

# Xpert<sup>®</sup> NPM1 Mutation

**REF** GXNPM1-CE-10

Gebrauchsanweisung

**IVD** CE

## **Marken-, Patent- und Urheberschutzangaben**

### **Trademark, Patents, and Copyright Statements**

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

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

© 2022–2023 Cepheid.

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

Cepheid<sup>®</sup>, das Cepheid-Logo, GeneXpert<sup>®</sup> und Xpert<sup>®</sup> sind Marken von Cepheid, die in den USA und anderen Ländern eingetragen sind.

Alle anderen Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

MIT DEM ERWERB DIESES PRODUKTS WIRD DEM KÄUFER DAS NICHT ÜBERTRAGBARE RECHT ZU SEINER VERWENDUNG ENTSPRECHEND DER VORLIEGENDEN GEBRAUCHSANWEISUNG GEWÄHRT. ES WERDEN KEINE ANDEREN RECHTE ÜBERTRAGEN, WEDER AUSDRÜCKLICH NOCH STILLSCHWEIGEND ODER DULDEND. DARÜBER HINAUS GEHT AUS DEM ERWERB DIESES PRODUKTS KEIN RECHT DES WEITERVERKAUFS HERVOR.

© 2022–2023 Cepheid.

Beschreibung der Änderungen siehe Abschnitt 28 Revisionsverlauf.

# Xpert<sup>®</sup> NPM1 Mutation

---

Zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum.

## 1 Markenname

Xpert<sup>®</sup> NPM1 Mutation

## 2 Gebräuchlicher oder üblicher Name

Xpert NPM1 Mutation

## 3 Zweckbestimmung

### 3.1 Verwendungszweck

Der Xpert NPM1 Mutation Test, durchgeführt im Cepheid GeneXpert<sup>®</sup> Dx System ist ein *In-vitro* diagnostischer Test zur Quantifizierung eines mutanten NPM1 mRNA Transkripts (Typen A, B und D in Exon 12) in Peripherblutproben von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Acute Myeloid Leukemia, AML). Der Test verwendet eine automatisierte Echtzeit Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und berichtet das prozentuale Verhältnis des Mutanten NPM1 zu ABL1 endogene Kontrolle mRNA Transkripte. Der Test ist als Hilfe beim Monitoring von Patient/innen mit NPM1-mutierter AML für die Konzentration des mutanten NPM1-mRNA-Transkripts vorgesehen. Der Test sollte in Verbindung mit anderen klinisch-pathologischen Faktoren verwendet werden.

Der Xpert NPM1 Mutation Test unterscheidet nicht zwischen mutierten NPM1-Transkripten vom Typ A, B oder D und weist keine anderen seltenen Typen von mutantem NPM1 nach oder überwacht sie. Dieser Test ist nicht zur Diagnose einer AML bestimmt.

### 3.2 Vorgesehene Anwender/Umgebung

Der Xpert NPM1 Mutation Test ist zur Durchführung durch geschultes Personal im Labor vorgesehen.

## 4 Zusammenfassung und Erklärung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist ein Karzinom der blutbildenden myeloischen Stammzellen im Knochenmark<sup>1,2</sup> bei dem verschiedene Nucleophosmin (NPM1)-Exon 12-Mutationen auftreten können<sup>3</sup>. Das Einführen von Nukleotiden in Exon 12 führt zu einer Frameshift-Mutation und erzeugt ein nukleares Exportsignal (NES). Die Mutationen im NPM1-Gen führen zu einer abweichenden zytoplasmatischen Lokalisierung von NPM1 und NPM1-interagierenden Proteinen. NPM1 ist eines der am häufigsten mutierten Gene bei AML, und die Mutationen treten in 28 % bis 35 % aller AML-Fälle auf. Zwar werden derzeit mehrere Arzneimittel untersucht, die auf mutiertes NPM1 abzielen, doch gibt es derzeit keine von der FDA zugelassenen zielgerichteten Therapien.<sup>4</sup>

Das NPM1-Gen kodiert für ein nukleäres Wagen-Protein, das eine Rolle in der Biologie der Zentrosomen und Ribosomen sowie bei der Regulierung anderer zellulärer Systeme, einschließlich der Tumorsuppressorwege, spielt. NPM1 ist ein nukleolares Phosphoprotein, das als Wagen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma dient. Es reguliert den Transport der ribosomalen Partikel durch die Kernmembran. NPM1-Mutationen wurden erstmals bei AML-Patienten entdeckt, nachdem beobachtet worden war, dass sie nicht wie üblich im Kern, sondern im Zytoplasma lokalisiert waren. Die genetische Bewertung leukämischer Blasten in Verbindung mit der zytoplasmatischen Lokalisierung von NPM1 hat zur Kenntnis der bekannten Exon 12 Frameshift-Mutationen geführt.<sup>3</sup> Die häufigsten NPM1-Mutationen sind Typ A (~75–

80 %), Typ B (~10%) und Typ D (~5 %), alle im Exon 12, was zu einer Frameshift-Mutation durch ein Einführen von vier Nukleotiden führt. Die Mutation führt bei AML-Patient/innen zum Verlust eines nukleolaren Lokalisierungssignals und zu einer abweichenden zytoplasmatischen Lokalisierung des Proteins.<sup>5</sup>

## 5 Verfahrensprinzip

Der Xpert NPM1 Mutation Test ist ein automatisierter Assay zur Quantifizierung der Menge an NPM1-Mutation-Transkripten als Verhältnis von NPM1-Mutation /ABL1. Der Test wird auf dem Cepheid GeneXpert Dx System durchgeführt, das die Probenreinigung, die Nukleinsäureamplifikation und den Nachweis der Zielsequenz in einfachen oder komplexen Proben mithilfe von Echtzeit-RT-PCR und geschachtelten (nested) PCR-Assays automatisiert und integriert. Das System besteht aus einem Instrument, einem Computer und einer vorinstallierten Software zur Durchführung der Assays und zum Anzeigen der Ergebnisse. Das System erfordert GeneXpert-Einwegkartuschen, in denen die RT-PCR- und geschachtelte (nested) PCR-Reagenzien enthalten sind und die RT-PCR- und geschachtelten (nested) PCR-Prozesse ablaufen. Eine vollständige Beschreibung des Systems ist im jeweiligen *GeneXpert Dx System Operator Manual* zu finden.

Der Xpert NPM1 Mutation Test umfasst Reagenzien zum Nachweis der NPM1-Mutation und des ABL1-Transkripts als endogene Kontrolle in peripheren Blutproben. Die Menge des NPM1-Mutation-Transkripts wird als das prozentuale Verhältnis von NPM1-Mutation/ABL1 quantifiziert. Der Xpert NPM1 Mutation-Test enthält zwei Kontrollen – die endogene Kontrolle (ABL1) und die Sondenprüfungskontrolle (PCC). Die endogene Kontrolle ABL normalisiert das NPM1-Mutationsziel und sorgt dafür, dass im Assay ausreichend Probe verwendet wird. Mit der PCC werden die Rehydrierung der Reagenzien und die Befüllung des PCR-Röhrchens überprüft. Außerdem werden Vorhandensein und Funktionsfähigkeit aller Reaktionskomponenten in der Kartusche, einschließlich Sonden und Farbstoffen, bestätigt.

## 6 Reagenzien und Instrumente

### 6.1 Enthaltene Materialien

Das Xpert NPM1 Mutation Kit (GXNPM1-CE-10) enthält ausreichend Reagenzien zur Bearbeitung von 10 Patienten- oder Qualitätskontroll-Assays. Das Kit enthält die folgenden Materialien:

#### Xpert NPM1 Mutation Reagenzien

Je 10 pro Kit

Proteinase K (PK)	10 x 130 µl pro Fläschchen
Komponente	Reagenzbestandteil
Proteinase K	< 5 %

Lysereagenz (LY) (Guanidiniumchlorid)	10 x 5,3 ml pro Fläschchen
Komponente	Reagenzbestandteil
Guanidiniumchlorid	25–50 %
Harnstoff	25–50 %
Natriumdodecylsulfat	< 2 %

Waschreagenz	10 x 2,9 ml pro Ampulle
Komponente	Reagenzbestandteil
Ethanol	< 50 %
Guanidiniumthiocyanat	< 50 %

Xpert NPM1 Mutation Kartuschen mit integrierten Reaktionsbehältern		10 pro Kit
Komponente	Reagenzbestandteil	Menge
Kügelchen 1 (gefriergetrocknet)	Enzym: Taq DNA-Polymerase < 50 E/ Kügelchen	1 pro Kartusche
	dNTPs < 0,05 %	
Kügelchen 2 (gefriergetrocknet)	Primer und Sonden < 0,005 %	1 pro Kartusche
Kügelchen 3 (gefriergetrocknet)	Primer und Sonden < 0,005 %	1 pro Kartusche
Kügelchen 4 (gefriergetrocknet)	Enzym: Taq DNA-Polymerase < 50 E/ Kügelchen	1 pro Kartusche
	dNTPs < 0,05 %	
Spülreagenz	Kaliumchlorid < 4 %	2 ml pro Kartusche
	Natriumazid < 0,1 %	
	Polyethylenglykol < 40 %	
	Tween-20 < 0,2 %	
Elutionsreagenz	Trizma-Base < 0,3 %	2,5 ml pro Kartusche
	Trizma-Hydrochlorid < 0,1 %	
	Natriumazid < 0,05 %	

**CD****1 pro Kit**

- Assay-Definitionsdatei (ADF)
- Anweisungen zum Importieren der ADF in die GeneXpert-Software
- Gebrauchsanweisung (Instructions for Use, IFU)

**Anmerkung**

Das bovine Serumalbumin (BSA) in den Kügelchen dieses Produkts wurde ausschließlich aus bovinem Plasma gewonnen und hergestellt, das aus den USA stammt. Die Tiere erhielten keinerlei Wiederkäuer- oder anderes Tierprotein mit dem Futter und wurden ante- und post-mortem Tests unterzogen. Bei der Verarbeitung wurde das Material nicht mit anderen Tiermaterialien vermischt.

**Anmerkung**

Analysezertifikate und Datenblätter mit Chargenspezifikationen sind über den technischen Kundendienst von Cepheid erhältlich.

## 7 Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

- GeneXpert Dx System (verschiedene Bestellnummern je nach Konfiguration): GeneXpert Instrument, Computer, Barcodescanner und Benutzerhandbuch.
- Für GeneXpert Dx System: GeneXpert Dx Softwareversion 6.2 oder höher.
- Drucker: Falls ein Drucker benötigt wird, wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst von Cepheid, um einen empfohlenen Drucker zu erwerben.
- Vortex-Mixer
- Mikrozentrifuge (mindestens 1000 x g)
- Pipetten und Aerosolfilter-Pipettenspitzen
- Konische 50-ml-Röhrchen
- Reines Ethanol in Reagenzqualität
- 1X PBS, pH 7,4

## 8 Aufbewahrung und Handhabung

- Den Inhalt des Xpert NPM1 Mutation Kits bei 2 °C bis 8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum aufbewahren.
- Den Deckel der Kartusche erst öffnen, wenn Sie bereit sind, die Testung durchzuführen.
- Keine Kartuschen mit abgelaufenem Verfallsdatum verwenden.
- Keine auslaufenden Kartuschen verwenden.
- Das Waschreagenz ist eine klare, farblose Flüssigkeit. Wenn das Waschreagenz trübe oder verfärbt ist, darf es nicht verwendet werden.
- Zwanzig (20) Minuten vor Beginn des Verfahrens Blutprobe, Kartusche und die Reagenzien zur Probenvorbereitung aus dem Lagerort entnehmen und auf Zimmertemperatur (20 °C bis 30 °C) kommen lassen.

## 9 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

### 9.1 Allgemeines

- Zum Gebrauch als *In-vitro*-Diagnostikum.
- Alle biologischen Proben und auch die gebrauchten Kartuschen und Reagenzien sind als potenziell infektiös zu behandeln. Da es oft unmöglich ist, potenziell infektiöse Proben zu erkennen, sind alle biologischen Proben gemäß den üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln.
- Richtlinien für den Umgang mit Proben sind von den U.S. Centers for Disease Control and Prevention<sup>6</sup> und dem Clinical and Laboratory Standards Institute erhältlich.<sup>7</sup>
- Die in der jeweiligen Einrichtung geltenden Sicherheitsvorkehrungen für den Umgang mit Chemikalien und biologischen Proben sind zu befolgen.
- Die Leistungsmerkmale dieses Tests wurden ausschließlich mit in EDTA-Röhrchen entnommenem Blut ermittelt. Die Assayfunktion wurde nicht mit anderen Probentypen bewertet.
- Verlässliche Ergebnisse hängen vom sachgemäßen Vorgehen bei Entnahme, Transport, Aufbewahrung und Bearbeitung der Probe ab. Falsche Assay-Ergebnisse können bei unsachgemäßer Probenentnahme, Handhabung oder Lagerung, technischen Fehlern oder Probenverwechslung ausgegeben werden, oder weil das Zieltranskript in der Probe unter der Nachweisgrenze des Assays liegt. Die Gebrauchsanweisung und *GeneXpert Dx System Operator Manual* müssen sorgfältig eingehalten werden, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden.
- Wenn der Xpert NPM1 Mutation Test mit Kits oder Proben durchgeführt wird, die außerhalb des für die Aufbewahrung der Probe empfohlenen Temperaturbereichs und Zeitraums gelagert wurden, kann er falsche oder ungültige Ergebnisse ausgeben.
- Biologische Proben, Transfervorrichtungen und gebrauchte Kartuschen sind als infektiös anzusehen und mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu handhaben. Bezüglich der angemessenen Entsorgung gebrauchter Kartuschen und nicht verwendeter Reagenzien sind die Umweltschutzvorschriften der jeweiligen Einrichtung einzuhalten. Diese Materialien können chemischen Sondermüll darstellen, der gemäß bestimmten nationalen oder regionalen Vorgehensweisen entsorgt werden muss. Falls die Vorschriften des jeweiligen Landes bzw. der jeweiligen Region keine klaren Anweisungen zur ordnungsgemäßen Entsorgung enthalten, sollten biologische Proben und gebrauchte Kartuschen gemäß den Richtlinien zur Handhabung und Entsorgung von medizinischen Abfällen der WHO (Weltgesundheitsorganisation) entsorgt werden.<sup>8</sup>

### 9.2 Probe

- Die vorgeschriebenen Lagerbedingungen sind einzuhalten, um die Unversehrtheit der Probe zu gewährleisten (siehe Abschnitt 11, Entnahme, Transport und Aufbewahrung der Proben). Die Probenstabilität unter anderen als den empfohlenen Transportbedingungen wurde nicht untersucht.
- EDTA-Peripherblutproben nicht einfrieren.
- Eine sachgemäße Vorgehensweise bei Entnahme, Aufbewahrung und Beförderung der Proben ist für korrekte Ergebnisse unabdingbar.

### 9.3 Test/Reagenz

- Keine Xpert NPM1 Mutation-Reagenzien durch andere Reagenzien ersetzen.
- Der Deckel der Xpert NPM1 Mutation Kartusche darf nur für die Zugabe von Probe und Waschreagenz geöffnet werden.

- Keine Kartuschen verwenden, die nach der Entnahme aus der Verpackung fallen gelassen wurden.
- Die Kartusche nicht schütteln. Wenn die Kartusche nach dem Öffnen des Kartuschendeckels geschüttelt oder fallen gelassen wird, sind die Ergebnisse möglicherweise ungültig.
- Das Etikett mit der Proben-ID nicht auf den Kartuschendeckel oder über das Barcode-Etikett der Kartusche kleben.
- Kartuschen mit beschädigtem Barcode-Etikett dürfen nicht verwendet werden.
- Kartuschen mit beschädigtem Reaktionsbehälter dürfen nicht verwendet werden.
- Es wird empfohlen, dass die Xpert NPM1 Mutation Kartuschen zum Testen Zimmertemperatur (20 °C bis 30 °C) haben.
- Jede Xpert NPM1 Mutation Kartusche dient zur Durchführung eines einzigen Assays (Einwegartikel). Verbrauchte Kartuschen nicht wiederverwenden.
- Den gesamten Inhalt einer (1) Ampulle mit Waschreagenz in die Waschreagenzkammer überführen. Das Auslassen des Hinzufügens von Waschreagenz kann zu einem falschen **NICHT NACHGEWIESEN (NOT DETECTED)** Ergebnis führen.
- Pipettenspitzen nicht wiederverwenden.
- Kartuschen, die nass aussehen oder deren Deckelversiegelung aufgebrochen zu sein scheint, dürfen nicht verwendet werden.
- Xpert NPM1 Mutation-Kartuschen nicht verwenden, wenn ein Reagenz in die falsche Öffnung gegeben wurde.
- Xpert NPM1 Mutation Kartuschen nach Abschluss des Assays nicht öffnen.
- Bestimmen Sie einen Pipetten- und Reagenziensatz, der ausschließlich für die Probenvorbereitung verwendet wird.
- Saubere Laborkittel und Handschuhe verwenden. Die Handschuhe nach der Handhabung jeder Probe wechseln.
- Falls Proben oder Kontrollen verschüttet wurden, die verschüttete Flüssigkeit mit Papiertüchern aufsaugen; dabei Handschuhe tragen. Anschließend den betroffenen Bereich gründlich mit einer frisch angesetzten, 1:10 verdünnten haushaltsüblichen Chlorbleiche reinigen. Die Endkonzentration von aktivem Chlor sollte unabhängig von der im jeweiligen Land üblichen Chlorbleiche 0,5 % betragen. Die Chlorbleiche mindestens zwei Minuten lang einwirken lassen.
- Die Arbeitsfläche vollständig trocknen lassen und dann Bleichmittelrückstände mit 70%igem denaturiertem Ethanol entfernen. Anschließend zunächst die Oberfläche vollständig trocknen lassen. Oder im Falle von Kontamination oder verschütteten Flüssigkeiten die Standardverfahren der jeweiligen Einrichtung befolgen. Im Falle von Geräten die Herstellerempfehlungen zur Dekontamination befolgen.

## 10 Chemische Gefahren

**Anmerkung** Die nachstehenden Informationen gelten für das gesamte Produkt mit Proteinase K, Lyse-, Wasch- und Spülreagenzien.

- CLP/GHS-Gefahrenpiktogramm: 
- Signalwort: GEFAHR
- **UN-GHS-Gefahrenhinweise**
  - Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar H225.
  - Verursacht Hautreizungen H315.
  - Verursacht schwere Augenreizung H319.
  - Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen H336.
  - Kann vermutlich genetische Defekte verursachen H341.
- **UN-GHS-Sicherheitshinweise**
  - **Prävention**
    - Siehe Sicherheitsdatenblatt für besondere Anweisungen vor Gebrauch.
    - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
    - Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
    - Von Hitze, Funken, offenen Flammen und/oder heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
    - Behälter dicht verschlossen halten.
    - Einatmen von Nebel/Dampf/Sprühnebel vermeiden.
    - Nach Gebrauch gründlich waschen.

- Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- **Reaktion**
  - BEI BRAND: Geeignete Mittel zum Löschen verwenden.
  - BEI EINATMEN: Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
  - Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
  - BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
  - Besondere Behandlung: Siehe zusätzliche Erste-Hilfe-Informationen.
  - Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
  - Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
  - BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
  - Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
  - Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- **Lagerung/Entsorgung**
  - Kühl halten.
  - An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
  - Behälter dicht verschlossen halten.
  - Unter Verschluss aufbewahren.
  - Entsorgen von Inhalten und/oder Behälter in Übereinstimmung mit den örtlichen, regionalen, nationalen und/oder internationalen Vorschriften.

## 11 Entnahme und Lagerung von Proben

- Peripherblutproben sollten unter Befolgung der Richtlinien Ihrer Einrichtung in EDTA-Röhrchen entnommen werden. Plasma und Zellen sollten nicht separiert werden.
- Proben sollten vor dem Test nicht länger als 3 Tage (72 Stunden) bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden.
- Eine sachgemäße Probenentnahme und Aufbewahrung ist für die korrekte Assayfunktion unabdingbar. Die Stabilität von Proben unter anderen als im Abschnitt 12 empfohlenen Aufbewahrungsbedingungen wurde für den Xpert NPM1 Mutation Test nicht ermittelt.

## 12 Verfahren

### 12.1 Bevor Sie beginnen

Zwanzig (20) Minuten vor Beginn des Verfahrens die Blutprobe, Probenvorbereitung, Reagenzien und Kartuschen aus dem Kühlschrank entnehmen und auf Zimmertemperatur kommen lassen. Proteinase K (PK) kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.

---

**Wichtig** Den Assay innerhalb von 1 Stunde nach dem Hinzufügen der mit Probenreagenz behandelten Probe zur Kartusche starten.

---

**Wichtig** Die Kartusche vor Vorbereitung der Probe aus der Kartonverpackung nehmen. (Siehe Abschnitt 12.3, Vorbereitung der Kartusche).

---

## 12.2 Vorbereitung der Probe

### 12.2.1 Eine Probe mit unbekannter Leukozytenzahl (WBC) oder Proben mit weniger als 30 Millionen Leukozyten/ml vorbereiten

1. 100 µl Proteinase K (PK) auf den Boden eines neuen, beschrifteten konischen 50 ml-Röhrchens hinzufügen.
2. Sicherstellen, dass die Blutprobe gut vermischt ist, indem das Blutsammelröhrchen unmittelbar vor dem Pipettieren 8-mal invertiert wird. Siehe Hinweise des Herstellers des EDTA-Blutsammelröhrchens.
3. Dem Röhrchen, das bereits Proteinase K enthält, 4 ml Blutprobe hinzufügen.
4. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 3 Sekunden lang vermischen.
5. 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubieren.
6. In dasselbe Röhrchen 2,5 ml Lysereagenz (LY) hinzugeben.

**Anmerkung** Das verbleibende Lysereagenz für die spätere Verwendung in Schritt 13 aufbewahren.

7. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischen.
8. 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischen.
10. 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Die Probe vermischen, indem 10-mal an den Boden des Röhrchens geklopft wird.
12. 1 ml des vorbereiteten Lysats in ein neues, beschriftetes konisches 50 ml-Röhrchen überführen.

**Anmerkung** Das verbleibende Lysat kann bei 2 °C bis 8 °C für bis zu 48 Stunden oder bei -20 °C oder kühler für bis zu 1 Monat aufbewahrt werden.

13. Dem neuen konischen Röhrchen, das Lysat enthält, 1,5 ml des verbleibenden LY aus Schritt 6 hinzugeben.
14. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischen.
15. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
16. In das gleiche konische Röhrchen 2 ml reines Ethanol in Reagenzqualität (vom Benutzer bereitzustellen) geben.
17. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischen. Zur Seite stellen.
18. Restmengen von PK- bzw. LY-Reagenz verwerfen.

### 12.2.2 Vorbereitung der Probe mit einer Leukozytenzahl von gleich oder größer als 30 Millionen Leukozyten/ml

1. Auf den Boden eines konischen 50-ml-Röhrchens 100 µl PK hinzufügen.
2. Sicherstellen, dass die Blutprobe gut vermischt ist, indem das Blutsammelröhrchen unmittelbar vor dem Pipettieren 8-mal invertiert wird. Siehe Hinweise des Herstellers des EDTA-Blutsammelröhrchens.
3. Dem Röhrchen, das bereits PK enthält, 250 µl der Blutprobe und 3,75 ml 1xPBS (pH 7,4, vom Benutzer bereitgestellt) hinzufügen.
4. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 3 Sekunden lang vermischen.
5. 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Das endgültige Lysat gemäß den Schritten 6–17 in Abschnitt 12.2.1 zubereiten.
7. Restmengen von PK- bzw. LY-Reagenz verwerfen.

## 12.3 Vorbereitung der Kartusche

Zugabe der Probe in die Xpert NPM1 Mutation-Kartusche:

1. Die Kartusche aus der Kartonverpackung nehmen.
2. Die Kartusche auf Beschädigungen überprüfen. Falls die Kartusche beschädigt ist, darf sie nicht verwendet werden.
3. Die Kartusche durch Anheben des Kartuschendeckels öffnen und den gesamten Inhalt einer (1) die Ampulle mit Waschreagenz vollständig in die Waschreagenzkammer (mit der kleinen Öffnung) übertragen. Siehe Abbildung 1.
4. Die vorbereitete Probe (4,5 ml) vollständig in die Probenkammer (große Öffnung) pipettieren. Siehe Abbildung 1.

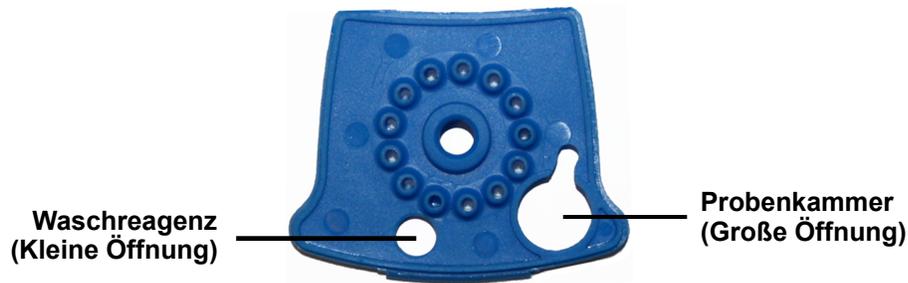


Abbildung 1. Xpert NPM1 Mutation-Kartusche (Draufsicht)

- Den Kartuschendeckel schließen. Sicherstellen, dass der Deckel fest eingerastet ist. Assay starten (siehe Abschnitt 12.4, Den Assay starten).

## 12.4 Den Assay starten

**Wichtig** Stellen Sie vor Beginn des Assays sicher, dass auf dem System die GeneXpert Dx Softwareversion 6.2 oder höher läuft und dass die richtige Assay-Definitionsdatei (ADF) in die Software importiert wurde. In diesem Abschnitt werden die Standardschritte bei der Bedienung des GeneXpert Dx System beschrieben.

**Anmerkung** Die zu befolgenden Schritte können unterschiedlich sein, falls der Standard-Workflow des Systems vom Systemadministrator geändert wurde.

- Schalten Sie das GeneXpert System ein, indem Sie zuerst das GeneXpert Dx Instrument und dann den Computer einschalten. Die GeneXpert Dx Software startet automatisch; eventuell müssen Sie sie durch Doppelklicken des Verknüpfungssymbols für die GeneXpert Dx Software auf dem Windows® Desktop starten.
- Melden Sie sich mit Ihrem Benutzernamen und Kennwort bei der GeneXpert Software an.
- Klicken Sie im Fenster **GeneXpert-System (GeneXpert System)** auf **Test erstellen (Create Test)** (GeneXpert Dx). Das Fenster **Test erstellen (Create Test)** erscheint.
- Scannen oder tippen Sie die Patienten-ID (Patient ID) ein. Vermeiden Sie Tippfehler beim Eintippen der Patienten-ID (Patient ID). Die Patienten-ID (Patient ID) ist mit den Testergebnissen verknüpft. Sie wird im Fenster **Ergebnisse anzeigen (View Results)** angezeigt und ist in allen Berichten enthalten. Das Dialogfeld **Proben-ID-Barcode scannen (Scan Sample ID Barcode)** öffnet sich.
- Scannen oder tippen Sie die Proben-ID (Sample ID) ein. Vermeiden Sie Tippfehler beim Eintippen der Proben-ID (Sample ID). Die Proben-ID erscheint links im Fenster „**View Results**“ (**Ergebnisse anzeigen**) sowie in allen Testberichten. Das Dialogfeld **Kartuschen-Barcode scannen (Scan Cartridge Barcode)** öffnet sich.
- Scannen Sie den Barcode der Xpert NPM1 Mutation-Kartusche ein. Anhand der über den Barcode erhaltenen Informationen werden die folgenden Felder automatisch ausgefüllt: „Chargen-ID“ (Reagent Lot ID), „Kartuschen-Seriennr.“ (Cartridge SN) und „Verfallsdatum“ (Expiration Date).

**Anmerkung** Falls der Barcode auf der Xpert NPM1 Mutation Kartusche sich nicht einscannen lässt, wiederholen Sie den Assay mit einer neuen Kartusche. Falls Sie den Kartuschen-Barcode in der Software gescannt haben und die Assay-Definitionsdatei (ADF) nicht verfügbar ist, erscheint ein Bildschirm mit der Meldung, dass die Assay-Definitionsdatei (ADF) nicht im System geladen ist. Wenn dieser Bildschirm erscheint, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Cepheid.

- Klicken Sie auf **Test starten (Start Test)**. Sie müssen Ihr Kennwort möglicherweise in das angezeigte Dialogfeld eingeben.
- Öffnen Sie die Klappe des Instrumentenmoduls mit der grün blinkenden Leuchte und laden Sie die Kartusche.
- Schließen Sie die Klappe. Der Test beginnt und die grüne Leuchte hört auf zu blinken. Wenn der Assay abgeschlossen ist, erlischt die Leuchte.
- Warten Sie ab, bis das System die Klappenverriegelung freigibt. Öffnen Sie anschließend die Modulklappe und entnehmen Sie die Kartusche.
- Verbrauchte Kartuschen müssen entsprechend den üblichen Praktiken Ihrer Einrichtung in einem geeigneten Proben-Abfallbehälter entsorgt werden.

**Anmerkung** Der Test dauert bis zur Ausgabe des Ergebnisses weniger als 3 Stunden (etwa 30 Minuten separate Probenvorbereitung und weniger als 2,5 Stunden Test-Laufzeit des Assays).

---

---

## 13 Anzeigen und Drucken der Ergebnisse

In diesem Abschnitt sind die grundsätzlichen Schritte für Anzeigen und Ausdrucken der Ergebnisse aufgelistet. Detailliertere Anweisungen zum Anzeigen und Ausdrucken von Ergebnissen sind im *GeneXpert Dx System Operator Manual* zu finden.

- Klicken Sie auf das Symbol **Ergebnisse anzeigen (View Results)**, um die Ergebnisse anzuzeigen.
- Nach Abschluss des Assays klicken Sie auf die Schaltfläche **Bericht (Report)** auf dem Bildschirm **Ergebnisse anzeigen (View Results)**, um eine Berichtdatei im PDF-Format anzuzeigen und/oder zu erstellen.

## 14 Qualitätskontrolle

Jede Kartusche umfasst eine endogene ABL1-Kontrolle und eine Sondenprüfungskontrolle (PCC).

**Endogene ABL1-Kontrolle** – Die endogene ABL1-Kontrolle prüft, ob beim Assay eine ausreichende Menge Probe verwendet wird. Darüber hinaus stellt diese Kontrolle eine probenbedingte Hemmung des Echtzeit-PCR-Assays fest. Die ABL1 ist erfolgreich, wenn sie die zugewiesenen Akzeptanzkriterien erfüllt.

**Sondenprüfungskontrolle (PCC)** – Vor Beginn der PCR-Reaktion verifiziert das GeneXpert System anhand des gemessenen Fluoreszenzsignals der Sonden die Rehydrierung der Kügelchen und die Füllung des Reaktionsbehälters und prüft, ob alle Reaktionskomponenten in der Kartusche funktionsfähig sind. Die PCC ist erfolgreich, wenn sie die zugewiesenen Akzeptanzkriterien erfüllt.

## 15 Interpretation der Ergebnisse

Das GeneXpert System interpretiert die Ergebnisse automatisch anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale und eingebauten Berechnungsalgorithmen. Die Ergebnisse werden im Fenster „Ergebnisse anzeigen“ (View Results) angezeigt. In Tabelle 1 sind die möglichen Ergebnisse und deren Auswertung angegeben.

Tabelle 1. Xpert NPM1 Mutation Ergebnisse und Interpretation für den Test

Ergebnis	Interpretation
<p><b>NPM1-Mutation NACHGEWIESEN (DETECTED)</b></p> <p>Publikation Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 4</p>	<p>NPM1-Mutations-Transkript wurde nachgewiesen.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● NPM1-Mutation ERMITTELT (NPM1 Mutation DETECTED) - NPM1 Mutation-Transkript wurde nachgewiesen und weist einen Schwellenwert-Zyklus (Ct) innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt oberhalb des eingestellten Schwellenwerts auf.</li> <li>● Mögliche nachgewiesene Ergebnisse: <ul style="list-style-type: none"> <li>● NPM1-MUTATION NACHGEWIESEN [#.##%] (NPM1 MUTATION DETECTED [#.##%]); Abbildung 2.</li> <li>● NPM1-MUTATION NACHGEWIESEN [Über oberer LoQ] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ]; Abbildung 3.</li> <li>● NPM1-MUTATION NACHGEWIESEN [Unter LoD; &lt;#.###%] NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; #.###%]; Abbildung 4.</li> </ul> </li> <li>● ABL BEST. (PASS) – ABL-Transkript wurde nachgewiesen und weist einen Zyklus-Schwellenwert (Ct) (Cycle threshold, Ct) innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt oberhalb des eingestellten Schwellenwerts auf.</li> <li>● Sondenprüfung BEST. (PASS) – Alle Ergebnisse der Sondenprüfung waren erfolgreich.</li> </ul>
<p><b>NPM1-Mutation NICHT NACHGEWIESEN (NPM1 Mutation NOT DETECTED)</b></p> <p>Siehe Abbildung 5</p>	<p>NPM1-Mutations-Transkript wurde nicht nachgewiesen.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● NPM1-Mutation NICHT NACHGEWIESEN [Ausreichendes ABL-Transkript] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript) - NPM1-Mutation-Transkript wurde nicht ermittelt und weist einen Schwellenwert-Zyklus (Ct) gleich null auf oder liegt über dem gültigen Bereich und/oder einem Endpunkt oberhalb des eingestellten Schwellenwerts.</li> <li>● ABL BEST. (PASS) – ABL-Transkript wurde nachgewiesen und weist einen Zyklus-Schwellenwert (Ct) (Cycle threshold, Ct) innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt oberhalb des eingestellten Schwellenwerts auf.</li> <li>● Sondenprüfung BEST. (PASS) – Alle Ergebnisse der Sondenprüfung waren erfolgreich.</li> </ul>
<p><b>UNGÜLTIG (INVALID)</b></p> <p>Publikation Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10</p>	<p>Die NPM1-Mutation-Transkript-Konzentration kann nicht bestimmt werden, da die Probe ein starkes NPM1-Mutation-Transkript und/oder ein starkes oder nicht ausreichendes ABL-Transkript enthält. Zusätzliche Anweisungen zur erneuten Testung der Probe siehe Abschnitt 18, Anleitung zur Fehlerbehebung.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● NPM1-Mutation UNGÜLTIG (NPM1 Mutation INVALID)- NPM1-Schwellenwert-Zyklus (Ct) war über null und unterhalb des unteren Endes des gültigen Bereichs (Abbildung 8, Abbildung 9)</li> <li>● ABL DEFECT (FAIL) – Der Schwellenwert-Zyklus-Wert (Ct) für ABL lag nicht innerhalb des gültigen Bereichs oder der Endpunkt lag unterhalb des eingestellten Schwellenwerts (Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 10)</li> <li>● Sondenprüfung – BEST. (PASS); alle Ergebnisse der Sondenprüfung waren erfolgreich.</li> </ul>

Ergebnis	Interpretation
<b>FEHLER (ERROR)</b> Siehe Abbildung 11	<p>Die NPM1-Mutation-Transkript-Konzentration kann nicht bestimmt werden. Zusätzliche Anweisungen zur erneuten Testung der Probe siehe Abschnitt 18, Anleitung zur Fehlerbehebung.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NPM1-Mutation KEIN ERGEBNIS (NPM1 Mutation NO RESULT)</li> <li>• ABL – KEIN ERGEBNIS (NO RESULT)</li> <li>• Sondenprüfung DEFEKT (FAIL) – Alle Sondenprüfungsergebnisse sind bzw. ein Sondenprüfungsergebnis ist fehlgeschlagen.</li> <li>• Sondenprüfung BEST. (PASS) oder KA (NA) (keine Angabe) und Abbruch* wegen falschen Drucks.</li> </ul> <p>*Wenn die Sondenprüfung bestanden wurde, wurde der Fehler durch Überschreiten des maximalen Druckgrenzwerts oder den Ausfall einer Systemkomponente verursacht.</p>
<b>KEIN ERGEBNIS (NO RESULT)</b>	<p>Die NPM1-Mutation-Transkript-Konzentration kann nicht bestimmt werden. Es wurden nicht genügend Daten gesammelt, um ein Assay-Ergebnis zu erzielen. Dies könnte beispielsweise auftreten, falls der Benutzer einen laufenden Assay abgebrochen hat. Zusätzliche Anweisungen zur erneuten Testung der Proben siehe Abschnitt 18, Anleitung zur Fehlerbehebung.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NPM1-Mutation KEIN ERGEBNIS (NPM1 Mutation NO RESULT)</li> <li>• ABL – KEIN ERGEBNIS (NO RESULT)</li> <li>• Sondenprüfung KA (NA) (keine Angabe)</li> </ul>

## 16 Quantitative Ergebnisse

Xpert NPM1 Mutation quantitative Ergebnisse werden als prozentuales Verhältnis von NPM1 Mutation/ABL1 angegeben. Den Kits werden chargenspezifische Werte für die Effizienz ( $E_{\Delta Ct}$ ) und ein Skalierungsfaktor (SF) zugewiesen, die die Quantifizierung der NPM1-Mutation (A, B und D) und der ABL1-Transkripte an die Kopienzahlen der synthetischen NPM1-Mutation und der *In-vitro* transkribierten ABL1-RNA (IVT-RNA) als Primärstandards binden.

Tabelle 2. Beispiele für Ergebnisse des Xpert NPM1 Mutation Tests

Assay	NPM1-Mutant		ABL		Xpert NPM1 Mutation Testergebnisse	Anmerkungen
	Ct	Ergebnis <sup>a</sup>	Ct	Ergebnis <sup>a</sup>		
1	5,2	UNGÜLTIG (INVALID)	5,8	DEFEKT (FAIL)	UNGÜLTIG [Zu hohe NPM1-Mutation und ABL-Transkripte] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcripts])	n. a.
2	9	UNGÜLTIG (INVALID)	5,5	DEFEKT (FAIL)	UNGÜLTIG [ABL-Transkripte zu hoch] (INVALID [Too high ABL transcripts])	n. a.
3	5,5	UNGÜLTIG (INVALID)	8,5	BEST. (PASS)	UNGÜLTIG [Zu hohe NPM1-Mutation-Transkripte] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcripts])	n. a.
4	25,0	UNGÜLTIG (INVALID)	21,8	DEFEKT (FAIL)	UNGÜLTIG [ABL-Transkript nicht ausreichend] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	n. a.
5	0	UNGÜLTIG (INVALID)	0	DEFEKT (FAIL)	UNGÜLTIG [Kein ABL-Transkript] (INVALID [No ABL transcript])	n. a.
6	8,5	POS. (POS)	13,6	BEST. (PASS)	NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Oberhalb des oberen LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])	n. a.
7	22,5	POS. (POS)	14,8	BEST. (PASS)	NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [1,05 %] (NPM1 Mutation DETECTED [1.05%]).	Berichteter Wert: 1,05 %
8	27,9	POS. (POS)	14,0	BEST. (PASS)	NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Unterhalb der LoD, <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])	n. a.
9	0	NEG	14,6	BEST. (PASS)	NEGATIV [ABL-Transkript ausreichend] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	n. a.
10	0	KEIN ERGEBNIS (NO RESULT)	0	KEIN ERGEBNIS (NO RESULT)	FEHLER (ERROR)	Zum Beispiel, Fehler 5017 [ABL] Sondenprüfung fehlgeschlagen

<sup>a</sup> Einzelheiten finden Sie auf der Registerkarte „Analyt-Ergebnisse (Analyte Results)“ in der Software für das GeneXpert Dx System.

## 16.1 NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [#.#%] (NPM1 Mutation DETECTED [#.#%])

NPM1-Mutation wurde bei einer Konzentration #.# % nachgewiesen.

Bei einem Ergebnis „**NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [#.#%]**“, (NPM1 Mutation DETECTED [#.#%]) ist die NPM1-Mutation ermittelbar, wenn der Ct-Wert der NPM1-Mutation größer oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „32“ ist und der Ct-Wert von ABL größer oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ ist. Die GeneXpert Software berechnet den %-Wert anhand der folgenden Gleichung, bei der der Delta-Ct( $\Delta Ct$ -) Wert durch Subtraktion von NPM1-Mutation Ct vom ABL-Ct erhalten wird:

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

Beim Skalierungsfaktor (*SF*) handelt es sich um einen chargenspezifischen Parameter, der im Barcode der Assay-Kartusche codiert ist. Der Wert dieses Faktors und die chargenspezifische Assay-Effizienz ( $E_{\Delta Ct}$ ) werden im Rahmen von Qualitätskontrolltests für jede Assay-Charge bestimmt, wobei Primärstandards verwendet werden, die auf die Kopienzahlen der synthetischen NPM1-Mutation und der *In-vitro* transkribierten ABL1-RNA (IVT-RNA) zur Quantifizierung des NPM1-Mutation-Transkripts kalibriert sind. Im hier dargestellten Beispiel ist der  $E_{\Delta Ct}$ -Wert auf 1,95 und der *SF*-Wert auf 1,79 eingestellt.

### Anmerkung

**Beispiel:** Chargenspezifischer  $E_{\Delta Ct} = 1,95$ ;  $SF = 1,79$   
 Assay ABL Ct = 14,5; NPM1-Mutation Ct = 17,1;  $\Delta Ct = 2,6$   
 $\% = 1,95^{(-2,6)} \times 100 \times 1,79 = 31,53 \%$

**Ergebnis:** **NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [31,53 %] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%])**.  
 Siehe Abbildung 2.

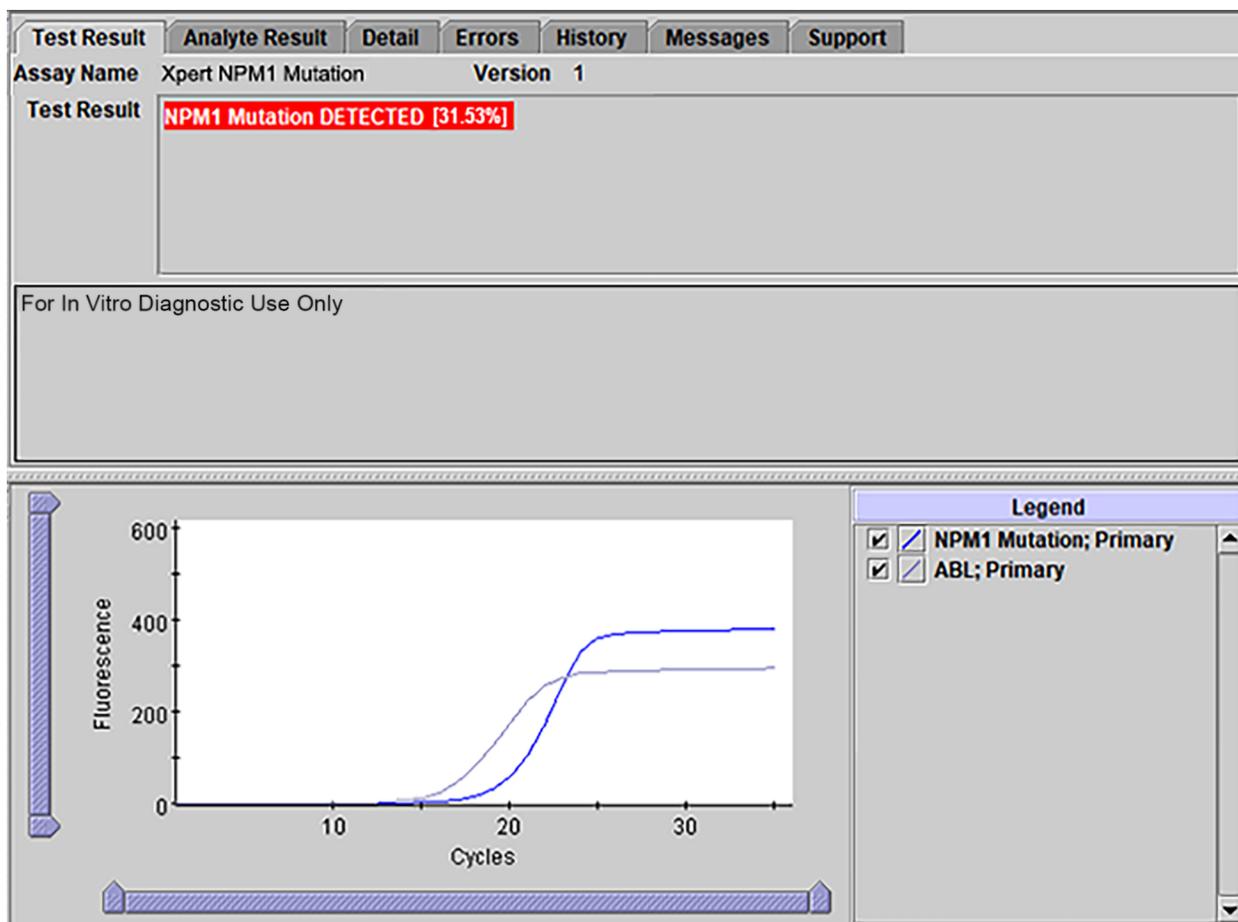


Abbildung 2. GeneXpert Dx Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“: NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [31,53 %] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%])

## 16.2 NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Oberhalb des oberen LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

NPM1-Mutation wurde bei einer Konzentration > 500 % nachgewiesen.

Bei einem Ergebnis „**NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Oberhalb des oberen LoQ]**“, (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ]) ist die NPM1-Mutation nachweisbar, wenn der Ct-Wert der NPM1-Mutation größer oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „32“ ist und der Ct-Wert von ABL größer oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ ist. Die GeneXpert Software berechnet den %-Wert anhand der folgenden Gleichung, bei der der Delta-Ct( $\Delta Ct$ ) Wert durch Subtraktion von NPM1-Mutation Ct vom ABL-Ct erhalten wird:

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

Beim Skalierungsfaktor (SF) handelt es sich um einen chargenspezifischen Parameter, der im Barcode der Assay-Kartusche codiert ist. Der Wert dieses Faktors und die chargenspezifische Assay-Effizienz ( $E_{\Delta Ct}$ ) werden im Rahmen von Qualitätskontrolltests für jede Assay-Charge bestimmt, wobei Primärstandards verwendet werden, die auf die Kopienzahlen der synthetischen NPM1-Mutation und der *In-vitro* transkribierten ABL1-RNA (IVT-RNA) zur Quantifizierung des NPM1-Mutation-Transkripts kalibriert sind. Im hier dargestellten Beispiel ist der  $E_{\Delta Ct}$ -Wert auf 1,95 und der SF-Wert auf 1,79 eingestellt.

### Anmerkung

**Beispiel:** Chargenspezifischer  $E_{\Delta Ct} = 1,95$ ;  $SF = 1,79$   
 Assay ABL Ct = 13,4; NPM1-Mutation Ct = 10,2;  $\Delta Ct = 3,2$   
 $\% = 1,95^{(3,2)} \times 100 \times 1,79 = 1516,92 \%$  ist größer als die definierte obere LoQ des Assays mit 500 %

**Ergebnis:** **NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Oberhalb des oberen LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ]).** Siehe Abbildung 3.

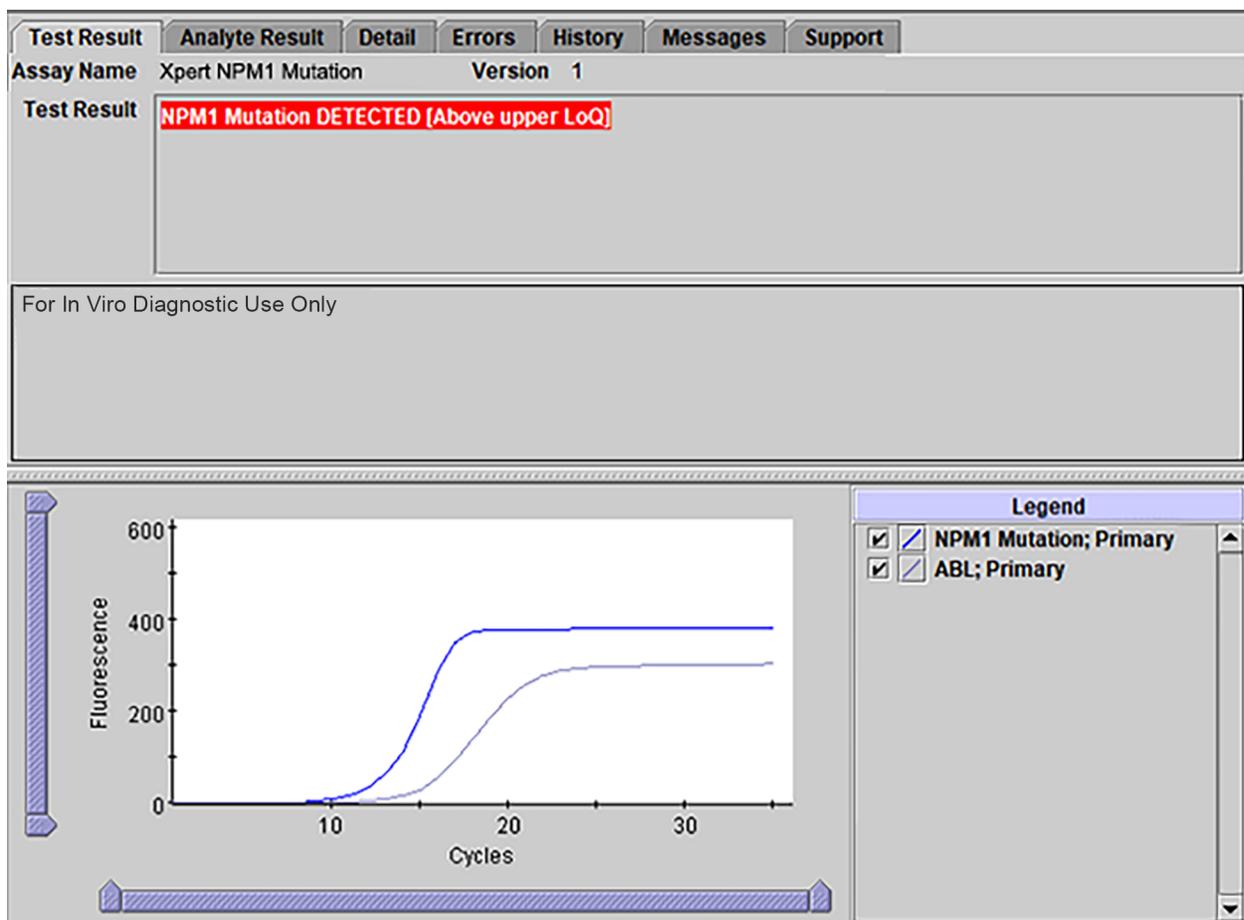


Abbildung 3. GeneXpert Dx Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“: NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Oberhalb des oberen LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

## 16.3 NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Unterhalb der LoD, <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])

NPM1-Mutation wurde bei einer Konzentration < 0,030 % nachgewiesen.

Bei einem Ergebnis „**NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Unterhalb LoD; <0,030 %]**“, (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%]) ist die NPM1-Mutation nachweisbar, wenn der Ct-Wert der NPM1-Mutation größer oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „32“ ist und der Ct-Wert von ABL größer oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ ist. Die GeneXpert Software berechnet den %-Wert anhand der folgenden Gleichung, bei der der Delta-Ct( $\Delta Ct$ -) Wert durch Subtraktion von NPM1-Mutation Ct vom ABL-Ct erhalten wird:

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

Beim Skalierungsfaktor (SF) handelt es sich um einen chargenspezifischen Parameter, der im Barcode der Assay-Kartusche codiert ist. Der Wert dieses Faktors und die chargenspezifische Assay-Effizienz ( $E_{\Delta Ct}$ ) werden im Rahmen von Qualitätskontrolltests für jede Assay-Charge bestimmt, wobei Primärstandards verwendet werden, die auf die Kopienzahlen der synthetischen NPM1-Mutation und der *In-vitro* transkribierten ABL1-RNA (IVT-RNA) zur Quantifizierung des NPM1-Mutation-Transkripts kalibriert sind. Im hier dargestellten Beispiel ist der  $E_{\Delta Ct}$ -Wert auf 1,95 und der SF-Wert auf 1,79 eingestellt.

### Anmerkung

**Beispiel:** Chargenspezifischer  $E_{\Delta Ct} = 1,95$ ;  $SF = 1,79$   
 Assay ABL Ct = 14,3; NPM1-Mutation Ct = 28,8;  $\Delta Ct = -14,5$   
 $\% = 1,95^{(-14,5)} \times 100 \times 1,79 = 0,011 \%$  ist kleiner als die definierte LoD des Assays mit 0,030 %

**Ergebnis:** **NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Unterhalb der LoD; <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])**. Siehe Abbildung 4.

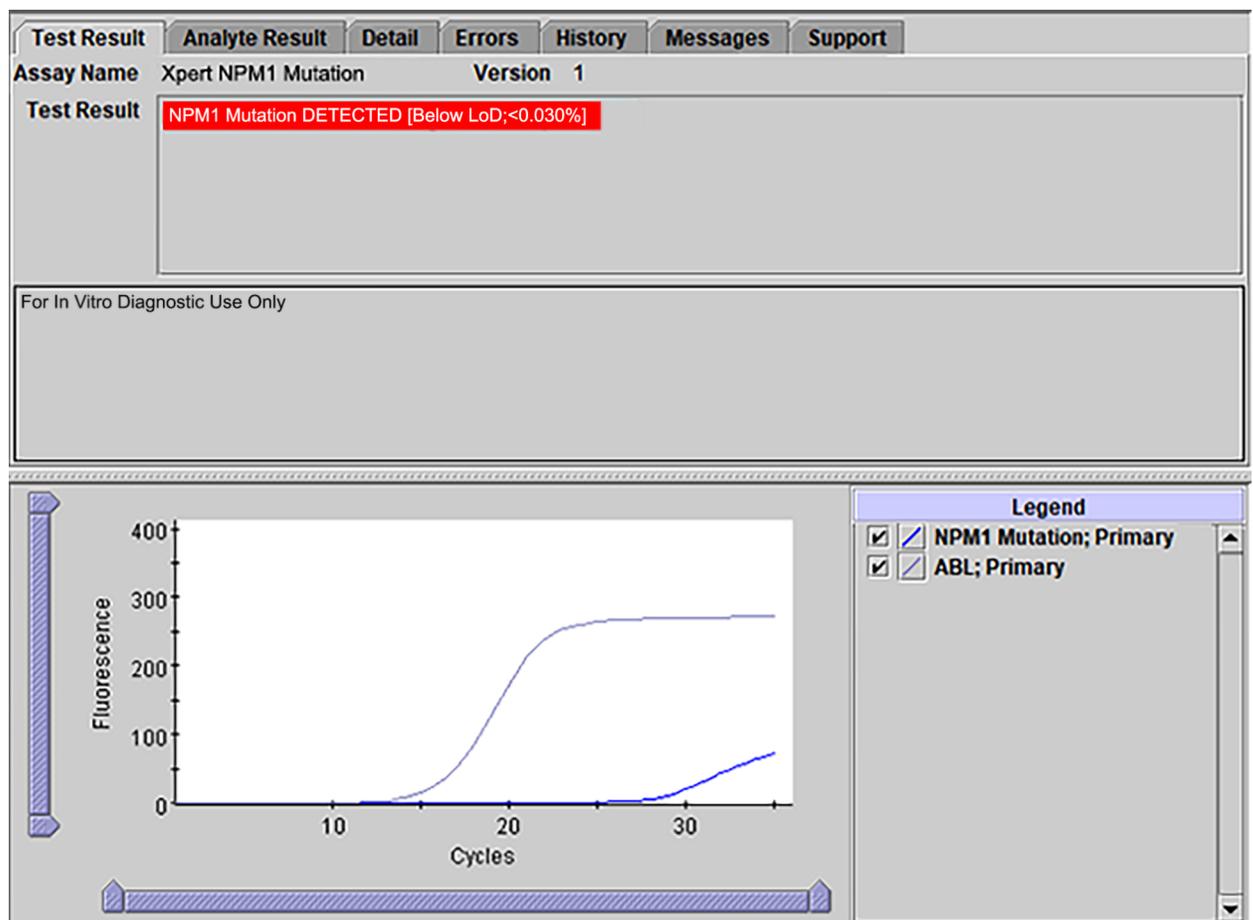


Abbildung 4. Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“ von GeneXpert: NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [Unterhalb der LoD, <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])

## 16.4 NPM1-Mutation NICHT NACHGEWIESEN [ABL-Transkript ausreichend] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

NPM1-Mutation wurde nicht nachgewiesen; NPM1 Ct war gleich „0“ oder größer als „32“ und der ABL-Ct war größer „6“ und kleiner oder gleich „20“.

The GeneXpert Software erfordert, dass der ABL Ct größer als oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ für den Xpert NPM1 Mutation Test ist, um ein „Ausreichendes ABL-Transkript“ zu gewährleisten. Siehe Abschnitt 15, Interpretation von Ergebnissen, Tabelle 1.

**Beispiel:** Assay NPM1-Mutation Ct = 0; ABL Ct = 14,0 ist zwischen „6“ und „20“.

**Ergebnis:** NPM1-Mutation NICHT NACHGEWIESEN [ABL-Transkript ausreichend] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]). Siehe Abbildung 5.

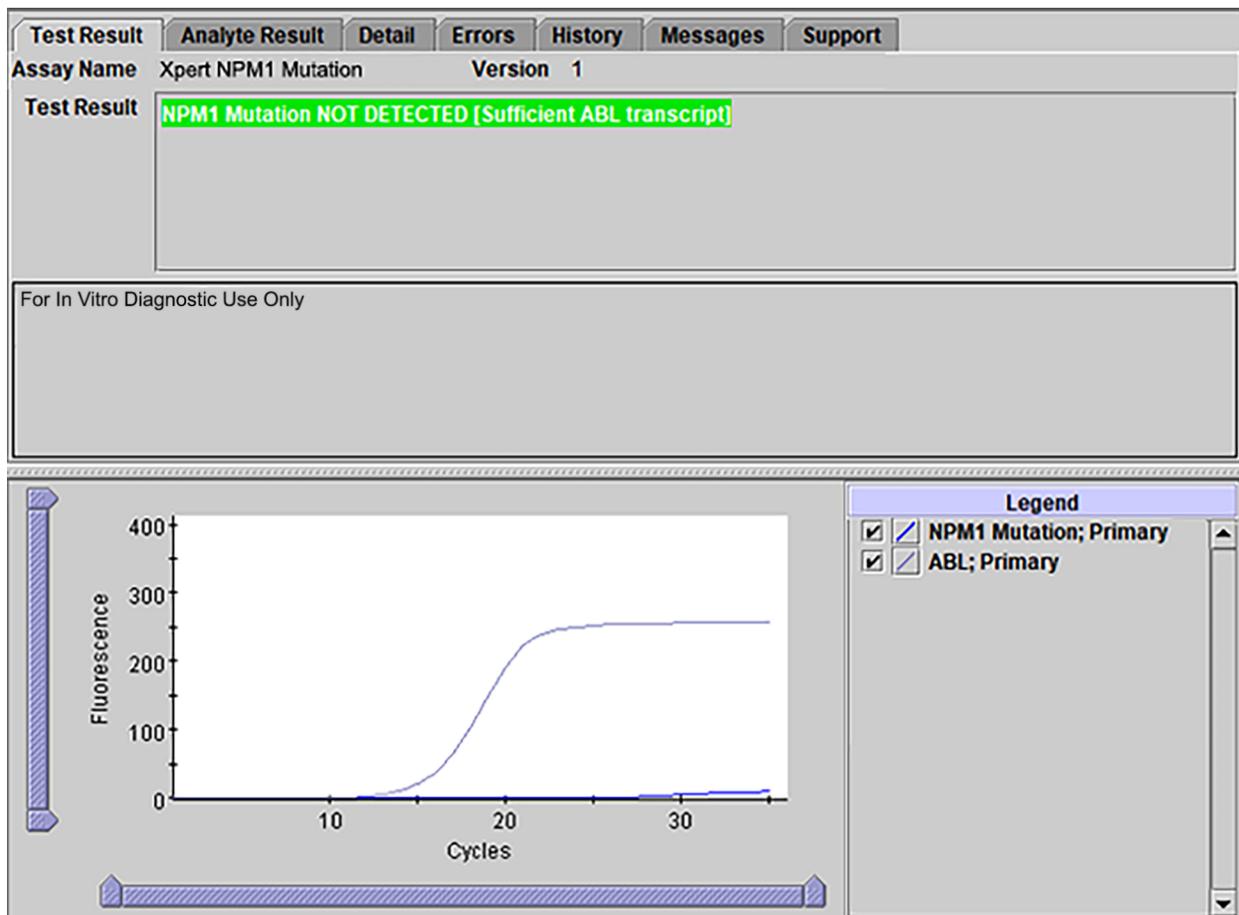


Abbildung 5. Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“ von GeneXpert: NPM1-Mutation NICHT NACHGEWIESEN [ABL-Transkript ausreichend] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

## 16.5 UNGÜLTIG [Kein ABL-Transkript] (INVALID [No ABL transcript])

NPM1-Mutation wurde nachgewiesen oder nicht nachgewiesen und der ABL-Ct war gleich „0“.

The GeneXpert Software erfordert, dass der ABL Ct größer als oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ für den Xpert NPM1 Mutation Test ist, um ein „Ausreichendes ABL-Transkript“ zu gewährleisten. Siehe Abschnitt 18, „Anleitung zur Fehlerbehebung“.

**Beispiel:** Assay NPM1-Mutation Ct = 0; ABL Ct = 0.

**Ergebnis:** **UNGÜLTIG [Kein ABL-Transkript] (INVALID [No ABL transcript])**. Siehe Abbildung 6.

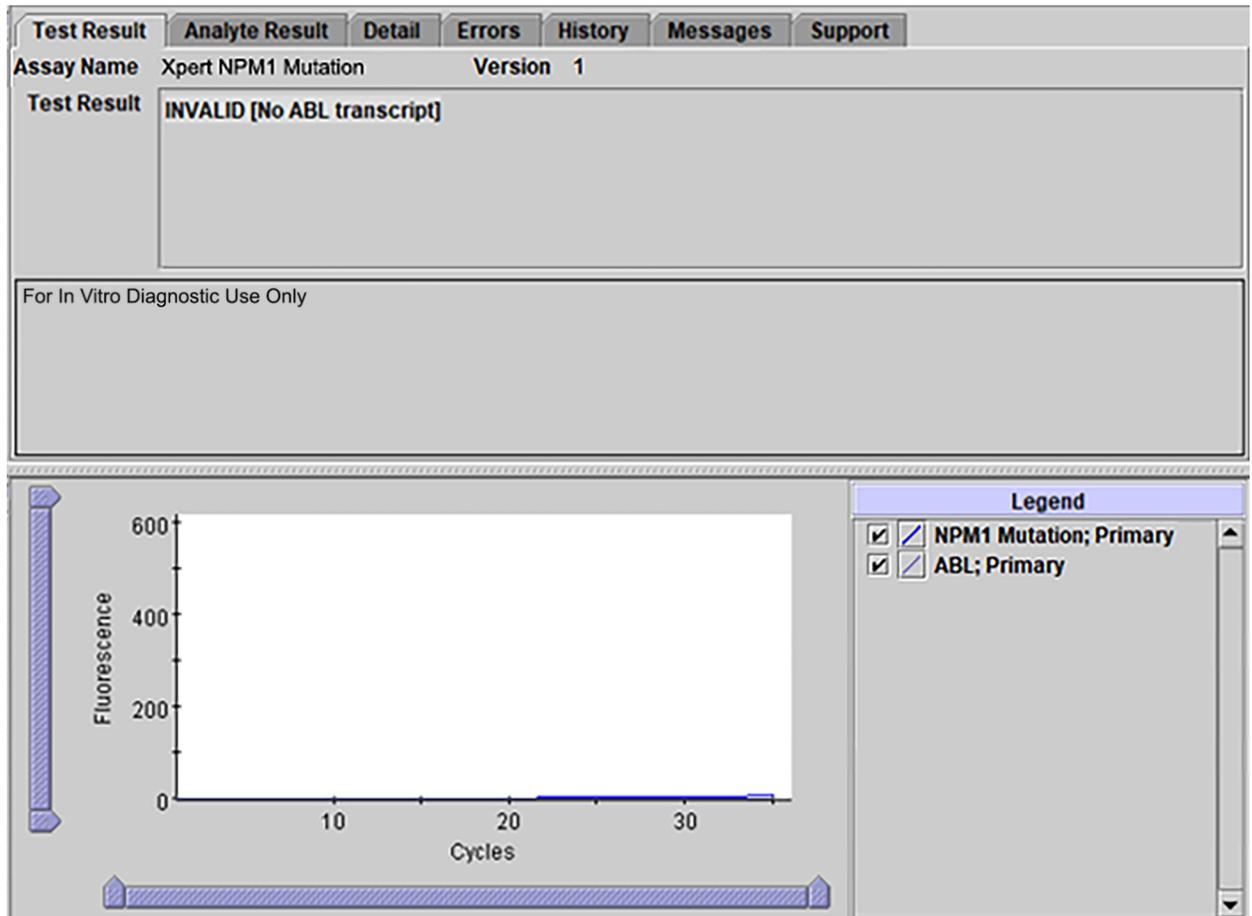


Abbildung 6. Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“ von GeneXpert: UNGÜLTIG [Kein ABL-Transkript] (INVALID [No ABL transcript])

## 16.6 UNGÜLTIG [ABL-Transkript nicht ausreichend] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

NPM1-Mutation wurde nachgewiesen oder nicht nachgewiesen und der ABL-Ct war größer „20“.

The GeneXpert Software erfordert, dass der ABL Ct größer als oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ für den Xpert NPM1 Mutation Test ist, um ein „Ausreichendes ABL-Transkript“ zu gewährleisten. Siehe Abschnitt 18, „Anleitung zur Fehlerbehebung“.

**Beispiel:** Assay NPM1-Mutation Ct = 33,3; ABL Ct = 20,2 ist größer als „20“.

**Ergebnis:** **UNGÜLTIG [ABL-Transkript nicht ausreichend] (INVALID [Insufficient ABL transcript]).**  
Siehe Abbildung 7.

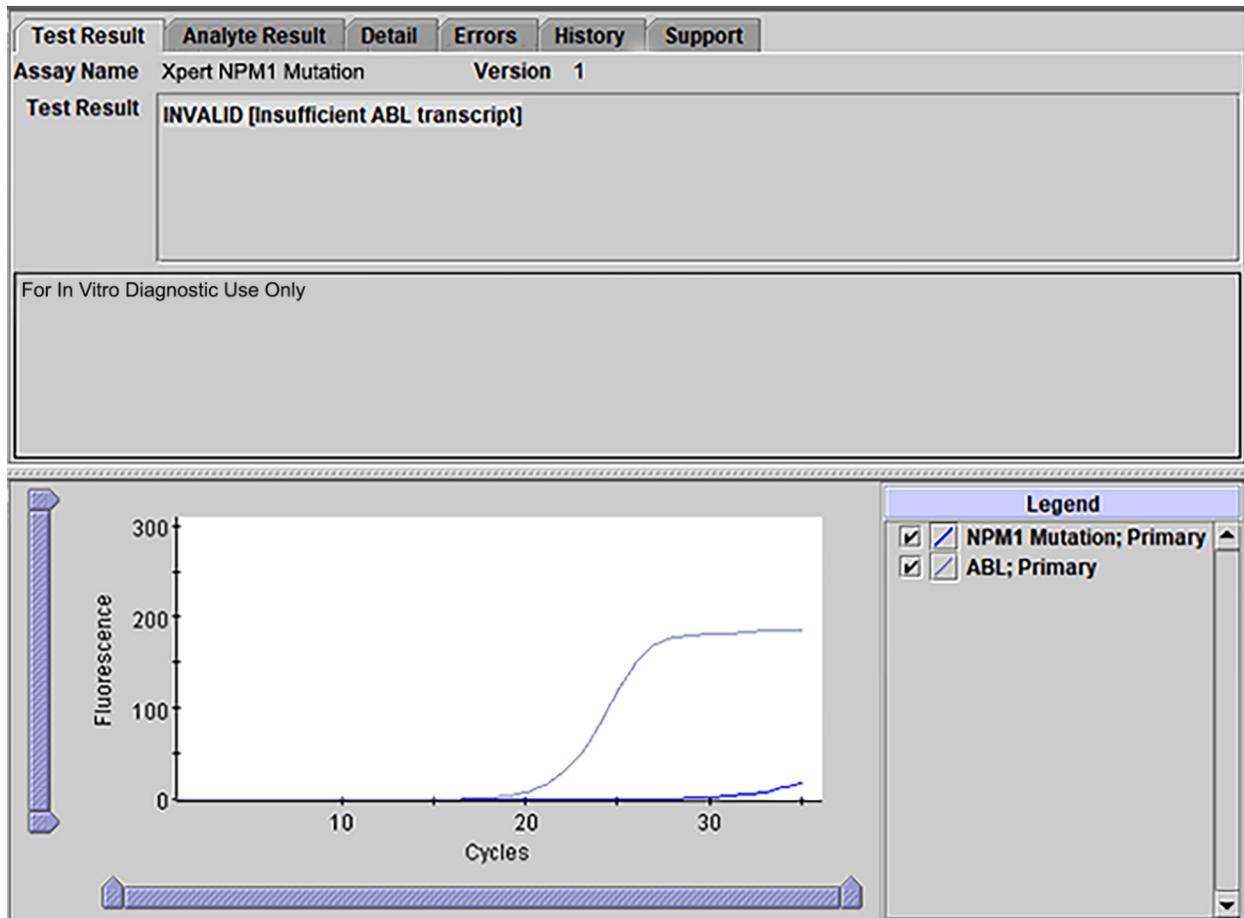


Abbildung 7. Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“ von GeneXpert:  
UNGÜLTIG [ABL-Transkript nicht ausreichend] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

## 16.7 UNGÜLTIG [Zu hohe NPM1-Mutation und ABL-Transkript] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

NPM1-Mutation wurde sowohl bei einer NPM1-Mutation als auch bei ABL Cts größer als „0“ und kleiner als „6“ nachgewiesen.

The GeneXpert Software erfordert, dass der ABL Ct größer als oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ für den Xpert NPM1 Mutation Test ist, um ein „Ausreichendes ABL-Transkript“ zu gewährleisten. Siehe Abschnitt 18, „Anleitung zur Fehlerbehebung“.

**Beispiel:** Assay NPM1-Mutation Ct = 5,4 ist größer als „0“ und kleiner als „6“; ABL Ct = 5,9 ist kleiner als „6“.

**Ergebnis:** **UNGÜLTIG [Zu hohe NPM1-Mutation und ABL-Transkript] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript]).** Siehe Abbildung 8.

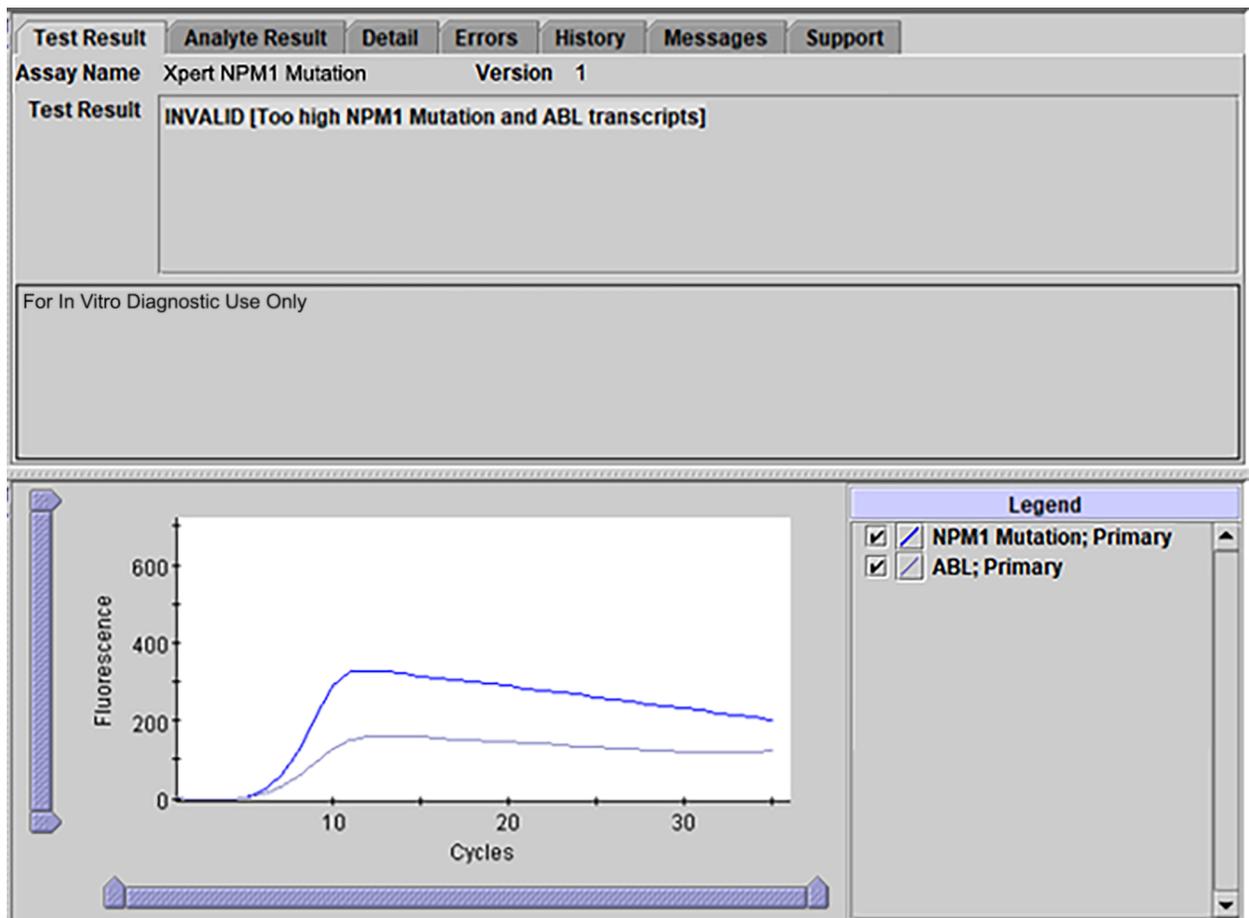


Abbildung 8. GeneXpert Dx Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“: UNGÜLTIG [Zu hohe NPM1-Mutation und ABL-Transkript] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

## 16.8 UNGÜLTIG [Zu hohes NPM1-Mutation-Transkript] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

NPM1-Mutation wurde nachgewiesen mit NPM1-Mutation Ct größer als „0“ und kleiner als „6“ und ABL Ct größer als „6“ und kleiner als oder gleich „20“.

The GeneXpert Software erfordert, dass der ABL Ct größer als oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ für den Xpert NPM1 Mutation Test ist, um ein „Ausreichendes ABL-Transkript“ zu gewährleisten. Siehe Abschnitt 18, „Anleitung zur Fehlerbehebung“.

**Beispiel:** Assay NPM1-Mutation Ct = 5,8 ist größer als „0“ und kleiner als „6“; ABL Ct = 13 ist zwischen „6“ und „20“.

**Ergebnis:** **UNGÜLTIG [Zu hohes NPM1-Mutation-Transkript] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript]).** Siehe Abbildung 9.

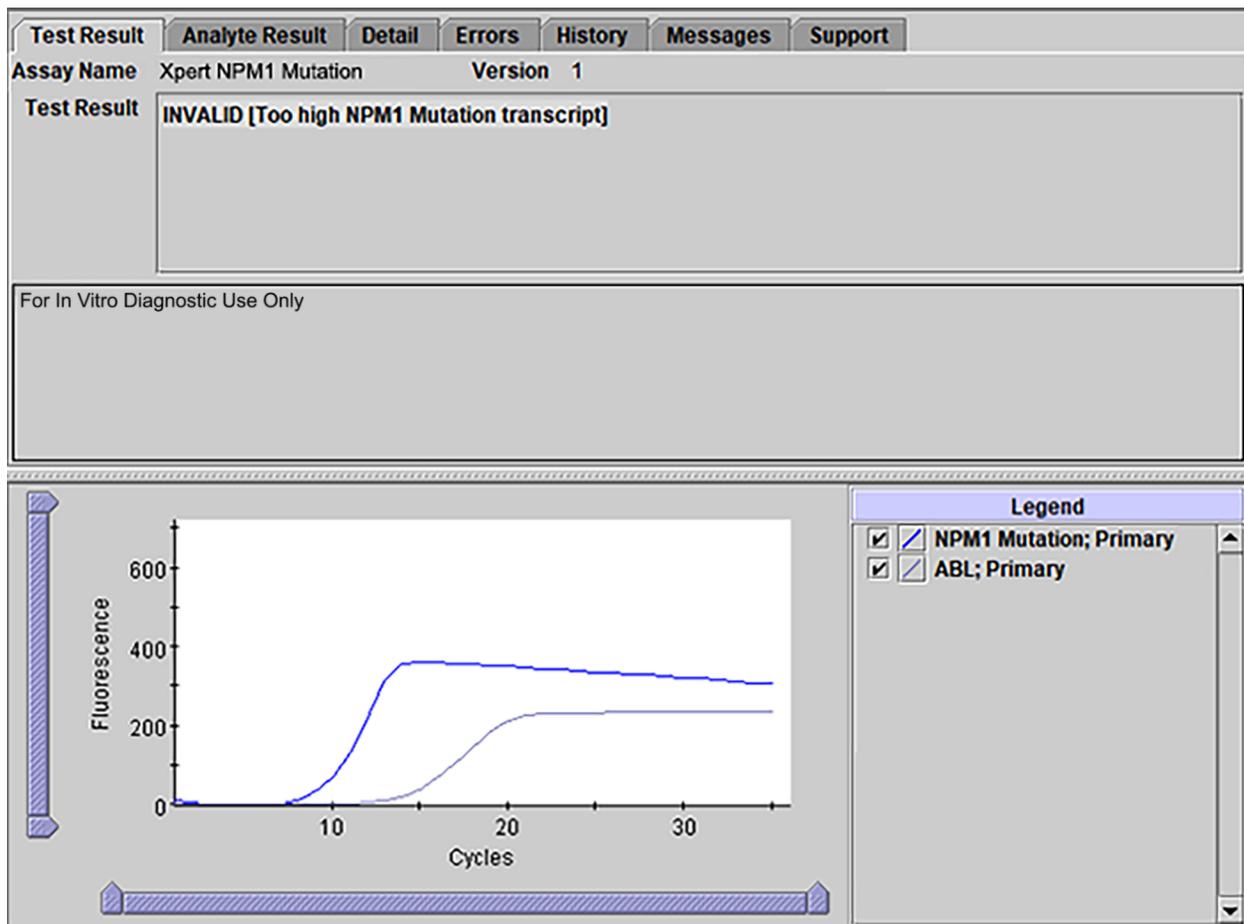


Abbildung 9. Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“ von GeneXpert: UNGÜLTIG [Zu hohes NPM1-Mutation-Transkript] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

## 16.9 UNGÜLTIG [Zu hohes ABL-Mutation-Transkript] (INVALID [Too high ABL Mutation transcript])

NPM1-Mutation wurde nachgewiesen mit NPM1-Mutation Ct größer als „6“ und kleiner als oder gleich „32“ und ABL Ct nicht gleich „0“ und kleiner als „6“.

The GeneXpert Software erfordert, dass der ABL Ct größer als oder gleich „6“ und kleiner oder gleich „20“ für den Xpert NPM1 Mutation Test ist, um ein „Ausreichendes ABL-Transkript“ zu gewährleisten. Siehe Abschnitt 18, „Anleitung zur Fehlerbehebung“.

**Beispiel:** Assay NPM1-Mutation Ct = 13,2; ABL Ct = 5,8 ist kleiner als „6“.

**Ergebnis:** **UNGÜLTIG [ABL-Transkript zu hoch] (INVALID [Too high ABL transcript])**. Siehe Abbildung 10.

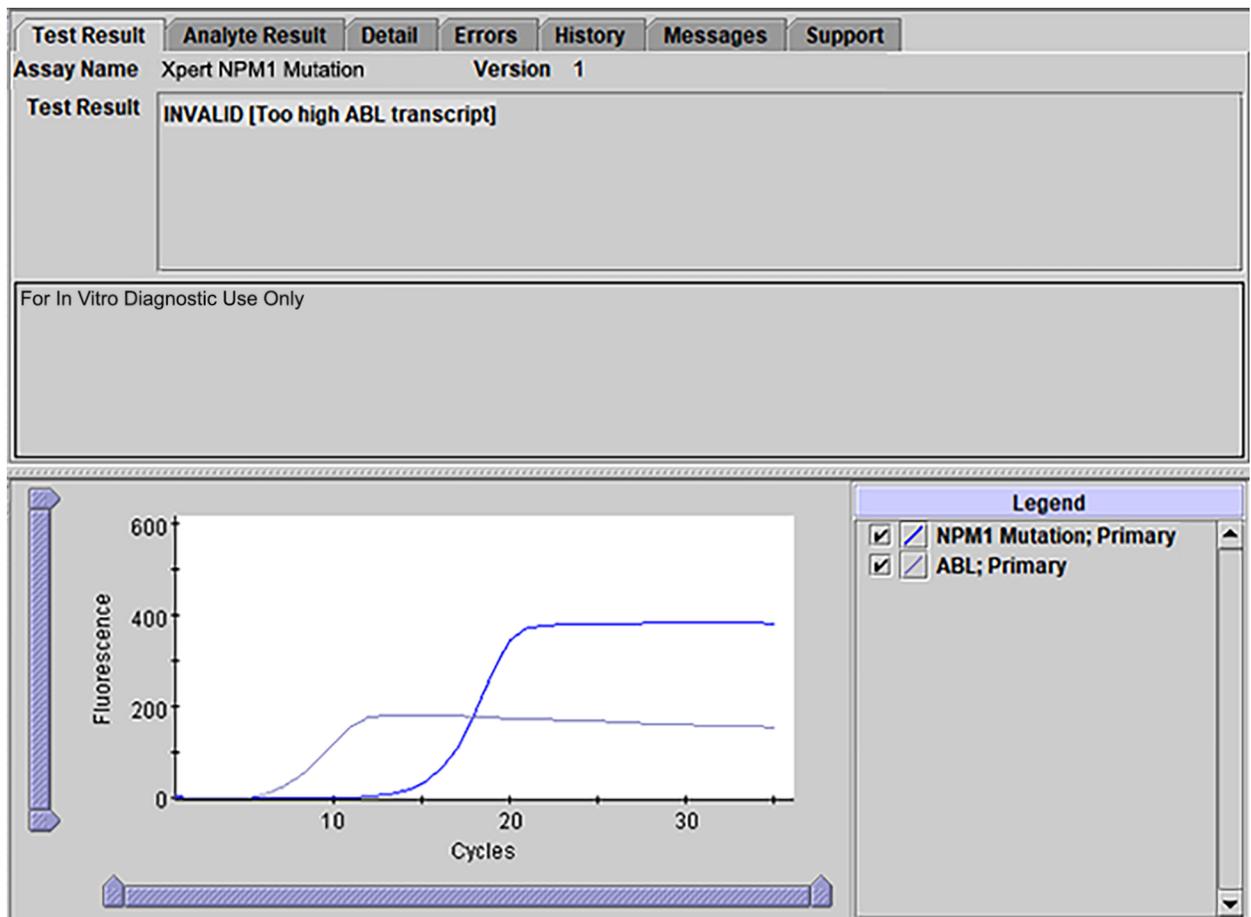


Abbildung 10. Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“ von GeneXpert:  
UNGÜLTIG [ABL-Transkript zu hoch] (INVALID [Too high ABL transcript])

## 16.10 FEHLER (ERROR)

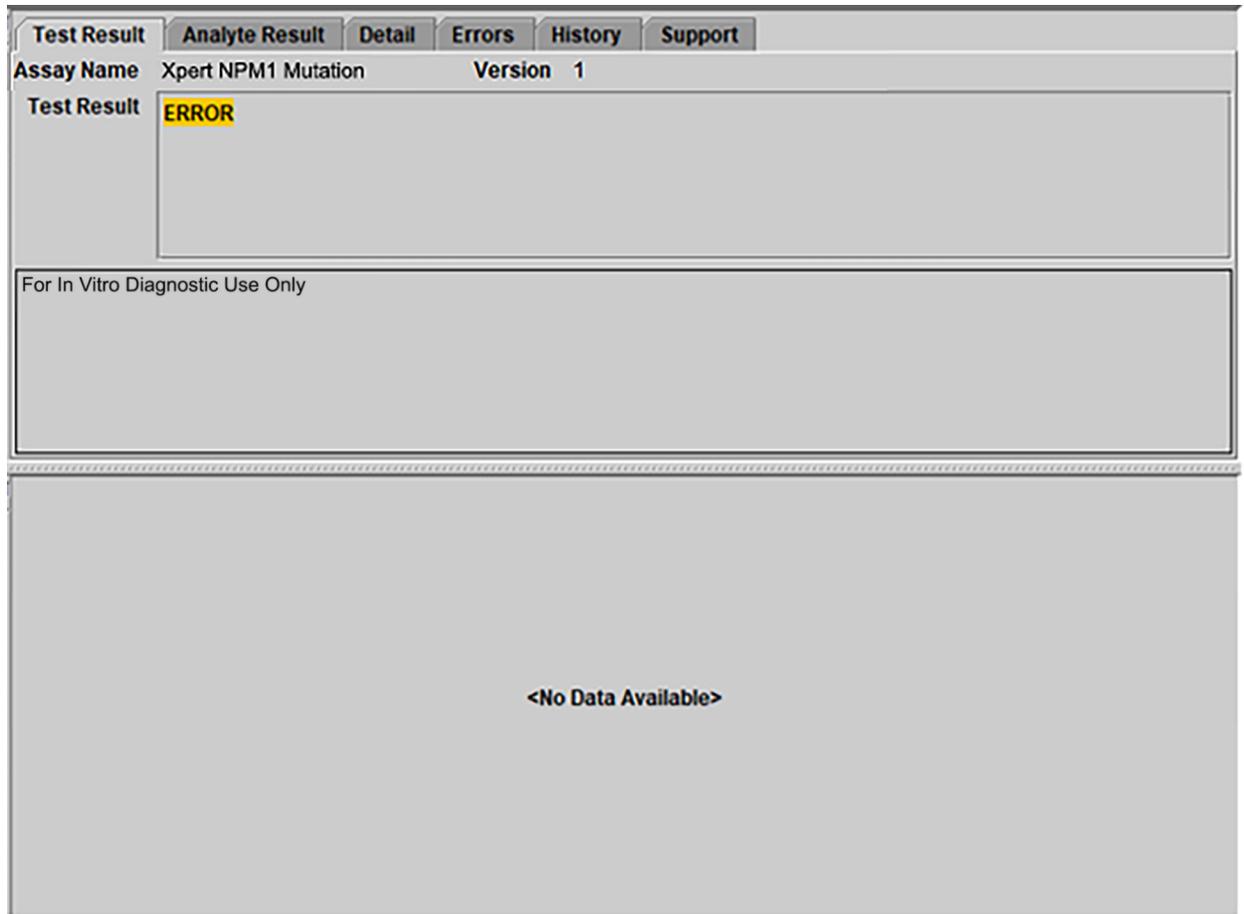


Abbildung 11. Fenster „Ergebnisse anzeigen (View Results)“ von GeneXpert: FEHLER (ERROR)

## 17 Einschränkungen des Assays

- Der Assay ist nicht zur Verwendung mit externen Kalibratoren bestimmt.
- Änderungen an diesen Vorgehensweisen können die Funktion des Assays beeinträchtigen.
- Dieses Produkt wurde nur für die Verwendung mit in EDTA-Röhrchen abgenommenem Blut entwickelt.
- Kein Heparin als Antikoagulans verwenden, da es die PCR-Reaktion hemmen kann.
- Die Probenotypen Natriumcitrat, Buffy-Coat und Knochenmark wurden nicht validiert.
- Zu fehlerhaften Assay-Ergebnissen kann es kommen, wenn die Probe unsachgemäß entnommen, gehandhabt oder gelagert wurde oder Proben verwechselt wurden. Die Gebrauchsanweisung ist sorgfältig zu befolgen, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden.
- Mutationen oder Polymorphismen in Primer oder Sonden bindenden Regionen wirken sich eventuell auf den Nachweis von neuen oder unbekanntem Varianten aus und können falsch negative Ergebnisse verursachen.
- Zu hohe Konzentrationen weißer Blutkörperchen können zur Druckbildung in der Kartusche und zu abgebrochenen Durchläufen oder ungenauen Ergebnissen führen.
- Manche Proben mit sehr niedriger ABL-Transkript-Konzentration oder mit einer Leukozytenzahl unter 150.000 Zellen/ml können als **UNGÜLTIG (INVALID)** (Typ 1) berichtet werden. Ein unbestimmtes Ergebnis schließt nicht aus, dass in der Probe Leukämiezellen in sehr niedriger Konzentration anwesend sind.

## 18 Anleitung zur Fehlerbehebung

Tabelle 3. Anleitung zur Fehlerbehebung

Assayergebnis	Mögliche Ursachen	Lösungsvorschläge
<b>UNGÜLTIG (INVALID)</b>	Typ 1: Fehler der endogenen Kontroll-ABL: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schlechte Probenqualität</li> <li>• RT-PCR-Hemmung</li> <li>• ABL-Ct &gt; 20 und/oder Endpunkt &lt; 100</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Überprüfen Sie die Qualität der Probe (z. B. Nichteinhaltung der Lagerbedingungen einschließlich Zeit und Temperatur).</li> <li>• Den Assay mit der Originalprobe (sofern vorhanden) oder zurückgehaltenem Lysat und einer neuen Kartusche wiederholen, wie in Abschnitt 19.1, Testwiederholung bei FEHLER (ERROR) oder UNGÜLTIG (INVALID) (Typ 1), erläutert.</li> </ul>
	Typ 2: Die NPM1-Transkript-Konzentration kann nicht bestimmt werden, da die Probe zu viele NPM1-Mutationen und/oder ABL-Transkripte enthält (Ct < 6)	Den Assay mit der Originalprobe (sofern vorhanden) oder zurückgehaltenem Lysat und einer neuen Kartusche wiederholen, wie in Abschnitt 19.2, Testwiederholung bei FEHLER (ERROR) (Code 2008) oder UNGÜLTIG (INVALID) (Typ 2), erläutert.
<b>FEHLER (ERROR)</b> (Code 2008)	Der Druck übersteigt den zulässigen Wert (Fehlermeldung 2008)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Überprüfen Sie die Qualität der Probe</li> <li>• Prüfen Sie, ob die Leukozytenzahl deutlich erhöht ist.</li> <li>• Den Assay mit der Originalprobe (sofern vorhanden) oder zurückgehaltenem Lysat und einer neuen Kartusche wiederholen, wie in Abschnitt 19.2, Testwiederholung bei FEHLER (ERROR) (Code 2008) oder UNGÜLTIG (INVALID) (Typ 2), erläutert.</li> </ul>
<b>FEHLER (ERROR)</b> (Codes 5006, 5007, 5008 und 5009*)  *Diese Liste der Fehlercodes ist nicht vollständig.	Sondenprüfung fehlgeschlagen	Den Assay mit der Originalprobe (sofern vorhanden) oder zurückgehaltenem Lysat und einer neuen Kartusche wiederholen, wie in Abschnitt 19.1, Testwiederholung bei FEHLER (ERROR) oder UNGÜLTIG (INVALID) (Typ 1), erläutert.
<b>KEIN ERGEBNIS (NO RESULT)</b>	Datenerfassungsfehler. Zum Beispiel hat der Benutzer einen laufenden Assay abgebrochen oder es ist zu einem Stromausfall gekommen.	Den Assay mit der Originalprobe (sofern vorhanden) oder zurückgehaltenem Lysat und einer neuen Kartusche wiederholen, wie in Abschnitt 19.1, Testwiederholung bei FEHLER (ERROR) oder UNGÜLTIG (INVALID) (Typ 1), erläutert.

## 19 Wiederholungstests

### 19.1 Testwiederholung bei FEHLER (ERROR) oder UNGÜLTIG (INVALID) (Typ 1)

Proben bei den Ergebnissen **FEHLER (ERROR)** oder **UNGÜLTIG (INVALID)** erneut testen, wenn als Ursache der ABL-Zyklusschwellwert (Ct) den maximalen gültigen Ct-Grenzwert ( $Ct > 20$ ) überschreitet oder der Endpunkt unterhalb des eingestellten Schwellenwerts ( $< 100$ ) liegt. Siehe Abschnitt 18, „Anleitung zur Fehlerbehebung (Troubleshooting Guide)“.

1. Falls ein ausreichendes Volumen der Blutprobe vorhanden ist, den Test mit dem Blutentnahmeröhrchen mit Originalblutprobe wiederholen, wie in Abschnitt 12.2 erläutert.

-ODER-

Falls kein ausreichendes Volumen der Blutprobe vorhanden ist, kann der Test mit dem zurückbehaltenen Lysat aus Abschnitt 12.2.1, Schritt 12 wiederholt werden.

- a. Wird das zurückbehaltene Lysat aus Abschnitt 12.2.1, Schritt 12 eingefroren aufbewahrt, muss es vor Gebrauch auf Zimmertemperatur aufgetaut werden.
  - b. Sicherstellen, dass das Lysat gut vermischt ist, indem die Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischt wird. Dann das Lysat 3 Minuten lang beiseite stellen, damit sich die Blasen absetzen können.
2. 1 ml vorbereitetes Lysat in ein neues konisches 50-ml-Röhrchen überführen.
  3. Das endgültige Lysat gemäß den Schritten 13–17 in Abschnitt 12.2.1 zubereiten.
  4. Die Kartusche durch Anheben des Kartuschendeckels öffnen und den gesamten Inhalt einer (1) Ampulle mit Waschreagenz vollständig in die Waschreagenzkammer (mit der kleinen Öffnung) übertragen. Siehe Abbildung 1.
  5. Die vorbereitete Probe vollständig in die Probenkammer (große Öffnung) pipettieren. Siehe Abbildung 1.
  6. Den Kartuschendeckel schließen. Assay starten (siehe Abschnitt 12.4, Den Assay starten).

### 19.2 Testwiederholung bei FEHLER (ERROR) (Code 2008) oder UNGÜLTIG (INVALID) (Typ 2)

Proben mit einer NPM1-Mutation und/oder ABL-Transkript-Konzentration unter dem gültigen Ct-Minimum ( $Ct > 0$  und  $Ct < 6$ ) und/oder bei Überschreitung des Druckgrenzwerts erneut testen. Siehe Abschnitt 18, „Anleitung zur Fehlerbehebung (Troubleshooting Guide)“.

1. Auf den Boden eines konischen 50-ml-Röhrchens 100 µl PK (Proteinase K) hinzufügen.
2. Stellen Sie sicher, dass die Blutprobe oder das verbleibende Lysat aus Abschnitt 12.2, Schritt 12 gut gemischt ist, indem Sie das Röhrchen unmittelbar vor dem Pipettieren 8-mal invertieren.
3. In das Röhrchen, das bereits Proteinase K enthält, 250 µl der Blutprobe und 3,75 ml PBS (pH 7,4, vom Benutzer bereitgestellt), falls verfügbar, oder 60 µL des verbleibenden Lysats aus Abschnitt 12.2.1, Schritt 12 hinzufügen.
  - a. Wird das zurückbehaltene Lysat aus Abschnitt 12.2.1, Schritt 12 eingefroren aufbewahrt, muss es vor Gebrauch auf Zimmertemperatur aufgetaut werden.
  - b. Sicherstellen, dass das Lysat gut vermischt ist, indem die Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischt wird. Dann das Lysat 3 Minuten lang beiseite stellen, damit sich die Blasen absetzen können.
4. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 3 Sekunden lang vermischen.
5. 1 Minute lang bei Zimmertemperatur inkubieren.
6. Für den Wiederholungstest von Blut mit PBS die Schritte 6-17 in Abschnitt 12.2.1 befolgen, um das endgültige Lysat herzustellen. Für den Wiederholungstest des verbleibenden Lysats die Schritte a-g befolgen, um das endgültige Lysat herzustellen.
  - a. Zu dem Röhrchen mit der Wiederholungsprobe des verbleibenden Lysats 2,5 ml LY hinzufügen.
  - b. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischen.
  - c. 5 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubieren.
  - d. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischen.
  - e. 5 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubieren.
  - f. In das gleiche Röhrchen 2 ml reines Ethanol in Reagenzqualität (vom Benutzer bereitgestellt) geben
  - g. Probe mit einem Vortex-Mixer auf der Maximaleinstellung kontinuierlich 10 Sekunden lang vermischen. Zur Seite stellen.

7. Die Kartusche durch Anheben des Kartuschendeckels öffnen und den gesamten Inhalt einer (1) Ampulle mit Waschreagenz vollständig in die Waschreagenzkammer (mit der kleinen Öffnung) übertragen. Siehe Abbildung 1.
8. Die vorbereitete Probe vollständig in die Probenkammer (große Öffnung) pipettieren. Siehe Abbildung 1.
9. Den Kartuschendeckel schließen. Assay starten (siehe Abschnitt 12.4, Den Assay starten).

## 20 Erwartete Werte

Der Xpert NPM1 Mutation Bereich deckt die wichtigsten klinischen Entscheidungspunkte zum Monitoring von AML. Erwartete Werte werden als prozentuales Verhältnis von NPM1-Mutation mRNA zu ABL-mRNA ausgedrückt und liegen zwischen 0,030 % und 500 %. Messungen unter diesem Bereich werden als „nicht ermittelt“ oder „unter der Nachweisgrenze“ (LoD) ausgegeben. Messungen über diesem Bereich werden als „über der Quantifizierungsgrenze“ (LoQ) ausgegeben. Siehe Abschnitt 15 für Details.

## 21 Klinische Leistung

Eine multizentrische, vergleichende Beobachtungsstudie wurde an drei Zentren in den Vereinigten Staaten und einem Zentrum außerhalb der Vereinigten Staaten durchgeführt. Proben von 40 diskreten AML-Patienten mit NPM1-Mutation von einem Zeitpunkt und über den gesamten Dynamikbereich des Xpert NPM1 Mutation Tests wurden in die Studie aufgenommen. Alter und Geschlecht wurden für diejenigen Patienten erhoben, von denen die Proben erhalten wurden. Die Geschlechterverteilung war 11 Männer (27,5 %) und 29 Frauen (72,5 %). Alle Proben stammten von Patienten in einem Alter zwischen 16 und 81 Jahren, deren Durchschnittsalter bei 59,7 Jahren lag.

Alle 40 Proben lieferten gültige Testergebnisse. Sechsenddreißig der 40 Proben lieferten Ergebnisse innerhalb der quantitativen Bereiche beider Tests. Vier Proben wurden von der Deming-Regression ausgeschlossen, da die Proben beim Xpert NPM1 Mutation und/oder dem Vergleichstest negativ waren. Eine zusätzliche Probe wurde ausgeschlossen, weil sie ein Ausreißerwert war. Insgesamt 35 Proben wurden in die Deming-Regression-Analyse aufgenommen.

Die Leistung des Xpert NPM1 Mutation Tests gegenüber dem Vergleichs-Assay wurde anhand einer Deming-Regression evaluiert, um Anstieg und Achsenabschnitt zu ermitteln. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Deming-Regression-Analyse, einschließlich des Anstiegs, Achsenabschnitts und der Identitätslinie bei den 35 Proben.. Die 95 %igen Konfidenzintervallgrenzen wurden anhand der Jackknife-Methode und der und der Pearson-Korrelationskoeffizient wird angezeigt.

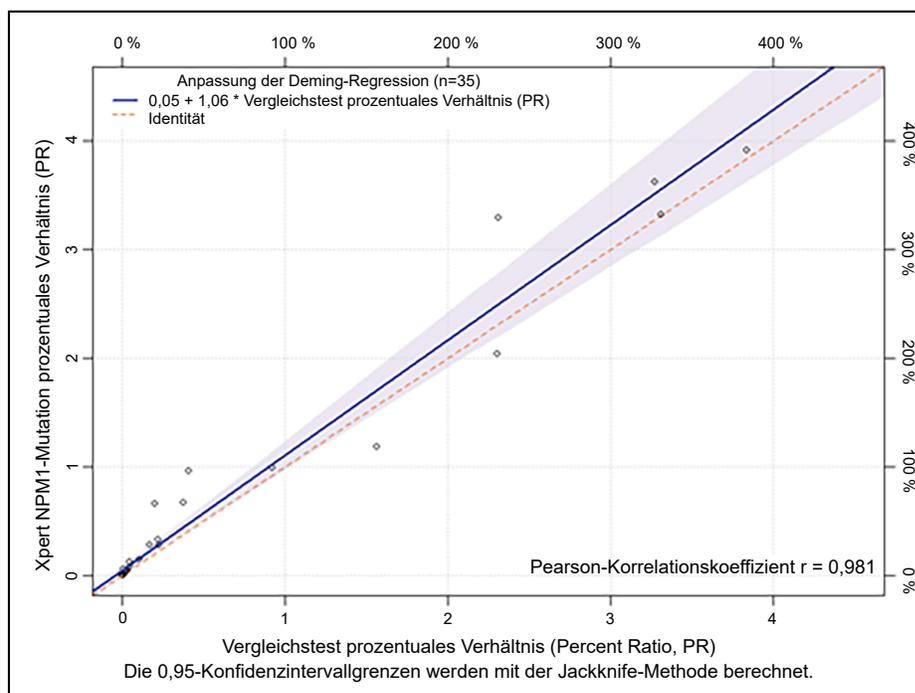
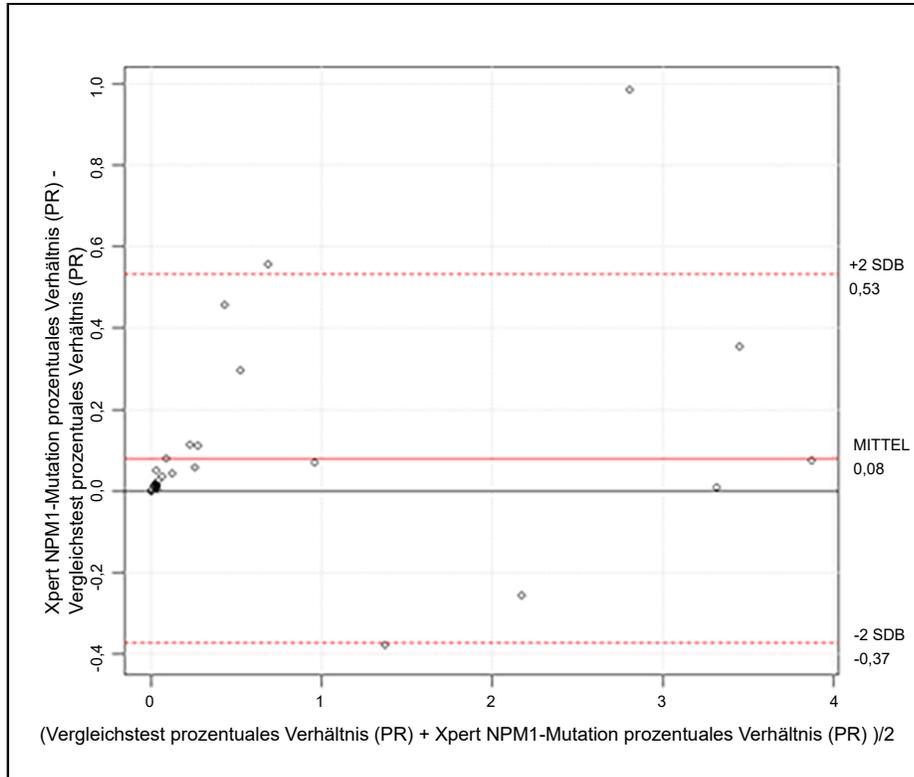


Abbildung 12. Deming-Regression für das prozentuale Verhältnis

Der Anstieg und Achsenabschnitt für das prozentuale Verhältnis aus der Deming-Regression-Analyse betragen 1,06 bzw. 0,05, und die Pearson-Korrelation betrug 0,981 zwischen den Xpert NPM1 Mutation Test- und Vergleichstestmessungen.

Eine Bland-Altman-Analyse für den Unterschied im prozentualen Verhältnis wurde für die 35 Proben mit quantitativen Ergebnissen evaluiert, die innerhalb des linearen Bereichs des Xpert NPM1 Mutation und des Vergleichstests lagen. Abbildung 13 zeigt das Bland-Altman-Diagramm mit dem Unterschied im prozentualen Verhältnis zwischen den beiden Tests gegenüber den durchschnittlichen prozentualen Verhältnisergebnissen für jede Probe. Das Diagramm zeigt auch die obere und untere Standardabweichung (2SA) der mittleren Differenz, die in der Studie beobachtet wurde.



**Abbildung 13. Bland-Altman-Diagramm für das prozentuale Verhältnis des Xpert NPM1-Mutation & Vergleichstests**

Der mittlere Unterschied zwischen dem Ergebnis des Xpert NPM1 Mutation Tests und des Vergleichstests betrug 0,08 Prozent. Die Mehrheit (91,4 %, 32/35) der Ergebnisse war innerhalb der 2SD der mittleren Differenz.

## 22 Analytische Daten

### 22.1 Linearität/Dynamikumfang

Die Linearität wurde für jeden der drei NPM1-Mutant-Subtypen, mutA, mutB und mutD durch Zelllysate bestimmt, die hohe Konzentrationen jedes Subtyp-Transkripts enthalten. Solche Lysate wurden mit einem Hintergrundlysat verdünnt, das von vermutlich NPM1-Mutations-negativen Spendern vorbereitet wurde, auf Zielbereiche von ~0,01–2500 % NPM1-Mutation/ABL. Alle Konzentrationen wurden auf einer Reagenzcharge vierfach getestet. Die Tests und statistischen Analysen wurden gemäß CLSI EP06-A<sup>9</sup> durchgeführt. Die Regressionskurven für jeden Subtyp sind in Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt. Der lineare Bereich jedes Subtyps und ihre linearen Modellkoeffizienten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

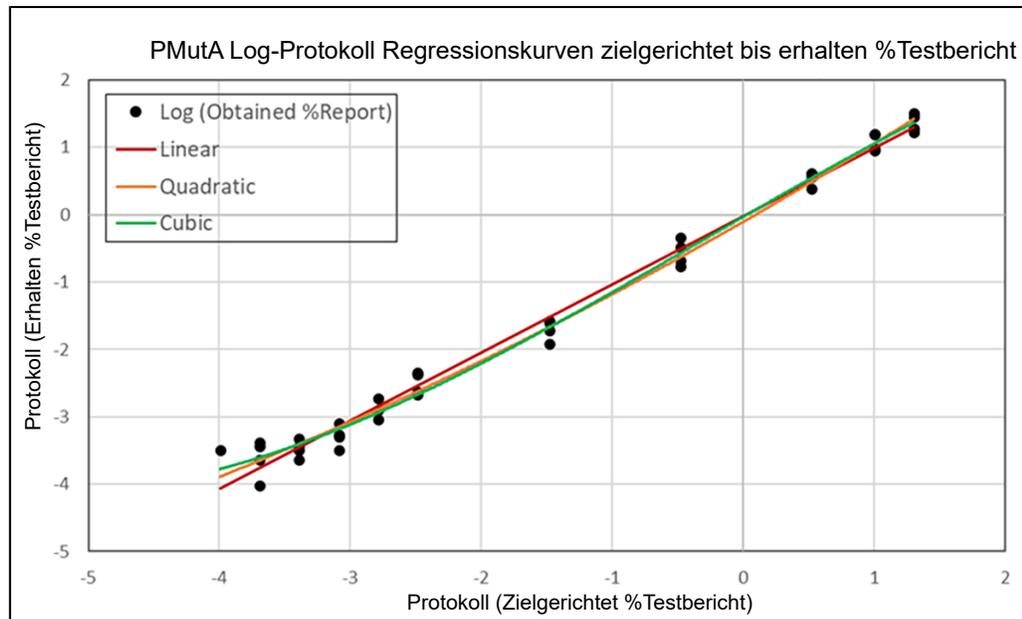


Abbildung 14. Regressionskurven für mutA

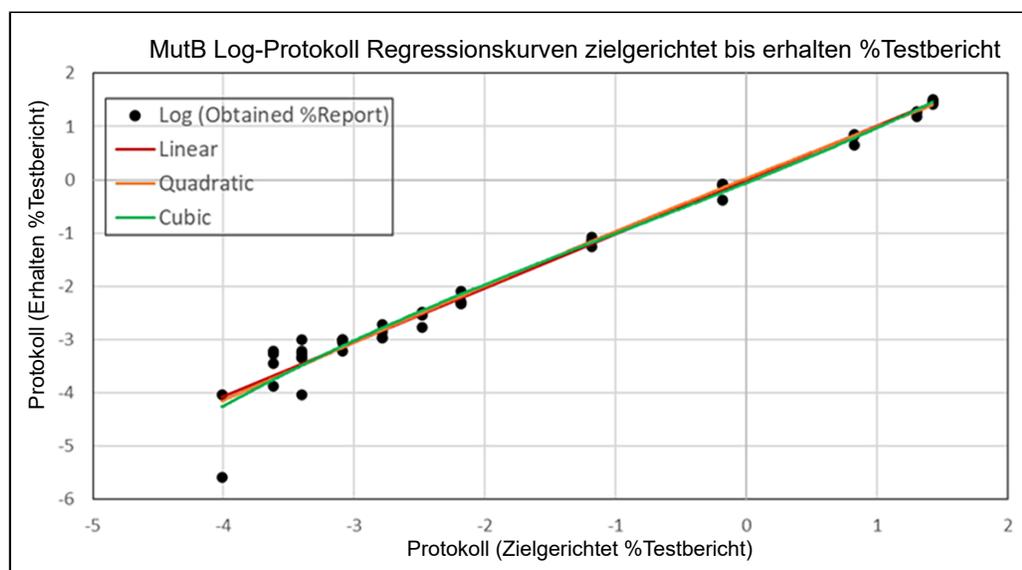


Abbildung 15. Regressionskurven für mutB

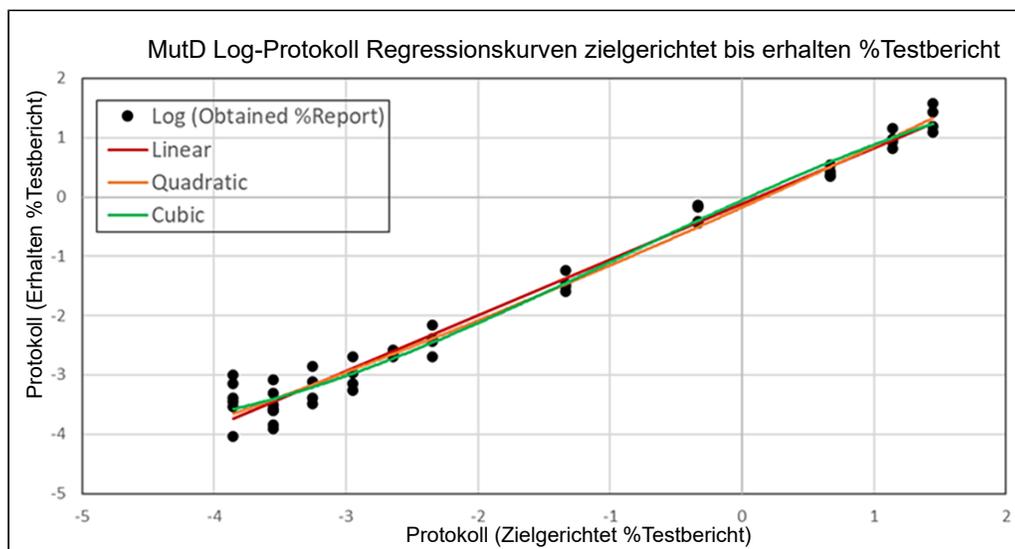


Abbildung 16. Regressionskurven für mutD

Tabelle 4. Zusammenfassung der linearen Bereiche und linearen Modellkoeffizienten

Subtyp	Linearer Bereich	Achsenabschnitt	Anstieg	R <sup>2</sup>
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

Kollektiv zeigte der Xpert NPM1 Mutation Test eine Linearität innerhalb von 0,014–2020 % NPM1-Mutation/ABL. Begrenzt durch den LoQ und die Software-Obergrenze beträgt der berichtbare Dynamikbereich 0,030–500 %.

## 22.2 Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze, Quantifizierungsgrenze, Leerprobengrenze)

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ist die niedrigste NPM1-Mutation/ABL-Konzentration, bei der 95 % der Proben konsistent als „**NPM1-Mutation NACHGEWIESEN [###.###%] (NPM1 Mutation DETECTED [###.###%]**“, berichtet werden. Die LoD wurde individuell für mutA-, mutB- und mutD-Subtypen bestimmt, indem Seriendilutionen von NPM1-Mutation-positiven Zelllysaten und klinischen Lysaten getestet wurden, die jeden Mutations-Subtyp enthielten. Die entsprechenden LoDs wurden nach CLSI EP17-A2 geschätzt und verifiziert<sup>10</sup>. Die resultierenden Analysen lieferten eine LoD von 0,025 % für mutA, 0,023 % für mutB und 0,030 % für mutD (Tabelle 5). Die höchste LoD unter den drei Subtypen bei 0,030 % wird als die allgemeine LoD des Xpert NPM1 Mutation Tests genommen.

Die Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ) ist die niedrigste NPM1-Mutation/ABL-Konzentration, oberhalb derer Proben mit einer Standardabweichung von  $\leq 0,36$  Log-Reduktion (Log Reduction, LR) für mittlere LRs über 3,5 quantifiziert werden können. Nach CLSI EP17-A2<sup>10</sup> wurden die LoQs bei 0,025 % für den mutA Subtyp, 0,023 % für den mutB Subtyp und 0,030 % für den mutD Subtyp geschätzt und verifiziert (Tabelle 5). Die höchste LoQ unter den drei Subtypen bei 0,030 % wird als die allgemeine LoQ des Xpert NPM1 Mutation Tests genommen.

Die Leerprobengrenze (Limit of Blank, LoB) ist das höchste NPM1-Mutation/ABL Ergebnis unter 95 % der leeren Proben von vermutlich NPM1-Mutation-negativen Spendern. Nach CLSI EP17-A2<sup>10</sup>, wurde die LoB des Xpert NPM1 Mutation Tests bei 0,0085 % geschätzt und verifiziert (Tabelle 5).

**Tabelle 5. Nachweisgrenze, Quantifizierungsgrenze und Leerprobengrenze des Xpert NPM1 Mutation Tests [% NPM1 Mutation/ABL]**

Subtyp	LoD [%NPM1 Mutation/ABL]	LoQ [%NPM1 Mutation/ABL]	LoB [%NPM1 Mutation/ABL]
mutA	0,025 %	0,025 %	0,0085 %
mutB	0,023 %	0,023 %	
mutD	0,030 %	0,030 %	

## 22.3 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des Xpert NPM1 Mutation Tests wurde bestimmt, indem EDTA-behandelte periphere Blutproben von fünfundzwanzig gesunden Spendern entnommen wurden.

Das **NACHGEWIESEN (DETECTED)** Ergebnis der NPM1-Mutation wurde von den vermutlich NPM1-Mutation-negativen Proben erhalten, die in dieser Studie beurteilt wurden. Daher ist der Xpert NPM1 Mutation Test spezifisch für die mutanten NPM1-mRNA-Transkripte (Typ A, B und D in Exon 12) in Verbindung mit AML und hat eine analytische Spezifität von 100 % für EDTA periphere Blutproben.

## 22.4 Beurteilung der Kontamination durch Verschleppung

Es wurde eine Studie durchgeführt, um nachzuweisen, dass abgeschlossene GeneXpert Einmal-Kartuschen eine Kontamination durch Verschleppung durch Kartuschen, die nacheinander dasselbe Instrumentenmodul durchlaufen, verhindern. Eine vermutlich NPM1-Mutation-negative Probe wurde nach einer hohen NPM1-Mutation-positiven Probe im gleichen GeneXpert Modul getestet. Das Prüfungsprogramm wurde 10 Mal auf zwei GeneXpert Modulen wiederholt (22 negative und 20 positive insgesamt). Alle Durchläufe der positiven Probe ergaben das erwartete Ergebnis **„NPM1-Mutation ERMITTELT [#.##%]„**, (NPM1 Mutation DETECTED [#.##%]) und alle Durchläufe der negativen Proben ergaben das erwartete Ergebnis **„NPM1-Mutation NICHT ERMITTELT [Ausreichendes ABL Transkript]„**, (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]).

## 22.5 Potenzielle Störsubstanzen

Diese Studie evaluierte fünf Substanzen, die in EDTA-Peripherblutproben vorhanden sein und die Leistung des Tests potenziell stören können. Die getesteten Verbindungen und Konzentrationen (siehe Tabelle 6) basierten auf der Anleitung aus CLSI EP07-ED3<sup>11</sup>. Die Störfaktoren wurden in EDTA-Peripherblutproben getestet, die mit Lysaten kultivierter NPM1-Mutation-positiven Zellen versetzt waren, und zwar in drei Stufen: > 1 %, 0,1-0,5% und negativ. Die Testkontrollen bestanden aus denselben Proben ohne die potenziell störenden Substanzen. Jede Konzentration wurde in Abwesenheit und Anwesenheit der fünf einzelnen Störsubstanzen in 4 Replikaten pro Bedingung getestet. Eine Substanz galt als nicht störend, wenn in ihrer Anwesenheit das beobachtete mittlere prozentuale Verhältnis im Vergleich zur Kontrolle innerhalb der 3-fachen Differenz lag.

Bei keiner der in dieser Studie evaluierten Störsubstanzen wurde eine klinisch signifikante Hemmwirkung auf den Xpert NPM1 Mutation Test beobachtet. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede (p-Wert < 0,05) in den Testbedingungen festgestellt, und die berichteten prozentualen Verhältnisse zwischen Test- und Kontrollbedingungen lagen innerhalb des akzeptablen 3-fachen Bereichs.

**Tabelle 6. Mit dem Xpert NPM1 Mutation getestete potenzielle Störsubstanzen**

Störsubstanzen	Getestete Konzentration
Unkonjugiertes Bilirubin	20 mg/dl
Cholesterin, insgesamt	500 mg/dl
Triglyceride, insgesamt (Lipide)	3000 mg/dl
Heparin	3500 E/l
EDTA (geringes Abnahmevervolumen)	930 mg/dl

## 23 Reproduzierbarkeit und Genauigkeit

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den allgemeinen Grundsätzen des CLSI-Standards EP05-A3 für Multifaktorstudien konzipiert. Sie wurde an drei Standorten durchgeführt. Das Studiendesign umfasste Panelproben mit den Mutationen A, B und D in zwei Konzentrationen. Sieben Panelproben wurden zweifach getestet, zwei Durchläufe pro Tag, insgesamt 6 Tage lang von jedem der beiden Benutzer an drei verschiedenen Standorten (3 Standorte × 2 Benutzer × 3 Chargen × 2 Tage × 2 Durchläufe × 2 Wiederholungen = 144 Testergebnisse/Panelprobe). Die Reproduzierbarkeits- und Genauigkeitsproben wurden von Cepheid vorbereitet und bestehen aus sieben Panelproben, wie angezeigt in Tabelle 7. Die Proben wurden in einer simulierten EDTA-Matrix aus peripherem Blut (PB) hergestellt.

**Tabelle 7. Reproduzierbarkeits- und Genauigkeitsproben**

Panelprobe	Zielsequenz	Konzentration prozentuales Verhältnis (PR)
1	Negativ	n. a.
2	NPM1-Mutation A	Mäßig positiv (~5 %)
3	NPM1-Mutation A	Niedrig positiv (~0,2 %)
4	NPM1-Mutation B	Mäßig positiv (~5 %)
5	NPM1-Mutation B	Niedrig positiv (~0,2 %)
6	NPM1-Mutation D	Mäßig positiv (~5 %)
7	NPM1-Mutation D	Niedrig positiv (~0,2 %)

Die Anzahl der Proben mit gültigen Ergebnissen für jede Panelprobe, die von jedem der beiden Benutzer an drei Standorten analysiert wurden, ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8. Reproduzierbarkeit und Genauigkeit: Anzahl der Proben mit gültigen Ergebnissen**

Panelprobe	Zentrum 1			Zentrum 2			Zentrum 3			Gesamtproben
	Ben. 1	Ben. 2	Zentrum	Ben. 1	Ben. 2	Zentrum	Ben. 1	Ben. 2	Zentrum	
1 Negativ	24/24 <sup>a</sup>	(24/24)	(48/48) <sup>a</sup>	(24/24) <sup>b</sup>	(24/24)	(48/48) <sup>b</sup>	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
2 LR1.3: mut A (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~0,2 %)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24) <sup>c</sup>	(24/24)	(48/48) <sup>c</sup>	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)

<sup>a</sup> Zwei negative Proben hatten gültige, aber nachgewiesene Ergebnisse (FP)

<sup>b</sup> Eine negative Probe hatte ein gültiges, aber nachgewiesenes Ergebnis (FP)

<sup>c</sup> Eine LR 2.7: mut D (Verhältnis von ~0,2 %) Probe hatte ein gültiges, aber nicht nachgewiesenes Ergebnis (FN)

Die quantitativen Ergebnisse wurden mittels genesteter Varianzanalyse (Analysis Of Variance, ANOVA) mit zufälligen Effekten und dem Variationskoeffizienten (CV) analysiert. Die Ergebnisse der ANOVA-Berechnungen für die Standardabweichung und die Varianz für jede positive Probe finden Sie in Tabelle 9. Die Varianz und der prozentuale Anteil der einzelnen Komponenten (Standort/Instrument, Benutzer, Charge, Tag, Durchlauf) an der Gesamtabweichung werden als SDB und prozentualer Anteil der einzelnen Komponenten angegeben.

**Tabelle 9. Ergebnisse des Variationskoeffizienten (CV): Prozentuales Verhältnis (PR)**

Panelprobe	N	Mittel	Zentrum		Ben.		Charge		Tag		Durchlauf		Innerhalb des Assays		Insgesamt	
			SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)
LR1.3: mut A (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~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 (Verhältnis von ~0,2 %)	143 <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup> Eine Probe wurde von Xpert NPM1 nicht nachgewiesen und wurde von der Analyse ausgeschlossen, da keine quantitative Messung erfolgte.

Der prozentuale gesamte Variationskoeffizient (VK) des prozentualen Verhältnisses, der die quantitativen Werte für die mäßig positiven Proben LR1.3: mut A, mut B und mut D (Verhältnis von ~5 %) berichtet, reichte von 21,74 bis 26,23 und für die schwach positiven Proben LR2.7: mut A, mut B und mut D (Verhältnis von ~0,2 %) von 20,68 bis 79,22.

## 24 Literatur

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>. Abgerufen am 16. September 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 (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. Document M29 (siehe aktuellste Ausgabe).
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 Standorte der Cepheid-Zentralen

### Konzernzentrale

Cepheid  
904 Caribbean Drive  
Sunnyvale, CA 94089  
USA

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

### Konzernzentrale in Europa

Cepheid Europe SAS  
Vira Solelh  
81470 Maurens-Scopont  
France

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

## 26 Technische Unterstützung

Halten Sie bitte die folgenden Informationen bereit, wenn Sie den technischen Kundendienst von Cepheid kontaktieren:

- Produktname
- Chargenbezeichnung
- Seriennummer des Instruments
- Fehlermeldungen (falls vorhanden)
- Software-Version und gegebenenfalls Service-Kennnummer (Service Tag Number) des Computers

### Vereinigte Staaten von Amerika

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

### Frankreich

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

Die Kontaktinformationen aller Vertretungen des technischen Kundendienstes von Cepheid finden Sie auf unserer Website:  
[www.cepheid.com/en\\_US/support/contact-us](http://www.cepheid.com/en_US/support/contact-us).

## 27 Symbolerklärung

Symbol	Bedeutung
	Bestellnummer
	CE-Kennzeichnung – Einhaltung der EU-Richtlinien
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Chargencode
	Nicht wiederverwenden
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Herstellungsland
	Inhalt reicht aus für $n$ Tests
	Kontrolle
	Verfallsdatum
	Temperaturbegrenzung
	Biologische Risiken
	Vorsicht
	Entzündbare Flüssigkeiten
	Reproduktions- und Organtoxizität
	Achtung
	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Bevollmächtigter in der Schweiz
	Importeur



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



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



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



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



## 28 Revisionsverlauf

Abschnitt	Beschreibung der Änderung
23	Fehler im Abschnitt „Reproduzierbarkeit und Genauigkeit“ korrigiert.