

Xpert[®] NPM1 Mutation

REF GXNPM1-CE-10

Istruzioni per l'uso

IVD CE

Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright

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

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

© 2022–2023 Cepheid.

Per una descrizione delle modifiche apportate, vedere Sezione 28, Cronologia delle revisioni.

Xpert[®] NPM1 Mutation

Per uso diagnostico *in vitro*

1 Nome registrato

Xpert[®] NPM1 Mutation

2 Nome comune o usuale

Xpert NPM1 Mutation

3 Scopo previsto

3.1 Destinazione d'uso

Il test Xpert NPM1 Mutation, eseguito su Cepheid GeneXpert[®] Dx System, è un test diagnostico *in vitro* per la quantificazione dei trascritti dell'mRNA di NPM1 mutante (tipi A, B e D nell'esone 12) nei campioni di analisi di sangue periferico raccolti da pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA). Il test utilizza una reazione a catena della polimerasi dopo retrotrascrizione real time (RT-PCR) automatizzata e segnala il rapporto percentuale di NPM1 mutante rispetto ai trascritti di mRNA del controllo endogeno ABL1. Il test è previsto come ausilio nel monitoraggio dei pazienti con LMA con NPM1 mutato per quanto riguarda il trascritto dell'mRNA di NPM1 mutante. Il test deve essere utilizzato con altri fattori clinico-patologici.

Il test Xpert NPM1 Mutation non distingue tra i trascritti di NPM1 mutante di tipo A, B o D e non rileva né monitora altri tipi rari di NPM1 mutanti. Questo test non è destinato alla diagnosi di LMA.

3.2 Utilizzatore/ambiente previsto

Il test Xpert NPM1 Mutation deve essere utilizzato in laboratorio da operatori appositamente formati.

4 Riepilogo e spiegazione

La leucemia mieloide acuta (LMA) è un cancro delle cellule staminali ematopoietiche mieloidi del midollo osseo^{1,2} ed è nota per la presenza di varie mutazioni della nucleofosmina (NPM1) nell'esone 12³. L'inserzione di nucleotidi nell'esone 12 causa una mutazione frameshift e crea un segnale di esportazione nucleare (NES). Le mutazioni nel gene NPM1 portano alla localizzazione citoplasmatica aberrante di NPM1 e di proteine che interagiscono con NPM1. NPM1 è uno dei geni più mutati nella LMA e le mutazioni si verificano nel 28%-35% di tutti i casi di LMA. Attualmente, molti farmaci per il trattamento di NPM1 mutato sono oggetto di studio, ma al momento non esistono terapie mirate disponibili approvate dall'FDA.⁴

Il gene NPM1 codifica per la proteina di trasporto nucleare coinvolta nella biologia di centrosomi e ribosomi, nonché nella regolazione di altri sistemi cellulari, compresi i percorsi dei soppressori tumorali. NPM1 è una fosfoproteina nucleolare che funge da trasportatrice fra il nucleo e il citoplasma e regola il trasporto di particelle ribosomiali attraverso la membrana nucleare. Le mutazioni di NPM1 sono state scoperte per la prima volta in individui con LMA seguendo l'osservazione della localizzazione citoplasmatica anomala, anziché la localizzazione nucleare normale. La valutazione genetica dei blasti leucemici unita alla localizzazione citoplasmatica di NPM1, ha portato alla scoperta delle note mutazioni frameshift nell'esone 12.³ Le mutazioni di NPM1 più frequenti sono di tipo A (~75-80%), di tipo B (~10%) e di tipo D (~5%), tutte

nell'esone 12, il che comporta una mutazione frameshift che deriva dall'inserzione di quattro nucleotidi. Nei pazienti con LMA, la mutazione causa una perdita del segnale di localizzazione nucleolare e una localizzazione citoplasmatica aberrante delle proteine.⁵

5 Principio della procedura

Il test Xpert NPM1 Mutation è un saggio automatizzato per la quantificazione dei trascritti della mutazione di NPM1 come un rapporto di mutazione di NPM1/ABL1. Il test viene eseguito su Cepheid GeneXpert Dx System, che automatizza e integra la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici o complessi, usando i saggi di RT-PCR real time e PCR annidata. Il sistema comprende uno strumento, un computer e un software già installato per l'esecuzione dei saggi e la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'uso delle cartucce GeneXpert monouso che contengono i reagenti per RT-PCR e PCR annidata e in cui si svolgono i processi di RT-PCR e PCR annidata. Per una descrizione completa dei sistemi, consultare l'appropriato *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Il test Xpert NPM1 Mutation comprende i reagenti per il rilevamento della mutazione di NPM1 e il trascritto ABL1 come controllo endogeno nei campioni di sangue periferico. La quantità del trascritto della mutazione di NPM1 viene quantificata come il rapporto percentuale di mutazione di NPM1/ABL1. Nel test Xpert NPM1 Mutation ci sono due controlli, il controllo endogeno (ABL1) e il controllo per la verifica della sonda (PCC). Il controllo endogeno ABL1 normalizza il target della mutazione NPM1 e garantisce l'uso di una quantità sufficiente di campione ai fini del saggio. Il PCC verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta PCR e che tutti i componenti della reazione, comprese le sonde e i coloranti, siano presenti e funzionali nella cartuccia.

6 Reagenti e strumenti

6.1 Materiali in dotazione

Il kit Xpert NPM1 Mutation (GXNPM1-CE-10) contiene reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni per il saggio o campioni di controllo qualità. Il contenuto del kit è il seguente:

Xpert NPM1 Mutation Reagenti	10 di ciascuno per kit
Proteinasi K (PK)	10 x 130 µl per flaoncino
Componente	Ingrediente del reagente
Proteinasi K	<5%
Reagente di lisi (LY) (Cloruro di guanidinio)	10 x 5,3 ml per flaoncino
Componente	Ingrediente del reagente
Cloruro di guanidinio	25-50%
Urea	25-50%
Sodio dodecilsolfato	<2%
Reagente di lavaggio	10 x 2,9 ml per fiala
Componente	Ingrediente del reagente
Etanolo	<50%
Tiocianato di guanidinio	<50%

Cartucce Xpert NPM1 Mutation con provette di reazione integrate		10 per kit
Componente	Ingrediente del reagente	Quantità
Microsfera 1 (liofilizzata)	Enzima: Taq polimerasi DNA <50 U/ microsfera	1 per cartuccia
	dNTP <0,05%	
Microsfera 2 (liofilizzata)	Primer e sonde <0,005%	1 per cartuccia
Microsfera 3 (liofilizzata)	Primer e sonde <0,005%	1 per cartuccia
Microsfera 4 (liofilizzata)	Enzima: Taq polimerasi DNA <50 U/ microsfera	1 per cartuccia
	dNTP <0,05%	
Reagente di risciacquo	Cloruro di potassio <4%	2 ml per cartuccia
	Azoturo di sodio <0,1%	
	Polietilenglicole <40%	
	Tween 20 <0,2%	
Reagente di eluizione	Base Trizma <0,3%	2,5 ml per cartuccia
	Trizma cloridrato <0,1%	
	Azoturo di sodio <0,05%	

CD**1 per kit**

- File di definizione del saggio (ADF)
- Istruzione per l'importazione degli ADF nel software GeneXpert
- Istruzioni per l'uso (IFU)

Nota

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

Nota

Le Schede dati con i certificati di analisi e le specifiche dei lotti sono disponibili attraverso il Supporto Tecnico di Cepheid.

7 Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert Dx System (il numero di catalogo varia in base alla configurazione): strumento GeneXpert, computer, lettore di codici a barre e manuale dell'operatore.
- Per GeneXpert Dx System: software GeneXpert Dx versione 6.2 o superiore.
- Stampante: se fosse necessaria una stampante, contattare il supporto tecnico di Cepheid per predisporre l'acquisto di una stampante consigliata.
- Miscelatore vortex
- Microcentrifuga (almeno 1000 x g)
- Pipette e puntali per pipette con filtro aerosol
- Provette coniche da 50 ml
- Etanolo assoluto di grado reagente
- 1x PBS, pH 7,4

8 Conservazione e manipolazione

- Conservare il contenuto del kit Xpert NPM1 Mutation a 2–8 °C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.
- Aprire il coperchio della cartuccia solo quando si è pronti per l'esecuzione del test.
- Non usare le cartucce oltre la data di scadenza.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.
- Il reagente di lavaggio è un liquido trasparente e incolore. Non usare il reagente di lavaggio se appare torbido o scolorito.
- Venti (20) minuti prima di iniziare la procedura, togliere il campione di sangue, la cartuccia e i reagenti di preparazione del campione dal sito di conservazione per consentire loro di raggiungere la temperatura ambiente (20 °C – 30 °C).

9 Avvertenze e precauzioni

9.1 Avvertenze di carattere generale

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Tutti i campioni biologici, comprese le cartucce e i reagenti usati, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché, nella maggior parte dei casi, è impossibile distinguere i potenziali veicoli di infezione, tutti i campioni biologici devono essere trattati attenendosi alle precauzioni standard.
- Le linee guida per il trattamento dei campioni sono disponibili presso l'ente statunitense per la prevenzione e il controllo delle malattie (U.S. Centers for Disease Control and Prevention)⁶ e l'istituto per gli standard clinici e di laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute).⁷
- Durante il trattamento di sostanze chimiche e la manipolazione di campioni biologici, rispettare le procedure di sicurezza previste dalla struttura sanitaria di appartenenza.
- Le caratteristiche prestazionali di questo test sono state stabilite solo con sangue raccolto in provette con EDTA. Il funzionamento del saggio non è stato valutato con altri tipi di campioni.
- L'affidabilità dei risultati dipende dall'uso di adeguate modalità di prelievo, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni. Un campione che sia stato prelevato, manipolato o conservato in modo improprio, un errore tecnico, lo scambio di campioni o la presenza di trascritto target nel campione di analisi inferiore al limite di rilevamento del saggio possono produrre risultati erranei. La stretta osservanza di queste Istruzioni per l'uso e di *GeneXpert Dx System Operator Manual* sono necessari per evitare risultati erranei.
- L'esecuzione del test Xpert NPM1 Mutation con intervalli della temperatura e tempi di conservazione del kit o dei campioni diversi da quelli consigliati può generare risultati erranei o non validi.
- I campioni biologici, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi, che richiedono precauzioni standard. Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali. Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto smaltimento, i campioni biologici e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici.⁸

9.2 Campione di analisi

- Mantenere le condizioni di conservazione corrette per garantire l'integrità del campione (vedere Sezione 11, Prelievo e conservazione dei campioni di analisi). La stabilità dei campioni di analisi in condizioni di spedizione diverse da quelle consigliate non è stata valutata.
- Non congelare il campione di analisi di sangue periferico EDTA.
- Un prelievo, una conservazione e un trasporto corretti del campione di analisi sono essenziali ai fini dell'affidabilità dei risultati.

9.3 Test/Reagente

- Non sostituire i reagenti del test Xpert NPM1 Mutation con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia Xpert NPM1 Mutation tranne che per aggiungere il campione e il reagente di lavaggio.
- Non utilizzare una cartuccia che sia caduta dopo essere stata estratta dalla confezione.

- Non agitare la cartuccia. Se la cartuccia cade o viene agitata dopo l'apertura del coperchio, si potrebbero ottenere risultati non validi.
- Non applicare l'etichetta con l'ID campione (Sample ID) sul coperchio o sull'etichetta del codice a barre della cartuccia.
- Non utilizzare una cartuccia che presenta l'etichetta del codice a barre danneggiata.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione è danneggiata.
- Si raccomanda che le cartucce Xpert NPM1 Mutation siano a temperatura ambiente (20 °C – 30 °C) quando vengono utilizzate per i test.
- Ciascuna cartuccia monouso Xpert NPM1 Mutation viene utilizzata per l'esecuzione di un solo saggio. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Trasferire l'intero contenuto di una (1) fiala del reagente di lavaggio nella camera del reagente di lavaggio. Non aggiungere il reagente di lavaggio potrebbe causare un risultato **NON RILEVATO (NOT DETECTED)** falso.
- Non riutilizzare puntali per pipette.
- Non usare la cartuccia se appare umida o se sembra che il sigillo del coperchio sia stato rotto.
- Non utilizzare una cartuccia Xpert NPM1 Mutation se è stato aggiunto un reagente nell'apertura errata.
- Non aprire le cartucce Xpert NPM1 Mutation dopo il completamento del saggio.
- Assegnare un set di pipette e reagenti esclusivamente alla preparazione dei campioni.
- Indossare camice da laboratorio e guanti puliti. Cambiare i guanti tra una manipolazione e l'altra di ciascun campione.
- In caso di fuoriuscita di campioni o di controlli, indossare dei guanti e assorbire la fuoriuscita con salviette di carta. Pulire, quindi, accuratamente l'area contaminata con una soluzione contenente candeggina per uso domestico diluita in rapporto 1:10 appena preparata. La concentrazione finale di cloro attivo deve essere dello 0,5%, indipendentemente dalla concentrazione della candeggina per uso domestico in uso nel proprio Paese. Prevedere un tempo di contatto minimo di due minuti.
- Accertarsi che l'area di lavoro sia asciutta prima di utilizzare l'etanolo denaturato al 70% per rimuovere i residui di candeggina. Lasciare asciugare completamente la superficie prima di proseguire. In alternativa, seguire le prassi standard del proprio istituto previste in caso di contaminazione o fuoriuscita. Per le apparecchiature, seguire le raccomandazioni del produttore per la decontaminazione.

10 Pericoli chimici

Nota

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

- Pittogramma di pericolo CLP/GHS: 
- Parola: PERICOLO
- **Indicazioni di pericolo UN GHS**
 - Liquido e vapori facilmente infiammabili H225.
 - Provoca irritazione cutanea H315.
 - Provoca grave irritazione oculare H319.
 - Può provocare sonnolenza o vertigini H336.
 - Sospettato di provocare alterazioni genetiche H341.
- **Fraasi di prudenza UN GHS**
 - **Prevenzione**
 - Prima dell'uso, consultare la Scheda dati di sicurezza per le istruzioni specifiche.
 - Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
 - Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. Non fumare.
 - Tenere il recipiente ben chiuso.
 - Evitare di respirare la nebbia/i vapori/l'aerosol.
 - Lavare accuratamente dopo l'uso.
 - Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.
 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
 - Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto.
 - **Risposta**

- In caso di INCENDIO: usare mezzi di estinzione appropriati.
- IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infornato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
- In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
- IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
- Trattamento specifico (vedere le informazioni supplementari di pronto soccorso).
- Togliere di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
- In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
- IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
- Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico.
- IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico.
- **Stoccaggio/Smaltimento**
 - Conservare in luogo fresco.
 - Conservare in luogo ben ventilato.
 - Tenere il recipiente ben chiuso.
 - Conservare sotto chiave.
 - Smaltire prodotto e/o recipiente in conformità con normative locali, regionali, nazionali e/o normative internazionali.

11 Prelievo e conservazione dei campioni di analisi

- I campioni di sangue periferico devono essere raccolti in provette con EDTA attenendosi alle linee guida della struttura sanitaria. Il plasma non deve essere separato dalle cellule.
- I campioni devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per non più di 3 giorni (72 ore) prima del test.
- Un prelievo e una conservazione corretti dei campioni di analisi sono essenziali per il funzionamento del saggio. La stabilità dei campioni di analisi in condizioni di conservazione diverse da quelle consigliate nell'elenco riportato nella Sezione 12 (Procedura) non è stata valutata con il test Xpert NPM1 Mutation.

12 Procedura

12.1 Operazioni preliminari

Venti (20) minuti prima di iniziare la procedura, togliere il campione ematico, i reagenti di preparazione dei campioni e le cartucce dal sito di conservazione refrigerato per consentire loro di raggiungere la temperatura ambiente. Agitare brevemente il reagente Proteinasi K (PK) in una microcentrifuga.

Importante Iniziare il saggio entro 1 ora dall'aggiunta alla cartuccia del campione trattato con il reagente per il campione.

Importante Rimuovere la cartuccia dalla confezione di cartone prima della preparazione del campione (fare riferimento alla Sezione 12.3, Preparazione della cartuccia).

12.2 Preparazione del campione

12.2.1 Preparazione di un campione con un conteggio di globuli bianchi (WBC) sconosciuto o campioni con meno di 30 milioni di WBC/ml

1. Sul fondo di una nuova provetta conica da 50 ml con etichetta, aggiungere 100 µl di Proteinasi K (PK).
2. Accertarsi di miscelare bene il campione di sangue capovolgendo la provetta di raccolta ematica per 8 volte immediatamente prima del pipettaggio. Consultare le istruzioni del produttore per la provetta di raccolta del sangue EDTA.
3. Alla provetta che contiene già PK, aggiungere 4 ml di campione di sangue.

4. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 3 secondi.
5. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto.
6. Aggiungere 2,5 ml di reagente di lisi (LY) alla stessa provetta.

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

7. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
8. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
9. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
10. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
11. Miscelare il campione picchiando 10 volte la parte inferiore della provetta.
12. Trasferire 1 ml del lisato preparato in una nuova provetta conica da 50 ml con etichetta.

Nota È possibile conservare il lisato residuo a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 48 ore oppure conservarlo a -20 °C o a una temperatura inferiore fino 1 mese.

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

12.2.2 Preparazione del campione con un conteggio di globuli bianchi uguale o maggiore di 30 milioni globuli bianchi/ml

1. Sul fondo di una nuova provetta conica da 50 ml, aggiungere 100 µl di PK.
2. Accertarsi di miscelare bene il campione di sangue capovolgendo la provetta di raccolta ematica per 8 volte immediatamente prima del pipettaggio. Consultare le istruzioni del produttore per la provetta di raccolta del sangue EDTA.
3. Alla provetta che contiene già PK, aggiungere 250 µl di campione di sangue e 3,75 ml di 1xPBS (pH 7,4, fornito dall'utilizzatore).
4. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 3 secondi.
5. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto.
6. Seguire i Passaggi 6-17 nella Sezione 12.2.1 per preparare il lisato finale.
7. Gettare i reagenti PK o LY rimasti.

12.3 Preparazione della cartuccia

Per inserire il campione nella cartuccia Xpert NPM1 Mutation:

1. Rimuovere la cartuccia dalla confezione di cartone.
2. Controllare che la cartuccia non sia danneggiata. Se danneggiata, non utilizzarla.
3. Aprire la cartuccia sollevandone il coperchio e trasferire l'intero contenuto di una (1) fiala di reagente di lavaggio nella camera del reagente di lavaggio (con apertura piccola). Vedere la Figura 1.
4. Pipettare l'intero contenuto del campione preparato (4,5 ml) nella camera per il campione (apertura grande). Vedere la Figura 1.

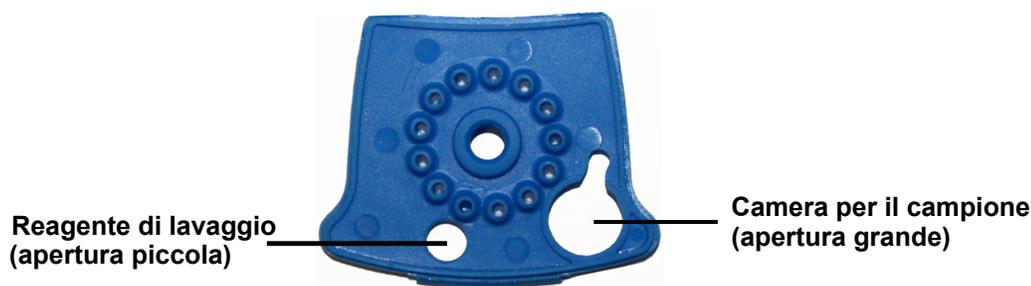


Figura 1. Cartuccia Xpert NPM1 Mutation (vista dall'alto)

5. Chiudere il coperchio della cartuccia. Accertarsi che il coperchio sia bloccato in posizione. Avviare il saggio (vedere la Sezione 12.4, Inizio del saggio).

12.4 Inizio del saggio

Importante Prima di iniziare il saggio, assicurarsi che il sistema stia eseguendo il software GeneXpert Dx versione 6.2 o superiore e che nel software sia stato importato il file di definizione del saggio corretto. In questa sezione sono riportati i passaggi predefiniti per il funzionamento del GeneXpert Dx System.

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

1. Accendere il sistema GeneXpert avviando prima lo strumento GeneXpert Dx, poi il computer. Il software GeneXpert Dx si avvierà automaticamente, oppure potrà essere necessario fare doppio clic sull'icona del collegamento del software GeneXpert Dx sul desktop di Windows®.
2. Effettuare l'accesso al software GeneXpert inserendo il nome utente e la password.
3. Nella finestra del **sistema GeneXpert**, fare clic su **Crea analisi (Create Test)** (GeneXpert Dx). Viene visualizzata la finestra **Crea analisi (Create Test)**.
4. Eseguire la scansione dell'ID paziente (Patient ID) o digitarlo. Se l'ID paziente (Patient ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID paziente (Patient ID) è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra **Visualizza risultati (View Results)** e in tutti i rapporti. Verrà visualizzata la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre dell'ID campione (Scan Sample ID Barcode)**.
5. Inserire l'ID campione (Sample ID) tramite scansione o manualmente. Se l'ID campione (Sample ID) viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID campione (Sample ID) viene visualizzato sul lato sinistro della finestra **Visualizza risultati (View Results)** e su tutti i rapporti. Si aprirà la finestra di dialogo **Esegui scansione del codice a barre della cartuccia (Scan Cartridge Barcode)**.
6. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia di Xpert NPM1 Mutation. Utilizzando le informazioni contenute nel codice a barre, il software compila automaticamente le caselle relative ai seguenti campi: ID lotto reagente (Reagent Lot ID), N/S cartuccia (Cartridge SN) e Data di scadenza (Expiration Date).

Nota Se non si riesce a eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia Xpert NPM1 Mutation, ripetere il saggio con una cartuccia nuova. Se è stata eseguita la scansione del codice a barre della cartuccia nel software e il file di definizione del saggio non è disponibile, apparirà una schermata in cui si indica che il file di definizione del saggio non è stato caricato nel sistema. Se compare tale schermata, contattare il Supporto Tecnico di Cepheid.

7. Fare clic su **Avvia test (Start Test)**. Potrebbe essere necessario digitare la password nella finestra di dialogo visualizzata.
8. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
9. Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde smette di lampeggiare. Al termine del saggio, la spia si spegne.
10. Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo, quindi rimuovere la cartuccia.
11. Smaltire le cartucce usate nell'apposito contenitore dei rifiuti dei campioni attenendosi alla prassi standard del proprio istituto.

Nota Il tempo necessario per ottenere il risultato è inferiore a 3 ore (circa 30 minuti di preparazione del campione esterno alla cartuccia e meno di 2,5 ore di esecuzione del saggio).

13 Visualizzazione e stampa dei risultati

In questa sezione sono elencati i passaggi principali per la visualizzazione e la stampa dei risultati. Per istruzioni più dettagliate sulla visualizzazione e la stampa dei risultati, consultare il *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

- Per visualizzare i risultati, fare clic sull'icona **Visualizza risultati (View Results)**.
- A completamento del saggio, fare clic sul pulsante **Rapporto (Report)** nella schermata **Visualizza risultati (View Results)** per visualizzare e/o generare un file del rapporto in formato PDF.

14 Controllo qualità

Ciascuna cartuccia contiene un controllo endogeno ABL1 e un controllo per la verifica della sonda (PCC).

Controllo endogeno ABL1 — Il controllo endogeno ABL1 verifica che con il saggio venga utilizzato un campione sufficiente. Questo controllo rileva inoltre l'inibizione del saggio di PCR real time associata ai campioni. L'ABL1 si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione assegnati.

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

15 Interpretazione dei risultati

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

Tabella 1. Risultati e interpretazione del test Xpert NPM1 Mutation

Risultato	Interpretazione
<p>Mutazione di NPM1 RILEVATA (NPM1 Mutation DETECTED)</p> <p>Vedere Figura 2, Figura 3, Figura 4</p>	<p>È stato rilevato un trascritto con mutazione di NPM1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mutazione di NPM1 RILEVATA (NPM1 Mutation DETECTED) – il trascritto della mutazione di NPM1 è stato rilevato con un ciclo soglia (Ct) che rientra nell'intervallo di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Possibili risultati rilevati: <ul style="list-style-type: none"> • MUTAZIONE DI NPM1 RILEVATA [##,##%] (NPM1 MUTATION DETECTED [##.##%]); Figura 2. • MUTAZIONE DI NPM1 RILEVATA [sopra il LoQ superiore] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ]); Figura 3. • MUTAZIONE DI NPM1 RILEVATA [inferiore al LoD; <#.###%] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <#.###%]); Figura 4. • ABL AMMESSO (PASS) – il trascritto di ABL è stato rilevato con un ciclo soglia (Ct) che rientra nell'intervallo di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>Mutazione di NPM1 NON RILEVATA (NPM1 Mutation NOT DETECTED)</p> <p>Vedere la Figura 5</p>	<p>Non è stato rilevato alcun trascritto della mutazione di NPM1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mutazione di NPM1 NON RILEVATA [trascritto di ABL sufficiente] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]) – Il trascritto della mutazione di NPM1 non è stato rilevato e ha un ciclo soglia (Ct) pari a zero o sopra il limite superiore del range valido e/o un endpoint inferiore all'impostazione della soglia. • ABL AMMESSO (PASS) – il trascritto di ABL è stato rilevato con un ciclo soglia (Ct) che rientra nell'intervallo di validità e un endpoint superiore alla soglia impostata. • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
<p>NON VALIDO (INVALID)</p> <p>Vedere Figura 6, Figura 7, Figura 8, Figura 9, Figura 10</p>	<p>Il livello del trascritto della mutazione di MPN1 non può essere determinato in quanto il campione contiene una quantità eccessiva di trascritto della mutazione di MPN1 e/o trascritto ABL eccessivo o insufficiente. Per ulteriori istruzioni su come ripetere il test del campione di analisi, consultare la Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mutazione di NPM1 NON VALIDA (NPM1 Mutation INVALID) – Il ciclo soglia (Ct) di NPM1 era maggiore di zero e sotto al limite inferiore del range valido (Figura 8, Figura 9) • ABL RESPINTO (FAIL) – Il valore ciclo soglia (Ct) di ABL non rientrava nell'intervallo di validità oppure l'endpoint era inferiore alla soglia impostata (Figura 6, Figura 7, Figura 8, Figura 10) • Verifica della sonda – AMMESSO (PASS); tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

Risultato	Interpretazione
<p>ERRORE (ERROR) Vedere la Figura 11</p>	<p>Non è possibile determinare il livello di trascritto della mutazione di NPM1. Per ulteriori istruzioni su come ripetere il test del campione di analisi, consultare la Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● NESSUN RISULTATO (NO RESULT) per la mutazione di NPM1 ● ABL - NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● Verifica della sonda – RESPINTO (FAIL): uno o tutti i risultati della verifica della sonda non sono validi. ● Verifica della sonda AMMESSO (PASS) o N/A (non applicabile) e Annulla per pressione (Pressure Abort).* <p>*Se la verifica della sonda è riuscita, l'errore è derivato dal superamento del limite massimo di pressione rispetto all'intervallo accettabile oppure dal guasto di un componente del sistema.</p>
<p>NESSUN RISULTATO (NO RESULT)</p>	<p>Non è possibile determinare il livello di trascritto della mutazione di NPM1. La quantità di dati raccolta non è sufficiente per generare un risultato del saggio. Una simile evenienza potrebbe verificarsi, per esempio, qualora l'operatore interrompesse l'esecuzione di un saggio in corso. Per ulteriori istruzioni su come ripetere il test dei campioni di analisi, consultare la Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● NESSUN RISULTATO (NO RESULT) per la mutazione di NPM1 ● ABL - NESSUN RISULTATO (NO RESULT) ● Verifica della sonda – NA (non applicabile)

16 Risultati quantitativi

Gli output quantitativi di Xpert NPM1 Mutation vengono forniti come rapporto percentuale di mutazione NPM1/ABL1. Ai kit vengono assegnati valori di efficienza ($E_{\Delta Ct}$) e di fattore di scala (SF) specifici del lotto che legano la quantificazione dei trascritti della mutazione di NPM1 (A, B e D) e di ABL1 ai numeri copia degli standard primari dell'RNA trascritto *in vitro* (IVT-RNA) della mutazione sintetica di NPM1 e ABL1.

Tabella 2. Esempi di Risultati del test Xpert NPM1 Mutation

Saggio	NPM1 mutante		ABL		Xpert NPM1 Mutation Risultati del test	Note
	Ct	Risultato ^a	Ct	Risultato ^a		
1	5,2	NON VALIDO (INVALID)	5,8	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO [trascritti della mutazione di NPM1 e di ABL troppo elevati] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcripts])	NA
2	9	NON VALIDO (INVALID)	5,5	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO [Trascritti di ABL troppo elevati] (INVALID [Too high ABL transcripts])	NA
3	5,5	NON VALIDO (INVALID)	8,5	AMMESSO (PASS)	NON VALIDO [trascritti della mutazione NPM1 troppo elevati] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcripts])	NA
4	25,0	NON VALIDO (INVALID)	21,8	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO [trascritto ABL insufficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	NA
5	0	NON VALIDO (INVALID)	0	RESPINTO (FAIL)	NON VALIDO [Nessun trascritto ABL] (INVALID [No ABL transcript])	NA
6	8,5	POS	13,6	AMMESSO (PASS)	Mutazione di NPM1 RILEVATA [sopra il LoQ superiore] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])	NA
7	22,5	POS	14,8	AMMESSO (PASS)	Mutazione di NPM1 RILEVATA [1,05%] (NPM1 Mutation DETECTED) [1.05%]	Valore riportato: 1,05%
8	27,9	POS	14,0	AMMESSO (PASS)	Mutazione di NPM1 RILEVATA [inferiore al LoD; <0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])	NA
9	0	NEG	14,6	AMMESSO (PASS)	NEGATIVO [Trascritto ABL sufficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	NA
10	0	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	0	NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	ERRORE (ERROR)	Ad esempio, Errore 5017 Verifica della sonda [ABL] non riuscita ([ABL] probe check failed)

^a Per i dettagli, consultare la scheda Risultati degli analiti nel software del sistema GeneXpert Dx.

16.1 Mutazione di NPM1 RILEVATA [#,##]% (NPM1 Mutation DETECTED [#,##]%)

La mutazione di NPM1 è stata rilevata a un livello di #,##%.

Per un risultato “**Mutazione di NPM1 RILEVATA [#,##%] (NPM1 Mutation DETECTED [#,##%])**”, la mutazione di NPM1 è rilevabile con il Ct della mutazione di NPM1 maggiore o uguale a “6” e minore o uguale a “32” e il Ct di ABL maggiore o uguale a “6” e minore di o uguale a “20”. Il software GeneXpert calcola la % tramite la seguente equazione, in cui il valore Delta Ct (ΔCt) si ottiene da Ct ABL meno Ct mutazione NPM1:

$$\% = E_{\Delta Ct}^{\Delta Ct} \times 100 \times \text{fattore di scala}$$

Il fattore di scala (SF) è un parametro specifico del lotto, incorporato nel codice a barre della cartuccia del saggio.

Nota Il valore di questo fattore e dell'efficienza del saggio specifica del lotto ($E_{\Delta Ct}$) vengono determinati in un'analisi del controllo qualità di ogni lotto di saggi con gli standard primari calibrati ai numeri copia dei calibratori sintetici dell'RNA trascritto *in vitro* (IVT-RNA) della mutazione di NPM1 e ABL1 per la quantificazione del trascritto della mutazione di NPM1. L' $E_{\Delta Ct}$ è impostata su 1,95 e il valore SF è impostato su 1,79 per l'uso nell'esempio indicato qui.

Esempio: $E_{\Delta Ct}$ specifica del lotto = 1,95; SF = 1,79
 Ct di ABL del saggio = 14,5; Ct della mutazione di NPM1 = 17,1; ΔCt = -2,6
 $\% = 1,95^{(-2,6)} \times 100 \times 1,79 = 31,53\%$

Risultato: **Mutazione di NPM1 RILEVATA [31,53%] (NPM1 Mutation DETECTED) [31.53%]** Vedere la Figura 2.

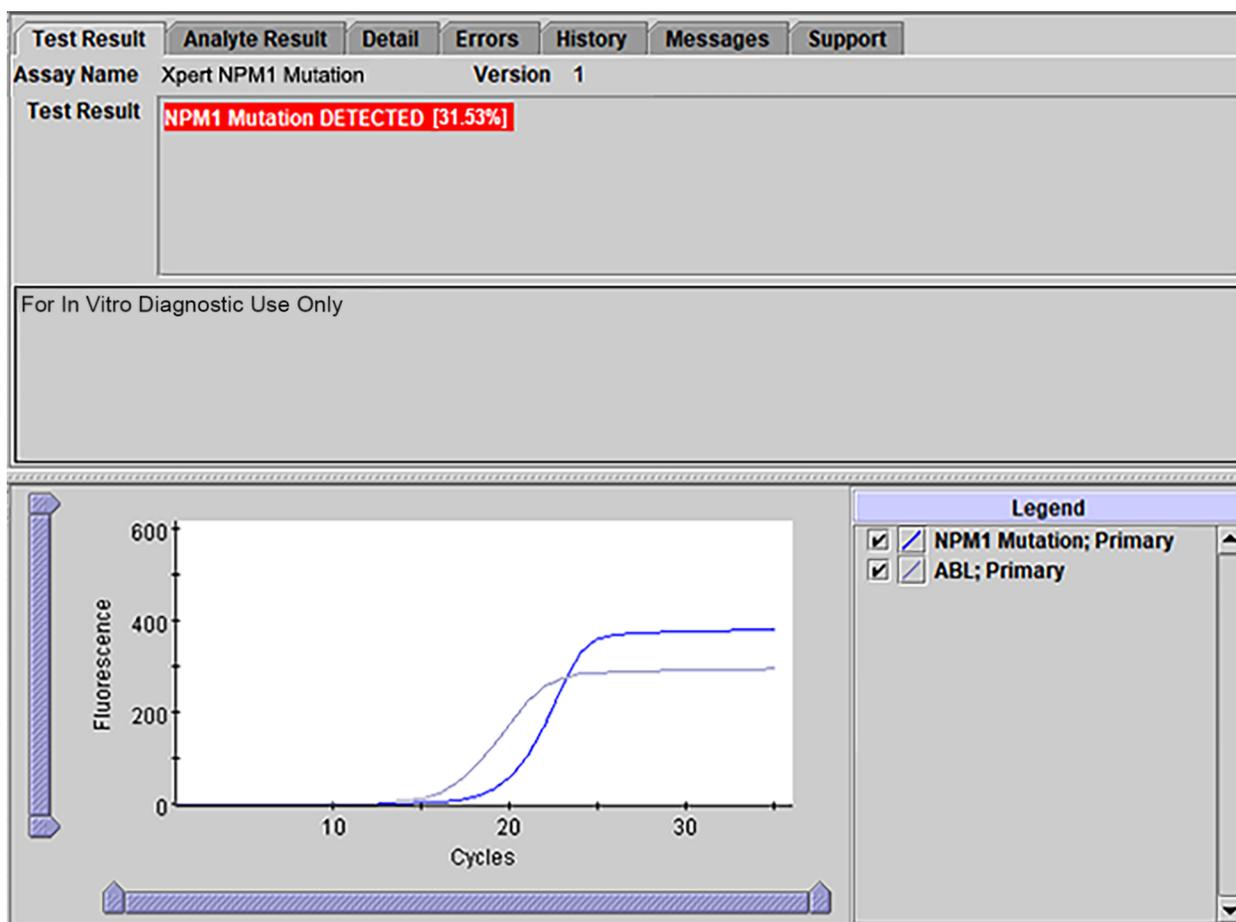


Figura 2. Finestra di visualizzazione dei risultati di GeneXpert Dx: Mutazione di NPM1 RILEVATA (NPM1 Mutation DETECTED) [31,53%]

16.2 Mutazione di NPM1 RILEVATA [sopra il LoQ superiore] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

La mutazione di NPM1 è stata rilevata a un livello >500%.

Per un risultato “**Mutazione di NPM1 RILEVATA [sopra il LoQ superiore] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])**”, la mutazione di NPM1 è individuabile con il Ct della mutazione di NPM1 maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “32” e il Ct di ABL maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20”. Il software GeneXpert calcola la % tramite la seguente equazione, in cui il valore Delta Ct (ΔCt) si ottiene da Ct ABL meno Ct mutazione NPM1:

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

Nota Il fattore di scala (SF) è un parametro specifico del lotto, incorporato nel codice a barre della cartuccia del saggio. Il valore di questo fattore e dell'efficienza del saggio specifica del lotto ($E_{\Delta Ct}$) vengono determinati in un'analisi del controllo qualità di ogni lotto di saggi con gli standard primari calibrati ai numeri copia dei calibratori sintetici dell'RNA trascritto *in vitro* (IVT-RNA) della mutazione di NPM1 e ABL1 per la quantificazione del trascritto della mutazione di NPM1. L' $E_{\Delta Ct}$ è impostata su 1,95 e il valore SF è impostato su 1,79 per l'uso nell'esempio indicato qui.

Esempio: $E_{\Delta Ct}$ specifica del lotto = 1,95; SF = 1,79
Ct di ABL del saggio = 13,4; Ct della mutazione di NPM1 = 10,2; ΔCt = 3,2
 $\% = 1,95^{(3,2)} \times 100 \times 1,79 = 1516,92\%$ è maggiore del LoQ superiore del saggio definito a 500%

Risultato: **Mutazione di NPM1 RILEVATA [sopra il LoQ superiore] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ]).** Vedere la Figura 3.

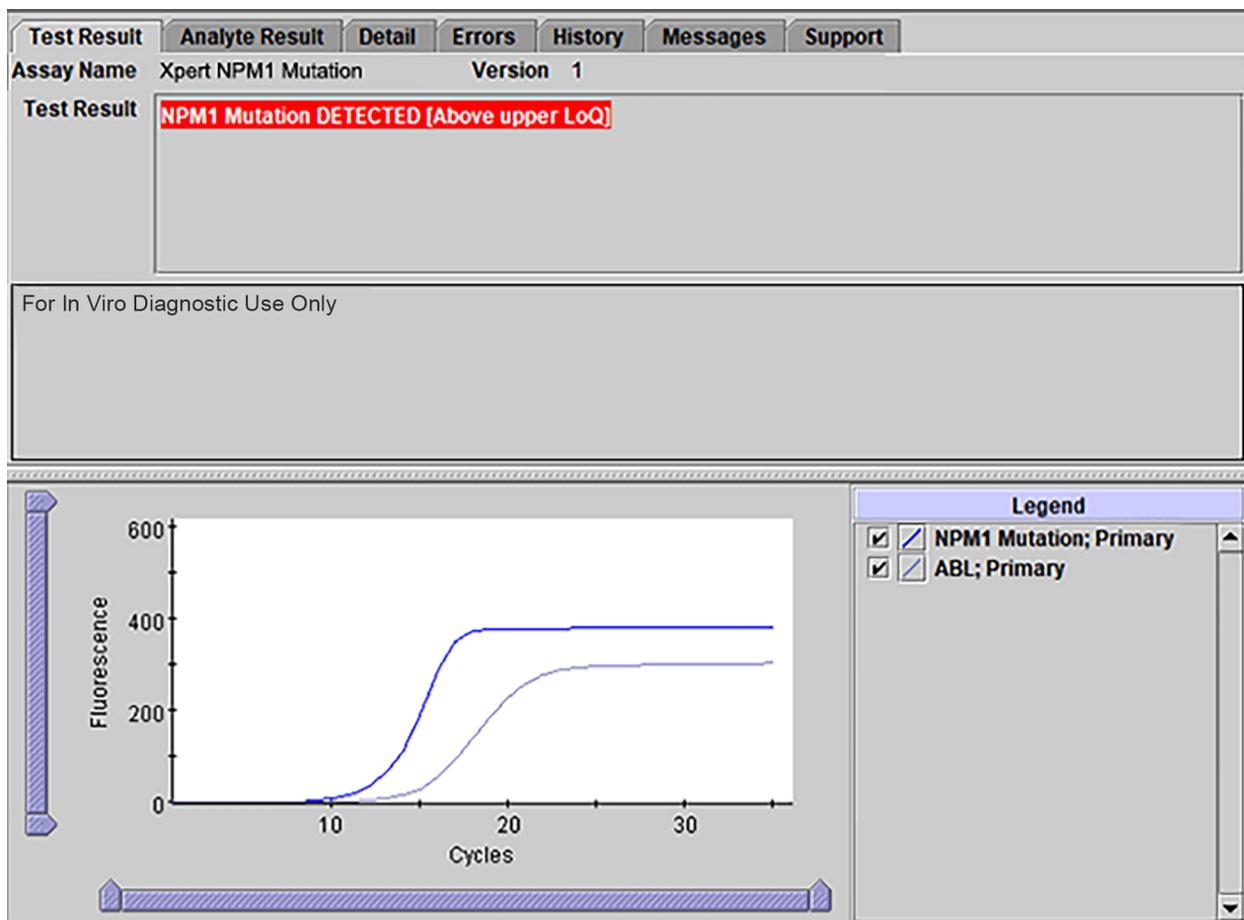


Figura 3. Finestra di visualizzazione dei risultati di GeneXpert Dx: Mutazione di NPM1 RILEVATA [sopra il LoQ superiore] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

16.3 Mutazione di NPM1 RILEVATA [inferiore al LoD; <0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

La mutazione di NPM1 è stata rilevata a un livello di <0,030%.

Per un risultato “**Mutazione di NPM1 RILEVATA [inferiore al LoD; <0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])**”, la mutazione di NPM1 è rilevabile con il Ct della mutazione di NPM1 maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “32” e il Ct di ABL maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20”. Il software GeneXpert calcola la % tramite la seguente equazione, in cui il valore Delta Ct (ΔCt) si ottiene da Ct ABL meno Ct mutazione NPM1:

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

Il fattore di scala (*SF*) è un parametro specifico del lotto, incorporato nel codice a barre della cartuccia del saggio. Il valore di questo fattore e dell'efficienza del saggio specifica del lotto ($E_{\Delta Ct}$) vengono determinati in un'analisi del controllo qualità di ogni lotto di saggi con gli standard primari calibrati ai numeri copia dei calibratori sintetici dell'RNA trascritto *in vitro* (IVT-RNA) della mutazione di NPM1 e ABL1 per la quantificazione del trascritto della mutazione di NPM1. L' $E_{\Delta Ct}$ è impostata su 1,95 e il valore *SF* è impostato su 1,79 per l'uso nell'esempio indicato qui.

Nota

Esempio: $E_{\Delta Ct}$ specifica del lotto = 1,95; *SF* = 1,79
 Ct di ABL del saggio = 14,3; Ct della mutazione di NPM1 = 28,8; $\Delta Ct = -14,5$
 $\% = 1,95^{(-14,5)} \times 100 \times 1,79 = 0,011\%$ è minore del LoD del saggio definito allo 0,030%

Risultato: **Mutazione di NPM1 RILEVATA [inferiore al LoD; <0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])**. Vedere la Figura 4.

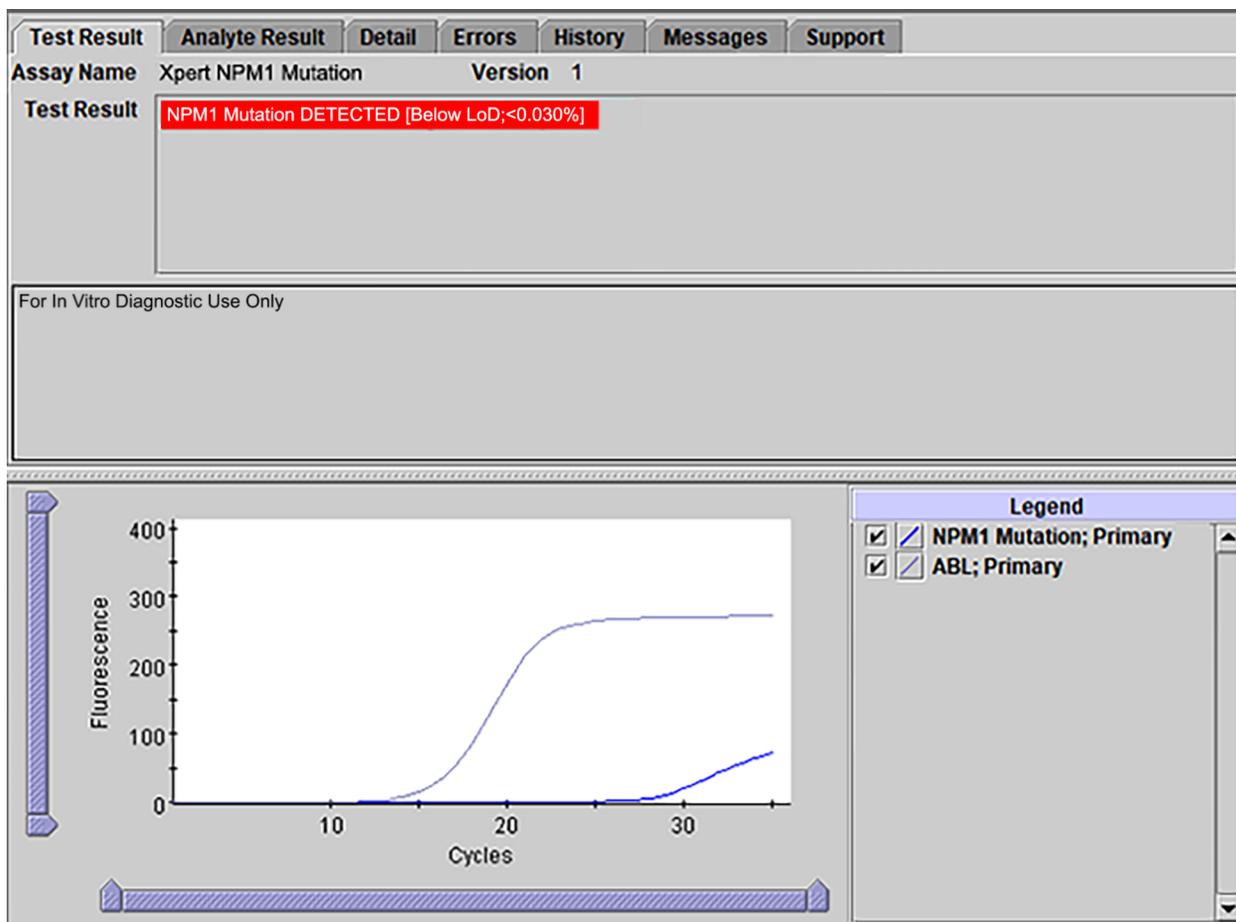


Figura 4. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert: Mutazione di NPM1 RILEVATA [inferiore al LoD; <0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

16.4 Mutazione di NPM1 NON RILEVATA (trascritto di ABL sufficiente) (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

La mutazione NPM1 non è stata rilevata con Ct NPM1 uguale a “0” o maggiore di “32” e Ct ABL maggiore di “6” e minore o uguale a “20”.

Il software GeneXpert necessita che il Ct di ABL sia maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20” per il test Xpert NPM1 Mutation, per assicurarsi di ottenere “Trascritto di ABL sufficiente (Sufficient ABL transcript)”. Vedere la Sezione 15, Interpretazione dei risultati, Tabella 1.

Esempio: Ct della mutazione di NPM1 del saggio = 0; Ct di ABL = 14,0 (tra “6” e “20”).

Risultato: **Mutazione di NPM1 NON RILEVATA [trascritto di ABL sufficiente] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]).** Vedere la Figura 5.

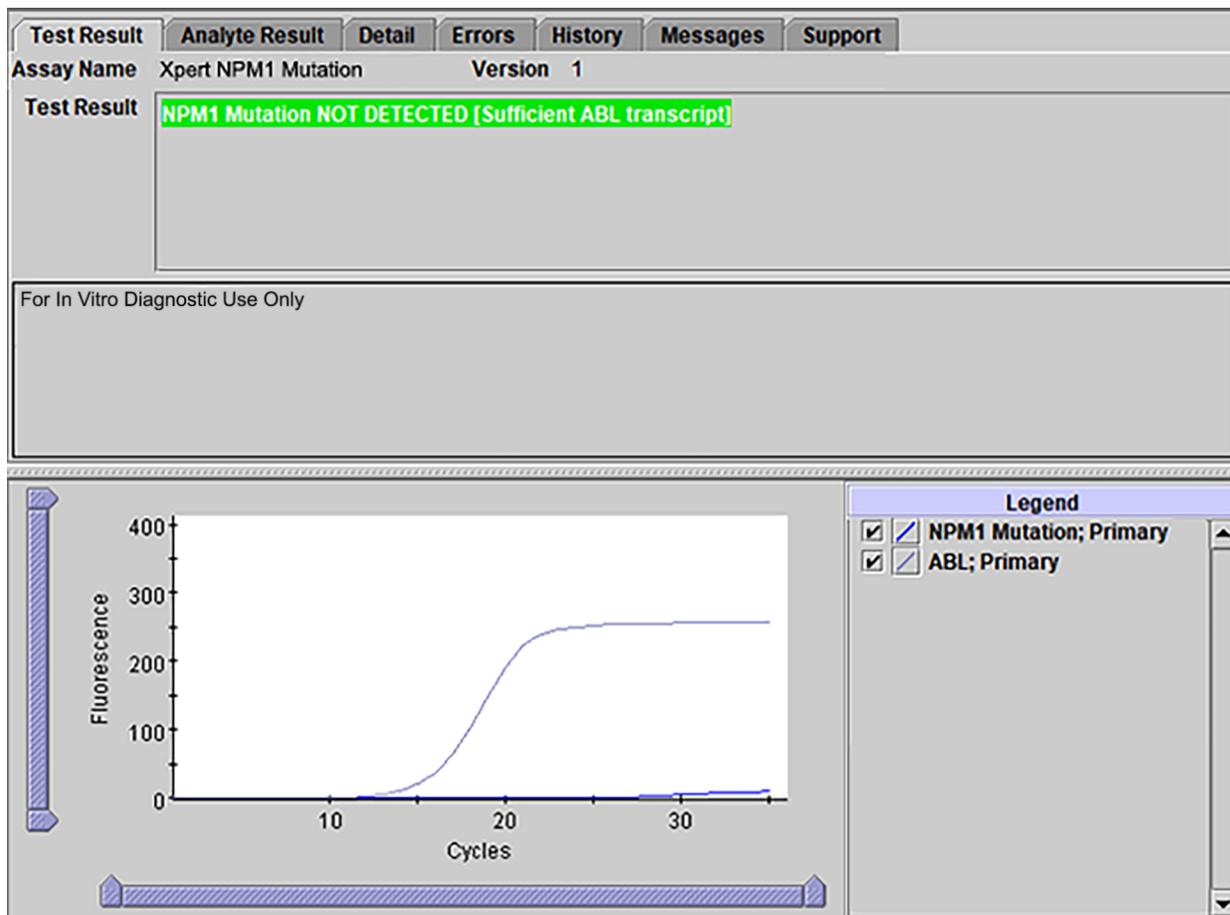


Figura 5. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert: Mutazione di NPM1 NON RILEVATA (trascritto di ABL sufficiente) (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

16.5 NON VALIDO [Nessun trascritto ABL] (INVALID [No ABL transcript])

La mutazione di NPM1 è stata rilevata o non rilevata con il Ct di ABL uguale a “0”.

Il software GeneXpert necessita che il Ct di ABL sia maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20” per il test Xpert NPM1 Mutation, per assicurarsi di ottenere “Trascritto di ABL sufficiente (Sufficient ABL transcript)”. Fare riferimento a Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.

Esempio: Ct della mutazione di NPM1 del saggio = 0; Ct di ABL = 0.

Risultato: **NON VALIDO [Nessun trascritto ABL] (INVALID [No ABL transcript])**. Vedere la Figura 6.

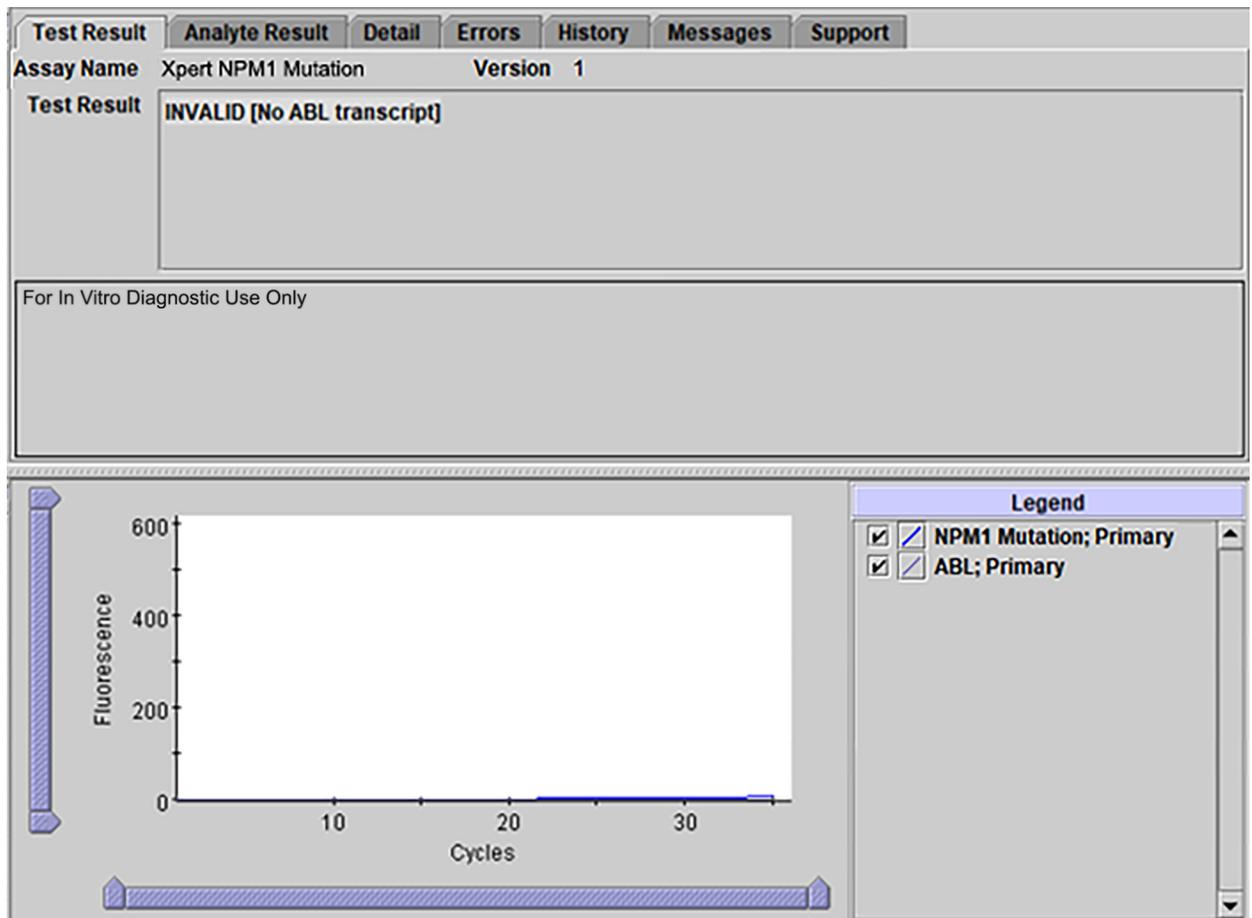


Figura 6. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert:
NON VALIDO [Nessun trascritto ABL] (INVALID [No ABL transcript])

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

La mutazione NPM1 è stata rilevata o non rilevata con Ct ABL maggiore di “20”.

Il software GeneXpert necessita che il Ct di ABL sia maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20” per il test Xpert NPM1 Mutation, per assicurarsi di ottenere “Trascritto di ABL sufficiente (Sufficient ABL transcript)”. Fare riferimento a Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.

Esempio: Ct della mutazione di NPM1 del saggio = 33,3; Ct di ABL = 20,2 (maggiore di “20”).

Risultato: **NON VALIDO [Trascritto ABL insufficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript]).**
Vedere la Figura 7.

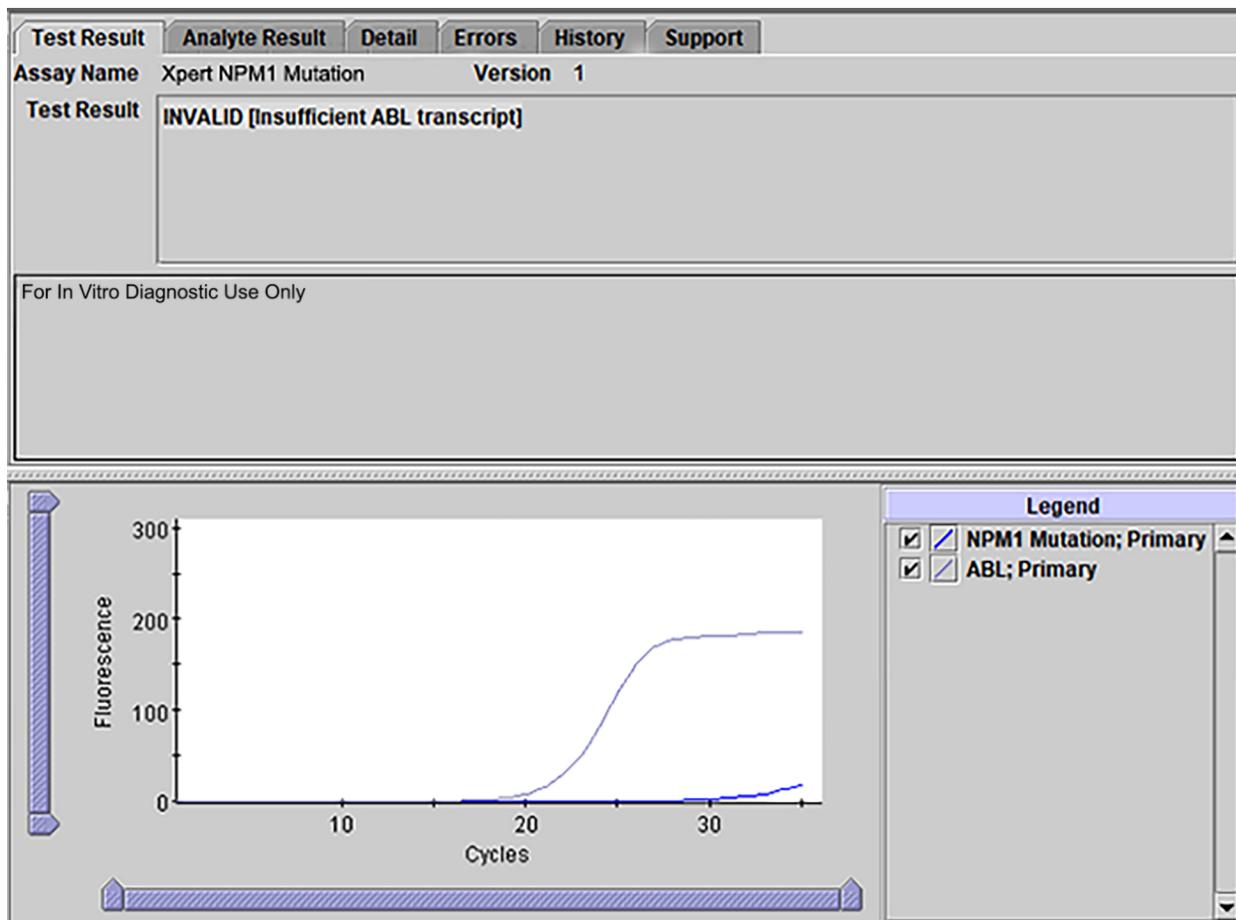


Figura 7. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert: NON VALIDO [trascritto ABL insufficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

16.7 NON VALIDO [mutazione di NPM1 e trascritto di ABL troppo elevati] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

La mutazione di NPM1 è stata rilevata: i Ct della mutazione di NPM1 e di ABL erano maggiori di “0” e minori di “6”.

Il software GeneXpert necessita che il Ct di ABL sia maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20” per il test Xpert NPM1 Mutation, per assicurarsi di ottenere “Trascritto di ABL sufficiente (Sufficient ABL transcript)”. Fare riferimento a Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.

Esempio: Ct della mutazione di NPM1 del saggio = 5,4 (maggiore di “0” e minore di “6”); Ct di ABL = 5,9 (minore di “6”).

Risultato: **NON VALIDO [mutazione di NPM1 e trascritto di ABL troppo elevati] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])**. Vedere la Figura 8.

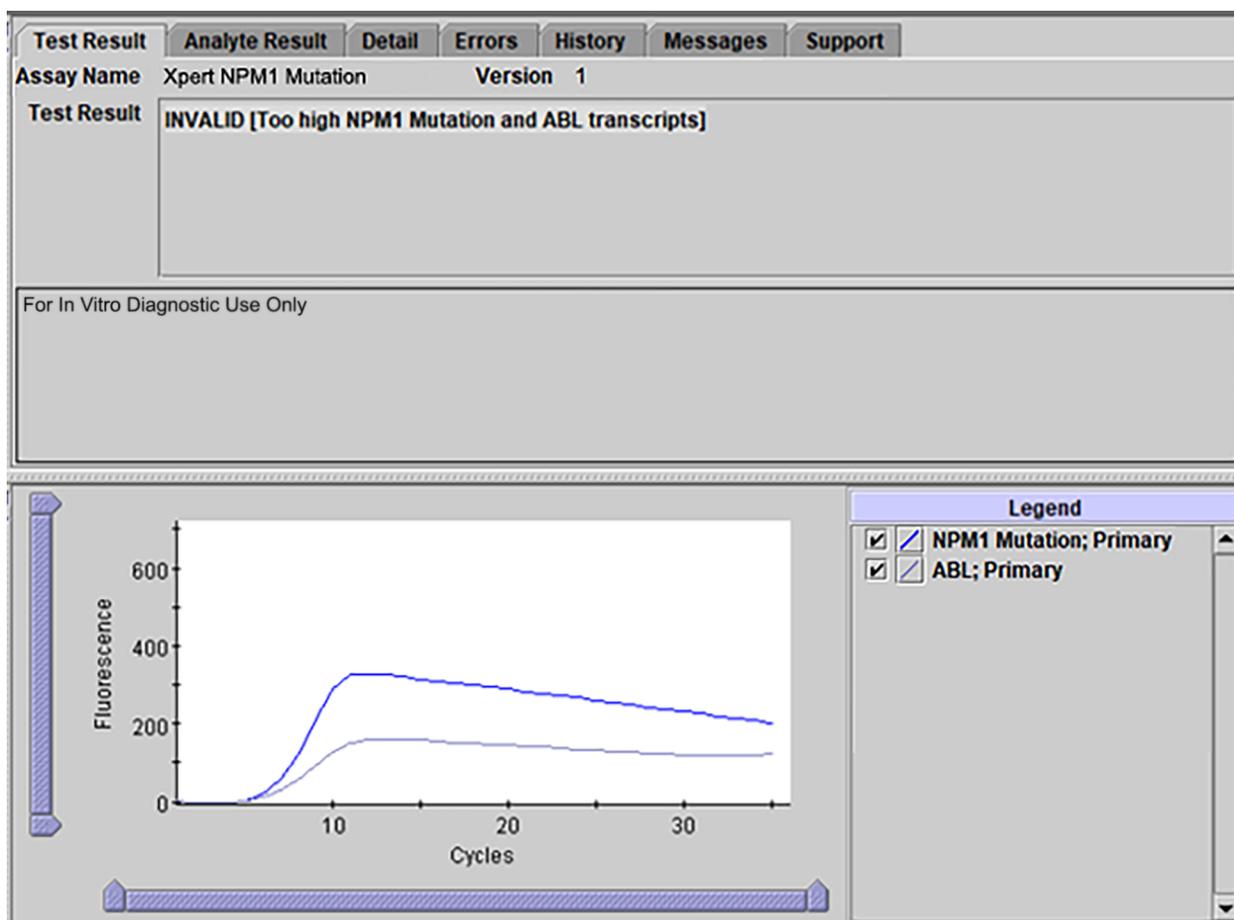


Figura 8. Finestra di visualizzazione dei risultati di GeneXpert Dx: **NON VALIDO [mutazione di NPM1 e trascritto di ABL troppo elevati] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])**

16.8 NON VALIDO [trascritto della mutazione di NPM1 troppo elevato] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

La mutazione di NPM1 è stata rilevata con un Ct della mutazione di NPM1 maggiore di “0” e minore di “6” e Ct di ABL maggiore di “6” e minore di o uguale a “20”.

Il software GeneXpert necessita che il Ct di ABL sia maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20” per il test Xpert NPM1 Mutation, per assicurarsi di ottenere “Trascritto di ABL sufficiente (Sufficient ABL transcript)”. Fare riferimento a Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.

Esempio: Ct della mutazione di NPM1 del saggio = 5,8 (maggiore di “0” e minore di “6”); Ct di ABL = 13 (tra “6” e “20”).

Risultato: **NON VALIDO [trascritto della mutazione di NPM1 troppo elevato] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript]).** Vedere la Figura 9.

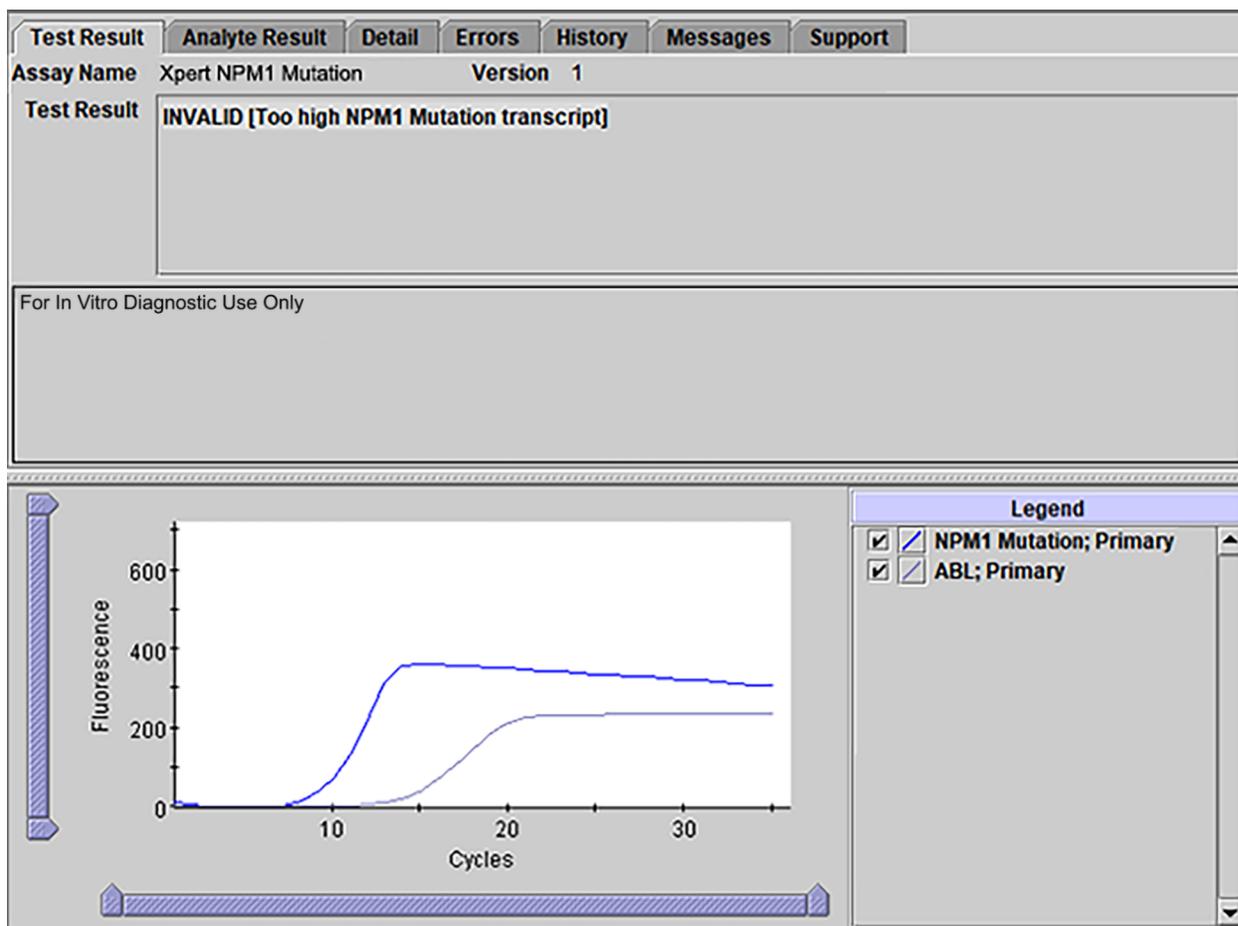


Figura 9. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert: NON VALIDO [trascritto della mutazione di NPM1 troppo elevato] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

16.9 NON VALIDO [Trascritto della mutazione ABL troppo elevato] (INVALID [Too high ABL Mutation transcript])

La mutazione di NPM1 è stata rilevata con il Ct della mutazione di NPM1 maggiore di “6” e minore di o uguale a “32” e il Ct di ABL non uguale a “0” e minore di “6”.

Il software GeneXpert necessita che il Ct di ABL sia maggiore di o uguale a “6” e minore di o uguale a “20” per il test Xpert NPM1 Mutation, per assicurarsi di ottenere “Trascritto di ABL sufficiente (Sufficient ABL transcript)”. Fare riferimento a Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.

Esempio: Ct della mutazione di NPM1 del saggio = 13,2; Ct di ABL = 5,8 (minore di “6”).

Risultato: **NON VALIDO [Trascritto di ABL troppo elevato] (INVALID [Too high ABL transcript])**.
Vedere la Figura 10.

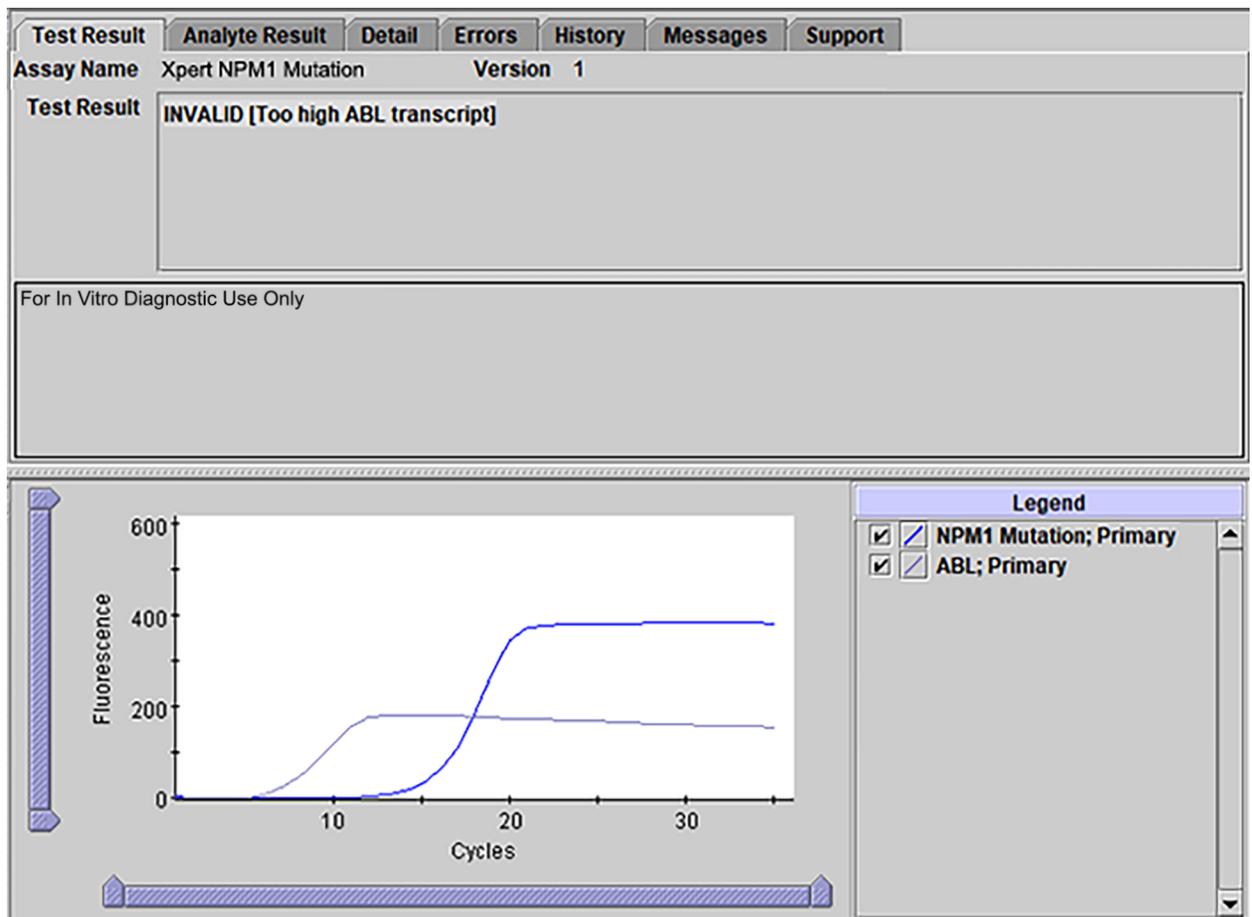


Figura 10. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert: NON VALIDO [trascritto di ABL troppo elevato] (INVALID [Too high ABL transcript])

16.10 ERRORE (ERROR)

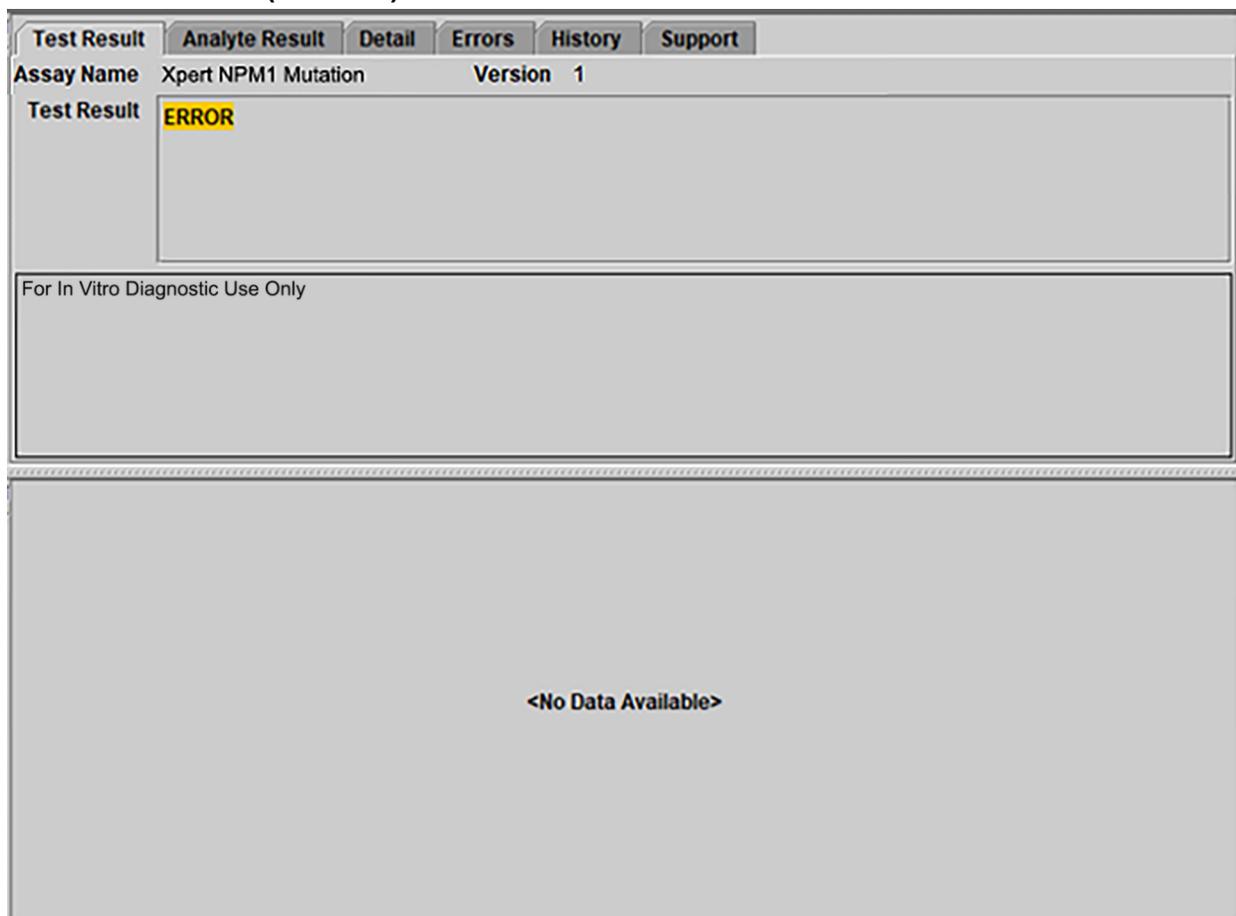


Figura 11. Finestra Visualizza risultati (View Results) di GeneXpert: ERRORE (ERROR)

17 Limiti del saggio

- Il saggio non è destinato ad essere utilizzato con calibratori esterni.
- Qualsiasi modifica apportata a queste procedure può alterare il funzionamento del saggio.
- Questo prodotto è stato progettato per l'utilizzo esclusivamente con sangue raccolto in provette con EDTA.
- Non utilizzare eparina come anticoagulante perché può inibire la reazione della PCR.
- Non sono stati convalidati campioni di midollo osseo, di buffy-coat o in sodio citrato.
- È possibile ottenere risultati errati del saggio se si raccolgono, manipolano, conservano incorrettamente o si scambiano i campioni di analisi. La stretta osservanza delle Istruzioni per l'uso è necessaria per evitare risultati erranei.
- Mutazioni o polimorfismi nelle regioni leganti il primer o la sonda possono compromettere il rilevamento di varianti nuove o sconosciute e possono generare risultati falsi negativi.
- Valori troppo alti dei leucociti possono determinare un aumento della pressione nella cartuccia con conseguente interruzione delle sessioni analitiche o risultati inaccurati.
- Alcuni campioni con livelli molto bassi di trascritto di ABL o con globuli bianchi inferiori a 150.000 cellule/ml possono essere segnalati come **NON VALIDO (INVALID)** (Tipo 1). Un risultato indeterminato non esclude la presenza di livelli molto bassi di cellule leucemiche nel campione.

18 Guida alla risoluzione dei problemi

Tabella 3. Guida alla risoluzione dei problemi

Risultato del saggio	Possibili cause	Suggerimenti
NON VALIDO (INVALID)	<p>Tipo 1: Errore del controllo endogeno dell'ABL:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Campione di scarsa qualità • Inibizione RT-PCR • Ct ABL >20 e/o endpoint <100 	<ul style="list-style-type: none"> • Controllare la qualità del campione (ad esempio, se è stato superato il requisito di conservazione del campione, compresi il tempo e la temperatura). • Ripetere il saggio con il campione originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 19.1, Procedura di ripetizione del test per ERRORE (ERROR) o NON VALIDO (INVALID) (Tipo 1).
	<p>Tipo 2: Il livello di trascritto della mutazione NPM1 non può essere determinato a causa del campione contenente trascritti della mutazione NPM1 e/o ABL in eccesso (Ct <6)</p>	<p>Ripetere il saggio con il campione originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 19.2, Procedura di ripetizione del test per ERRORE (ERROR) (Codice 2008) o NON VALIDO (INVALID) (Tipo 2).</p>
ERRORE (ERROR) (Codice 2008)	Superamento del limite di pressione (messaggio di errore 2008)	<ul style="list-style-type: none"> • Verificare la qualità del campione • Verificare la presenza di un conteggio di globuli bianchi esageratamente elevato • Ripetere il saggio con il campione originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 19.2, Procedura di ripetizione del test per ERRORE (ERROR) (Codice 2008) o NON VALIDO (INVALID) (Tipo 2).
ERRORE (ERROR) (Codice 5006, 5007, 5008 e 5009*) *Questo non è un elenco completo dei codici di ERRORE (ERROR).	Errore nella verifica della sonda	<p>Ripetere il saggio con il campione originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 19.1, Procedura di ripetizione del test per ERRORE (ERROR) o NON VALIDO (INVALID) (Tipo 1).</p>
NESSUN RISULTATO (NO RESULT)	Errore nella raccolta dei dati. Ad esempio, l'operatore ha interrotto un saggio che era in esecuzione oppure si è verificata un'interruzione di alimentazione.	<p>Ripetere il saggio con il campione originale (se disponibile) o con lisato messo da parte in precedenza e una nuova cartuccia seguendo la procedura descritta nella Sezione 19.1, Procedura di ripetizione del test per ERRORE (ERROR) o NON VALIDO (INVALID) (Tipo 1).</p>

19 Ripetizioni del test

19.1 Procedura di ripetizione del test per ERRORE (ERROR) o NON VALIDO (INVALID) (Tipo 1)

Sottoporre nuovamente a test i campioni con risultati **ERRORE (ERROR)** o **NON VALIDO (INVALID)** a causa del ciclo soglia ABL (Ct) che supera il Ct valido massimo (Ct >20) o con endpoint al di sotto della soglia impostata (<100). Fare riferimento anche alla Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.

1. Se è disponibile un campione di sangue di volume sufficiente, ripetere l'analisi dalla provetta di raccolta del campione di sangue originale seguendo la procedura descritta in Sezione 12.2.

-OPPURE-

Se è disponibile un campione ematico insufficiente, è possibile ripetere il test con il lisato messo da parte in precedenza dal Passaggio 12 della Sezione 12.2.1.

- a. Se il lisato messo da parte in precedenza dal Passaggio 12 della Sezione 12.2.1 viene conservato congelato, scongelare a temperatura ambiente prima dell'uso.
 - b. Accertarsi che il lisato sia ben miscelato mescolando ininterrottamente per 10 secondi il campione in vortex all'impostazione massima e metterlo da parte per 3 minuti affinché le bolle scompaiano.
2. Trasferire 1 ml del lisato preparato in una nuova provetta conica da 50 ml.
 3. Seguire i Passaggi 13-17 nella Sezione 12.2.1 per preparare il lisato finale.
 4. Aprire la cartuccia sollevandone il coperchio e trasferire l'intero contenuto di una (1) fiala di reagente di lavaggio nella camera del reagente di lavaggio (con apertura piccola). Vedere la Figura 1.
 5. Pipettare l'intero contenuto del campione preparato nella camera per il campione (apertura grande). Vedere la Figura 1.
 6. Chiudere il coperchio della cartuccia. Avviare il saggio (vedere la Sezione 12.4, Inizio del saggio).

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

Analizzare nuovamente i campioni con livelli di trascritto della mutazione NPM1 e/o ABL inferiori al Ct minimo valido (Ct >0 e Ct <6) e/o quando viene superato il limite di pressione. Fare riferimento anche alla Sezione 18, Guida alla risoluzione dei problemi.

1. Sul fondo di una nuova provetta conica da 50 ml, aggiungere 100 µl di PK (Proteinasi K).
2. Assicurarsi che il campione di sangue o il lisato residuo di cui alla Sezione 12.2, Passaggio 12 sia ben miscelato capovolgendo la provetta per 8 volte immediatamente prima del pipettaggio.
3. Alla provetta che contiene già Proteinasi K, aggiungere 250 µl di campione di sangue e 3,75 ml di PBS (pH 7,4, fornito dall'utilizzatore), se disponibile, oppure 60 µl di lisato messo da parte di cui alla Sezione 12.2.1, Passaggio 12.
 - a. Se il lisato messo da parte in precedenza dal Passaggio 12 della Sezione 12.2.1 viene conservato congelato, scongelare a temperatura ambiente prima dell'uso.
 - b. Accertarsi che il lisato sia ben miscelato mescolando ininterrottamente per 10 secondi il campione in vortex all'impostazione massima e metterlo da parte per 3 minuti affinché le bolle scompaiano.
4. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 3 secondi.
5. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto.
6. Per il campione di sangue con PBS da analizzare di nuovo, seguire i Passaggi 6-17 nella Sezione 12.2.1, per preparare il lisato finale. Per il campione di lisato messo da parte da analizzare di nuovo, seguire i Passaggi a-g qui sotto per preparare il lisato finale.
 - a. Aggiungere 2,5 ml di lisato alla provetta con il campione di LY messo da parte da analizzare di nuovo.
 - b. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
 - c. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
 - d. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi.
 - e. Lasciare in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.
 - f. Aggiungere 2 ml di etanolo assoluto di grado reagente (fornito dall'utente) alla stessa provetta.
 - g. Miscelare ininterrottamente il campione in vortex all'impostazione massima per 10 secondi. Mettere da parte il campione.

7. Aprire la cartuccia sollevandone il coperchio e trasferire l'intero contenuto di una (1) fiala di reagente di lavaggio nella camera del reagente di lavaggio (con apertura piccola). Vedere la Figura 1.
8. Pipettare l'intero contenuto del campione preparato nella camera per il campione (apertura grande). Vedere la Figura 1.
9. Chiudere il coperchio della cartuccia. Avviare il saggio (vedere la Sezione 12.4, Inizio del saggio).

20 Valori attesi

L'intervallo di Xpert NPM1 Mutation copre i principali punti di decisione clinica per il monitoraggio di LMA. I valori attesi sono espressi come rapporto percentuale dell'mRNA della mutazione NPM1 rispetto all'mRNA di ABL e sono compresi tra lo 0,030% e il 500%. Le misurazioni al di sotto di tale intervallo vengono indicate come non rilevate o inferiori al limite di rilevamento (LoD), mentre quelle al di sopra di tale intervallo vengono indicate come superiori al limite di quantificazione (LoQ). Per i dettagli, fare riferimento alla Sezione 15.

21 Prestazioni cliniche

È stato condotto uno studio con metodo comparativo osservazionale multicentrico in tre centri negli Stati Uniti e in un centro al di fuori degli Stati Uniti. 40 pazienti con LMA in discrete condizioni con mutazione di NPM1 sono stati arruolati nello studio per ottenere campioni di analisi da un intervallo di osservazione e nell'intervallo dinamico del test Xpert NPM1 Mutation. Dei pazienti che hanno fornito i campioni sono stati registrati età e sesso. La distribuzione di genere era la seguente: 11 uomini (27,5%) e 29 donne (72,5%). Tutti i campioni provenivano da pazienti di età compresa tra 16 e 81 anni con una media di 59,7 anni.

Tutti i 40 campioni hanno prodotto risultati validi. Trentasei campioni su 40 hanno prodotto risultati entro gli intervalli quantitativi di entrambi i test. Quattro campioni sono stati esclusi dalla regressione di Deming a causa della loro negatività su Xpert NPM1 Mutation e/o con il test di confronto. Un altro campione è stato escluso in quanto era anomalo. Nell'analisi della regressione di Deming è stato incluso un totale di 35 campioni.

Le prestazioni del test Xpert NPM1 Mutation rispetto al saggio di confronto sono state valutate utilizzando una regressione di Deming per determinare la pendenza e l'intercetta. Figura 12 mostra i risultati dell'analisi di regressione di Deming e comprende la pendenza, l'intercetta e la linea di identità dei 35 campioni. Gli intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati con il metodo jackknife e viene mostrato il coefficiente di correlazione di Pearson.

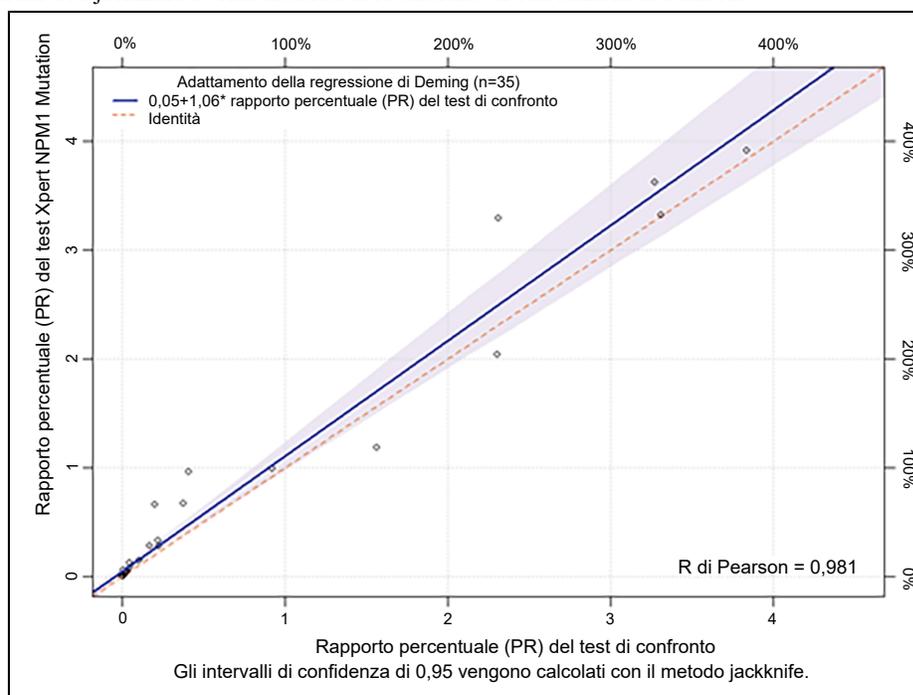


Figura 12. Regressione di Deming per rapporto percentuale

La pendenza e l'intercetta per il rapporto percentuale derivante dalla regressione di Deming erano, rispettivamente, di 1,06 e 0,05 e la correlazione di Pearson tra il test Xpert NPM1 Mutation e le misurazioni del test di confronto era di 0,981.

È stata valutata un'analisi Bland-Altman sulla differenza in rapporto percentuale per i 35 campioni con risultati quantitativi che rientravano nel range lineare di Xpert NPM1 Mutation e del test di confronto. La Figura 13 mostra il grafico Bland-Altman con la differenza in rapporto percentuale tra i due test rispetto ai risultati medi del rapporto percentuale per ogni campione. Il grafico mostra inoltre le due deviazioni standard (2DS) superiori e inferiori della differenza media osservata nello studio.

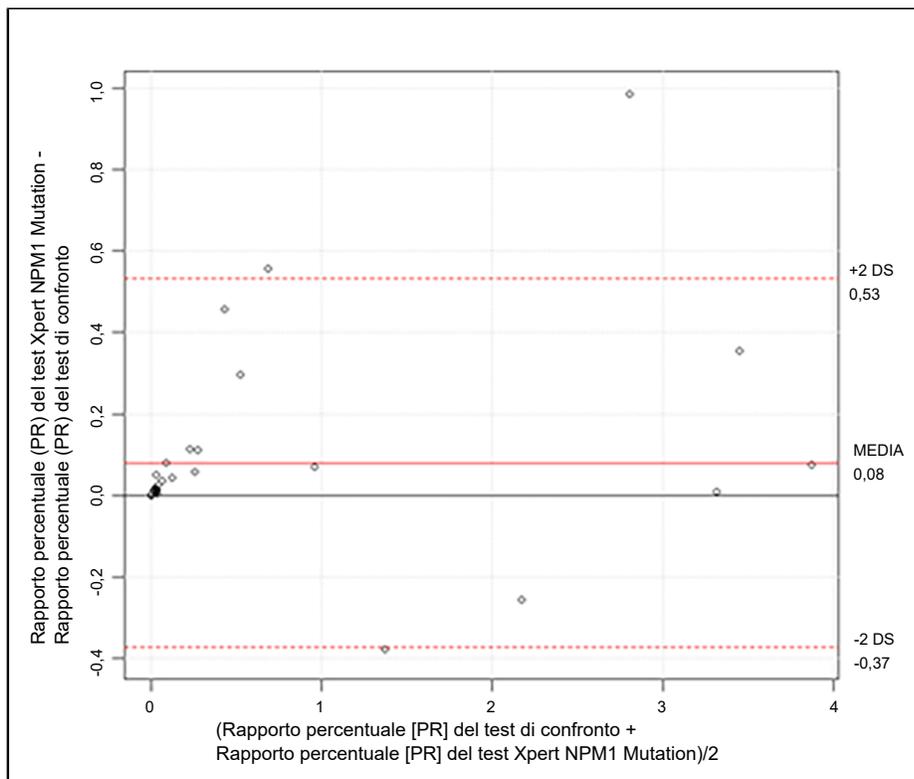


Figura 13. Grafico Bland-Altman per il rapporto percentuale tra il test Xpert NPM1 Mutation e il test di confronto

La differenza media tra il risultato di Xpert NPM1 Mutation e del test di confronto era di 0,08 (rapporto percentuale). La maggioranza (91,4%, 32/35) dei risultati rientrava nelle 2DS della differenza media.

22 Dati analitici

22.1 Intervallo di linearità/dinamico

La linearità è stata determinata per ciascuno dei tre sottotipi mutanti di NPM1, mutA, mutB e mutD con lisati cellulari con elevati livelli di trascritto di ogni sottotipo. Questi lisati sono stati diluiti in un lisato di background preparato da donatori presumibilmente negativi alla mutazione di NPM1 a intervalli target di ~0,01-2500% (mutazione di NPM1/ABL). Tutti i livelli sono stati analizzati su un lotto di reagenti in quadruplicato. I test e le analisi statistiche sono stati condotti in base al documento CLSI EP06-A⁹. Le curve di regressione per ogni sottotipo sono mostrate nella Figura 14, nella Figura 15 e nella Figura 16. Il range lineare di ogni sottotipo e i rispettivi coefficienti del modello lineare sono riepilogati nella Tabella 4.

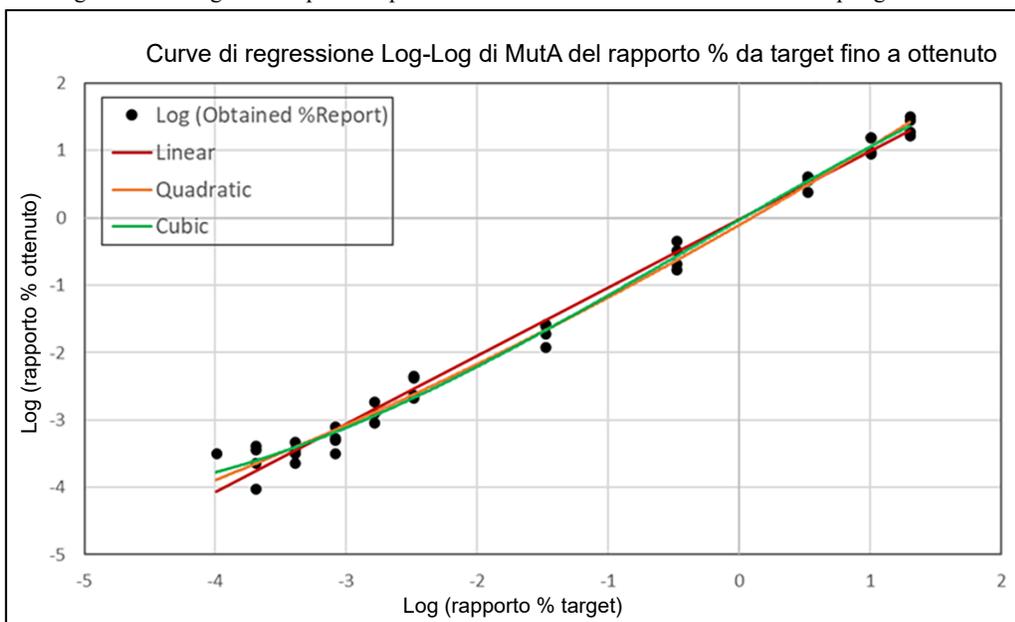


Figura 14. Curve di regressione per mutA

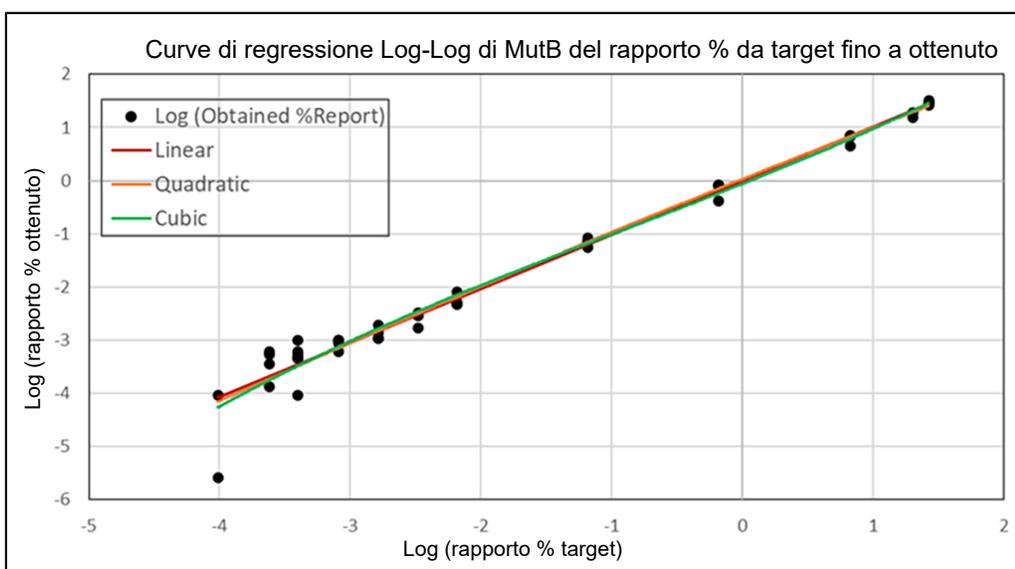


Figura 15. Curve di regressione per mutB

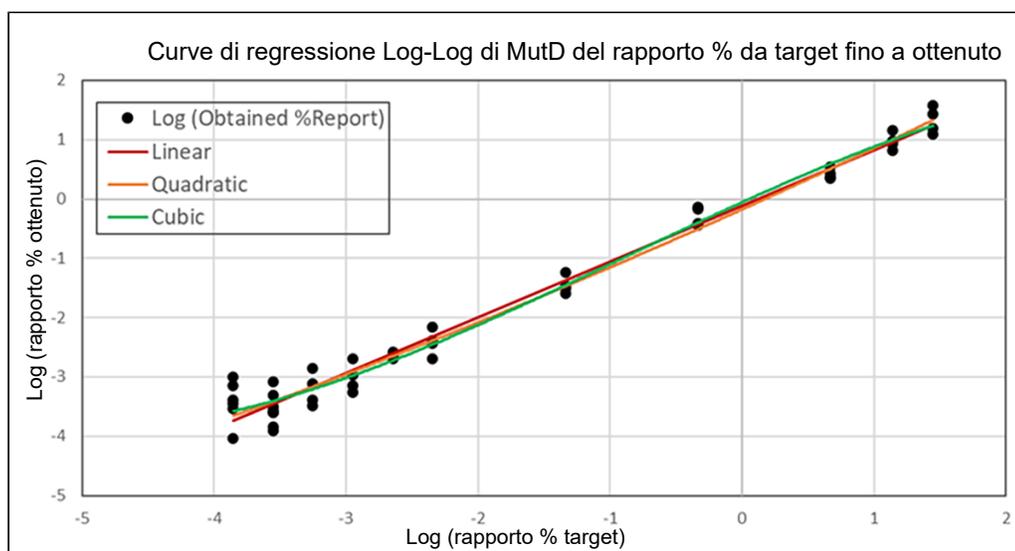


Figura 16. Curve di regressione per mutD

Tabella 4. Riepilogo dei coefficienti dei range lineari e del modello lineare

Sottotipo	Range lineare	Intercetta	Pendenza	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

Complessivamente, il test Xpert NPM1 Mutation ha mostrato una linearità di 0,014-2020% (mutazione di NPM1/ABL). Intervallato dal LoQ e dal limite superiore del software, il range dinamico segnalabile è di 0,030-500%.

22.2 Sensibilità analitica (Limite di rilevamento, Limite di quantificazione, Limite del bianco)

Il limite di rilevamento (LoD) è il livello più basso di Mutazione NPM1/ABL a cui il 95% dei campioni viene segnalato costantemente come “**Mutazione di NPM1 RILEVATA [##,##%] (NPM1 Mutation DETECTED [##,##%])**”. Il LoD è stato stabilito individualmente per i sottotipi di mutA, mutB e mutD analizzando diverse diluizioni seriali dei lisati delle cellule positive alla mutazione di NPM1 e lisati clinici che comprendevano ogni sottotipo di mutazione. I LoD corrispondenti sono stati stimati e verificati in base al documento CLSI EP17-A2¹⁰. Le analisi ottenute hanno avuto come risultato un LoD dello 0,025% per mutA, 0,023% per mutB e 0,030% per mutD (Tabella 5). Il LoD più elevato dei tre sottotipi allo 0,030% viene considerato come il LoD complessivo del test Xpert NPM1 Mutation.

Il limite di quantificazione (LoQ) è il livello Mutazione NPM1/ABL più basso al di sopra del quale i campioni possono essere quantificati con una riduzione standard di $\leq 0,36$ della riduzione logaritmica (LR) per le LR medie maggiori di 3,5. In base al documento CLSI EP17-A2¹⁰, i LoQ sono stati stimati e verificati allo 0,025% per il sottotipo mutA, allo 0,023% per il sottotipo mutB e allo 0,030% per il sottotipo mutD (Tabella 5). Il LoQ più elevato dei tre sottotipi allo 0,030% viene considerato come il LoQ complessivo del test Xpert NPM1 Mutation.

Il limite del bianco (LoB) è il risultato più elevato di Mutazione NPM1/ABL atteso tra il 95% dei campioni bianchi, presumibilmente da donatori negativi alla mutazione di NPM1. In base al documento CLSI EP17-A2¹⁰, il LoB del test Xpert NPM1 Mutation è stato stimato e verificato allo 0,0085% (Tabella 5).

Tabella 5. Limite di rilevamento, limite di quantificazione e limite del bianco del test Xpert NPM1 Mutation (Mutazione NPM1/ABL %)

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

22.3 Specificità analitica

La specificità analitica del test Xpert NPM1 Mutation è stata determinata analizzando i campioni di analisi di sangue periferico trattati in EDTA prelevati da venticinque donatori sani.

Dai campioni di analisi valutati in questo studio presumibilmente negativi alla mutazione di NPM1 non sono stati ottenuti risultati **RILEVATO (DETECTED)** per la mutazione di NPM1. Pertanto, il test Xpert NPM1 Mutation è specifico per i trascritti dell'mRNA di NPM1 mutante (tipi A, B e D nell'esone 12) associati all'LMA e ha una specificità analitica del 100% per i campioni di analisi di sangue periferico EDTA.

22.4 Valutazione della contaminazione da carry-over

È stato condotto uno studio per dimostrare che le cartucce chiuse monouso GeneXpert impediscono la contaminazione da carry-over da cartucce eseguite sequenzialmente nello stesso modulo dello strumento. Un campione presumibilmente negativo alla mutazione di NPM1 è stato analizzato dopo un campione altamente positivo alla mutazione di NPM1 nello stesso modulo GeneXpert. Lo schema di analisi è stato ripetuto 10 volte sue due moduli GeneXpert (22 negativi e 20 positivi in totale). Tutte le sessioni del campione di analisi positivo hanno prodotto il risultato atteso "**Mutazione di NPM1 RILEVATA [##,##%] (NPM1 Mutation DETECTED [##,##%])**" e tutte le sessioni dei campioni negativi hanno prodotto il risultato atteso "**Mutazione di NPM1 NON RILEVATA [Trascritto ABL sufficiente] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])**".

22.5 Sostanze potenzialmente interferenti

Questo studio ha valutato cinque sostanze che possono essere presenti nei campioni di analisi di sangue periferico in EDTA e possono interferire con le prestazioni del test. I composti e i livelli testati (vedere Tabella 6) si basavano sulle linee guida del documento CLSI EP07-ED3¹¹. Le sostanze interferenti sono state analizzate in campioni di analisi di sangue periferico in EDTA inoculati con lisati di cellule di coltura positive alla mutazione di NPM1 che rappresentavano tre livelli: >1%, 0,1-0,5%, e negativo. I controlli dei test consistevano negli stessi campioni senza le sostanze potenzialmente interferenti. Ciascun livello è stato testato in assenza e in presenza delle cinque sostanze interferenti individuali a 4 replicati per condizione. Una sostanza è stata considerata non interferente se in sua presenza la media del rapporto percentuale osservata era entro la differenza tripla rispetto al controllo.

Non sono stati osservati effetti inibitori clinicamente significativi sul test Xpert NPM1 Mutation con le sostanze interferenti valutate in questo studio. Non sono state osservate differenze statisticamente significative (valore $p < 0,05$) nelle condizioni testate e i rapporti percentuali segnalati tra le condizioni del test e di controllo rientravano nell'intervallo accettabile della differenza tripla.

Tabella 6. Sostanze potenzialmente interferenti analizzate con Xpert NPM1 Mutation

Sostanze interferenti	Concentrazione analizzata
Bilirubina non coniugata	20 mg/dl
Colesterolo totale	500 mg/dl
Trigliceridi totali (lipidi)	3000 mg/dl
Eparina	3500 U/l
EDTA (prelievo breve)	930 mg/dl

23 Precisione e riproducibilità

Lo studio è stato progettato in conformità con i principi generali esposti nello standard CLSI EP05-A3 per gli studi multifattoriali ed è stato condotto in tre centri. Il progetto dello studio comprendeva componenti di un pannello di campioni con mutazioni A, B e D a due concentrazioni. Sette componenti del pannello sono stati analizzati in duplicato (due sessioni al giorno per un totale di 6 giorni) da ciascuno dei due operatori nei tre centri diversi (3 centri x 2 operatori x 3 lotti x 2 giorni x 2 sessioni x 2 replicati = 144 risultati del test/componente del pannello). I pannelli di riproducibilità e precisione sono stati preparati da Cepheid e sono formati da sette componenti del pannello, come mostrato nella Tabella 7. I pannelli sono stati inoculati in una matrice di sangue periferico (PB) simulata in EDTA.

Tabella 7. Pannelli di precisione e riproducibilità

Componente del pannello	Bersaglio	Livello del rapporto percentuale (PR)
1	Negativo	NA
2	Mutazione A di NPM1	Moderato positivo (~5%)
3	Mutazione A di NPM1	Positivo basso (~0,2%)
4	Mutazione B di NPM1	Moderato positivo (~5%)
5	Mutazione B di NPM1	Positivo basso (~0,2%)
6	Mutazione D di NPM1	Moderato positivo (~5%)
7	Mutazione D di NPM1	Positivo basso (~0,2%)

La Tabella 8 mostra il numero di campioni con i risultati validi per ogni componente del pannello analizzati da ciascuno dei due operatori nei tre centri.

Tabella 8. Precisione e riproducibilità: Numero di campioni con risultati validi

Componente del pannello	Centro 1			Centro 2			Centro 3			Campioni totali
	Op 1	Op 2	Centro	Op 1	Op 2	Centro	Op 1	Op 2	Centro	
1 Negativo	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 LR 1,3: mut A (rapporto ~5%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
3 LR 2,7: mut A (rapporto ~0,2%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
4 LR 1,3: mut B (rapporto ~5%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
5 LR 2,7: mut B (rapporto ~0,2%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
6 LR 1,3: mut D (rapporto ~5%)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
7 LR 2,7: mut D (rapporto ~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 Due campioni di analisi negativi con risultati validi ma non rilevati (FP)

^b Un campione di analisi negativo con risultati valido ma non rilevato (FP)

^c Un campione con LR 2,7: mut D (rapporto ~0,2%) ha mostrato un risultato valido ma non rilevato (FN)

I risultati quantitativi sono stati analizzati dall'analisi nested della varianza (ANOVA) con effetti casuali e il coefficiente di variazione (CV). I risultati dei calcoli ANOVA per la deviazione e la varianza standard per ogni campione positivo si trovano nella Tabella 9. La varianza e la percentuale della varianza totale apportate da ogni componente (Centro/Strumento, Operatore, Lotto, Giorno, Sessione) viene indicata con DS e contributo percentuale per ogni componente.

Tabella 9. Risultati dal coefficiente di variazione (CV): rapporto percentuale (PR)

Componente del pannello	N	Media	Centro		Op		Lotto		Giorno		Sessione		All'interno del saggio		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
LR 1,3: mut A (rapporto ~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
LR 2,7: mut A (rapporto ~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
LR 1,3: mut B (rapporto ~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
LR 2,7: mut B (rapporto ~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
LR 1,3: mut D (rapporto ~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
LR 2,7: mut D (rapporto ~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 Un campione non è stato rilevato dal test Xpert NPM1 ed è stato escluso dall'analisi in quanto non era presente alcuna misurazione quantitativa.

La percentuale totale del coefficiente di variazione (CV) del rapporto percentuale che segnala i valori quantitativi per i campioni di tipo moderato positivo LR 1,3: mut A, mut B e mut D (rapporto ~5%) era compresa tra 21,74 e 26,23; per i campioni di tipo basso positivo LR 2,7: mut A, mut B e mut D (rapporto ~0,2%) era compresa tra 20,68 e 79,22.

24 Riferimenti bibliografici

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>. Consultazione: 16 settembre 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 (fare riferimento all'ultima edizione). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (fare riferimento all'ultima edizione).
8. Health-care Waste. Organizzazione Mondiale della Sanità. <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 Ubicazione delle sedi centrali Cepheid

Sede centrale globale

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Sede centrale europea

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

26 Assistenza tecnica

Prima di contattare il supporto tecnico di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:

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

Stati Uniti d'America

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

Francia

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

Le informazioni di contatto di tutti gli uffici di Supporto Tecnico di Cepheid sono disponibili nel sito www.cepheid.com/en_US/support/contact-us.

27 Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Marchio CE - Conformità europea
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Codice lotto
	Non riutilizzare
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Fabbricante
	Paese di produzione
	Contenuto sufficiente per <i>n</i> test
	Controllo
	Data di scadenza
	Limiti di temperatura
	Rischi biologici
	Avviso
	Liquidi infiammabili
	Tossicità riproduttiva e per organi
	Attenzione
	Mandatario per l'Unione europea
	Rappresentante autorizzato in Svizzera
	Importatore



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



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



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



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



28 Cronologia delle revisioni

Sezione	Descrizione della modifica
23	Correzione errore nella sezione "Precisione e riproducibilità".