przygotowanie próbki

12.2.1 Przygotowanie próbki z nieznaną liczbą krwinek białych (WBC) lub próbki z mniej niż 30 milionami krwinek białych/ml

1. Na dno nowej, oznaczonej probówki stożkowej o pojemności 50 ml dodać 100 µl proteiny K (PK).
2. Upewnić się, że próbka krwi została dobrze wymieszana poprzez odwrócenie probówki do pobierania krwi 8 razy bezpośrednio przed pipetowaniem. Zapoznać się z instrukcją producenta dotyczącą probówki do pobierania krwi z EDTA.
3. Do probówki już zawierającej proteinazę K dodać 4 ml próbki krwi.
4. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 3 sekundy.
5. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 minutę.
6. Do tej samej probówki dodać 2,5 ml odczynnika do lizy (LY).

Uwaga Zachować pozostałą ilość odczynnika do lizy do ponownego wykorzystania w Kroku 13.

7. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund.
8. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
9. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund.
10. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
11. Wymieszać próbkę, 10 razy stukając w spód probówki.
12. Przenieść 1 ml przygotowanego lizatu do nowej, oznaczonej probówki stożkowej o pojemności 50 ml.

Uwaga Pozostałość lizatu można przechowywać w temperaturze od 2 °C do 8 °C przez maksymalnie 48 godzin lub w temperaturze -20 °C lub niższej przez maksymalnie 1 miesiąc.

13. Do nowej probówki stożkowej zawierającej lizat dodać 1,5 ml odczynnika LY zachowanego w Kroku 6.
14. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund.
15. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut.
16. Do tej samej probówki stożkowej dodać 2 ml bezwodnego alkoholu etylowego o czystości odczynnika (dostarczany przez użytkownika).
17. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund. Odstawić na bok.
18. Usunąć wszelkie pozostałości odczynnika PK lub LY.

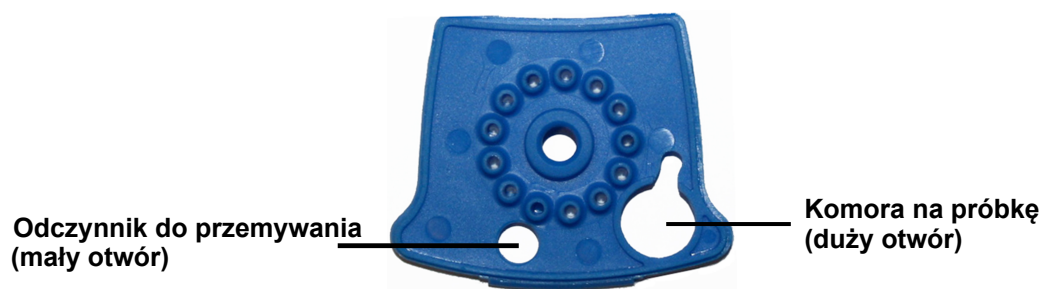
12.2.2 Przygotowanie próbki z co najmniej 30 milionami krwinek białych/ml

1. Na dno nowej probówki stożkowej o pojemności 50 ml dodać 100 µl proteiny K.
2. Upewnić się, że próbka krwi została dobrze wymieszana poprzez odwrócenie probówki do pobierania krwi 8 razy bezpośrednio przed pipetowaniem. Zapoznać się z instrukcją producenta dotyczącą probówki do pobierania krwi z EDTA.
3. Do probówki już zawierającej proteinazę K dodać 250 µl próbki krwi i 3,75 ml 1xPBS (pH 7,4, dostarczana przez użytkownika).
4. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 3 sekundy.
5. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 minutę.
6. Wykonać Kroki 6–17 opisane w punkcie Sekcja 12.2.1, aby uzyskać końcowy lizat.
7. Usunąć wszelkie pozostałości odczynnika PK lub LY.

12.3 Przygotowywanie kartridża

Aby dodać próbkę do kartridża Xpert NPM1 Mutation:

1. Wyjąć kartridż z kartonowego opakowania.
2. Sprawdzić kartridż pod kątem uszkodzeń. W razie zaobserwowania uszkodzenia nie używać kartridża.
3. Otworzyć wieczko kartridża i przenieść całą zawartość jednej (1) ampułki z odczynnikami do przemywania do komory na odczynnik do przemywania (z małym otworem). Patrz Ilustracja 1.
4. Przenieść pipetą całą przygotowaną próbkę (4,5 ml) do komory na próbkę (duży otwór). Patrz Ilustracja 1.



Ilustracja 1. Xpert NPM1 Mutation Kartridż testu (widok z góry)

5. Zamknij wieczko kartridża. Upewnij się, że wieczko zostało mocno zatrzasknięte. Rozpocząć test (patrz Sekcja 12.4, Rozpoczynanie testu).

12.4 Rozpoczynanie testu

Ważne Przed rozpoczęciem testu należy się upewnić, że w systemie jest uruchomione oprogramowanie GeneXpert Dx w wersji 6.2 lub nowszej oraz że do oprogramowania zaimportowano odpowiedni plik definicji testu. Niniejszy punkt zawiera opis standardowej obsługi GeneXpert Dx System.

Uwaga Wykonywane czynności mogą być inne, jeśli administrator systemu zmienił domyślny cykl pracy.

1. Włączyć system GeneXpert, najpierw włączając aparat GeneXpert Dx, a następnie — komputer. Oprogramowanie GeneXpert Dx zostanie uruchomione automatycznie lub może wymagać dwukrotnego kliknięcia ikony skrótu oprogramowania GeneXpert Dx na pulpicie systemu Windows®.
2. Zalogować się do oprogramowania GeneXpert, podając nazwę użytkownika i hasło.
3. W oknie systemu **GeneXpert** należy kliknąć **Nowe badanie** (Create Test) (GeneXpert Dx). Zostanie wyświetlone okno **Nowe badanie (Create Test)**.
4. Zeskanować lub wpisać Identyfikator pacjenta (Patient ID). W wypadku wpisywania Identyfikatora pacjenta (Patient ID) należy upewnić się, że Identyfikator pacjenta (Patient ID) jest wpisany poprawnie. Identyfikator pacjenta (Patient ID) jest powiązany z wynikami badania i wyświetlany w oknie **Wyświetlanie wyników (View Results)** oraz we wszystkich raportach. Pojawi się okno dialogowe **Skanowanie kodu kreskowego identyfikatora próbki (Scan Sample ID Barcode)**.
5. Zeskanować lub wpisać Identyfikator próbki (Sample ID). W wypadku wpisywania Identyfikatora próbki (Sample ID) upewnić się, że Identyfikator próbki (Sample ID) jest wpisany poprawnie. Identyfikator próbki (Sample ID) jest wyświetlany po lewej stronie okna **Wyświetlanie wyników (View Results)** i wszystkich raportów. Pojawi się okno dialogowe **Skanowanie kodu kreskowego kartridża (Scan Cartridge Barcode)**.
6. Zeskanować kod kreskowy na kartridżu testu Xpert NPM1 Mutation. Na podstawie informacji zawartych w kodzie kreskowym oprogramowanie automatycznie wypełni następujące pola: Identyfikator serii odczynników (Reagent Lot ID), Numer seryjny kartridża (Cartridge SN) i Data ważności (Expiration Date).

Uwaga Jeśli nie można zeskanować kodu kreskowego na kartridżu testu Xpert NPM1 Mutation, wówczas należy powtórzyć test z użyciem nowego kartridża. Jeśli kod kreskowy kartridża został zeskanowany w oprogramowaniu, a plik definicji testu nie jest dostępny, pojawi się ekran wskazujący, że plik definicji testu nie został wczytany do systemu. Jeśli pojawi się ten ekran, należy skontaktować się z centrum wsparcia klienta firmy Cepheid.

7. Kliknąć **Rozpocznij badanie (Start Test)**. Konieczne może być wpisanie hasła w wyświetlonym oknie dialogowym.
8. Otworzyć drzwiczki modułu aparatu z migającą zieloną lampką i załadować kartridż.
9. Zamknąć drzwiczki. Badanie zostanie rozpoczęte, a zielona lampka przestanie migać. Po zakończeniu testu lampka przestanie świecić.
10. Poczekać, aż system zwolni blokadę drzwiczek, a następnie otworzyć drzwiczki modułu i wyjąć kartridż.
11. Zużyte kartridże należy wyrzucać do odpowiedniego pojemnika na odpady związane z próbkami, zgodnie ze standardową praktyką obowiązującą w danej instytucji.

Uwaga Czas oczekiwania na wynik wynosi mniej niż 3 godziny (potrzeba około 30 minut na przygotowywanie próbki poza aparatem oraz mniej niż 2,5 godziny na wykonanie testu).

13 Wyświetlanie i drukowanie wyników

W niniejszym punkcie opisano podstawowe kroki umożliwiające wyświetlanie i drukowanie wyników. Szczegółowe instrukcje dotyczące wyświetlania i drukowania wyników można znaleźć w dokumencie *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

- Kliknąć ikonę **Wyświetl wyniki (View Results)**, aby wyświetlić wyniki.
- Po zakończeniu testu kliknąć przycisk **Raport (Report)** w oknie **Wyświetlanie wyników (View Results)**, aby wyświetlić i/lub utworzyć plik PDF z raportem.

14 Kontrola jakości

Każdy kartridż zawiera kontrolę endogenną ABL1 i kontrolę sondy (PCC).

Kontrola endogenna ABL1 — Kontrola endogenna ABL1 umożliwia upewnienie się, że do wykonania testu użyto odpowiedniej ilości próbki. Ponadto ta kontrola wykrywa hamowanie reakcji real-time PCR testu związane z próbką. Kontrola ABL1 zakończy się powodzeniem, jeśli spełni przypisane kryteria akceptacji.

Kontrola sondy (PCC) — Przed rozpoczęciem reakcji PCR system GeneXpert mierzy sygnał fluorescencji z sond w celu monitorowania nawadniania kulek, napełnienia komory reakcyjnej i działania wszystkich składników reakcji w kartridżu. Kontrola PCC zakończy się powodzeniem, jeśli spełni przypisane kryteria akceptacji.

15 Interpretacja wyników

Wyniki są interpretowane automatycznie przez aparat GeneXpert na podstawie zmierzonych sygnałów fluorescencji i wbudowanych algorytmów obliczeniowych, a następnie wyświetlane w oknie Wyświetlanie wyników (View Results). Możliwe wyniki i interpretacje przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Wyniki testu Xpert NPM1 Mutation i ich interpretacja

Wynik	Interpretacja
<p>WYKRYTO mutację NPM1 (NPM1 Mutation DETECTED)</p> <p>Patrz Ilustracja 2, Ilustracja 3, Ilustracja 4</p>	<p>Transkrypt mutacji NPM1 został wykryty.</p> <ul style="list-style-type: none"> • WYKRYTO mutację NPM1 (NPM1 Mutation DETECTED) — został wykryty transkrypt mutacji NPM1, którego wartość cyklu progowego (Ct) mieści się w prawidłowym zakresie, a punkt końcowy znajduje się powyżej wartości progowej. • Możliwe wyniki dodatnie: <ul style="list-style-type: none"> • WYKRYTO MUTACJĘ NPM1 [#,##%] (NPM1 MUTATION DETECTED [#,##%]); Ilustracja 2. • WYKRYTO MUTACJĘ NPM1 [powyżej górnej granicy LoQ] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ]); Ilustracja 3. • WYKRYTO MUTACJĘ NPM1 [poniżej LoD; < #,###%] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <#.###%]); Ilustracja 4. • ABL — POWODZENIE (PASS): został wykryty transkrypt ABL, którego wartość cyklu progowego (Ct) mieści się w prawidłowym zakresie, a punkt końcowy znajduje się powyżej wartości progowej. • Kontrola sondy — POWODZENIE (PASS): wszystkie wyniki kontroli sondy są poprawne.
<p>NIE WYKRYTO mutacji NPM1 (NPM1 Mutation NOT DETECTED)</p> <p>Patrz Ilustracja 5</p>	<p>Transkrypt mutacji NPM1 nie został wykryty.</p> <ul style="list-style-type: none"> • NIE WYKRYTO mutacji NPM1 [dostateczny transkrypt ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]) — transkrypt mutacji NPM1 nie został wykryty, a jego wartość cyklu progowego (Ct) wynosiła zero lub więcej niż wartość górnej granicy prawidłowego zakresu i/lub punkt końcowy znajdował się poniżej wartości progowej. • ABL — POWODZENIE (PASS): został wykryty transkrypt ABL, którego wartość cyklu progowego (Ct) mieści się w prawidłowym zakresie, a punkt końcowy znajduje się powyżej wartości progowej. • Kontrola sondy — POWODZENIE (PASS): wszystkie wyniki kontroli sondy są poprawne.
<p>WYNIK NIEWAŻNY (INVALID)</p> <p>Patrz Ilustracja 6, Ilustracja 7, Ilustracja 8, Ilustracja 9, Ilustracja 10</p>	<p>Nie można określić poziomu transkryptów mutacji NPM1, ponieważ próbka zawiera zbyt wiele transkryptów mutacji NPM1 i/lub zbyt wiele albo zbyt mało transkryptów ABL. Dodatkowe instrukcje dotyczące ponownego badania próbki zawiera Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.</p> <ul style="list-style-type: none"> • WYNIK NIEWAŻNY dla mutacji NPM1 (NPM1 Mutation INVALID) — wartość cyklu progowego (Ct) NPM1 wynosiła więcej niż zero i mniej niż wartość dolnej granicy prawidłowego zakresu (Ilustracja 8, Ilustracja 9) • ABL — NIEPOWODZENIE (FAIL): wartość cyklu progowego (Ct) ABL nie mieściła się w prawidłowym zakresie lub punkt końcowy znajdował się poniżej wartości progowej (Ilustracja 6, Ilustracja 7, Ilustracja 8, Ilustracja 10) • Kontrola sondy — POWODZENIE (PASS): wszystkie wyniki kontroli sondy są poprawne.

Wynik	Interpretacja
<p>BŁĄD (ERROR) Patrz Ilustracja 11</p>	<p>Nie można określić poziomu transkryptów mutacji NPM1. Dodatkowe instrukcje dotyczące ponownego badania próbki zawiera Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● BRAK WYNIKU dla mutacji NPM1 (NPM1 Mutation NO RESULT) ● ABL — BRAK WYNIKU (NO RESULT) ● Kontrola sondy — NIEPOWODZENIE (FAIL): wszystkie lub jeden wynik kontroli sondy był nieważny. ● Kontrola sondy — POWODZENIE (PASS) lub NIE DOTYCZY (NA) i Błąd ciśnienia (Pressure Abort)*. <p>* Jeśli kontrola sondy zakończyła się powodzeniem, błąd został spowodowany wartością graniczną ciśnienia maksymalnego będącą poza dopuszczalnym zakresem lub awarią elementu systemu.</p>
<p>BRAK WYNIKU (NO RESULT)</p>	<p>Nie można określić poziomu transkryptów mutacji NPM1. Nie można uzyskać wyniku testu z powodu zgromadzenia niewystarczających danych. Taka sytuacja może wystąpić na przykład wtedy, gdy operator zatrzymał test będący w toku. Dodatkowe instrukcje dotyczące ponownego badania próbek zawiera Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● BRAK WYNIKU dla mutacji NPM1 (NPM1 Mutation NO RESULT) ● ABL — BRAK WYNIKU (NO RESULT) ● Kontrola sondy — NIE DOTYCZY (NA)

16 Wyniki ilościowe

Dane ilościowe testu Xpert NPM1 Mutation są dostarczane jako współczynnik procentowy mutacji NPM1/ABL1. Do zestawów przypisuje się wartości skuteczności właściwej dla serii ($E_{\Delta Ct}$) i współczynnika skalowania (SF), które powiążają oznaczanie ilościowe transkryptów mutacji NPM1 (A, B i D) i ABL1 z liczbami kopii syntetycznych standardów podstawowych RNA zmutowanego NPM1 i ABL1 transkrybowanego *in vitro* (IVT-RNA).

Tabela 2. Przykładowe wyniki testu Xpert NPM1 Mutation

Test	Mutacja NPM1		ABL		Xpert NPM1 Mutation Wyniki testu	Uwagi
	Ct	Wynik ^a	Ct	Wynik ^a		
1	5,2	WYNIK NIEWAŻNY (INVALID)	5,8	NIEPO- WODZENIE (FAIL)	NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1 i ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])	ND.
2	9	WYNIK NIEWAŻNY (INVALID)	5,5	NIEPO- WODZENIE (FAIL)	NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt ABL] (INVALID [Too high ABL transcript])	ND.
3	5,5	WYNIK NIEWAŻNY (INVALID)	8,5	POWO- DZENIE (PASS)	NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])	ND.
4	25,0	WYNIK NIEWAŻNY (INVALID)	21,8	NIEPO- WODZENIE (FAIL)	NIEWAŻNY [niedostateczny transkrypt ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	ND.
5	0	WYNIK NIEWAŻNY (INVALID)	0	NIEPO- WODZENIE (FAIL)	NIEWAŻNY [brak transkryptu ABL] (INVALID [No ABL transcript])	ND.
6	8,5	WYNIK DODATNI (POS)	13,6	POWO- DZENIE (PASS)	WYKRYTO mutację NPM1 [powyżej górnej granicy LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])	ND.
7	22,5	WYNIK DODATNI (POS)	14,8	POWO- DZENIE (PASS)	WYKRYTO mutację NPM1 [1,05%] (NPM1 Mutation DETECTED [1.05%])	Zgłoszona wartość: 1,05%
8	27,9	WYNIK DODATNI (POS)	14,0	POWO- DZENIE (PASS)	WYKRYTO mutację NPM1 [poniżej LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])	ND.
9	0	WYNIK UJEMNY (NEG)	14,6	POWO- DZENIE (PASS)	UJEMNY [dostateczny transkrypt ABL] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	ND.
10	0	BRAK WYNIKU (NO RESULT)	0	BRAK WYNIKU (NO RESULT)	BŁĄD (ERROR)	Na przykład błąd 5017 niepowodzenie kontroli sondy [ABL] ([ABL] probe check failed)

^a * Szczegółowe informacje można znaleźć w karcie wyników analitu w oprogramowaniu systemu GeneXpert Dx.

16.1 WYKRYTO mutację NPM1 [#,#%] (NPM1 Mutation DETECTED [#.#%])

Wykryto mutację NPM1 na poziomie #,#%.

Dla wyniku „**WYKRYTO mutację NPM1 [#,#%] (NPM1 Mutation DETECTED [#.#%])**” mutacja NPM1 jest wykrywalna przy wartości Ct mutacji NPM1 wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 32 oraz przy wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20. Oprogramowanie GeneXpert oblicza wartość % na podstawie poniższego równania, gdzie wartość Delta Ct (ΔCt) jest równa wartości Ct ABL minus wartość Ct mutacji NPM1:

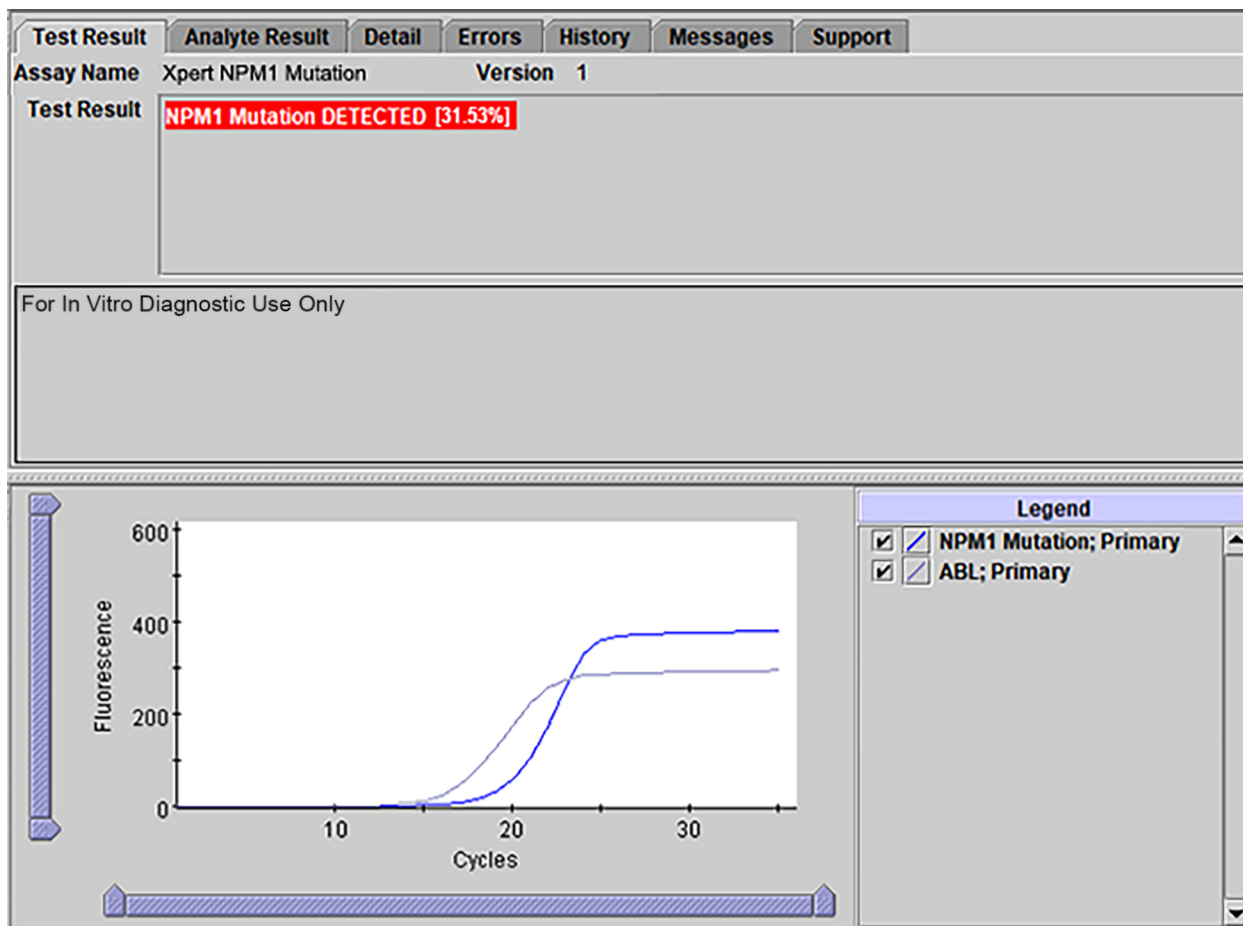
$$\% = E_{\Delta Ct}^{\Delta Ct} \times 100 \times \text{współczynnik skalowania}$$

Uwaga

Współczynnik skalowania (SF) jest parametrem właściwym dla serii, który jest zawarty w kodzie kreskowym kartridża testu. Wartości tego współczynnika i skuteczności testu właściwej dla serii ($E_{\Delta Ct}$) są określane podczas testów kontroli jakości dla każdej serii testu z użyciem standardów podstawowych skalibrowanych względem liczby kopii syntetycznych kalibratorów RNA zmutowanego NPM1 i ABL1 transkrybowanego *in vitro* (IVT-RNA) do oznaczania ilościowego transkryptów zmutowanego NPM1. Wartość $E_{\Delta Ct}$ została ustawiona na 1,95, a wartość SF została ustawiona na 1,79 na potrzeby przedstawionego przykładu.

Przykład: Właściwa dla serii wartość $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
 Wartość Ct ABL testu = 14,5; Ct mutacji NPM1 = 17,1; $\Delta Ct = -2,6$
 $\% = 1,95^{(-2,6)} \times 100 \times 1,79 = 31,53\%$

Wynik: **WYKRYTO mutację NPM1 [31,53%] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%])**. Patrz Ilustracja 2.



Ilustracja 2. GeneXpert Dx Okno Wyświetlanie wyników (View Results):
WYKRYTO mutację NPM1 [31,53%] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%])

16.2 WYKRYTO mutację NPM1 [powyżej górnej granicy LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

Wykryto mutację NPM1 na poziomie > 500%.

Dla wyniku „**WYKRYTO mutację NPM1 [powyżej górnej granicy LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])**” mutacja NPM1 jest wykrywalna przy wartości Ct mutacji NPM1 wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 32 oraz przy wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20. Oprogramowanie GeneXpert oblicza wartość % na podstawie poniższego równania, gdzie wartość Delta Ct (ΔCt) jest równa wartości Ct ABL minus wartość Ct mutacji NPM1:

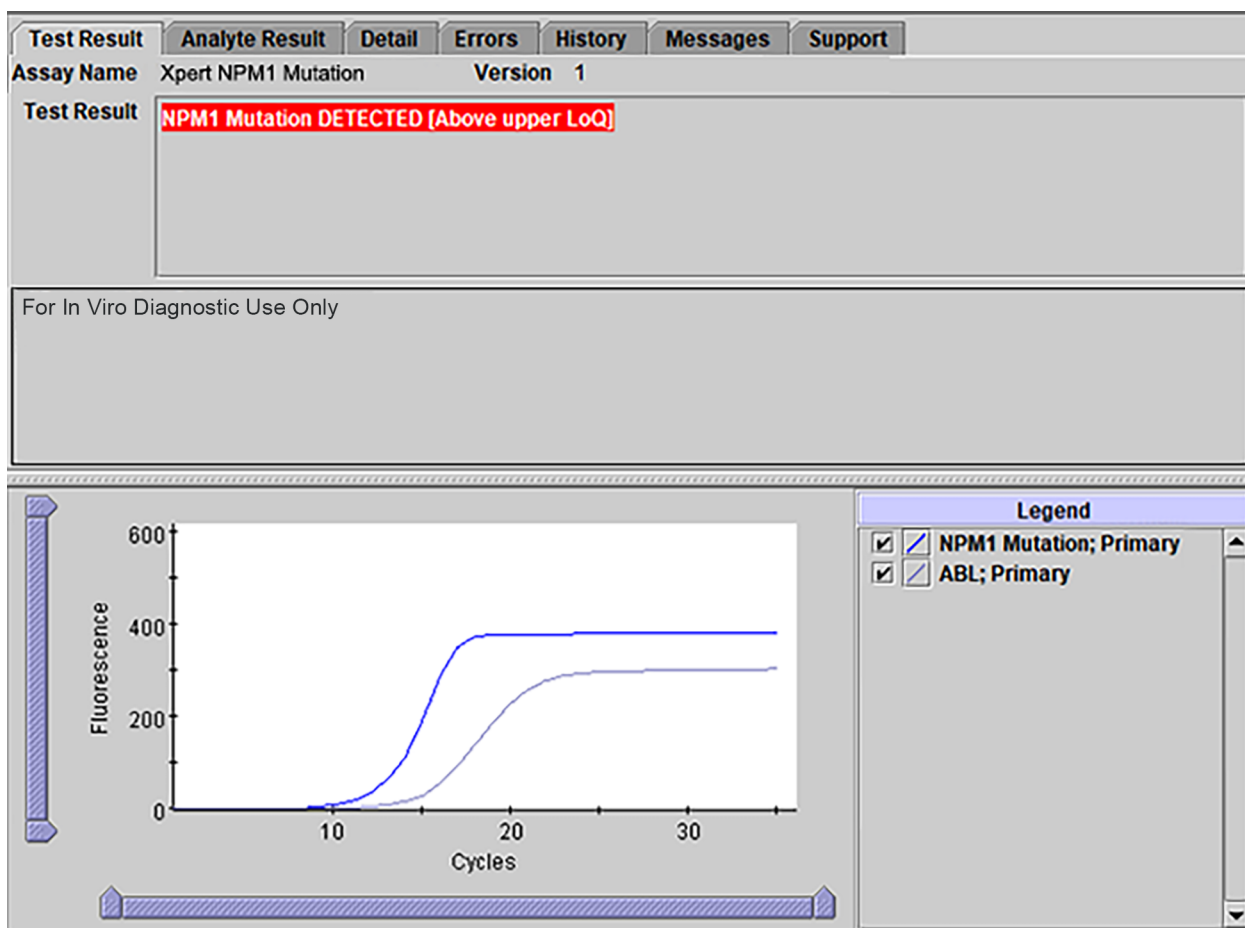
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{współczynnik skalowania (SF)}$$

Współczynnik skalowania (SF) jest parametrem właściwym dla serii, który jest zawarty w kodzie kreskowym kartridża testu. Wartości tego współczynnika i skuteczności testu właściwej dla serii ($E_{\Delta Ct}$) są określone podczas testów kontroli jakości dla każdej serii testu z użyciem standardów podstawowych skalibrowanych względem liczby kopii syntetycznych kalibratorów RNA zmutowanego NPM1 i ABL1 transkrybowanego *in vitro* (IVT-RNA) do oznaczania ilościowego transkryptów zmutowanego NPM1. Wartość $E_{\Delta Ct}$ została ustawiona na 1,95, a wartość SF została ustawiona na 1,79 na potrzeby przedstawionego przykładu.

Uwaga

Przykład: Właściwa dla serii wartość $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
 Wartość Ct ABL testu = 13,4; Ct mutacji NPM1 = 10,2; $\Delta Ct = 3,2$
 $\% = 1,95^{(3,2)} \times 100 \times 1,79 = 1516,92\%$ wynosi więcej niż zdefiniowana górna granica liniowości oznaczenia ilościowego testu wynosząca 500%

Wynik: **WYKRYTO mutację NPM1 [powyżej górnej granicy LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])**. Patrz Ilustracja 3.



Ilustracja 3. GeneXpert Dx Okno Wyświetlanie wyników (View Results): WYKRYTO mutację NPM1 [powyżej górnej granicy LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

16.3 WYKRYTO mutację NPM1 [poniżej LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

Wykryto mutację NPM1 na poziomie < 0,030%.

Dla wyniku „**WYKRYTO mutację NPM1 [poniżej LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])**” mutacja NPM1 jest wykrywalna przy wartości Ct mutacji NPM1 wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 32 oraz przy wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20. Oprogramowanie GeneXpert oblicza wartość % na podstawie poniższego równania, gdzie wartość Delta Ct (ΔCt) jest równa wartości Ct ABL minus wartość Ct mutacji NPM1:

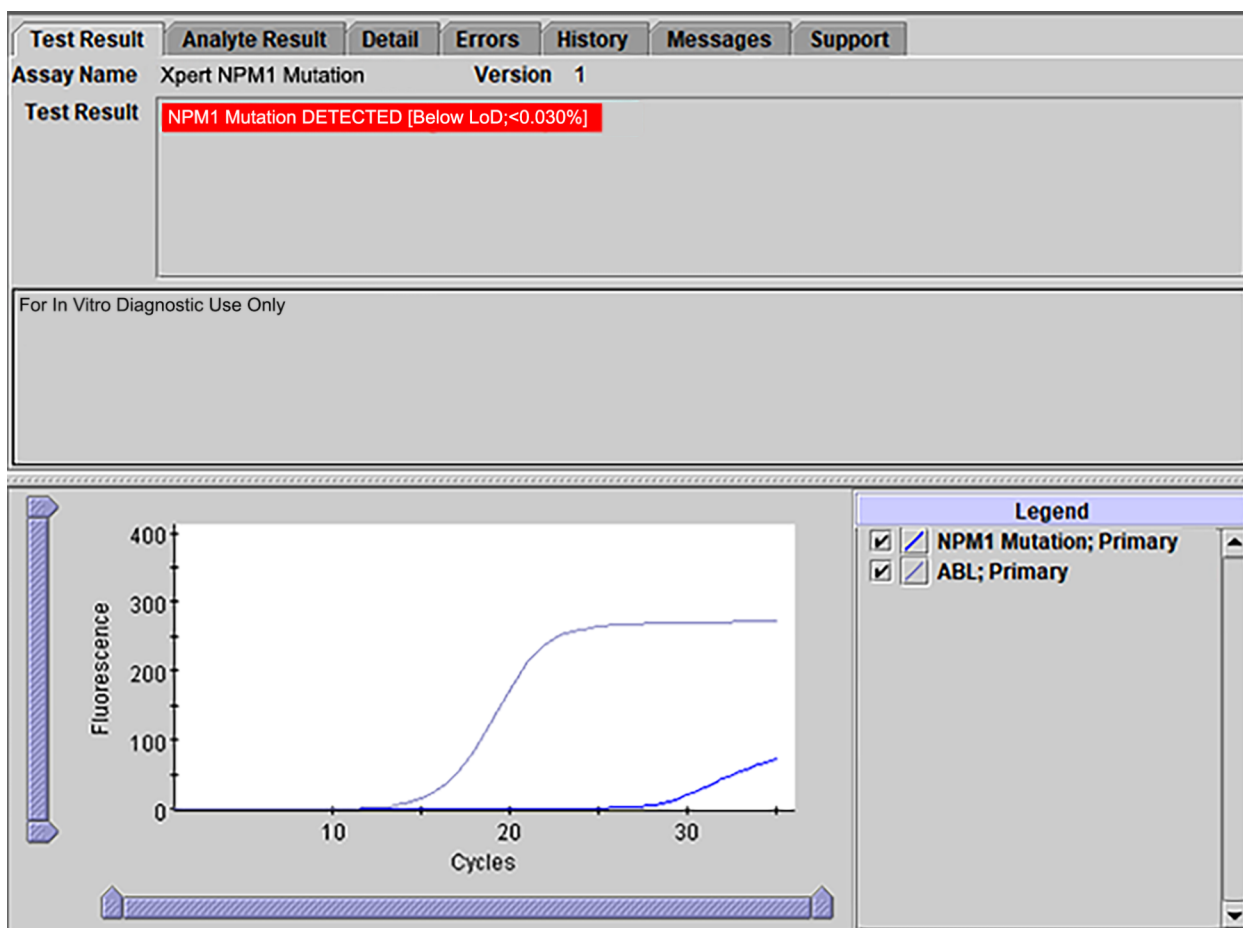
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{współczynnik skalowania (SF)}$$

Uwaga

Współczynnik skalowania (SF) jest parametrem właściwym dla serii, który jest zawarty w kodzie kreskowym kartridża testu. Wartości tego współczynnika i skuteczności testu właściwej dla serii ($E_{\Delta Ct}$) są określane podczas testów kontroli jakości dla każdej serii testu z użyciem standardów podstawowych skalibrowanych względem liczby kopii syntetycznych kalibratorów RNA zmutowanego NPM1 i ABL1 transkrybowanego *in vitro* (IVT-RNA) do oznaczania ilościowego transkryptów zmutowanego NPM1. Wartość $E_{\Delta Ct}$ została ustawiona na 1,95, a wartość SF została ustawiona na 1,79 na potrzeby przedstawionego przykładu.

Przykład: Właściwa dla serii wartość $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
 Wartość Ct ABL testu = 14,3; Ct mutacji NPM1 = 28,8; $\Delta Ct = -14,5$
 $\% = 1,95^{(-14,5)} \times 100 \times 1,79 = 0,011\%$ wynosi mniej niż zdefiniowana granica wykrywalności testu wynosząca 0,030%

Wynik: **WYKRYTO mutację NPM1 [poniżej LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])**. Patrz Ilustracja 4.



Ilustracja 4. Okno Wyświetlanie wyników (View Results) systemu GeneXpert: WYKRYTO mutację NPM1 [poniżej LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

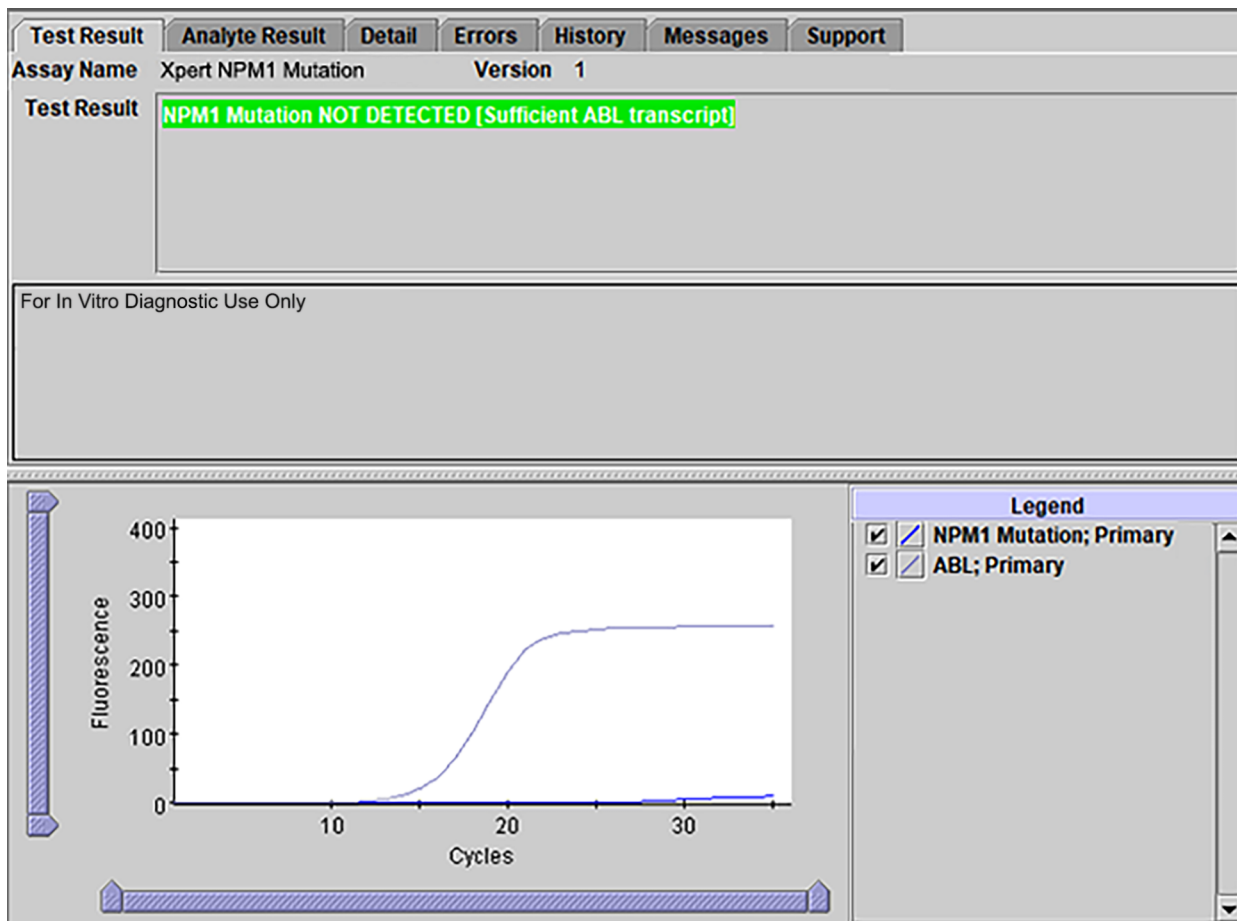
16.4 NIE WYKRYTO mutacji NPM1 [dostateczny transkrypt ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

Mutacja NPM1 nie została wykryta przy wartości Ct NPM1 wynoszącej 0 lub więcej niż 32 oraz wartości Ct ABL wynoszącej więcej niż 6 i nie więcej niż 20.

Oprogramowanie GeneXpert wymaga wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20, aby test Xpert NPM1 Mutation miał oznaczenie „Dostateczny transkrypt ABL (Sufficient ABL transcript)”. Patrz Sekcja 15, Interpretacja wyników, Tabela 1.

Przykład: Wartość Ct mutacji NPM1 testu = 0; Ct ABL = 14,0 wynosi więcej niż 6 i mniej niż 20.

Wynik: **NIE WYKRYTO mutacji NPM1 [dostateczny transkrypt ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]).** Patrz Ilustracja 5.



Ilustracja 5. Okno Wyświetlanie wyników (View Results) systemu GeneXpert: NIE WYKRYTO mutacji NPM1 [dostateczny transkrypt ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

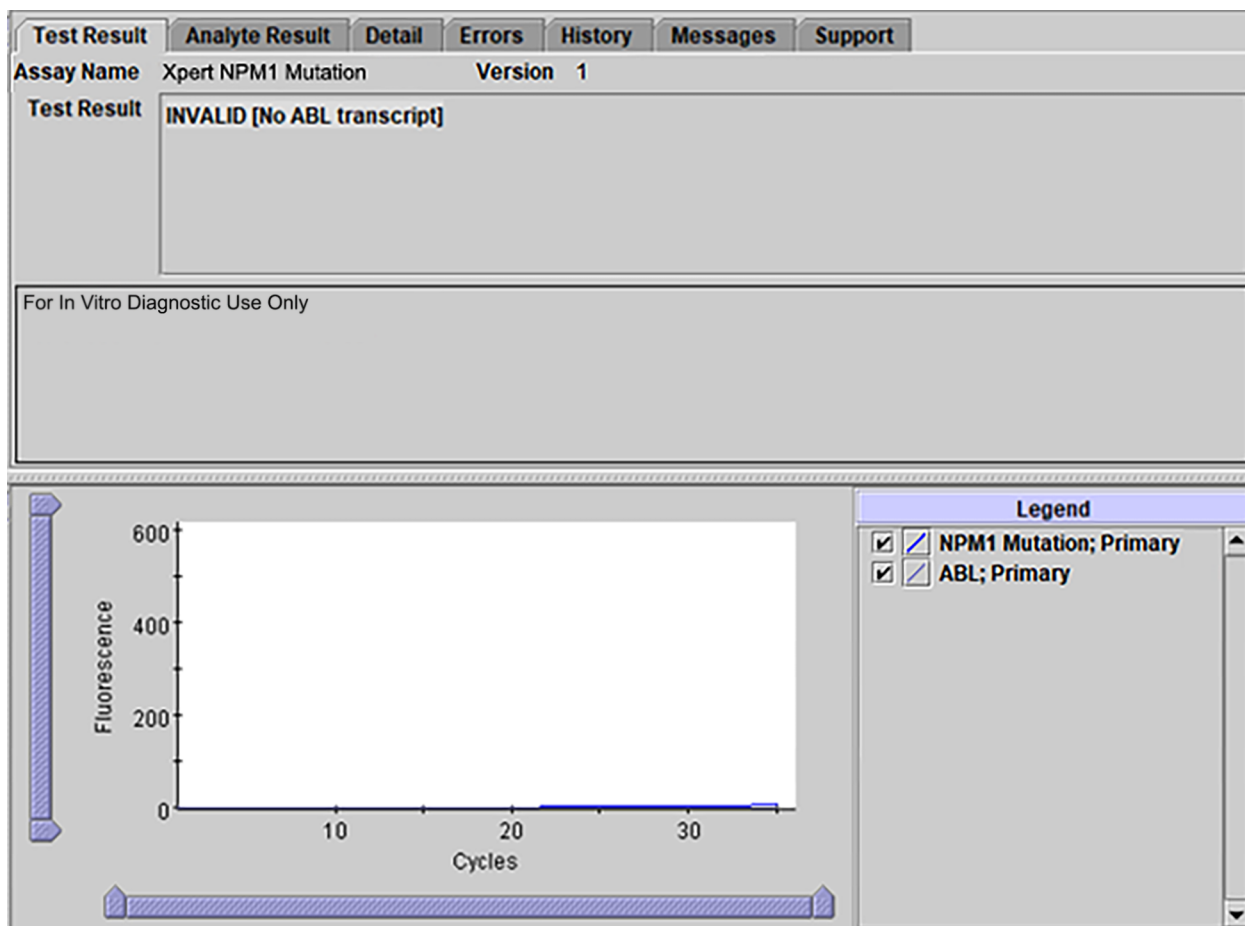
16.5 NIEWAŻNY [brak transkryptu ABL] (INVALID [No ABL transcript])

Mutacja NPM1 została wykryta lub nie została wykryta przy wartości Ct ABL wynoszącej 0.

Oprogramowanie GeneXpert wymaga wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20, aby test Xpert NPM1 Mutation miał oznaczenie „Dostateczny transkrypt ABL (Sufficient ABL transcript)”. Patrz Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.

Przykład: Wartość Ct mutacji NPM1 testu = 0; Ct ABL = 0.

Wynik: **NIEWAŻNY [brak transkryptu ABL] (INVALID [No ABL transcript])**. Patrz Ilustracja 6.



Ilustracja 6. Okno Wyświetlanie wyników (View Results) systemu GeneXpert:
NIEWAŻNY [brak transkryptu ABL] (INVALID [No ABL transcript])

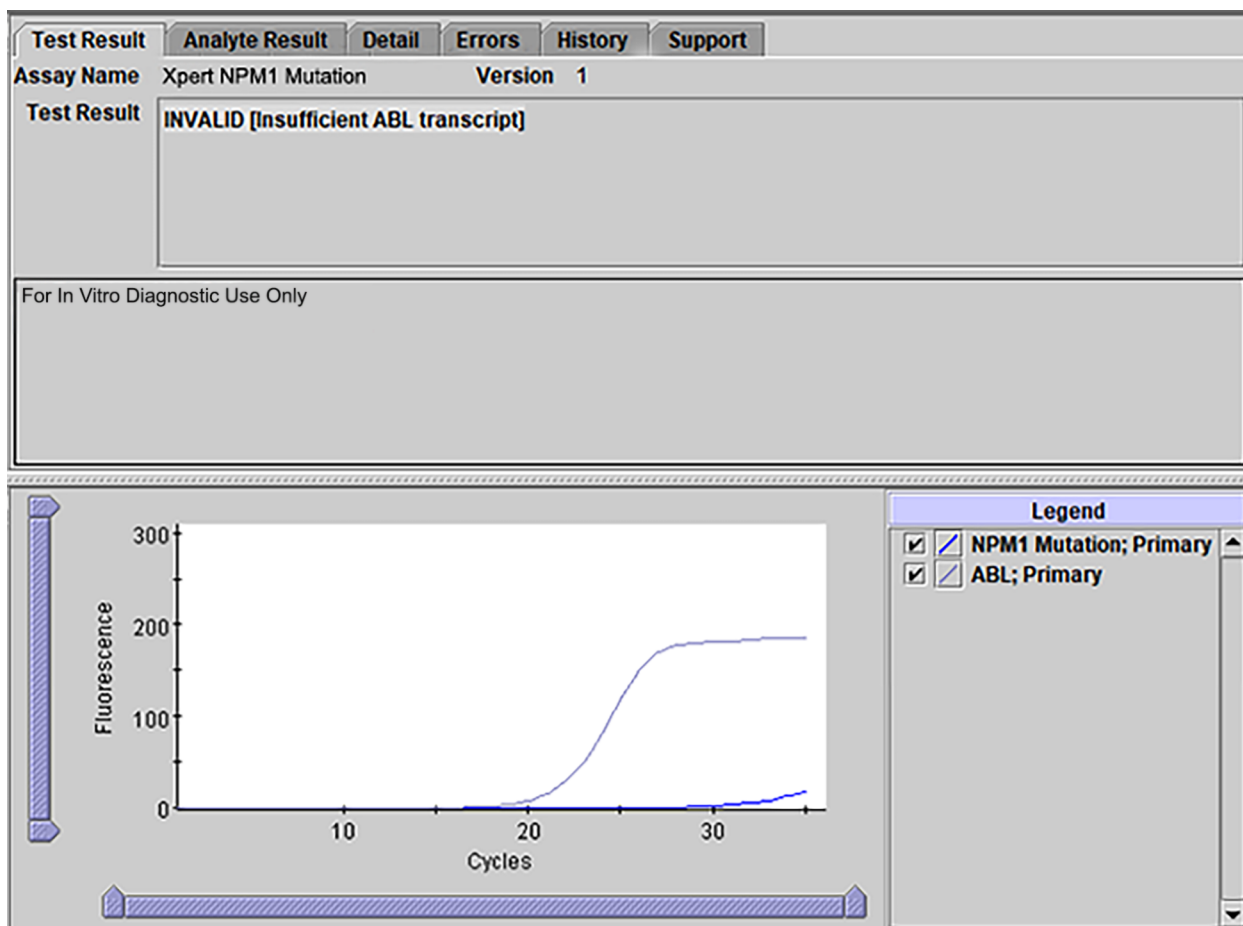
16.6 NIEWAŻNY [niedostateczny transkrypt ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

Mutacja NPM1 została wykryta lub nie została wykryta przy wartości Ct ABL wynoszącej więcej niż 20.

Oprogramowanie GeneXpert wymaga wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20, aby test Xpert NPM1 Mutation miał oznaczenie „Dostateczny transkrypt ABL (Sufficient ABL transcript)”. Patrz Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.

Przykład: Wartość Ct mutacji NPM1 testu = 33,3; Ct ABL = 20,2 wynosi więcej niż 20.

Wynik: **NIEWAŻNY [niedostateczny transkrypt ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript]).**
Patrz Ilustracja 7.



Ilustracja 7. Okno Wyświetlanie wyników (View Results) systemu GeneXpert:
NIEWAŻNY [niedostateczny transkrypt ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

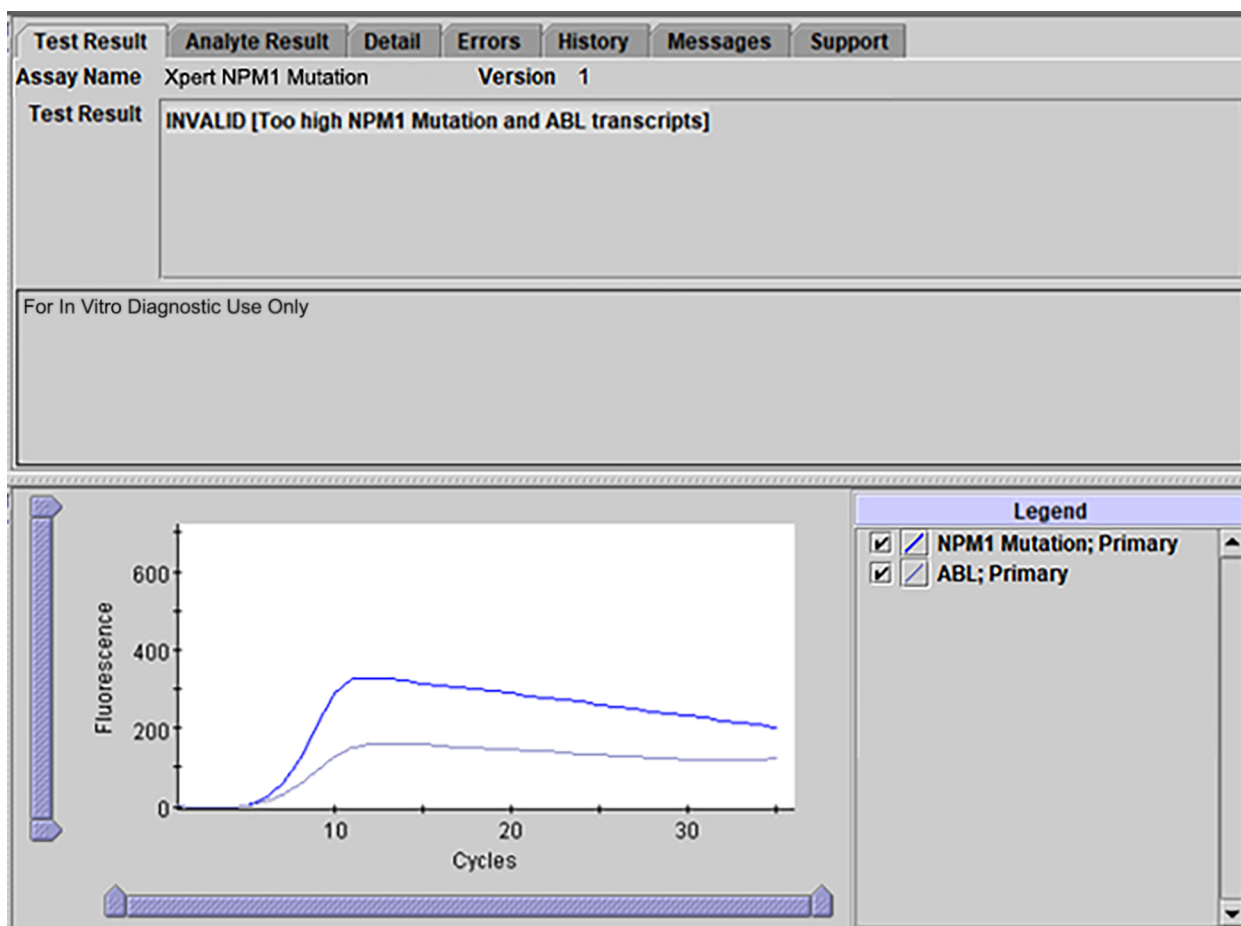
16.7 NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1 i ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

Mutacja NPM1 została wykryta przy wartościach Ct mutacji NPM1 i ABL wynoszących więcej niż 0 i mniej niż 6.

Oprogramowanie GeneXpert wymaga wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20, aby test Xpert NPM1 Mutation miał oznaczenie „Dostateczny transkrypt ABL (Sufficient ABL transcript)”. Patrz Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.

Przykład: Wartość Ct mutacji NPM1 testu = 5,4 wynosi więcej niż 0 i mniej niż 6; Ct ABL = 5,9 wynosi mniej niż 6.

Wynik: **NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1 i ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])**. Patrz Ilustracja 8.



Ilustracja 8. GeneXpert Dx Okno Wyświetlanie wyników (View Results): NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1 i ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

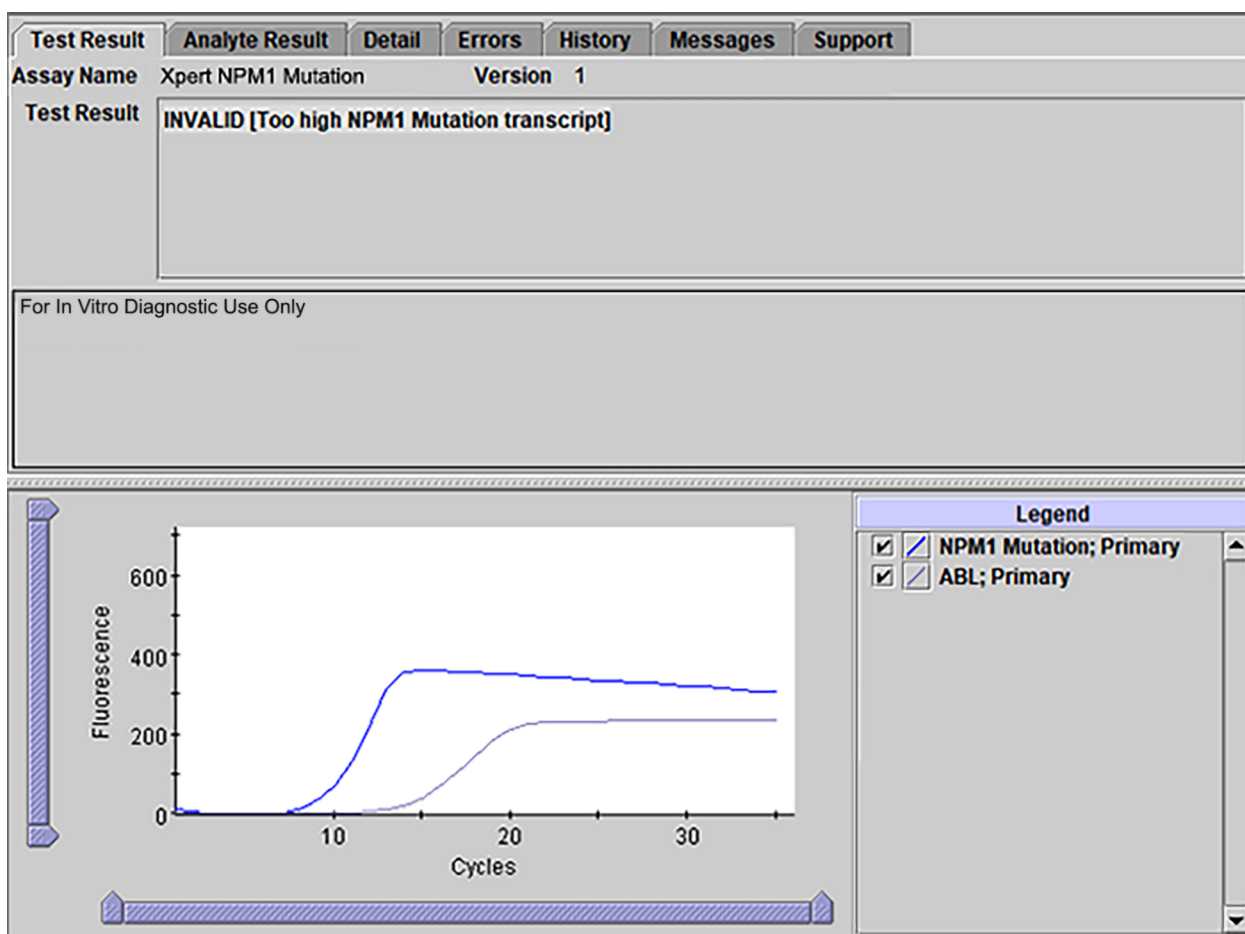
16.8 NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

Mutacja NPM1 została wykryta przy wartości Ct mutacji NPM1 wynoszącej więcej niż 0 i mniej niż 6 oraz wartości Ct ABL wynoszącej więcej niż 6 i nie więcej niż 20.

Oprogramowanie GeneXpert wymaga wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20, aby test Xpert NPM1 Mutation miał oznaczenie „Dostateczny transkrypt ABL (Sufficient ABL transcript)”. Patrz Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.

Przykład: Wartość Ct mutacji NPM1 testu = 5,8 wynosi więcej niż 0 i mniej niż 6; Ct ABL = 13 wynosi więcej niż 6 i mniej niż 20.

Wynik: **NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])**. Patrz Ilustracja 9.



Ilustracja 9. Okno Wyświetlanie wyników (View Results) systemu GeneXpert: NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt mutacji NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

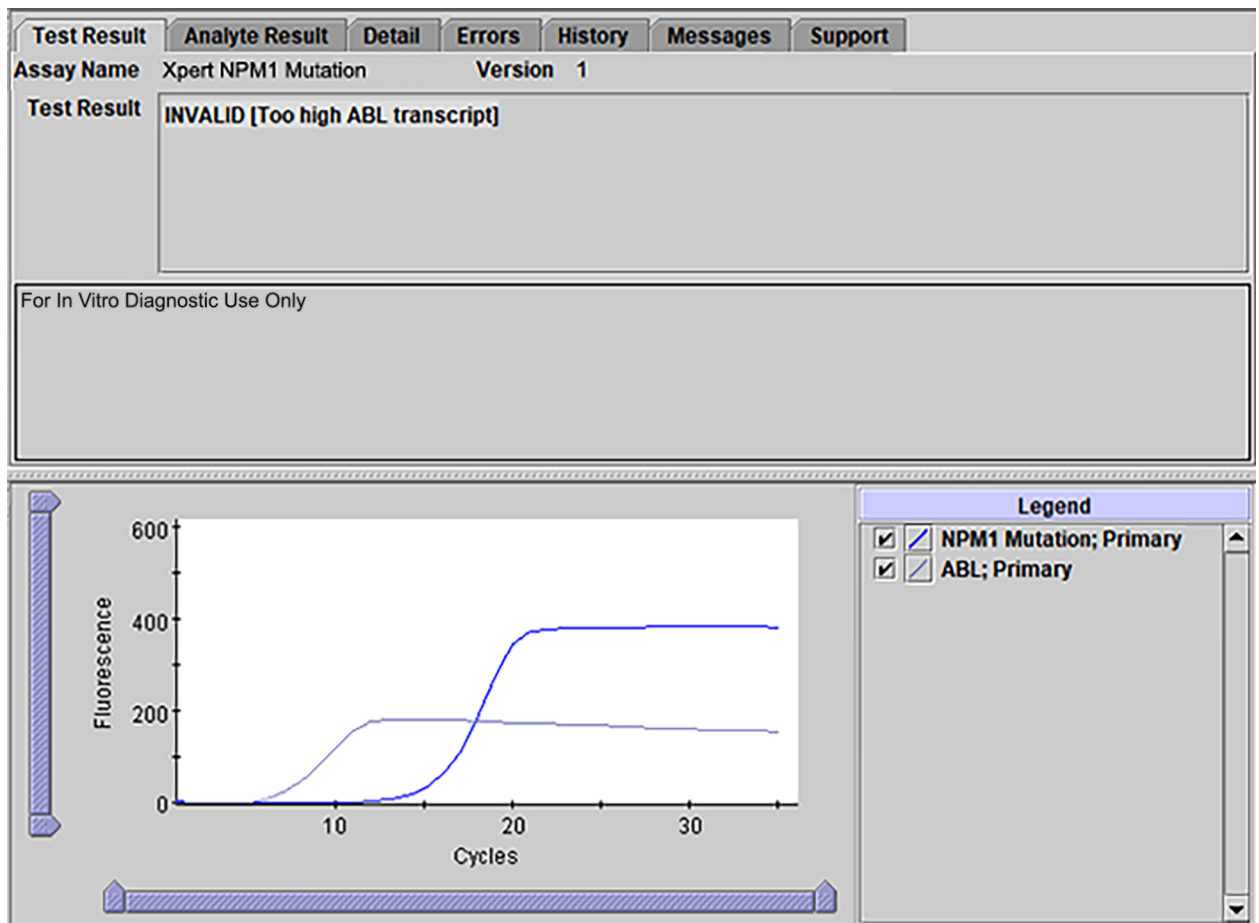
16.9 NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt ABL] (INVALID [Too high ABL transcript])

Mutacja NPM1 została wykryta przy wartości Ct mutacji NPM1 wynoszącej więcej niż 6 i nie więcej niż 32 oraz wartości Ct ABL innej niż 0 i mniejszej niż 6.

Oprogramowanie GeneXpert wymaga wartości Ct ABL wynoszącej co najmniej 6 i nie więcej niż 20, aby test Xpert NPM1 Mutation miał oznaczenie „Dostateczny transkrypt ABL (Sufficient ABL transcript)”. Patrz Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.

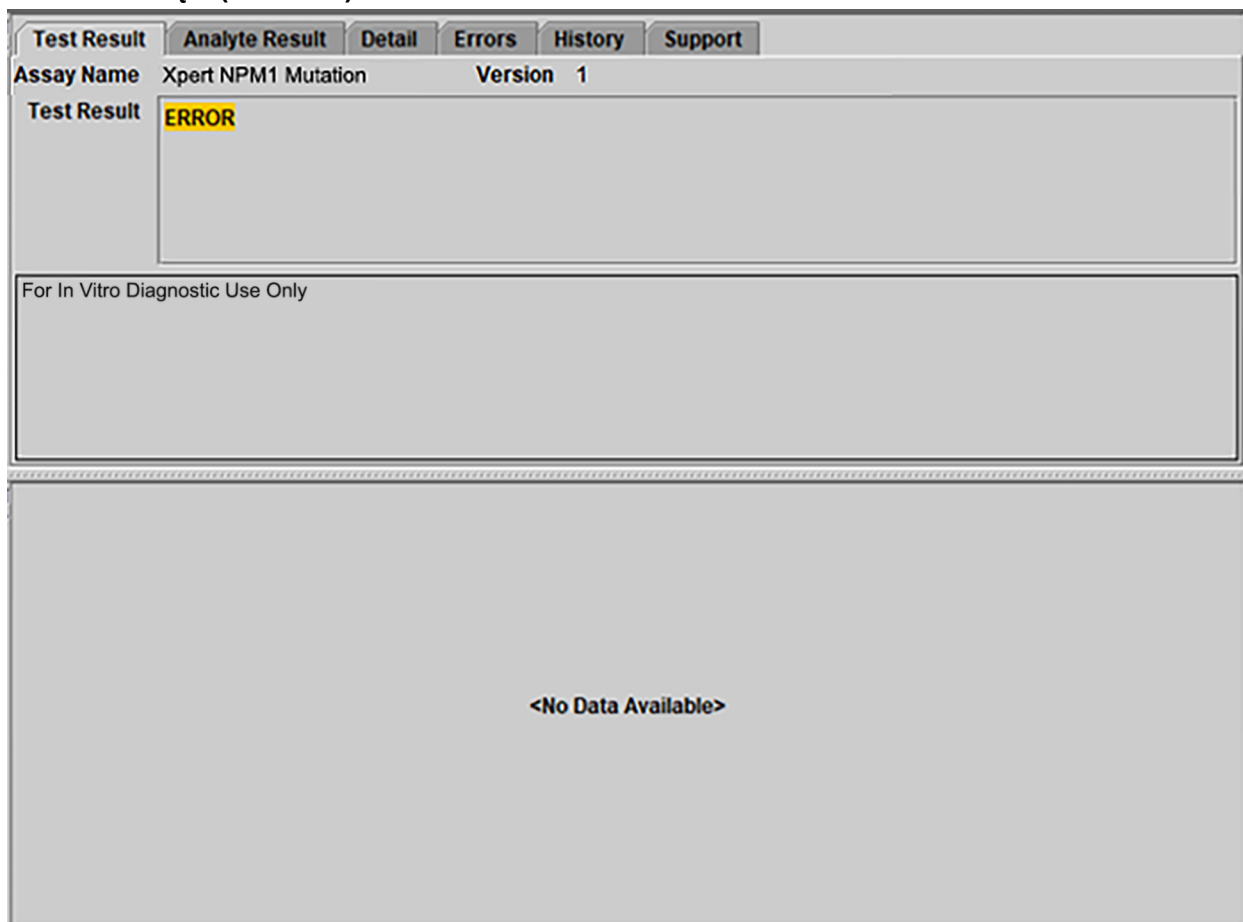
Przykład: Wartość Ct mutacji NPM1 testu = 13,2; Ct ABL = 5,8 wynosi mniej niż 6.

Wynik: **NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt ABL] (INVALID [Too high ABL transcript])**. Patrz Ilustracja 10.



Ilustracja 10. Okno Wyświetlanie wyników (View Results) systemu GeneXpert: NIEWAŻNY [zbyt wysoki transkrypt ABL] (INVALID [Too high ABL transcript])

16.10 BŁĄD (ERROR)



Ilustracja 11. Okno Wyświetlanie wyników (View Results) systemu GeneXpert: BŁĄD (ERROR)

17 Ograniczenia testu

- Test nie jest przeznaczony do stosowania z zewnętrznymi kalibratorami.
- Modyfikacja tych procedur może wpłynąć na skuteczność testu.
- Ten produkt opracowano pod kątem stosowania wyłącznie z próbkami krwi pobranymi do probówek zawierających EDTA.
- Nie używać heparyny jako antykoagulantu, ponieważ może ona powodować zahamowanie reakcji PCR.
- Nie zatwierdzono próbek typu: cytrynian sodu, kożuszek leukocyarno-płytkowy ani szpik kostny.
- Błędne wyniki testu mogą być spowodowane niewłaściwym pobraniem, obsługą lub przechowywaniem próbki bądź wymieszaniem próbek. Uważne przestrzeganie instrukcji użycia pozwoli uniknąć uzyskania błędnych wyników.
- Mutacje lub polimorfizmy w regionach wiązania starterów lub sond mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanych wariantów, co może prowadzić do uzyskania wyniku fałszywie ujemnego.
- Nadmiernie wysoka liczba krwinek białych może spowodować wzrost ciśnienia w kartridżu i prowadzić do przerwania analizy lub uzyskania niedokładnych wyników.
- Niektóre próbki z bardzo niskimi poziomami transkryptów ABL lub z liczbą krwinek białych mniejszą niż 150 000 komórek/ml mogą być zgłaszane z wynikiem **NIEWAŻNY (INVALID)** (typ 1). Wynik niejednoznaczny nie wyklucza braku obecności bardzo małych stężeń komórek białaczkowych w próbce.

18 Rozwiązywanie problemów

Tabela 3. Rozwiązywanie problemów

Wynik testu	Możliwe przyczyny	Wskazówki
WYNIK NIEWAŻNY (INVALID)	Typ 1: Niepowodzenie kontroli endogennej ABL: <ul style="list-style-type: none"> Niska jakość próbki Hamowanie przebiegu reakcji RT-PCR Ct ABL > 20 i/lub punkt końcowy < 100 	<ul style="list-style-type: none"> Sprawdzić jakość próbki (np. czy przestrzegano wymagań dotyczących przechowywania próbki, w tym czasu i temperatury). Powtórzyć test z użyciem oryginalnej próbki (jeśli jest dostępna) lub zachowanego lizatu oraz nowego kartridża, wykonując procedurę opisaną w punkcie Sekcja 19.1, Procedura powtórzenia badania w przypadku wyniku BŁĄD (ERROR) lub NIEWAŻNY (INVALID) (typ 1).
	Typ 2: Nie można określić poziomu transkryptów mutacji NPM1, ponieważ próbka zawiera zbyt wiele transkryptów mutacji NPM1 i/lub ABL (Ct < 6)	Powtórzyć test z użyciem oryginalnej próbki (jeśli jest dostępna) lub zachowanego lizatu oraz nowego kartridża, wykonując procedurę opisaną w punkcie Sekcja 19.2, Procedura powtórzenia badania w przypadku wyniku BŁĄD (ERROR) (kod 2008) lub NIEWAŻNY (INVALID) (typ 2).
BŁĄD (ERROR) (kod 2008)	Przekroczona wartość graniczna ciśnienia (komunikat o błędzie 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Sprawdzić jakość próbki Sprawdzić, czy liczba krwinek białych nie jest znacznie podwyższona Powtórzyć test z użyciem oryginalnej próbki (jeśli jest dostępna) lub zachowanego lizatu oraz nowego kartridża, wykonując procedurę opisaną w punkcie Sekcja 19.2, Procedura powtórzenia badania w przypadku wyniku BŁĄD (ERROR) (kod 2008) lub NIEWAŻNY (INVALID) (typ 2).
BŁĄD (ERROR) (kod 5006, 5007, 5008 i 5009*) * Ta lista kodów BŁĄD (ERROR) nie jest kompletna.	Niepowodzenie kontroli sondy	Powtórzyć test z użyciem oryginalnej próbki (jeśli jest dostępna) lub zachowanego lizatu oraz nowego kartridża, wykonując procedurę opisaną w punkcie Sekcja 19.1, Procedura powtórzenia badania w przypadku wyniku BŁĄD (ERROR) lub NIEWAŻNY (INVALID) (typ 1).
BRĄK WYNIKU (NO RESULT)	Błąd zbierania danych. Taka sytuacja może wystąpić na przykład wtedy, gdy operator zatrzymał test będący w toku lub gdy nastąpiła awaria zasilania.	Powtórzyć test z użyciem oryginalnej próbki (jeśli jest dostępna) lub zachowanego lizatu oraz nowego kartridża, wykonując procedurę opisaną w punkcie Sekcja 19.1, Procedura powtórzenia badania w przypadku wyniku BŁĄD (ERROR) lub NIEWAŻNY (INVALID) (typ 1).

19 Powtarzanie badań

19.1 Procedura powtórzenia badania w przypadku wyniku BŁĄD (ERROR) lub NIEWAŻNY (INVALID) (typ 1)

Należy powtórzyć badanie próbek z wynikami **BŁĄD (ERROR)** lub **NIEWAŻNY (INVALID)** spowodowanymi wartością cyklu progowego (Ct) ABL przekraczającą maksymalną prawidłową wartość odcięcia Ct (Ct > 20) lub punktem końcowym poniżej wartości progowej (< 100). Patrz również Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.

1. Jeśli dostępna jest wystarczająca objętość próbki krwi, wówczas należy powtórzyć badanie z użyciem pierwotnej probówki do pobierania próbki krwi zgodnie z procedurą, której opis zawiera Sekcja 12.2.

-LUB-

Jeśli objętość próbki krwi jest niewystarczająca, wówczas można powtórzyć badanie z użyciem lizatu zachowanego w Sekcja 12.2.1 Kroku 12.

- a. Jeśli zachowany lizat uzyskany w Sekcja 12.2.1 Kroku 12 jest przechowywany w stanie zamrożonym, przed użyciem należy go doprowadzić do temperatury pokojowej.
 - b. Upewnić się, że lizat jest dobrze wymieszany poprzez wymieszanie próbki w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund i odstawienie próbki na 3 minuty do zniknięcia pęcherzyków powietrza.
2. Przenieść 1 ml przygotowanego lizatu do nowej probówki stożkowej o pojemności 50 ml.
 3. Wykonać Kroki 13–17 opisane w punkcie Sekcja 12.2.1, aby uzyskać końcowy lizat.
 4. Otworzyć wieczko kartridża i przenieść całą zawartość jednej (1) ampułki z odczynnikiem do przemywania do komory na odczynnik do przemywania (z małym otworem). Patrz Ilustracja 1.
 5. Przenieść pipetą całą przygotowaną próbkę do komory na próbkę (duży otwór). Patrz Ilustracja 1.
 6. Zamknij wieczko kartridża. Rozpocząć test (patrz Sekcja 12.4, Rozpoczynanie testu).

19.2 Procedura powtórzenia badania w przypadku wyniku BŁĄD (ERROR) (kod 2008) lub NIEWAŻNY (INVALID) (typ 2)

Należy powtórzyć badanie próbek, dla których poziomy transkryptów mutacji NPM1 i/lub ABL są poniżej prawidłowej minimalnej wartości Ct (Ct > 0 i Ct < 6) i/lub w przypadku przekroczenia wartości granicznej ciśnienia. Patrz również Sekcja 18, Rozwiązywanie problemów.

1. Na dno nowej probówki stożkowej o pojemności 50 ml dodać 100 µl proteinazy K (PK).
2. Upewnić się, że próbka krwi lub lizat zachowany w Sekcja 12.2 Kroku 12 zostały dobrze wymieszane poprzez odwrócenie probówki 8 razy bezpośrednio przed pipetowaniem.
3. Do probówki już zawierającej proteinazę K dodać 250 µl próbki krwi i 3,75 ml PBS (pH 7,4, dostarczana przez użytkownika), jeśli jest dostępna, lub 60 µl lizatu zachowanego w Sekcja 12.2.1 Kroku 12.
 - a. Jeśli zachowany lizat uzyskany w Sekcja 12.2.1 Kroku 12 jest przechowywany w stanie zamrożonym, przed użyciem należy go doprowadzić do temperatury pokojowej.
 - b. Upewnić się, że lizat jest dobrze wymieszany poprzez wymieszanie próbki w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund i odstawienie próbki na 3 minuty do zniknięcia pęcherzyków powietrza.
4. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 3 sekundy.
5. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 minutę.
6. W celu przygotowania próbki krwi z PBS do powtórzenia badania wykonać Kroki 6–17 opisane w punkcie Sekcja 12.2.1, aby uzyskać końcowy lizat. W celu przygotowania próbki zachowanego lizatu do powtórzenia badania wykonać Kroki a–g opisane poniżej, aby uzyskać końcowy lizat.
 - a. Do probówki zawierającej próbkę zachowanego lizatu do powtórzenia badania dodać 2,5 ml odczynnika LY.
 - b. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund.
 - c. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
 - d. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund.
 - e. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
 - f. Do tej samej probówki dodać 2 ml bezwodnego alkoholu etylowego o czystości odczynnika (dostarczany przez użytkownika).
 - g. Mieszać próbkę w wytrząsarce typu Vortex z maksymalną prędkością w trybie ciągłym przez 10 sekund. Odstawić na bok.

7. Otworzyć wieczko kartridża i przenieść całą zawartość jednej (1) ampułki z odczynnikami do przemywania do komory na odczynnik do przemywania (z małym otworem). Patrz Ilustracja 1.
8. Przenieść pipetą całą przygotowaną próbkę do komory na próbkę (duży otwór). Patrz Ilustracja 1.
9. Zamknij wieczko kartridża. Rozpocząć test (patrz Sekcja 12.4, Rozpocznianie testu).

20 Wartości oczekiwane

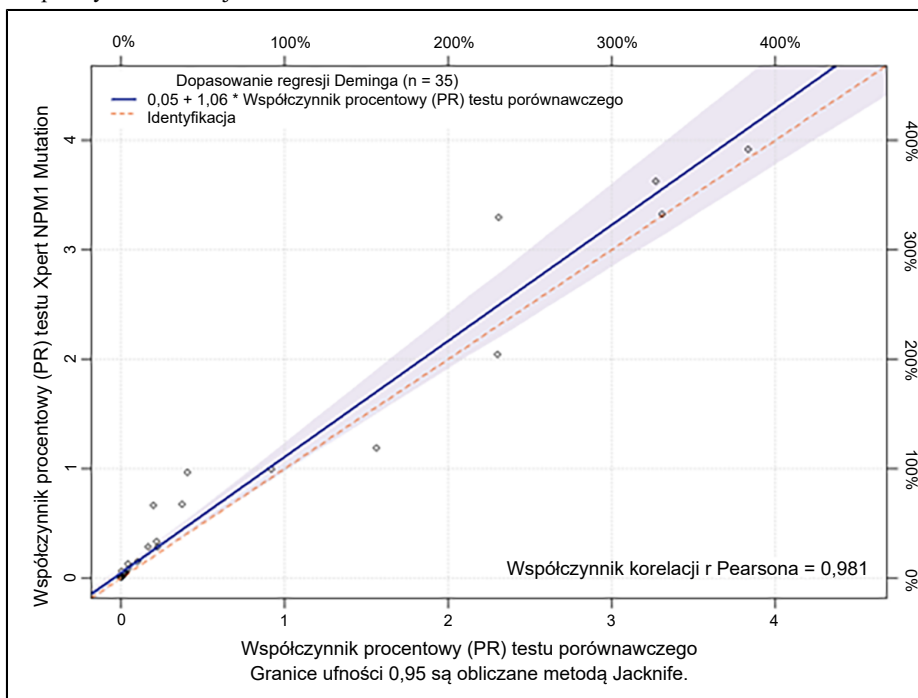
Zakres Xpert NPM1 Mutation obejmuje kluczowe kliniczne punkty decyzyjne związane z monitorowaniem AML. Oczekiwane wartości są wyrażone jako współczynnik procentowy mRNA mutacji NPM1 do mRNA ABL i mieszczą się w zakresie od 0,030% do 500%. Pomiary poniżej tego zakresu są zgłaszane jako niewykryte lub poniżej granicy wykrywalności (LoD). Pomiary powyżej tego zakresu są zgłaszane jako powyżej granicy oznaczenia ilościowego (LoQ). Szczegóły znaleźć można w Sekcja 15.

21 Skuteczność kliniczna

Przeprowadzono wieloośrodkowe, obserwacyjne badanie porównawcze w trzech ośrodkach w Stanach Zjednoczonych i jednym ośrodku poza Stanami Zjednoczonymi. Do badania włączono próbki od 40 poszczególnych pacjentów cierpiących na AML z mutacją NPM1 z jednego punktu czasowego i dla całego zakresu dynamicznego testu Xpert NPM1 Mutation. Zebrano informacje dotyczące wieku i płci pacjentów, od których uzyskano próbki. Wśród pacjentów było 11 mężczyzn (27,5%) i 29 kobiet (72,5%). Wszystkie próbki uzyskano od pacjentów w wieku od 16 do 81 lat, a średnia wieku wynosiła 59,7 roku.

Dla wszystkich z 40 próbek uzyskano ważne wyniki testu. Dla trzydziestu sześciu z 40 próbek uzyskano wyniki z zakresach ilościowych obu testów. Cztery próbki wykluczono z analizy regresji Deminga, ponieważ dla próbek uzyskano wyniki ujemne w teście Xpert NPM1 Mutation i/lub teście porównawczym. Dodatkową próbkę wykluczono, ponieważ stanowiła ona element odstający. Łącznie 35 próbek uwzględniono w analizie regresji Deminga.

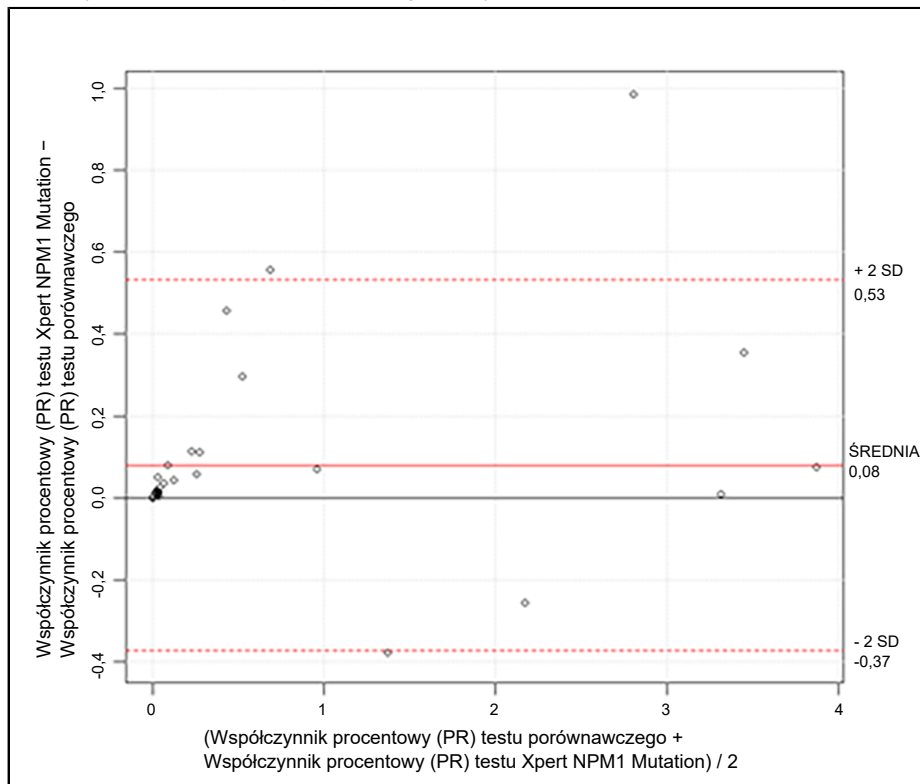
Skuteczność testu Xpert NPM1 Mutation w porównaniu z testem porównawczym oceniono z zastosowaniem analizy regresji Deminga w celu określenia nachylenia i punktu przecięcia. Ilustracja 12 przedstawia wyniki analizy regresji Deminga, w tym nachylenie, punkt przecięcia i linię identyfikacji dla 35 próbek. 95% przedziały ufności obliczono metodą Jackknife i przedstawiono współczynnik korelacji Pearsona.



Ilustracja 12. Regresja Deminga dla współczynnika procentowego

Nachylenie i punkt przecięcia dla współczynnika procentowego z analizy regresji Deminga wyniosły odpowiednio 1,06 i 0,05, a współczynnik korelacji Pearsona między wynikami testu Xpert NPM1 Mutation a testu porównawczego wyniósł 0,981.

Wyniki analizy Blanda-Altmana dotyczącej różnicy między współczynnikami procentowymi oceniono dla 35 próbek z wynikami ilościowymi, które mieściły się w zakresie liniowym testu Xpert NPM1 Mutation i testu porównawczego. Ilustracja 13 przedstawia wykres Blanda-Altmana z różnicami między współczynnikami procentowymi dla obu testów w porównaniu ze średnimi wynikami współczynników procentowych dla każdej próbki. Wykres przedstawia również górne i dolne dwukrotne odchylenie standardowe (2SD) średniej różnicy, które zaobserwowano w badaniu.



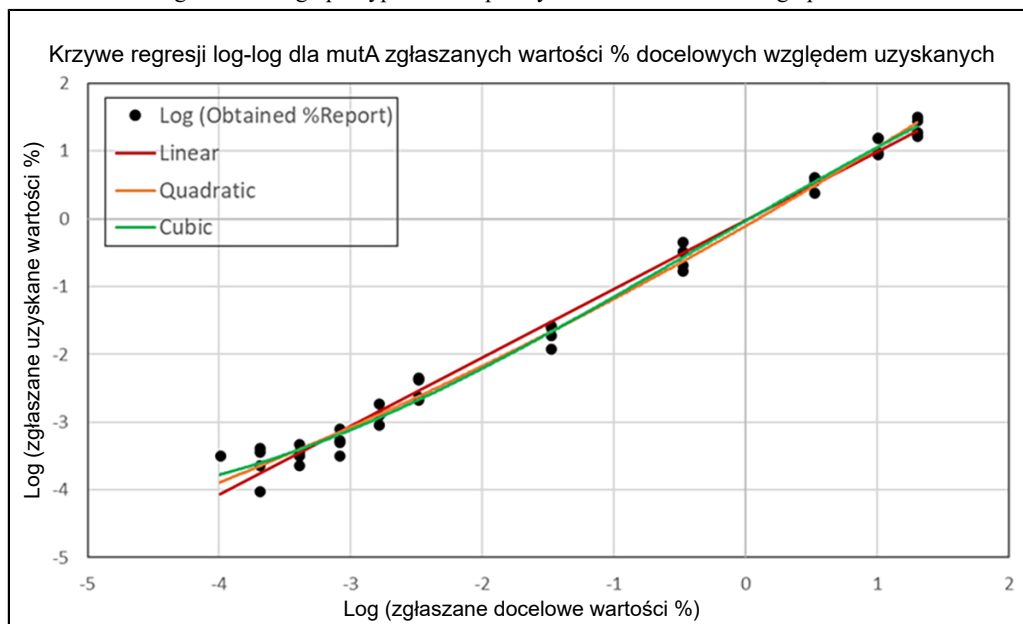
Ilustracja 13. Wykres Blanda-Altmana dla współczynników procentowych testu Xpert NPM1 Mutation & testu porównawczego

Średnia różnica między współczynnikami procentowymi wyników testu Xpert NPM1 Mutation i testu porównawczego wyniosła 0,08. Większość (91,4%, 32/35) wyników mieściła się w zakresie 2SD średniej różnicy.

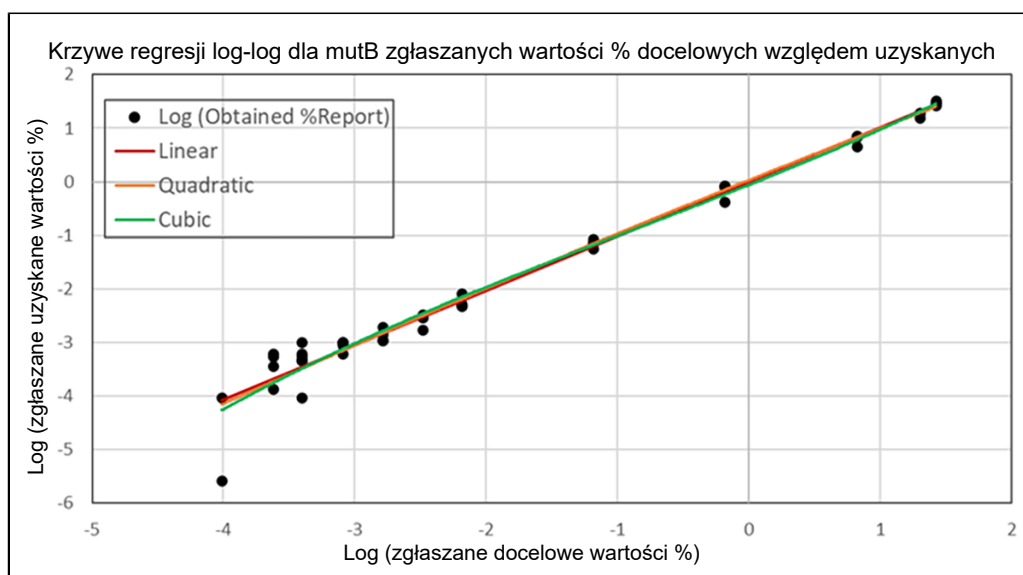
22 Dane analityczne

22.1 Liniowość / zakres dynamiczny

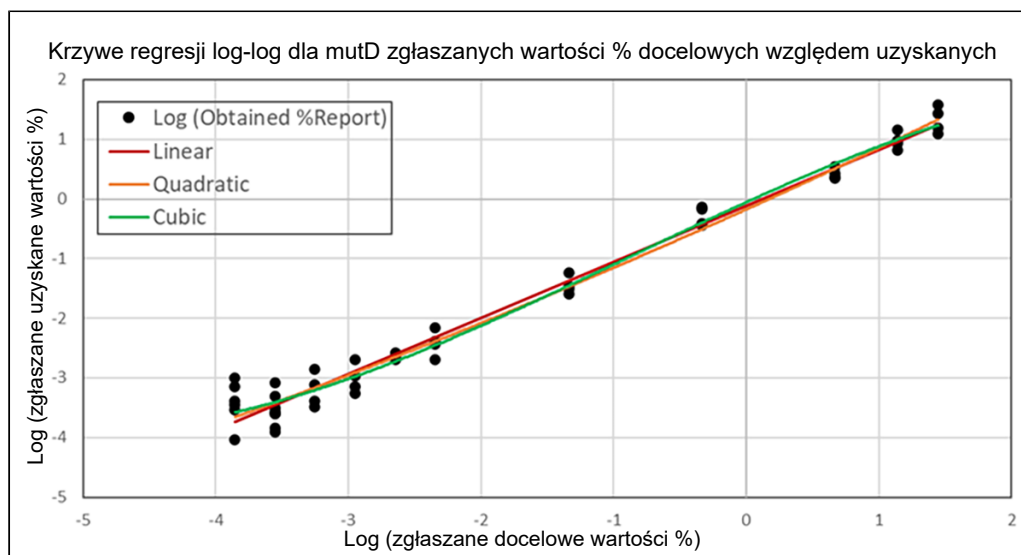
Liniowość określono dla każdego z trzech podtypów mutacji NPM1 — mutA, mutB i mutD — stosując lizaty komórkowe zawierające wysokie poziomy transkryptów każdego podtypu. Te lizaty rozcieńczono w lizacie tła przygotowanym z próbek uzyskanych od pacjentów z wynikami przypuszczalnie ujemnymi w kierunku mutacji NPM1 do zakresów docelowych ok. 0,01–2500% mutacji NPM1/ABL. Wszystkie poziomy badano z użyciem jednej serii odczytników w czterech powtórzeniach. Badania i analizy statystyczne przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie CLSI EP06-A⁹. Krzywe regresji dla każdego podtypu przedstawia Ilustracja 14, Ilustracja 15 i Ilustracja 16. Podsumowanie dotyczące zakresu liniowego dla każdego podtypu i ich współczynników modelu liniowego przedstawia Tabela 4.



Ilustracja 14. Krzywe regresji dla mutA



Ilustracja 15. Krzywe regresji dla mutB



Ilustracja 16. Krzywe regresji dla mutD

Tabela 4. Podsumowanie dotyczące zakresów liniowych i współczynników modelu liniowego

Podtyp	Zakres liniowy	Punkt przecięcia	Nachylenie	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

Łącznie test Xpert NPM1 Mutation wykazał liniowość dla zakresu 0,014–2020% mutacji NPM1/ABL. Uwzględniając granicę liniowości oznaczenia ilościowego i górną granicę oprogramowania, zgłaszalny zakres dynamiczny wynosi 0,030–500%.

22.2 Czułość analityczna (granica wykrywalności, granica oznaczenia ilościowego, granica próby ślepej)

Granica wykrywalności (LoD) to najniższy poziom mutacji NPM1/ABL, przy którym 95% próbek konsekwentnie uzyskuje wynik „**WYKRYTO mutację NPM1 [##,##%] (NPM1 Mutation DETECTED [##,##%])**”. Granicę wykrywalności określono oddzielnie dla podtypów mutA, mutB i mutD, badając rozcieńczenia seryjne lizatów komórkowych dodatnich w kierunku mutacji NPM1 i lizatów klinicznych obejmujących każdy z podtypów mutacji. Odpowiednie granice wykrywalności oszacowano i zweryfikowano zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie CLSI EP17-A2¹⁰. W analizach uzyskano granice wykrywalności o wartości 0,025% dla podtypu mutA, 0,023% dla podtypu mutB i 0,030% dla podtypu mutD (Tabela 5). Najwyższa granica wykrywalności dla trzech podtypów, wynosząca 0,030%, stanowi ogólną granicę wykrywalności dla testu Xpert NPM1 Mutation.

Granica oznaczenia ilościowego (LoQ) to najniższy poziom mutacji NPM1/ABL, powyżej którego próbki mogą zostać oznaczone ilościowo z odchyleniem standardowym $\leq 0,36$ logarytmicznego wskaźnika redukcji (LR) dla średnich wskaźników LR o wartości powyżej 3,5. Granice liniowości oznaczenia ilościowego oszacowano i zweryfikowano zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie CLSI EP17-A2¹⁰, uzyskując wartość 0,025% dla podtypu mutA, 0,023% dla podtypu mutB i 0,030% dla podtypu mutD (Tabela 5). Najwyższa granica liniowości oznaczenia ilościowego dla trzech podtypów, wynosząca 0,030%, stanowi ogólną granicę liniowości oznaczenia ilościowego dla testu Xpert NPM1 Mutation.

Granica próby ślepej (LoB) to najwyższy wynik mutacji NPM1/ABL oczekiwany dla 95% próbek ślepych od dawców z wynikami przypuszczalnie ujemnymi w kierunku mutacji NPM1. Granicę próby ślepej dla testu Xpert NPM1 Mutation oszacowano i zweryfikowano zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie CLSI EP17-A2¹⁰, uzyskując wartość 0,0085% (Tabela 5).

Tabela 5. Granica wykrywalności, granica oznaczenia ilościowego i granica próby ślepej dla testu Xpert NPM1 Mutation [współczynnik % mutacji NPM1/ABL]

Podtyp	LoD [współczynnik % mutacji NPM1/ABL]	LoQ [współczynnik % mutacji NPM1/ABL]	LoB [współczynnik % mutacji NPM1/ABL]
mutA	0,025%	0,025%	0,0085%
mutB	0,023%	0,023%	
mutD	0,030%	0,030%	

22.3 Swoistość analityczna

Swoistość analityczną testu Xpert NPM1 Mutation określono, badając próbki krwi obwodowej z EDTA pobrane od dwudziestu pięciu zdrowych dawców.

Nie uzyskano żadnych wyników **WYKRYTO mutację NPM1 (NPM1 Mutation DETECTED)** dla żadnych próbek z wynikami przypuszczalnie ujemnymi w kierunku mutacji NPM1 ocenianych w tym badaniu. W związku z tym test Xpert NPM1 Mutation jest swoisty względem transkryptów mRNA zmutowanego NPM1 (typów A, B i D w eksonie 12) powiązanych z AML oraz cechuje się 100% swoistością analityczną względem próbek krwi obwodowej z EDTA.

22.4 Ocena przenoszenia zanieczyszczeń

Przeprowadzono badanie mające na celu wykazanie, że samowystarczalne i jednorazowe kartridże GeneXpert zapobiegają przeniesieniu zanieczyszczeń z kartridży używanych kolejno w tym samym module aparatu. Próbkę z wynikiem przypuszczalnie ujemnym w kierunku mutacji NPM1 badano po próbce z wysokim wynikiem dodatnim w kierunku mutacji NPM1 w tym samym module aparatu GeneXpert. Ten schemat badania powtórzono 10 razy w dwóch modułach aparatu GeneXpert (uzyskując łącznie 22 wyniki ujemne i 20 wyników dodatnich). We wszystkich badaniach próbki dodatniej uzyskano oczekiwany wynik „**WYKRYTO mutację NPM1 [#,%] (NPM1 Mutation DETECTED [#,%])**”, a we wszystkich badaniach próbki ujemnej uzyskano oczekiwany wynik „**NIE WYKRYTO mutacji NPM1 [dostateczny transkrypt ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])**”.

22.5 Potencjalnie interferujące substancje

W tym badaniu oceniono pięć substancji mogących występować w próbkach krwi obwodowej z EDTA i mogących zakłócać działanie testu. Badane związki chemiczne i poziomy (patrz Tabela 6) oparto na wytycznych zawartych w dokumencie CLSI EP07-ED3¹¹. Substancje interferujące testowano w próbkach krwi obwodowej z EDTA przygotowanych z lizatami kultury komórkowej dodatniej w kierunku mutacji NPM1, reprezentującymi trzy poziomy: > 1%, 0,1–0,5% i wynik ujemny. Kontrole testu obejmowały te same próbki bez substancji potencjalnie interferujących. Każdy poziom badano bez obecności i z obecnością pięciu poszczególnych substancji interferujących w 4 powtórzeniach na każdy warunek. Substancję uznawano za nieinterferującą, jeśli w przypadku jej obecności obserwowany średni współczynnik procentowy mieścił się w granicy 3-krotnej różnicy w porównaniu z kontrolą.

Nie zaobserwowano klinicznie znaczącego działania hamującego na test Xpert NPM1 Mutation w przypadku jakiegokolwiek z substancji interferujących ocenianych w tym badaniu. Nie zaobserwowano żadnych statystycznie istotnych różnic (wartość $p < 0,05$) w żadnych warunkach testu, a zgłaszane współczynniki procentowe między warunkami testu a warunkami kontroli mieściły się w dopuszczalnym zakresie 3-krotności.

Tabela 6. Badane potencjalnie interferujące substancje za pomocą Xpert NPM1 Mutation

Substancje interferujące	Badane stężenie
Bilirubina niezwiązana	20 mg/dl
Cholesterol całkowity	500 mg/dl
Triglicerydy (lipidy)	3000 mg/dl
Heparyna	3500 U/l

Substancje interferujące	Badane stężenie
EDTA (krótkie pobranie)	930 mg/dl

23 Odtwarzalność i precyzja

Badanie zaprojektowano zgodnie z ogólnymi wytycznymi zawartymi w dokumencie CLSI EP05-A3 dotyczącym badań wieloczynnikowych. Przeprowadzono je w trzech ośrodkach. Projekt badania obejmował elementy panelu próbek zawierającego mutacje A, B i D w dwóch stężeniach. Siedem elementów panelu badano w dwóch powtórzeniach, w dwóch seriach testów na dzień, co dało łącznie 6 dni dla każdego z dwóch operatorów w trzech różnych ośrodkach (3 ośrodki × 2 operatorów × 3 serie × 2 dni × 2 nastawienia × 2 powtórzenia = 144 wyniki testu/element panelu). Panele odtwarzalności i precyzji przygotowano w firmie Cepheid i obejmowały one siedem elementów panelu, co przedstawia Tabela 7. Panele przygotowano w symulowanej matrycy krwi obwodowej (PB) z EDTA.

Tabela 7. Panele odtwarzalności i precyzji

Element panelu	Sekwencja docelowa	Współczynnik procentowy (PR) poziomu
1	Wynik ujemny	ND.
2	NPM1 mutacja A	Średnio dodatnia (ok. 5%)
3	NPM1 mutacja A	Nisko dodatnia (ok. 0,2%)
4	NPM1 mutacja B	Średnio dodatnia (ok. 5%)
5	NPM1 mutacja B	Nisko dodatnia (ok. 0,2%)
6	NPM1 mutacja D	Średnio dodatnia (ok. 5%)
7	NPM1 mutacja D	Nisko dodatnia (ok. 0,2%)

Liczbę próbek z ważnymi wynikami dla każdego elementu panelu analizowanego przez każdego z dwóch operatorów w trzech ośrodkach przedstawia Tabela 8.

Tabela 8. Odtwarzalność i precyzja: Liczba próbek z ważnymi wynikami

Element panelu	Ośrodek 1			Ośrodek 2			Ośrodek 3			Łączna liczba próbek
	Operator 1	Operator 2	Ośrodek	Operator 1	Operator 2	Ośrodek	Operator 1	Operator 2	Ośrodek	
1 Wynik ujemny	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: mutA (współczynnik ok. 5%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
3 LR2.7: mutA (współczynnik ok. 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: mutB (współczynnik ok. 5%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
5 LR2.7: mutB (współczynnik ok. 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: mutD (współczynnik ok. 5%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)

Element panelu		Ośrodek 1			Ośrodek 2			Ośrodek 3			Łączna liczba próbek
		Operator 1	Operator 2	Ośrodek	Operator 1	Operator 2	Ośrodek	Operator 1	Operator 2	Ośrodek	
7	LR2.7: mutD (współczynnik ok. 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 Dwie próbki ujemne miały ważne wyniki, ale fałszywie dodatnie (FP)
b Jedna próbka ujemna miała ważny wynik, ale fałszywie dodatni (FP)
c Jedna próbka LR2.7: mutD (współczynnik ok. 0,2%) miała ważny wynik, ale fałszywie ujemny (FN)

Wyniki ilościowe analizowano z wykorzystaniem zagnieżdżonej analizy wariancji (ANOVA) z efektami losowymi i współczynnikiem zmienności (CV). Wyniki obliczeń na podstawie analizy ANOVA pod kątem odchylenia standardowego i wariancji dla każdej próbki dodatniej przedstawia Tabela 9. Wariancję i procentową wartość całkowitej wariancji wynikającą z każdego elementu (ośrodek/aparat, operator, seria, dzień, nastawienie) wyrażono jako SD i procentowy udział każdego elementu.

Tabela 9. Wyniki współczynnika zmienności (CV): Współczynnik procentowy (PR)

Element panelu	N	Średnia	Ośrodek		Operator		Seria		Dzień		Nastawienie		Wewnętrzne		Łącznie	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
LR1.3: mutA (współczynnik ok. 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: mutA (współczynnik ok. 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: mutB (współczynnik ok. 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: mutB (współczynnik ok. 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: mutD (współczynnik ok. 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: mutD (współczynnik ok. 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 Jedna próbka nie została wykryta przez test Xpert NPM1 i została wykluczona z analizy, ponieważ pomiar ilościowy nie był dostępny.

Łączna wartość procentowa współczynnika zmienności (CV) dla współczynnika procentowego określającego wartości ilościowe dla próbek średnio dodatnich LR1.3: mutA, mutB i mutD (współczynnik ok. 5%) mieściła się w zakresie od 21,74 do 26,23, a dla próbek nisko dodatnich LR2.7: mutA, mutB i mutD (współczynnik ok. 0,2%) mieściła się w zakresie od 20,68 do 79,22.

24 Piśmiennictwo

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>. Dostęp 16 września 2020 r.
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 (refer to latest edition). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Dokument M29 (patrz najnowsze wydanie).
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 Lokalizacja siedziby głównej firmy Cepheid

Siedziba główna firmy

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

Telefon: + 1 408 541 4191
Faks: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Siedziba główna w Europie

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Telefon: + 33 563 825 300
Faks: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

26 Wsparcie techniczne

Przed skontaktowaniem się z Centrum wsparcia klienta firmy Cepheid należy przygotować następujące informacje:

- Nazwa produktu
- Numer serii
- Numer seryjny aparatu
- Komunikaty o błędach (jeśli występują)
- Wersja oprogramowania i numer znacznika serwisowego komputera (w odpowiednim przypadku)

USA





















Telefon: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

Francja

Telefon: + 33 563 825 319
E-mail: support@cepheideurope.com

Dane kontaktowe wszystkich centrów wsparcia klienta firmy Cepheid są dostępne na naszej stronie internetowej:
www.cepheid.com/en_US/support/contact-us.

27 Tabela symboli

Symbol	Znaczenie
	Numer katalogowy
	Oznaczenie CE — zgodność z normami europejskimi
	Wyrób medyczny przeznaczony do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Kod partii
	Nie używać ponownie
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Producent
	Kraj produkcji
	Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia <i>n</i> testów
	Kontrola
	Data ważności
	Ograniczenie temperatury
	Zagrożenia biologiczne
	Przeostroga
	Łatwopalne ciecze
	Działanie szkodliwe na rozrodczość i na narządy
	Ostrzeżenie
	Upoważniony przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej
	Upoważniony przedstawiciel w Szwajcarii
	Importer



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA
Telefon: + 1 408 541 4191
Faks: + 1 408 541 4192



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francja
Telefon: + 33 563 825 300
Faks: + 33 563 825 301



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



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



28 Historia zmian

Punkt	Opis zmiany
23	Poprawiono błąd w punkcie „Odtwarzalność i precyzja”.