

Xpert[®] NPM1 Mutation

REF GXNPM1-CE-10

Lietošanas pamācība

IVD CE

Paziņojumi par preču zīmēm, patentiem un autortiesībām

Trademark, Patents, and Copyright Statements

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

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

© 2022–2023 Cepheid.

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

Cepheid[®], Cepheid logotips, GeneXpert[®] un Xpert[®] ir Cepheid preču zīmes, kas reģistrētas ASV un citās valstīs. Visas pārējās preču zīmes pieder to attiecīgajiem īpašniekiem.

IEGĀDĀJOTIES ŠO PRODUKTU, PIRCĒJAM TIEK PIEŠĶIRTAS TĀLĀK NENODODAMAS TIESĪBAS TO IZMANTOT SASKAŅĀ AR ŠAJĀ LIETOŠANAS PAMĀCĪBĀ SNIEGTAJIEM NORĀDĪJUMIEM. NETIEK PIEŠĶIRTAS NEKĀDAS CITAS TIESĪBAS NE TIEŠI, NE NETIEŠI UN NE PĒC ESTOPPEL PRINCIPA. TURKLĀT LĪDZ AR ŠĪ PRODUKTA IEGĀDI NETIEK PIEŠĶIRTAS NEKĀDAS TĀLĀKPĀRDOŠANAS TIESĪBAS.

© 2022–2023 Cepheid.

Izmaiņu aprakstu skatiet sadaļā Sadaļa 28 Pārstrādāto izdevumu vēsture.

Xpert[®] NPM1 Mutation

Tikai *in vitro* diagnostikai

1 Patentētais nosaukums

Xpert[®] NPM1 Mutation

2 Vispārpieņemtais jeb parastais nosaukums

Xpert NPM1 Mutation

3 Paredzētais mērķis

3.1 Paredzētā lietošana

Xpert NPM1 Mutation tests, kas tiek veikts ar Cepheid GeneXpert[®] Dx System, ir *in vitro* diagnostikas tests NPM1 mutācijas mRNS transkriptu (A, B un D tipu 12. eksonā) kvantificēšanai perifēro asiņu paraugos, kas iegūti no pacientiem, kas sirgst ar akūtu mieloīdo leukēmiju (AML). Testā tiek izmantota automatizēta reāllaika reversās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcija (RT-PCR), un tas uzrāda attiecību procentos starp NPM1 mutācijas un ABL1 endogēnās kontroles mRNS transkriptiem. Testu ir paredzēts izmantot kā palīg līdzekli, lai uzraudzītu pacientus ar NPM1 mutācijas AML, nosakot mutantā NPM1 mRNS transkripta līmeni. Šī testa rezultāti ir jāvērtē kopā ar citiem klīniski patoloģiskajiem faktoriem.

Xpert NPM1 Mutation tests neizšķir A, B vai D tipa NPM1 mutācijas transkriptus, un tas nenosaka un neuzrauga citus retus NPM1 mutācijas tipus. Šo testu nav paredzēts izmantot AML diagnostikai.

3.2 Paredzētais lietotājs/vide

Xpert NPM1 Mutation testu ir paredzēts izmantot apmācītiem lietotājiem laboratorijas apstākļos.

4 Kopsavilkums un skaidrojums

Akūta mieloīdā leukēmija (AML) ir hematopoētisko cilmes šūnu vēzis kaulu smadzenēs^{1,2} un ir zināms, ka tai ir raksturīgas dažādas nukleofosmīna (NPM1) 12. eksona mutācijas³. Nukleotīdu ievietoējums 12. eksonā izraisa nolasīšanas nobīdes mutāciju un rada nukleārā eksporta signālu (NES). NPM1 gēna mutācijas izraisa NPM1 un NPM1 mijiedarbības proteīnu novirzījušos citoplazmatisku lokalizāciju. NPM1 ir viens no visvairāk mutētajiem gēniem AML gadījumā, un mutācijas notiek 28%–35% no visiem AML gadījumiem. Lai gan pašlaik tiek pētīti vairāki medikamenti, kas iedarbojas uz mutēto NPM1, šobrīd nav pieejama neviena FDA apstiprināta mērķterapija.⁴

NPM1 gēns kodē nukleārās pārvietošanās proteīnu, kam ir loma centrosomas un ribosomas bioloģijā, kā arī citu šūnu sistēmu, tostarp audzēju supresoru signālceļu, regulācijā. NPM1 ir nukleolārs fosfoproteīns, kas darbojas kā transports starp kodolu un citoplazmu. Tas regulē ribosomu daļiņu pārvietošanos cauri kodola membrānai. NPM1 mutācijas sākotnēji tika atklātas AML pacientiem pēc tam, kad tika novērota anormāla citoplazmatiskā lokācija normālas nukleārās lokācijas vietā. Leikēmisku blastu ģenētiskā izvērtēšana apvienojumā ar citoplazmatisko NPM1 lokāciju ļāva atklāt zināmās 12. eksona nolasīšanas nobīdes mutācijas.³ Visbiežākās NPM1 mutācijas ir A tipa (~75–80%), B tipa (~10%) un D tipa (~5%), kas visas rodas 12. eksonā un izraisa nolasīšanas nobīdes mutāciju četru nukleotīdu ievietojumu rezultātā. Šī mutācija AML pacientiem izraisa nukleolārās lokalizācijas signāla zudumu un novirzījušos proteīna citoplazmatisku lokalizāciju.⁵

5 Procedūras princips

Xpert NPM1 Mutation tests ir automatizēta analīze, ar kuru paredzēts kvantificēt NPM1 mutācijas transkriptu daudzumu kā NPM1 mutācijas/ABL1 attiecību. Šis tests tiek veikts Cepheid GeneXpert Dx System, kas automatizē un integrē paraugu attīrīšanu, nukleīnskābju amplifikāciju un mērķa sekvenču noteikšanu vienkāršos vai kompleksos paraugos, izmantojot reāllaika RT-PCR un divsoļu PCR analīzes. Sistēma ietver iekārtu, datoru un iepriekš instalētu programmatūru analīžu izpildei un rezultātu skatīšanai. Sistēmai ir nepieciešams izmantot vienreizlietojamus GeneXpert kārtidžus, kas satur RT-PCR un divsoļu PCR reaģentus, kā arī vada RT-PCR un divsoļu PCR procesus. Pilnu sistēmu aprakstu skatiet atbilstošajā *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Xpert NPM1 Mutation testā ir ietverti reaģenti NPM1 mutācijas noteikšanai un ABL1 transkripts kā endogēna kontrole perifēro asiņu paraugos. NPM1 mutācijas transkripta daudzums tiek kvantificēts kā NPM1 mutācijas/ABL1 attiecība procentos. Xpert NPM1 Mutation testā ir ietvertas divas kontroles — endogēnā kontrole (ABL1) un zondes pārbaudes kontrole (PCC). ABL1 endogēnā kontrole normalizē NPM1 mutācijas mērķi un nodrošina, ka analīzē tiek izmantots pietiekams parauga daudzums. PCC pārbauda reaģentu rehidratāciju, PCR mēģenes uzpildi un to, ka kārtidžā atrodas un darbojas visi reakcijas komponenti, tostarp zondes un krāsvielas.

6 Reaģenti un instrumenti

6.1 Nodrošinātie materiāli

Xpert NPM1 Mutation komplektā (GXNPM1-CE-10) ir iekļauts pietiekams reaģentu skaits, lai varētu apstrādāt 10 analīzes paraugus vai kvalitātes kontroles paraugus. Komplektā ir iekļauts tālāk norādītais:

Xpert NPM1 Mutation Reaģenti

Pa 10 katrā komplektā

Proteināze K (PK)	10 x 130 µl katrā flakonā
Sastāvdaļa	Reaģenta sastāvdaļa
Proteināze K	< 5%
Līzes reaģents (LY) (guanidīnija hlorīds)	10 x 5,3 ml katrā flakonā
Sastāvdaļa	Reaģenta sastāvdaļa
Guanidīnija hlorīds	25–50%
Karbamīds	25–50%
Nātrija dodecilsulfāts	< 2%
Mazgāšanas reaģents	10 x 2,9 ml katrā ampulā
Sastāvdaļa	Reaģenta sastāvdaļa
Etanols	< 50%
Guanidīnija tiocianāts	< 50%

Xpert NPM1 Mutation kārtidži ar integrētām reakciju mēģenēm		10 komplektā
Sastāvdaļa	Reāģenta sastāvdaļa	Daudzums
1. lodīte (liofilizēta)	Enzīms: Taq DNS polimerāze < 50 U/lodītē	1 katrā kārtidžā
	dNTPs < 0,05%	
2. lodīte (liofilizēta)	Praimeri un zondes < 0,005%	1 katrā kārtidžā
3. lodīte (liofilizēta)	Praimeri un zondes < 0,005%	1 katrā kārtidžā
4. lodīte (liofilizēta)	Enzīms: Taq DNS polimerāze < 50 U/lodītē	1 katrā kārtidžā
	dNTPs < 0,05%	
Skalošanas reāģents	Kālija hlorīds < 4%	2 ml katrā kārtidžā
	Nātrija azīds < 0,1%	
	Polietilēnglikols < 40%	
	Tween 20 < 0,2%	
Eluēšanas reāģents	Trizma bāze < 0,3%	2,5 ml katrā kārtidžā
	Trizma hidrochlorīds < 0,1%	
	Nātrija azīds < 0,05%	

Kompaktdisks**1 komplektā**

- Analīzes definīcijas fails (ADF)
- Norādījumi ADF importēšanai GeneXpert programmatūrā
- Lietošanas pamācība (IFU)

Piezīme Šī produkta lodītēs esošais liellopu seruma albumīns (BSA) tika ražots tikai no Amerikas Savienotajās Valstīs iegūtas liellopu plazmas. Dzīvnieki netika baroti ar atgremotāju vai citu dzīvnieku proteīnu; dzīvniekiem tika veikta pirmsnāves un pēcnāves testēšana. Apstrādes laikā materiāls netika sajaukts ar citu dzīvnieku materiāliem.

Piezīme Analīzes sertifikāti un partijas specifikāciju datu lapas ir pieejamas, sazinoties ar Cepheid tehniskā atbalsta biroju.

7 Nepieciešamie materiāli, kas nav nodrošināti

- GeneXpert Dx System (kataloga numurs atšķiras atkarībā no konfigurācijas): GeneXpert iekārta, dators, svītrkodu skeneris un operatora rokasgrāmata.
- GeneXpert Dx System: GeneXpert Dx programmatūras versija 6.2 vai jaunāka.
- Printeris: ja ir nepieciešams printeris, sazinieties ar Cepheid tehniskā atbalsta biroju, lai noorganizētu ieteiktā printera iegādi.
- Vorteksa maisītājs
- Mikrocentrifūga (vismaz 1000 x g)
- Pipetes un aerosola filtru pipetes uzgaļi
- 50 ml konusveida mēģenes
- Reāģenta pakāpes absolūtais etanols
- 1x PBS, pH 7,4

8 Uzglabāšana un lietošana

- Uzglabājiet Xpert NPM1 Mutation komplekta saturu 2–8 °C temperatūrā līdz derīguma termiņa beigū datumam, kas norādīts uz etiķetes.
- Neatveriet kārtidža vāku, līdz neesat gatavs veikt testu.
- Nelietojiet kārtidžus, kuriem beidzies derīguma termiņš.

- Neizmantojiet kārtidžu, kam radusies noplūde.
- Mazgāšanas reaģents ir dzidrs, bezkrāsains šķidrums. Nelietojiet mazgāšanas reaģentu, ja tas ir kļuvis duļķains vai mainījies nokrāsu.
- Divdesmit (20) minūtes pirms procedūras sākšanas izņemiet asins paraugu, kārtidžu un paraugu sagatavošanas reaģentus no glabāšanas vietas, lai ļautu tiem sasniegt istabas temperatūru (20–30 °C).

9 Brīdinājumi un piesardzības pasākumi.

9.1 Vispārīga informācija

- Tikai *in vitro* diagnostikai.
- Rīkojieties ar visiem bioloģiskajiem paraugiem, tostarp izlietotajiem kārtidžiem un reaģentiem, kā tādiem, kas spēj pārnest infekciozas vielas. Tā kā bieži nav iespējams zināt, kuri no bioloģiskajiem paraugiem ir infekciozi, ar tiem visiem ir jārīkojas, ievērojot standarta piesardzības pasākumus.
- Vadlīnijas attiecībā uz rīkošanos ar paraugiem sniedz ASV Slimību kontroles un novēršanas centri⁶ un Klīnisko un laboratorijas standartu institūts.⁷
- Ievērojiet jūsu iestādes noteiktās drošības procedūras, strādājot ar ķīmiskajām vielām un rīkojoties ar bioloģiskajiem paraugiem.
- Šī testa veiktspējas parametri ir noteikti, izmantojot tikai EDTA mēģenēs savāktu asiņu paraugus. Analīzes darbība nav novērtēta ar citu vielu paraugiem.
- Uzticami rezultāti ir atkarīgi no pareizas parauga paņemšanas, transportēšanas, uzglabāšanas un apstrādes. Nepareizus analīzes rezultātus var izraisīt nepareiza parauga paņemšana, rīkošanās ar to vai uzglabāšana, tehniska kļūda, parauga sajaukšana vai tas, ka mērķa transkripts paraugā ir zem analīzes noteikšanas robežas. Lai nepieļautu kļūdainus rezultātus, rūpīgi jāievēro norādījumi, kas sniegti šajā lietošanas pamācībā un *GeneXpert Dx System Operator Manual*.
- Veicot Xpert NPM1 Mutation testu ārpus ieteicamajiem komplekta vai parauga uzglabāšanas temperatūras diapazoniem un ilguma, var tikt radīti kļūdaini vai nederīgi rezultāti.
- Bioloģiskie paraugi, pārņemšanas ierīces un izlietotie kārtidži ir uzskatāmi par tādiem, kas var pārnest infekciozas vielas, tādēļ uz tiem attiecas standarta piesardzības pasākumi. Ievērojiet iestādes atkritumu aizvākšanas procedūras, lai pareizi likvidētu izlietos kārtidžus un neizmantotos reaģentus. Šiem materiāliem var piemist ķīmiski bīstamu atkritumu īpašības, kam nepieciešamas specifiskas valsts vai reģionālās likvidēšanas procedūras. Ja valsts vai reģionālajos noteikumos nav skaidru norāžu par pareizu likvidēšanu, bioloģiskie paraugi un izlietotie kārtidži ir jālikvidē saskaņā ar PVO [Pasauls Veselības organizācijas] medicīnisko atkritumu apstrādes un likvidēšanas vadlīnijām.⁸

9.2 Paraugi

- Ievērojiet pareizus uzglabāšanas nosacījumus, lai nodrošinātu parauga veselumu (skatiet Sadaļa 11 Parauga paņemšana un uzglabāšana). Paraugu stabilitāte nav izvērtēta, ja paraugi tiek transportēti citos apstākļos, nekā ieteikts.
- EDTA perifēro asiņu paraugu nedrīkst sasaldēt.
- Pareiza paraugu paņemšana, uzglabāšana un transportēšana ir būtiski svarīga pareizu rezultātu iegūšanai.


9.3 Tests/reaģents

- Neaizstājiet Xpert NPM1 Mutation reaģentus ar citiem reaģentiem.
- Neatveriet Xpert NPM1 Mutation kārtidža vāku, izņemot gadījumus, kad jāpievieno paraugs un mazgāšanas reaģents.
- Neizmantojiet kārtidžu, kas pēc tā izņemšanas no iepakojuma ir nomests.
- Nekratiet kārtidžu. Kratot vai nometot kārtidžu pēc kārtidža vāka atvēršanas, var tikt iegūti nederīgi rezultāti.
- Nenovietojiet parauga ID etiķeti uz kārtidža vāka vai kārtidža svītrkoda etiķetes.
- Nelietojiet kārtidžu ar bojātu svītrkoda etiķeti.
- Neizmantojiet kārtidžu, kam ir bojāta reakciju mēģene.
- Kad Xpert NPM1 Mutation kārtidži tiek izmantoti testēšanai, tiem ieteicams būt istabas temperatūrā (20–30 °C).
- Katrs vienreizlietojamais Xpert NPM1 Mutation kārtidžs tiek izmantots vienas analīzes apstrādei. Nelietojiet apstrādātus kārtidžus atkārtoti.
- Pārnēsiet visu vienas (1) mazgāšanas reaģenta ampulas saturu uz mazgāšanas reaģenta nodalījumu. Ja mazgāšanas reaģents netiek pievienots, var tikt izraisīts nepatiess rezultāts **NAV NOTEIKTS (NOT DETECTED)**.
- Neizmantojiet atkārtoti pipešu uzgaļus.

- Nelietojiet kārtidžu, ja tas šķiet mitrs vai ja vāka blīvējums šķiet bojāts.
- Nelietojiet Xpert NPM1 Mutation kārtidžu, ja reaģents ir pievienots nepareizajā atverē.
- Neatveriet Xpert NPM1 Mutation kārtidžus, kad analīze ir pabeigta.
- Izmantojiet pipešu un reaģentu komplektu tikai paraugu sagatavošanai.
- Izmantojiet tīrus laboratorijas halātus un cimdus. Mainiet cimdus pēc katra parauga apstrādes.
- Paraugu vai kontroļu izšķakstīšanas gadījumā uzvelciet cimdus un uzsūciet šķakatas ar papīra dvieļiem. Pēc tam piesārņoto zonu rūpīgi notīriet ar tikko sagatavotu majsaimniecības hlora balinātāja 1:10 atšķaidījumu. Aktīvā hlora galīgajai koncentrācijai ir jābūt 0,5% neatkarīgi no saimniecības balinātāja koncentrācijas jūsu valstī. Nodrošiniet vismaz divu minūšu saskares laiku.
- Pirms 70% denaturēta etanola izmantošanas, lai notīrītu balinātāja nogulsnes, pārlicinieties, vai darba zona ir sausa. Pirms turpināt darbu, ļaujiet virsmai pilnībā nožūt. Vai arī izpildiet savas iestādes standarta procedūras, kas paredzētas piesārņojuma vai izšķakstīšanās gadījumiem. Attiecībā uz aprīkojumu izpildiet ražotāja ieteikumus par atsārņošanu.

10 Ķīmiski apdraudējumi

Piezīme Tālāk sniegtā informācija attiecas uz visu produktu, kas ietver proteīnāzes K, līzes, mazgāšanas un skalošanas reaģentus.

- CLP/GHS bīstamības piktogramma: 
- Signālvārds: BĪSTAMI
- **ANO GHS bīstamības apzīmējumi**
 - Viegli uzliesmojošs šķidrums un tvaiki — H225.
 - Kairina ādu — H315.
 - Izraisa nopietnu acu kairinājumu — H319.
 - Var izraisīt miegainību vai reibošus — H336.
 - Ir aizdomas, ka var izraisīt ģenētiskus bojājumus — H341.
- **ANO GHS piesardzības apzīmējumi**
 - **Novēršana**
 - Pirms lietošanas drošības datu lapā skatīt īpašus norādījumus.
 - Pirms lietošanas saņemt speciālu instruktažu.
 - Neizmantojot pirms nav izlasīti un saprasti visi piesardzības pasākumi.
 - Sargāt no karstuma, dzirkstelēm, atklātas liesmas un/vai karstām virsmām. Smēķēt aizliegts.
 - Tvertni stingri noslēgt.
 - Nepieļaut izgarojumu, tvaiku vai aerosolu ieelpošanu.
 - Pēc izmantošanas kārtīgi nomazgāt.
 - Izmantot tikai ārā vai labi vēdināmās telpās.
 - Izmantot aizsargcimdus/ aizsargdrēbes/ acu aizsargus/ sejas aizsargus.
 - Izmantot personisko aizsargaprīkojumu atbilstoši prasībām.
 - **Reakcija**
 - UGUNSGRĒKA gadījumā: dzēšanai izmantot piemērotus līdzekļus.
 - IEELPOJOT: izvest cietušo svaigā gaisā un turēt miera stāvoklī, lai būtu ērti elpot.
 - Sazinieties ar SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstu, ja jums ir slikta pašsajūta.
 - SASKARĒ AR ĀDU (vai matiem): nekavējoties novilkt visus piesārņotos apģērbus. Noskalot ādu ar ūdeni/dušā.
 - Specifiska rīcība, skatīt papildinformāciju par pirmo palīdzību.
 - Novilkt piesārņoto apģērbu un pirms atkārtotas lietošanas izmazgāt.
 - Ja rodas ādas iekaisums: lūdziet palīdzību mediķiem.
 - IEKĻŪSTOT ACĪS: Uzmanīgi skalot ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemiet kontaktlēcas, ja tādas ir un to var viegli izdarīt. Turpiniet skalošanu.
 - Ja acu iekaisums nepāriet: lūdziet palīdzību mediķiem.
 - Ja saskaras vai saistīts ar: lūdziet palīdzību mediķiem.
 - **Uzglabāšana/likvidēšana**
 - Turēt vēsumā.
 - Glabāt labi vēdināmā vietā.

- Tvertni stingri noslēgt.
- Glabāt slēgtā veidā.
- Atbrīvojies no satura un/vai tvertnes atbilstoši vietējiem, reģionālajiem, nacionālajiem un/vai starptautiskajiem noteikumiem.

11 Parauga paņemšana un uzglabāšana

- Perifēro asiņu paraugi ir jāsavāc EDTA mēģenēs, ievērojot iestādes vadlīnijas. Plazmu nedrīkst atdalīt no šūnām.
- Pirms testēšanas paraugi ir jāuzglabā 2–8 °C temperatūrā ne ilgāk par 3 dienām (72 stundām).
- Pareiza paraugu paņemšana un uzglabāšana ir būtiski svarīga šīs analīzes darbībai. Paraugu stabilitāte, izmantojot Sadaļa 12 testu, ir izvērtēta tikai tālāk esošajā Xpert NPM1 Mutation Procedūra ieteiktajos uzglabāšanas apstākļos.

12 Procedūra

12.1 Pirms darba sākšanas

Divdesmit (20) minūtes pirms procedūras sākšanas izņemiet asins paraugu, paraugu sagatavošanas reaģentus un kārtidžus no saldētavas, lai ļautu tiem sasniegt istabas temperatūru. Īsu brīdi centrifugējiet proteīnāzi K (PK) mikrocentrifūgā.

Svarīgi Sāciet analīzi 1 stundas laikā pēc parauga, kas apstrādāts ar paraugu reaģentu, pievienošanas kārtidžam.

Svarīgi Pirms sagatavojat paraugu, izņemiet kārtidžu no kartona iepakojuma. (Skatiet Sadaļa 12.3 Kārtidža sagatavošana).

12.2 Parauga sagatavošana

12.2.1 Parauga ar nezināmu balto asins šūnu (BAŠ) skaitu vai paraugu ar mazāk nekā 30 miljoniem BAŠ/ml sagatavošana

1. Jaunas, marķētas 50 ml konusveida mēģenes apakšā pievienojiet 100 µl proteīnāzes K (PK).
2. Nodrošiniet, lai asins paraugs būtu labi samaisīts, tieši pirms pipetēšanas 8 reizes apgriežot asins savākšanas mēģeni. Skatiet ražotāja norādījumus par EDTA asins savākšanas mēģeni.
3. Mēģenē, kurā jau ir PK, pievienojiet 4 ml asins parauga.
4. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 3 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
5. Inkubējiet 1 minūti istabas temperatūrā.
6. Tajā pašā mēģenē pievienojiet 2,5 ml līzes reaģenta (LY).

Piezīme Saglabājiet atlikušo līzes reaģentu, lai to atkal izmantotu 13. darbībā.

7. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
8. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
9. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
10. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
11. Samaisiet paraugu, 10 reizes piesitot mēģenes apakšai.
12. Pārnēsiet 1 ml sagatavotā lizāta jaunā, marķētā 50 ml konusveida mēģenē.

Piezīme Atlikušo lizātu var uzglabāt 2–8 °C temperatūrā līdz 48 stundām vai arī -20 °C vai zemākā temperatūrā līdz 1 mēnesim.

13. Jaunajā konusveida mēģenē, kas satur lizātu, pievienojiet 1,5 ml LY, kas tika saglabāts 6. darbībā.
14. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
15. Inkubējiet 10 minūtes istabas temperatūrā.
16. Tai pašai konusveida mēģenei pievienojiet 2 ml reaģenta pakāpes absolūto etanolu (lietotāja nodrošinātu).
17. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu. Nolieciet malā.
18. Izmetiet visus atlikušos PK vai LY reaģentus.

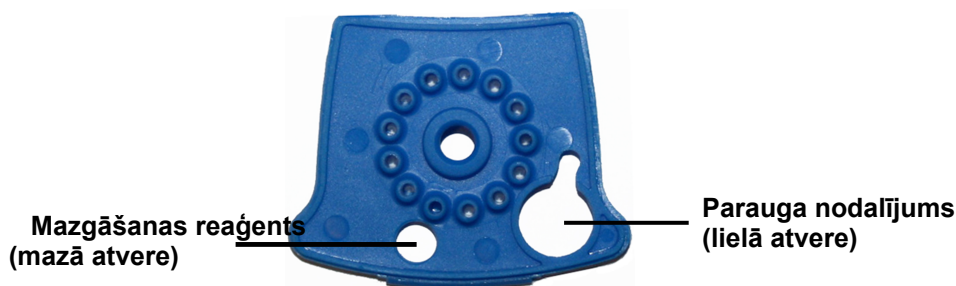
12.2.2 Parauga ar BAŠ skaitu, kas ir vienāds ar vai lielāks par 30 miljoniem BAŠ/ml, sagatavošana

1. Jaunas 50 ml konusveida mēģenes apakšā pievienojiet 100 µl PK.
2. Nodrošiniet, lai asins paraugs būtu labi samaisīts, tieši pirms pipetēšanas 8 reizes apgriežot asins savākšanas mēģeni. Skatiet ražotāja norādījumus par EDTA asins savākšanas mēģeni.
3. Mēģenē, kurā jau ir PK, pievienojiet 250 µl asins parauga un 3,75 ml 1x PBS (pH 7,4, lietotāja nodrošinātu).
4. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 3 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
5. Inkubējiet 1 minūti istabas temperatūrā.
6. Izpildiet Sadaļa 12.2.1 6.–17. darbību, lai pagatavotu gala lizātu.
7. Izmetiet visus atlikušos PK vai LY reaģentus.

12.3 Kārtridža sagatavošana

Lai pievienotu paraugu Xpert NPM1 Mutation kārtridžā:

1. Izņemiet kārtridžu no kartona iepakojuma.
2. Apskatiet kārtridžu un pārbaudiet, vai tam nav bojājumu. Ja tas ir bojāts, nelietojiet.
3. Atveriet kārtridžu, paceļot kārtridža vāku, un pārnēsiet visu vienas (1) mazgāšanas reaģenta ampulas saturu uz mazgāšanas reaģenta nodalījumu (ar mazo atveri). Skatiet Attēls 1.
4. Pipetējiet visu sagatavotā parauga (4,5 ml) saturu parauga nodalījumā (lielā atvere). Skatiet Attēls 1.



Attēls 1. Xpert NPM1 Mutation Kārtridžs (skats no augšas)

5. Aizveriet kārtridža vāku. Pārlicinieties, vai vāks cieši nifiksējas vietā. Sāciet analīzi (skatiet Sadaļa 12.4 Analīzes sākšana).

12.4 Analīzes sākšana

Svarīgi Pirms analīzes sākšanas pārlicinieties, vai sistēmā darbojas GeneXpert Dx programmatūras versija 6.2 vai jaunāka versija un vai programmatūrā ir importēts pareizais analīzes definīcijas fails. Šajā sadaļā ir uzskaitītas GeneXpert Dx System lietošanas noklusējuma darbības.

Piezīme Veicamās darbības var atšķirties, ja sistēmas administrators ir mainījis sistēmas noklusējuma darbplūsmu.

1. Ieslēdziet GeneXpert sistēmu, vispirms ieslēdzot GeneXpert Dx iekārtu un pēc tam ieslēdzot datoru. GeneXpert Dx programmatūra tiks startēta automātiski vai arī var būt jāveic dubultklikšķis uz GeneXpert Dx programmatūras saīsmes ikonas Windows® darbvirsma.
2. Piesakieties GeneXpert programmatūrā, izmantojot savu lietotājvārdu un paroli.
3. **GeneXpert sistēmas** logā noklikšķiniet uz **Izveidot testu (Create Test)** (GeneXpert Dx). Tiks atvērts logs **Izveidot testu (Create Test)**
4. Skenējiet vai ievadiet Pacienta ID (Patient ID). Ja ievadāt Pacienta ID (Patient ID), pārlicinieties, vai Pacienta ID (Patient ID) ir ievadīts pareizi. Lauks Pacienta ID (Patient ID) ir saistīts ar testa rezultātiem un tiek parādīts logā **Skatīt rezultātus (View Results)** un visos pārskatos. Tiks parādīts dialoglodziņš **Skenēt parauga ID svītrkodu (Scan Sample ID Barcode)**.
5. Skenējiet vai ievadiet Parauga ID (Sample ID). Ja ievadāt Parauga ID (Sample ID), pārlicinieties, vai Parauga ID (Sample ID) ir ievadīts pareizi. Lauks Parauga ID (Sample ID) tiek parādīts loga **Skatīt rezultātus (View Results)** kreisajā pusē un visos pārskatos. Tiks parādīts dialoglodziņš **Skenēt kārtridža svītrkodu (Scan Cartridge Barcode)**.

6. Skenējiet Xpert NPM1 Mutation kārtidža svītrkodu. Izmantojot svītrkoda informāciju, programmatūra automātiski aizpilda lodziņus šādos laukos: Reaģenta partijas ID (Reagent Lot ID), Kārtidža SN (Cartridge SN) un Derīguma termiņš (Expiration Date).

Piezīme

Ja Xpert NPM1 Mutation kārtidža svītrkods netiek noskenēts, atkārtojiet analīzi, izmantojot jaunu kārtidžu. Ja programmatūrā esat ieskenējis kārtidža svītrkodu un analīzes definīcijas fails nav pieejams, parādīsies ekrāns, kurā būs norādīts, ka analīzes definīcijas fails nav ielādēts sistēmā. Ja parādās šis ekrāns, sazinieties ar Cepheid tehnisko atbalstu.

7. Noklikšķiniet uz **Sākt testu (Start Test)**. Parādītajā dialoglodziņā, iespējams, būs jāievada parole.
8. Atveriet iekārtas moduļa durtiņas, uz kurām mirgo zaļa lampiņa, un ievietojiet kārtidžu.
9. Aizveriet durtiņas. Tiek sākts tests, un zaļā lampiņa pārtrauc mirgot. Kad analīze ir pabeigta, lampiņa izslēdzas.
10. Pirms atverat moduļa durtiņas un izņemat kārtidžu, uzgaidiet, kamēr sistēma atbrīvo durtiņu bloķētāju.
11. Izmetiet izlietotos kārtidžus atbilstošā paraugu atkritumu tvertnē saskaņā ar savas iestādes standarta praksi.

Piezīme

Līdz rezultāta iegūšanai jāgaida mazāk nekā 3 stundas (aptuveni 30 minūtes aizņem parauga sagatavošana ārpus iekārtas, savukārt analīzes izpilde ilgst 2,5 stundas).

13 Rezultātu skatīšana un drukāšana

Šajā sadaļā uzskaitītas rezultātu skatīšanas un drukāšanas pamata darbības. Detalizētākus norādījumus par to, kā apskatīt un izdrukāt rezultātus, skatīt *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

- Lai skatītu rezultātus, noklikšķiniet uz ikonas **Skatīt rezultātus (View Results)**.
- Pēc analīzes pabeigšanas ekrānā **Skatīt rezultātus (View Results)** noklikšķiniet uz pogas **Pārskats (Report)**, lai skatītu un/vai ģenerētu pārskata PDF failu.

14 Kvalitātes kontrole

Katrā kārtidžā ir ietverta ABL1 endogēnā kontrole un zondes pārbaudes kontrole (PCC).

ABL1 endogēnā kontrole — ABL1 endogēnā kontrole pārbauda, vai analīzē tiek izmantots pietiekams parauga daudzums. Turklāt šī kontrole nosaka ar paraugu saistītu reāllaika PCR analīzes inhibīciju. ABL1 kontrole tiek izturēta, ja tā atbilst piešķirtajiem pieņemšanas kritērijiem.

Zondes pārbaudes kontrole (PCC) — pirms PCR reakcijas sākšanas GeneXpert sistēma mēra fluorescences signālu no zondēm, lai uzraudzītu lodīšu rehidratāciju, reakciju mēģenes uzpildīšanu un to, vai kārtidžā darbojas visi reakcijas komponenti. PCC kontrole tiek izturēta, ja tā atbilst piešķirtajiem pieņemšanas kritērijiem.

15 Rezultātu interpretācija

Rezultātus automātiski interpretē GeneXpert sistēma no izmērītajiem fluorescentajiem signāliem un integrētajiem aprēķinu algoritmiem, un tie tiek parādīti logā Skatīt rezultātus (View Results). Iespējamie rezultāti un interpretācijas ir parādīti Tabula 1.

Tabula 1. Xpert NPM1 Mutation testa rezultāti un interpretācija

Rezultāts	Interpretācija
<p>NOTEIKTA NPM1 mutācija (NPM1 Mutation DETECTED)</p> <p>Skatiet Attēls 2, Attēls 3, Attēls 4</p>	<p>Tika noteikts NPM1 mutācijas transkripts.</p> <ul style="list-style-type: none"> NOTEIKTA NPM1 mutācija (NPM1 Mutation DETECTED) — tika noteikts NPM1 mutācijas transkripts; tā cikla sliekšnis (Ct) ir derīgā diapazona ietvaros un galapunkta vērtība ir lielāka par sliekšņa iestatījumu. Iespējamie noteiktie rezultāti: <ul style="list-style-type: none"> NOTEIKTA NPM1 MUTĀCIJA [#,##%] (NPM1 MUTATION DETECTED [#,##%]); Attēls 2. NOTEIKTA NPM1 MUTĀCIJA [virs augšējās LoQ] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ]); Attēls 3. NOTEIKTA NPM1 MUTĀCIJA [zem LoD; < #,##%] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <#,##%]). Attēls 4. ABL IZTURĒTS (PASS) — tika noteikts ABL transkripts; tā cikla sliekšnis (Ct) ir derīgā diapazona ietvaros un galapunkta vērtība ir lielāka par sliekšņa iestatījumu. Zondes pārbaude IZTURĒTA (PASS) — visi zondes pārbaudes rezultāti ir izturēti.
<p>NAV NOTEIKTA NPM1 mutācija (NPM1 Mutation NOT DETECTED)</p> <p>Skatiet Attēls 5</p>	<p>Netika noteikts NPM1 mutācijas transkripts.</p> <ul style="list-style-type: none"> NAV NOTEIKTA NPM1 mutācija [pietiekams ABL transkripta līmenis] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]) — netika noteikts NPM1 mutācijas transkripts; tā cikla sliekšnis (Ct) ir nulle vai lielāks par derīgā sliekšņa augšējo vērtību un/ vai galapunkta vērtība ir mazāka par sliekšņa iestatījumu. ABL IZTURĒTS (PASS) — tika noteikts ABL transkripts; tā cikla sliekšnis (Ct) ir derīgā diapazona ietvaros un galapunkta vērtība ir lielāka par sliekšņa iestatījumu. Zondes pārbaude IZTURĒTA (PASS) — visi zondes pārbaudes rezultāti ir izturēti.
<p>NEDERĪGS (INVALID)</p> <p>Skatiet Attēls 6, Attēls 7, Attēls 8, Attēls 9, Attēls 10</p>	<p>NPM1 mutācijas transkripta līmeni nevar noteikt, jo paraugs satur pārāk lielu NPM1 mutācijas transkripta daudzumu un/vai pārāk lielu vai nepietiekamu ABL transkripta daudzumu. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis, lai iegūtu papildu norādījumus par parauga atkārtotu testēšanu.</p> <ul style="list-style-type: none"> NPM1 mutācija NEDERĪGA (NPM1 Mutation INVALID) — NPM1 cikla sliekšnis (Ct) bija virs nulles vai mazāks par derīgā diapazona apakšējo vērtību (Attēls 8, Attēls 9). ABL NEIZTURĒTS (FAIL) — ABL cikla sliekšnis (Ct) nebija derīgā diapazona ietvaros vai galapunkta vērtība bija mazāka par sliekšņa iestatījumu (Attēls 6, Attēls 7, Attēls 8, Attēls 10). Zondes pārbaude – IZTURĒTS (PASS). Visi zondes pārbaudes rezultāti ir izturēti.
<p>KĻŪDA (ERROR)</p> <p>Skatiet Attēls 11</p>	<p>NPM1 mutācijas transkripta līmeni nevar noteikt. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis, lai iegūtu papildu norādījumus par parauga atkārtotu testēšanu.</p> <ul style="list-style-type: none"> NPM1 mutācijai NAV REZULTĀTA (NO RESULT) ABL NAV REZULTĀTA (NO RESULT) Zondes pārbaude NEIZTURĒTA (FAIL) — visi vai viens no zondes pārbaudes rezultātiem bija kļūmīgi. Zondes pārbaude IZTURĒTA (PASS) vai NA (nav attiecināms) un Spiediena pārtraukums (Pressure Abort)*. <p>* Ja zondes pārbaude ir izturēta, kļūdu izraisīja maksimālā spiediena robeža, kas pārsniedza pieļaujamo diapazonu, vai sistēmas sastāvdaļas kļūme.</p>
<p>NAV REZULTĀTA (NO RESULT)</p>	<p>NPM1 mutācijas transkripta līmeni nevar noteikt. Tika apkopots nepietiekams datu daudzums, lai iegūtu analīzes rezultātu. Tas var notikt ja, piemēram, operators aptur notiekošu analīzi. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis, lai iegūtu papildu norādījumus par paraugu atkārtotu testēšanu.</p> <ul style="list-style-type: none"> NPM1 mutācijai NAV REZULTĀTA (NO RESULT) ABL NAV REZULTĀTA (NO RESULT) Zondes pārbaude NA (nav attiecināms)

16 Kvantitatīvie rezultāti

Xpert NPM1 Mutation kvantitatīvās izzaves tiek sniegtas kā NPM1 mutācijas/ABL1 attiecība procentos. Komplekšiem tiek piešķirtas partijai specifiskas efektivitātes ($E_{\Delta Ct}$) un mēroga koeficienta (SF) vērtības, kas sasaista NPM1 mutācijas (A, B un D) un ABL1 transkriptu kvantifikāciju ar sintētisko NPM1 mutācijas un ABL1 *in vitro* transkribēto RNS (IVT-RNS) primāro standartu pavairojumu skaitu.

Tabula 2. Xpert NPM1 Mutation testa rezultātu piemēri

Analīzē	NPM1 mutācija		ABL		Xpert NPM1 Mutation Testa rezultāti	Piezīmes
	Ct	Rezultāts ^a	Ct	Rezultāts ^a		
1	5,2	NEDERĪGS (INVALID)	5,8	NEIZTURĒTS (FAIL)	NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas un ABL transkriptu līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcripts])	NA
2	9	NEDERĪGS (INVALID)	5,5	NEIZTURĒTS (FAIL)	NEDERĪGS [pārāk augsts ABL transkriptu līmenis] (INVALID [Too high ABL transcripts]).	NA
3	5,5	NEDERĪGS (INVALID)	8,5	IZTURĒTS (PASS)	NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas transkriptu līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcripts])	NA
4	25,0	NEDERĪGS (INVALID)	21,8	NEIZTURĒTS (FAIL)	NEDERĪGS [nepietiekams ABL transkripts] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	NA
5	0	NEDERĪGS (INVALID)	0	NEIZTURĒTS (FAIL)	NEDERĪGS [nav ABL transkripta] (INVALID [No ABL transcript])	NA
6	8,5	POZ	13,6	IZTURĒTS (PASS)	NOTEIKTA NPM1 mutācija [virs augšējās LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])	NA
7	22,5	POZ	14,8	IZTURĒTS (PASS)	NOTEIKTA NPM1 mutācija [1,05%] (NPM1 Mutation DETECTED [1.05%])	Ziņotā vērtība: 1,05%
8	27,9	POZ	14,0	IZTURĒTS (PASS)	NOTEIKTA NPM1 mutācija [zem LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])	NA
9	0	NEG	14,6	IZTURĒTS (PASS)	NEGATĪVS [pietiekams ABL transkripta līmenis] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	NA
10	0	NAV REZULTĀTA (NO RESULT)	0	NAV REZULTĀTA (NO RESULT)	KĻŪDA (ERROR)	Piemēram, kļūda 5017 [ABL] zondes pārbaude neizdevās ([ABL] probe check failed)

^a Papildinformāciju skatiet GeneXpert Dx sistēmas programmatūras cilnē Analīta rezultāti (Analyte Results).

16.1 NOTEIKTA NPM1 mutācija [#,#%] (NPM1 Mutation DETECTED [#.#%])

NPM1 mutācija noteikta #,#% līmenī.

Rezultātam “NOTEIKTA NPM1 mutācija [#,#%] (NPM1 Mutation DETECTED [#.#%])” NPM1 mutācija ir nosakāma, kad NPM1 mutācijas Ct ir lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “32”, savukārt ABL Ct ir lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20”. GeneXpert aprēķina procentuālo vērtību, izmantojot šādu vienādojumu, kur delta Ct (ΔCt) vērtība tiek iegūta, no ABL Ct atņemot NPM1 mutācijas Ct:

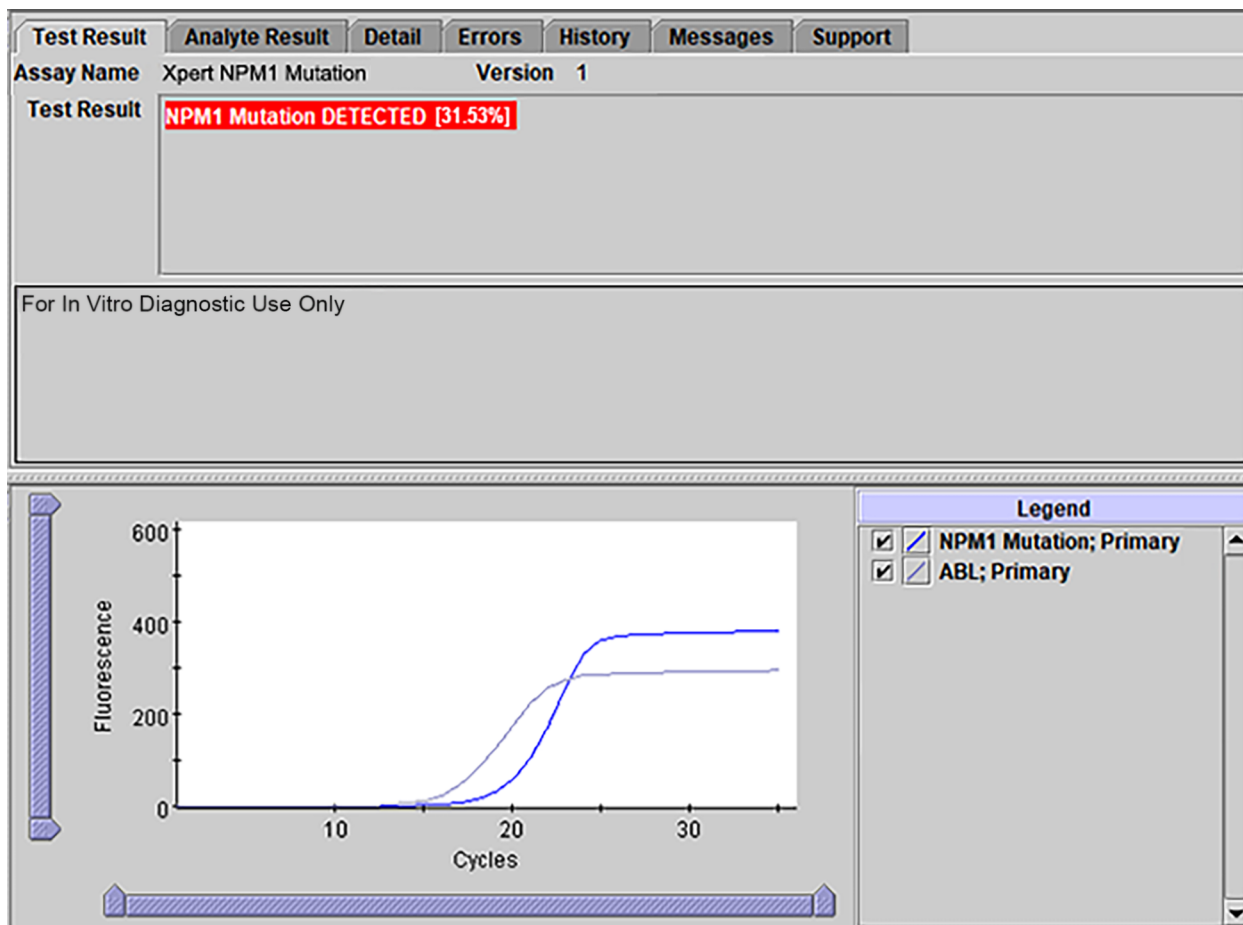
$$\% = E_{\Delta Ct}^{\Delta Ct} \times 100 \times \text{mēroga koeficients}$$

Piezīme

Mēroga koeficients (SF) ir partijai specifisks parametrs, kas ir integrēts analīzes kārtidža svītrkodā. Šī koeficienta vērtība un partijai specifiskā analīzes efektivitāte ($E_{\Delta Ct}$) tiek noteiktas katras analīzes partijas kvalitātes kontroles testēšanā, izmantojot primāros standartus, kas kalibrēti atbilstoši sintētisko NPM1 mutācijas un ABL1 *in vitro* transkribēto RNS (IVT-RNS) kalibratoru pavairojumu skaitam, lai kvantificētu NPM1 mutācijas transkriptu. Izmantošanai šeit parādītajā piemērā $E_{\Delta Ct}$ ir iestatīts uz 1,95, savukārt SF vērtība ir iestatīta uz 1,79.

Piemērs: Partijai specifiskais $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
 Analīzes ABL Ct = 14,5; NPM1 mutācijas Ct = 17,1; $\Delta Ct = -2,6$
 $\% = 1,95^{(-2,6)} \times 100 \times 1,79 = 31,53\%$

Rezultāts: NOTEIKTA NPM1 mutācija [31,53%] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%]). Skatiet Attēls 2.



Attēls 2. GeneXpert Dx logs Skatīt rezultātus (View Results): NOTEIKTA NPM1 mutācija [31,53%] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%])

16.2 NOTEIKTA NPM1 mutācija [virs augšējās LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

NPM1 mutācija noteikta > 500% līmenī.

Rezultātam “NOTEIKTA NPM1 mutācija [virs augšējās LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])” NPM1 mutācija ir nosakāma, kad NPM1 mutācijas Ct ir lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “32”, savukārt ABL Ct ir lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20”. GeneXpert aprēķina procentuālo vērtību, izmantojot šādu vienādojumu, kur delta Ct (ΔCt) vērtība tiek iegūta, no ABL Ct atņemot NPM1 mutācijas Ct:

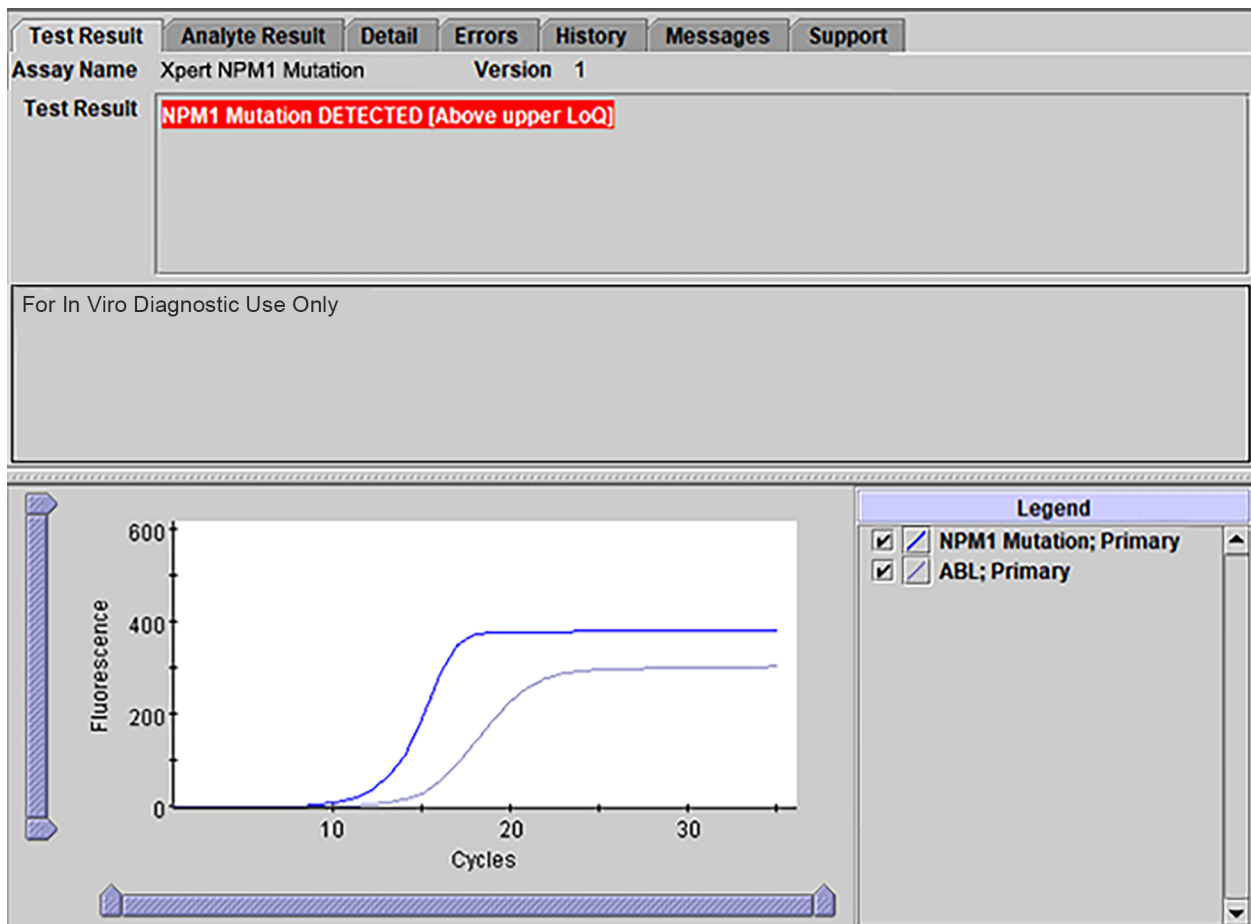
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{mēroga koeficients (SF)}$$

Mēroga koeficients (SF) ir partijai specifisks parametrs, kas ir integrēts analīzes kārtidža svītkodā. Šī koeficienta vērtība un partijai specifiskā analīzes efektivitāte ($E_{\Delta Ct}$) tiek noteiktas katras analīzes partijas kvalitātes kontroles testēšanā, izmantojot primāros standartus, kas kalibrēti atbilstoši sintētisko NPM1 mutācijas un ABL1 *in vitro* transkribēto RNS (IVT-RNS) kalibratoru pavairojumu skaitam, lai kvantificētu NPM1 mutācijas transkriptu. Izmantošanai šeit parādītajā piemērā $E_{\Delta Ct}$ ir iestatīts uz 1,95, savukārt SF vērtība ir iestatīta uz 1,79.

Piezīme

Piemērs: Partijai specifiskais $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
 Analīzes ABL Ct = 13,4; NPM1 mutācijas Ct = 10,2; $\Delta Ct = 3,2$
 $\% = 1,95^{(3,2)} \times 100 \times 1,79 = 1516,92\%$ ir lielāks par definēto analīzes augšējo LoQ pie 500%

Rezultāts: NOTEIKTA NPM1 mutācija [virs augšējās LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ]). Skatiet Attēls 3.



Attēls 3. GeneXpert Dx logs Skatīt rezultātus (View Results): NOTEIKTA NPM1 mutācija [virs augšējās LoQ] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

16.3 NOTEIKTA NPM1 mutācija [zem LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

NPM1 mutācija noteikta < 0,030% līmenī.

Rezultātam “NOTEIKTA NPM1 mutācija [zem LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])” NPM1 mutācija ir nosakāma, kad NPM1 mutācijas Ct ir lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “32”, savukārt ABL Ct ir lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20”. GeneXpert aprēķina procentuālo vērtību, izmantojot šādu vienādojumu, kur delta Ct (ΔCt) vērtība tiek iegūta, no ABL Ct atņemot NPM1 mutācijas Ct:

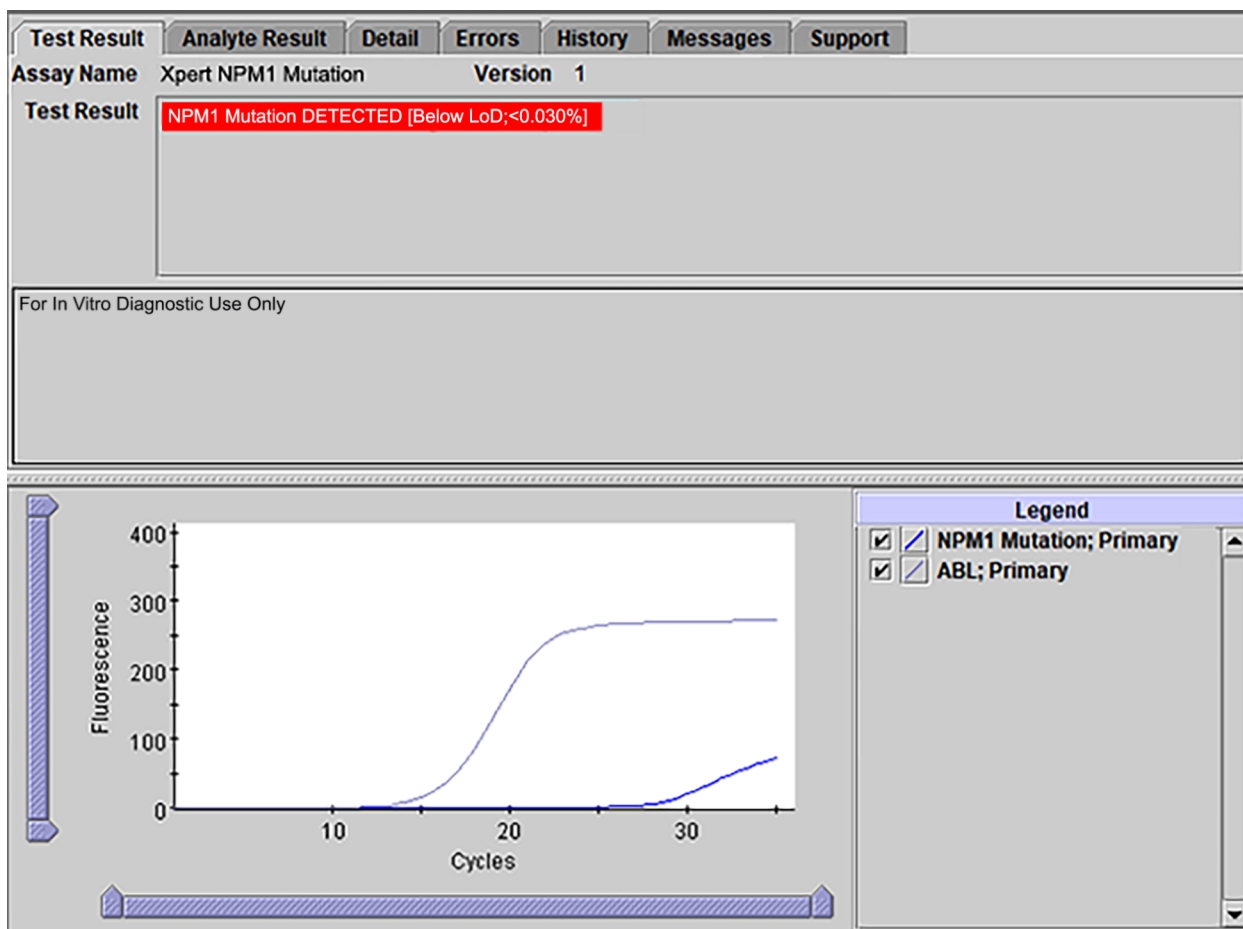
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{mēroga koeficients (SF)}$$

Piezīme

Mēroga koeficients (SF) ir partijai specifisks parametrs, kas ir integrēts analīzes kārtīdža svītrkodā. Šī koeficienta vērtība un partijai specifiskā analīzes efektivitāte ($E_{\Delta Ct}$) tiek noteiktas katras analīzes partijas kvalitātes kontroles testēšanā, izmantojot primāros standartus, kas kalibrēti atbilstoši sintētisko NPM1 mutācijas un ABL1 *in vitro* transkribēto RNS (IVT-RNS) kalibratoru pavairojumu skaitam, lai kvantificētu NPM1 mutācijas transkriptu. Izmantošanai šeit parādītajā piemērā $E_{\Delta Ct}$ ir iestatīts uz 1,95, savukārt SF vērtība ir iestatīta uz 1,79.

Piemērs: Partijai specifiskais $E_{\Delta Ct} = 1,95$; $SF = 1,79$
 Analīzes ABL Ct = 14,3; NPM1 mutācijas Ct = 28,8; $\Delta Ct = -14,5$
 $\% = 1,95^{(-14,5)} \times 100 \times 1,79 = 0,011\%$ ir mazāks par definēto analīzes LoD pie 0,030%

Rezultāts: NOTEIKTA NPM1 mutācija [zem LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%]). Skatiet Attēls 4.



Attēls 4. GeneXpert logs Skatīt rezultātus (View Results): NOTEIKTA NPM1 mutācija [zem LoD; < 0,030%] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

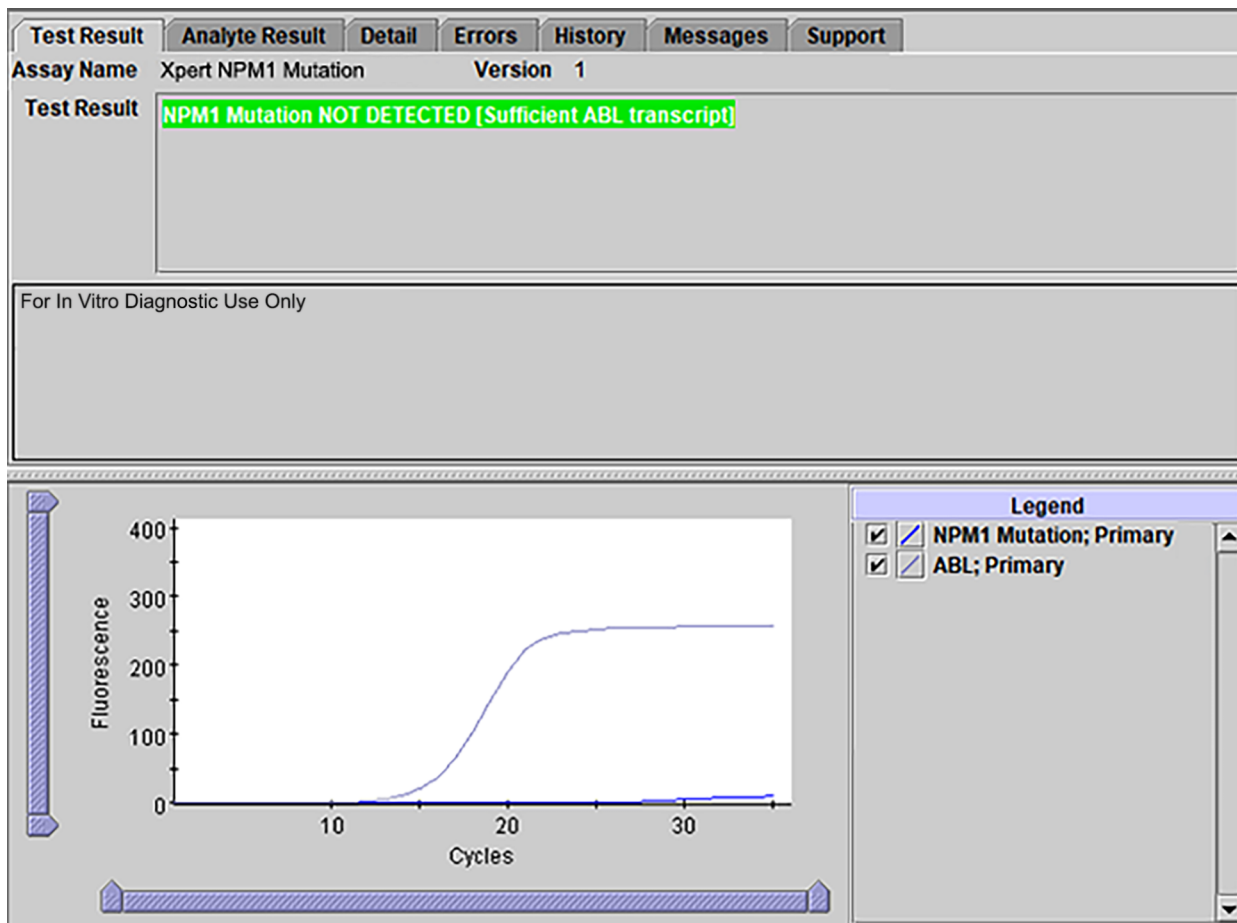
16.4 NAV NOTEIKTA NPM1 mutācija [pietiekams ABL transkripta līmenis] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

NPM1 mutācija netika noteikta, kad NPM1 Ct bija vienāds ar “0” vai lielāks par “32” un kad ABL Ct bija lielāks par “6” un mazāks par vai vienāds ar “20”.

GeneXpert programmatūrai nepieciešams, lai ABL Ct būtu lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20” Xpert NPM1 Mutation testam, lai nodrošinātu, ka ir “Pietiekams ABL transkripts (Sufficient ABL transcript)”. Skatiet Sadaļa 15 Rezultātu interpretācija, 1. tabulu.

Piemērs: Analīzes NPM1 mutācijas Ct = 0; ABL Ct = 14,0 ir diapazonā starp “6” un “20”.

Rezultāts: NAV NOTEIKTA NPM1 mutācija [pietiekams ABL transkripta līmenis] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]). Skatiet Attēls 5.



Attēls 5. GeneXpert logs Skatīt rezultātus (View Results): NAV NOTEIKTA NPM1 mutācija [pietiekams ABL transkripta līmenis] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

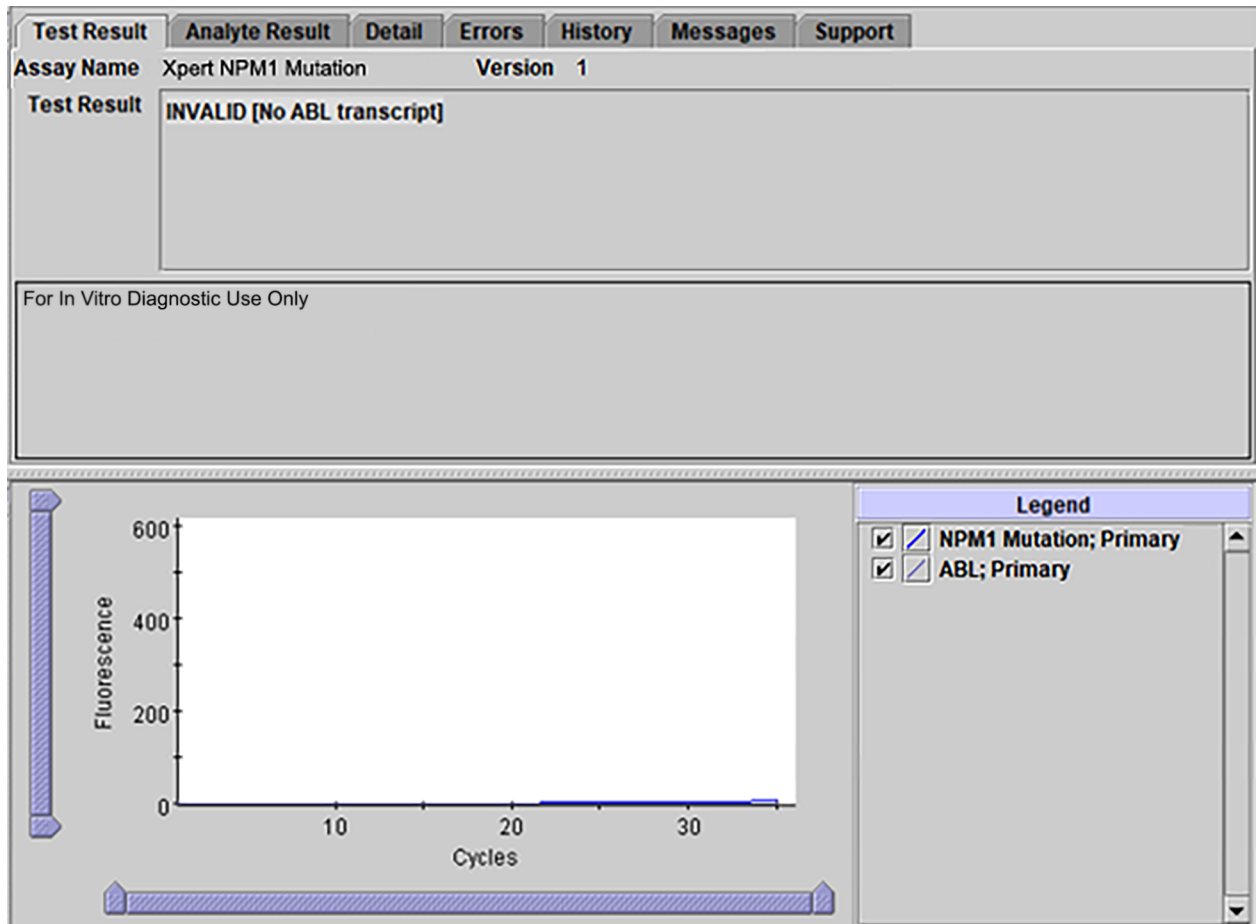
16.5 NEDERĪGS [nav ABL transkripta] (INVALID [No ABL transcript])

NPM1 mutācija tika noteikta vai netika noteikta, kad ABL Ct bija vienāds ar “0”.

GeneXpert programmatūrai nepieciešams, lai ABL Ct būtu lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20” Xpert NPM1 Mutation testam, lai nodrošinātu, ka ir “Pietiekams ABL transkripts (Sufficient ABL transcript)”. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis.

Piemērs: Analīzes NPM1 mutācijas Ct = 0; ABL Ct = 0.

Rezultāts: **NEDERĪGS [nav ABL transkripta] (INVALID [No ABL transcript])**. Skatiet Attēls 6.



Attēls 6. GeneXpert logs Skatīt rezultātus (View Results):
NEDERĪGS [nav ABL transkripta] (INVALID [No ABL transcript])

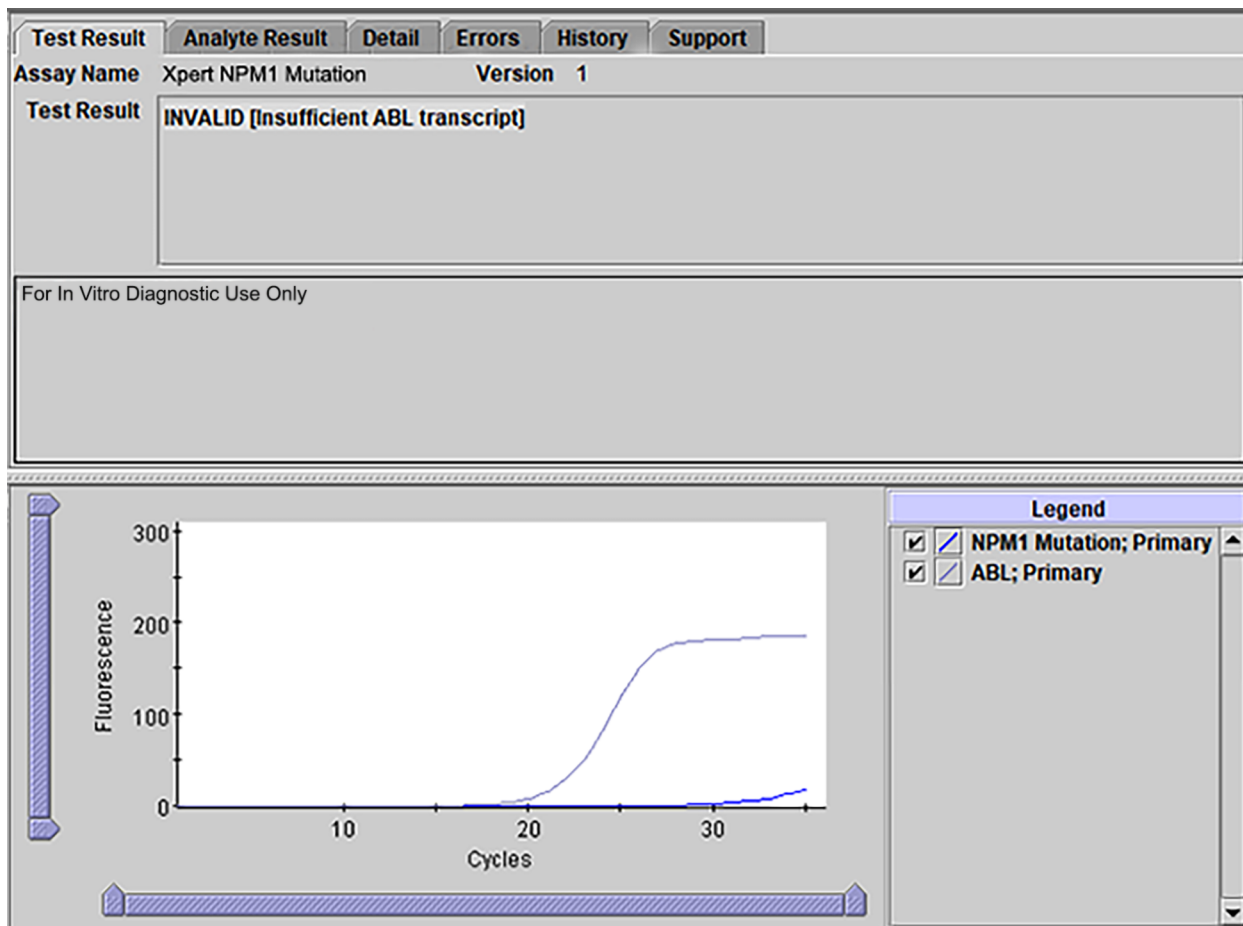
16.6 NEDERĪGS [nepietiekams ABL transkripts] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

NPM1 mutācija tika noteikta vai netika noteikta, kad ABL Ct bija lielāks par “20”.

GeneXpert programmatūrai nepieciešams, lai ABL Ct būtu lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20” Xpert NPM1 Mutation testam, lai nodrošinātu, ka ir “Pietiekams ABL transkripts (Sufficient ABL transcript)”. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis.

Piemērs: Analīzes NPM1 mutācijas Ct = 33,3; ABL Ct = 20,2 ir lielāks par “20”.

Rezultāts: **NEDERĪGS [nepietiekams ABL transkripts] (INVALID [Insufficient ABL transcript])**.
Skatiet Attēls 7.



Attēls 7. GeneXpert logs Skatīt rezultātus (View Results): **NEDERĪGS [nepietiekams ABL transkripts] (INVALID [Insufficient ABL transcript])**

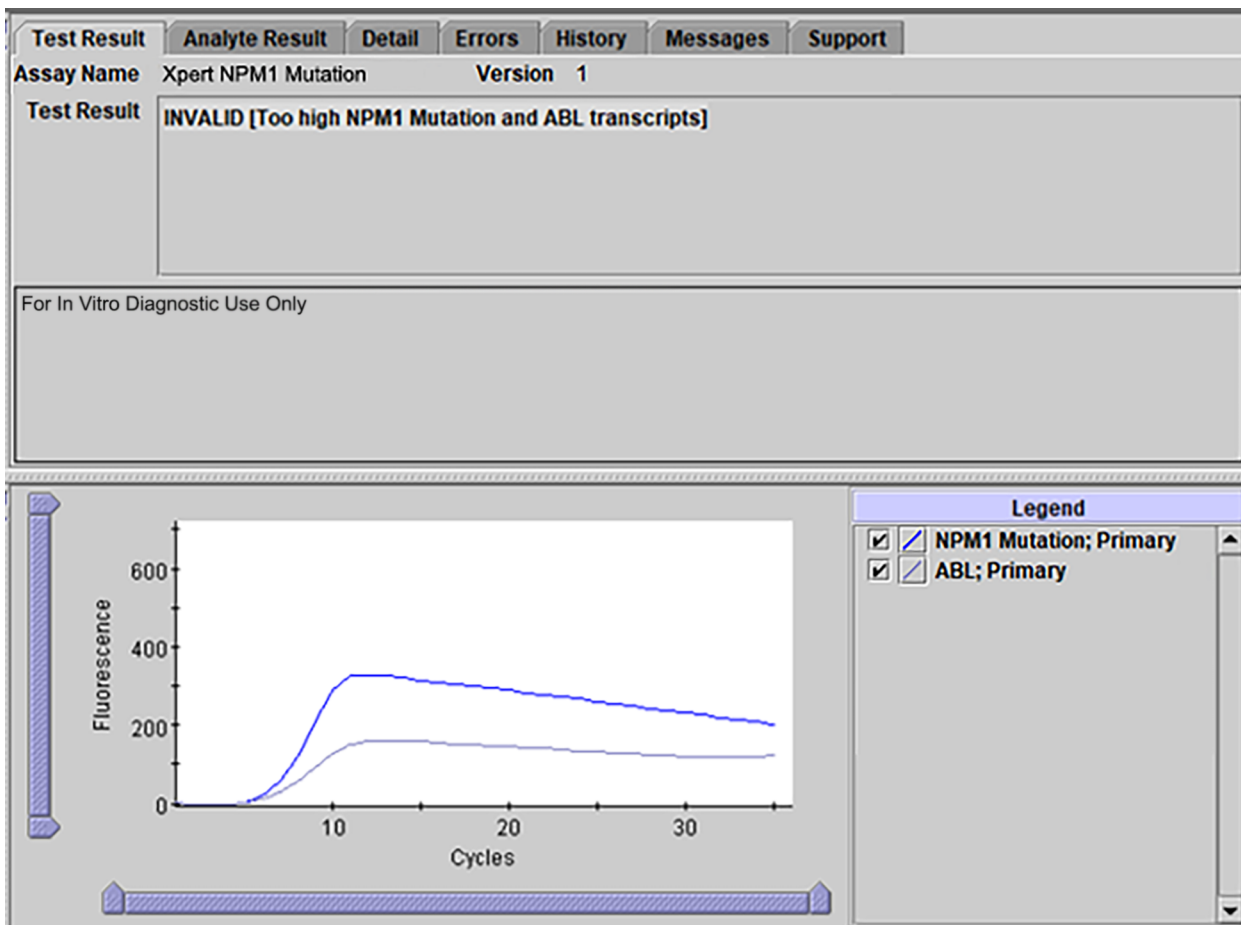
16.7 NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas un ABL transkripta līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

NPM1 mutācija tika noteikta, kad gan NPM1 mutācijas, gan ABL Ct bija lielāki par “0” un mazāki par “6”.

GeneXpert programmatūrai nepieciešams, lai ABL Ct būtu lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20” Xpert NPM1 Mutation testam, lai nodrošinātu, ka ir “Pietiekams ABL transkripts (Sufficient ABL transcript)”. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis.

Piemērs: Analīzes NPM1 mutācijas Ct = 5,4 ir lielāks par “0” un mazāks par “6”; ABL Ct = 5,9 ir mazāks par “6”.

Rezultāts: **NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas un ABL transkripta līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])**. Skatiet Attēls 8.



Attēls 8. GeneXpert Dx logs Skatīt rezultātus (View Results): NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas un ABL transkripta līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

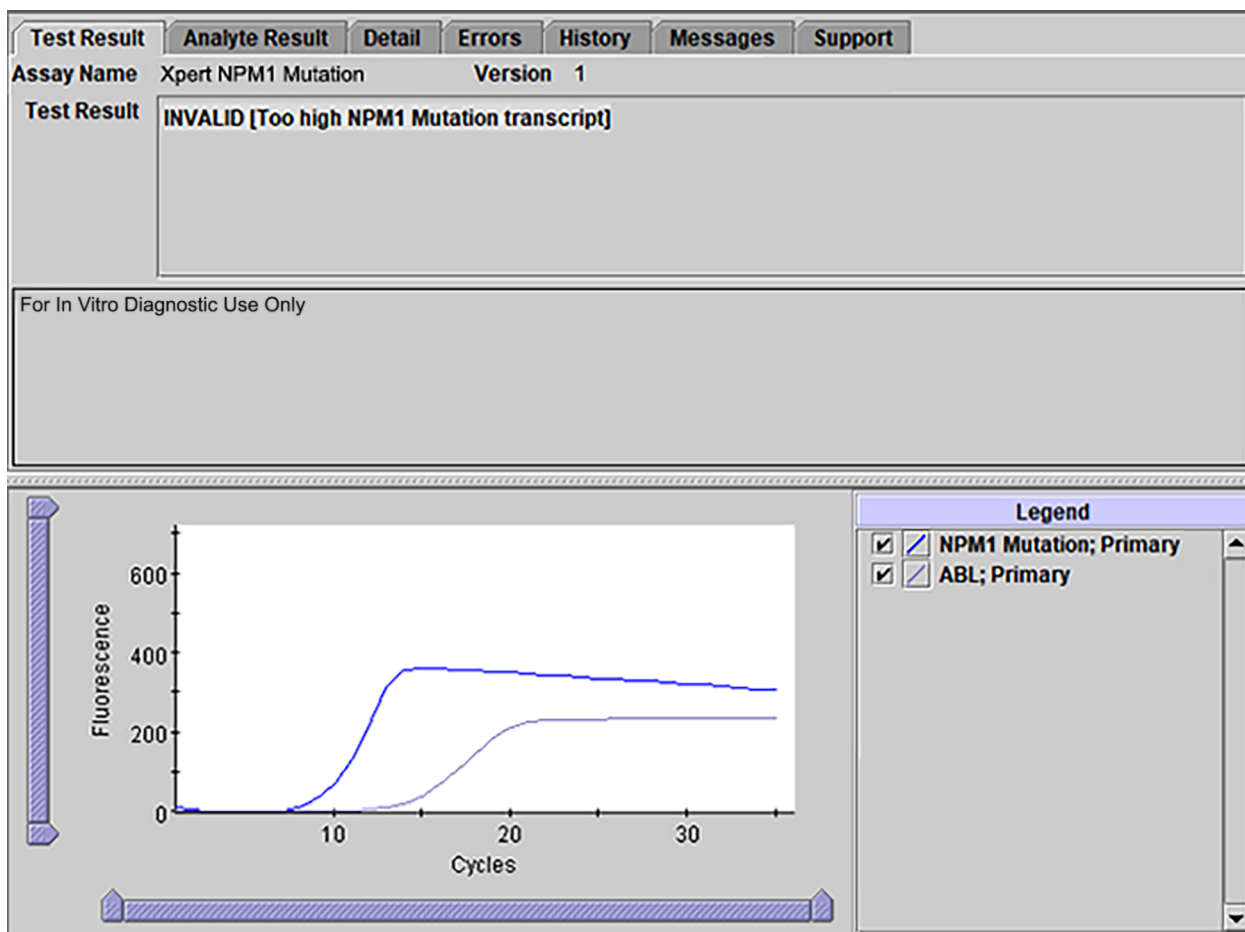
16.8 NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas transkripta līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

NPM1 mutācija tika noteikta, kad NPM1 mutācijas Ct bija lielāks par “0” un mazāks par “6” un kad ABL Ct bija lielāks par “6” un mazāks par vai vienāds ar “20”.

GeneXpert programmatūrai nepieciešams, lai ABL Ct būtu lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20” Xpert NPM1 Mutation testam, lai nodrošinātu, ka ir “Pietiekams ABL transkripts (Sufficient ABL transcript)”. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis.

Piemērs: Analīzes NPM1 mutācijas Ct = 5,8 ir lielāks par “0” un mazāks par “6”; ABL Ct = 13 ir diapazonā starp “6” un “20”.

Rezultāts: **NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas transkripta līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])**. Skatiet Attēls 9.



Attēls 9. GeneXpert logs Skatīt rezultātus (View Results): **NEDERĪGS [pārāk augsts NPM1 mutācijas transkripta līmenis] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])**

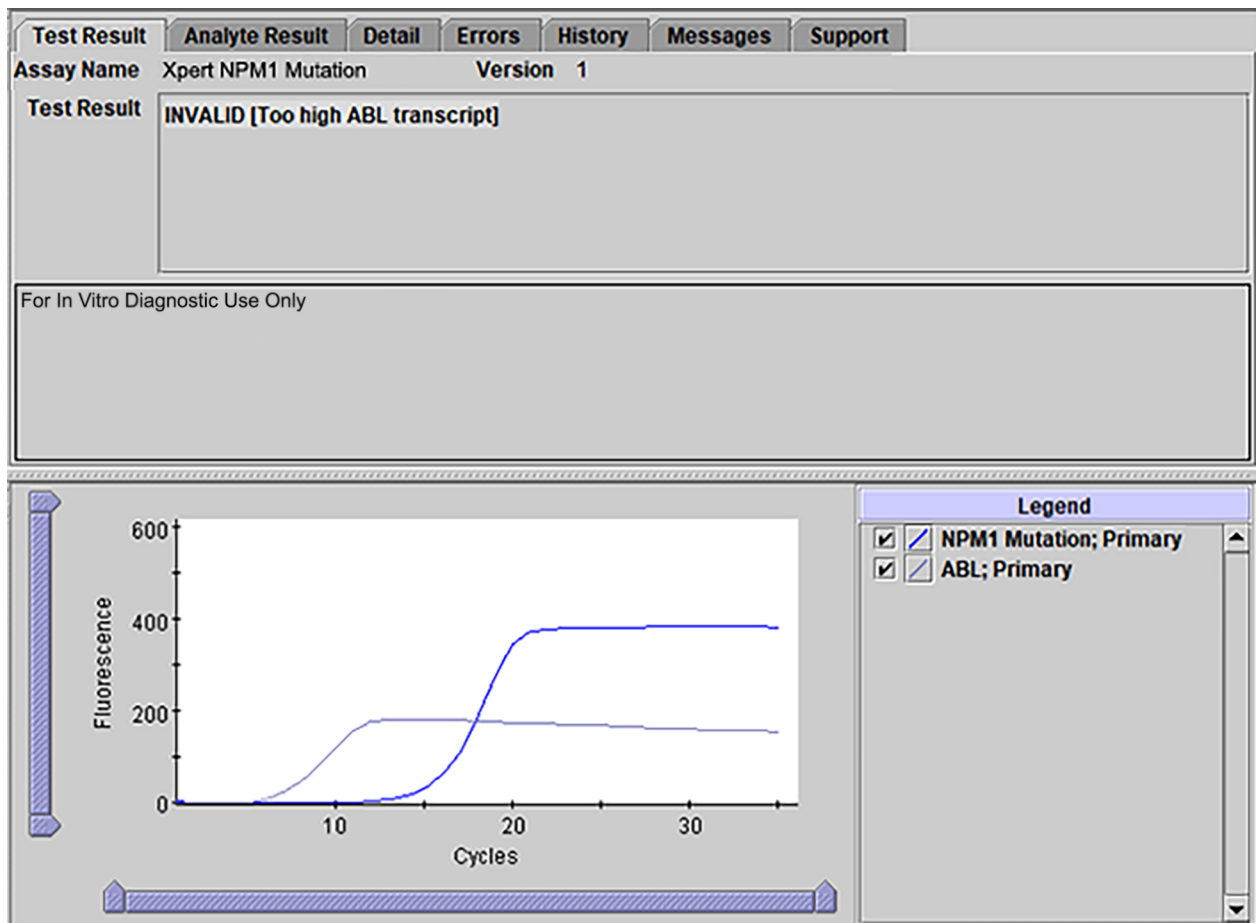
16.9 NEDERĪGS [pārāk augsts ABL mutācijas transkripta līmenis] (INVALID [Too high ABL Mutation transcript])

NPM1 mutācija tika noteikta, kad NPM1 mutācijas Ct bija lielāks par “6” un mazāks par vai vienāds ar “32” un kad ABL Ct nebija vienāds ar “0” un bija mazāks par “6”.

GeneXpert programmatūrai nepieciešams, lai ABL Ct būtu lielāks par vai vienāds ar “6” un mazāks par vai vienāds ar “20” Xpert NPM1 Mutation testam, lai nodrošinātu, ka ir “Pietiekams ABL transkripts (Sufficient ABL transcript)”. Skatiet Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis.

Piemērs: Analīzes NPM1 mutācijas Ct = 13,2; ABL Ct = 5,8 ir mazāks par “6”.

Rezultāts: **NEDERĪGS [pārāk augsts ABL transkripta līmenis] (INVALID [Too high ABL transcript])**. Skatiet Attēls 10.



Attēls 10. GeneXpert logs Skatīt rezultātus (View Results): NEDERĪGS [pārāk augsts ABL transkripta līmenis] (INVALID [Too high ABL transcript]).

16.10 KĻŪDA (ERROR)

The screenshot shows the GeneXpert software interface. At the top, there are several tabs: 'Test Result', 'Analyte Result', 'Detail', 'Errors', 'History', and 'Support'. The 'Test Result' tab is currently selected. Below the tabs, the 'Assay Name' is 'Xpert NPM1 Mutation' and the 'Version' is '1'. The 'Test Result' field displays 'ERROR' in a yellow box. Below this, there is a section labeled 'For In Vitro Diagnostic Use Only'. The main area of the interface is mostly empty, with the text '<No Data Available>' centered at the bottom.

Attēls 11. GeneXpert logs Skatīt rezultātus (View Results): KĻŪDA (ERROR)

17 Analīzes ierobežojumi

- Analīzi nav paredzēts izmantot ar ārējiem kalibratoriem.
- Šo procedūru izmaiņas var mainīt analīzes darbību.
- Šis produkts tika izstrādāts lietošanai tikai ar EDTA mēģenēs savāktiem asiņu paraugiem.
- Neizmantojiet heparīnu kā antikoagulantu, jo tas var kavēt PCR reakciju.
- Nātrija citrāta, leikocītu un trombocītu centrifugāta slāņa un kaulu smadzeņu paraugu veidi nav apstiprināti.
- Nepareizas paraugu savākšanas, lietošanas, uzglabāšanas vai paraugu sajaukšanas rezultātā analīzes rezultāti var būt kļūdaini. Lai nepieļautu kļūdainus rezultātus, rūpīgi jāievēro lietošanas pamācība.
- Mutācijas vai polimorfismi praimera vai zondes saistīšanās reģionos var ietekmēt jaunu vai nezināmu variantu noteikšanu un var radīt viltus negatīvu rezultātu.
- Pārmērīgi augsts balto asins šūnu skaits var radīt spiedienu kārtidžā un izraisīt izpildes pārtraukšanu vai nepareizus rezultātus.
- Dažiem paraugiem ar ļoti zemu ABL transkripta līmeni vai balto asins šūnu skaitu, kas ir mazāks par 150 000 šūnām/ml, var tikt uzrādīts rezultāts **NEDERĪGS (INVALID)** (1. tipa). Nenoteikts rezultāts neizslēdz ļoti zema līmeņa leikēmisku šūnu klātbūtni paraugā.

18 Problēmu novēršanas ceļvedis

Tabula 3. Problēmu novēršanas ceļvedis

Analīzes rezultāts	Iespējamie cēloņi	Ieteikumi
NEDERĪGS (INVALID)	1. tips. Endogēnās kontroles ABL kļūme: <ul style="list-style-type: none"> Slikta parauga kvalitāte RT-PCR inhibīcija ABL Ct ir > 20 un/vai galapunkts ir < 100 	<ul style="list-style-type: none"> Pārbaudiet parauga kvalitāti (piem., vai nav pārsniegtas parauga uzglabāšanas prasības, tostarp attiecībā uz ilgumu un temperatūru). Atkārtojiet analīzi ar oriģinālo paraugu (ja pieejams) vai izmantojot saglabāto lizātu un jaunu kārtidžu, izpildot Sadaļa 19.1 "Atkārtotas testēšanas procedūra rezultāta KĻŪDA (ERROR) vai NEDERĪGS (INVALID) gadījumā (1. tips)" aprakstīto procedūru.
	2. tips: NPM1 mutācijas transkripta līmeni nevar noteikt, jo paraugs satur pārāk lielu NPM1 mutācijas un/vai ABL transkriptu daudzumu (Ct < 6)	Atkārtojiet analīzi ar oriģinālo paraugu (ja pieejams) vai izmantojot saglabāto lizātu un jaunu kārtidžu, izpildot Sadaļa 19.2 "Atkārtotas testēšanas procedūra rezultāta KĻŪDA (ERROR) (kods 2008) vai NEDERĪGS (INVALID) gadījumā (2. tips)" aprakstīto procedūru.
KĻŪDA (ERROR) (kods 2008)	Spiediens pārsniedz ierobežojumu (kļūdas ziņojums 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Pārbaudiet parauga kvalitāti Pārbaudiet, vai nav ievērojami palielināts BAŠ skaits Atkārtojiet analīzi ar oriģinālo paraugu (ja pieejams) vai izmantojot saglabāto lizātu un jaunu kārtidžu, izpildot Sadaļa 19.2 "Atkārtotas testēšanas procedūra rezultāta KĻŪDA (ERROR) (kods 2008) vai NEDERĪGS (INVALID) gadījumā (2. tips)" aprakstīto procedūru.
KĻŪDA (ERROR) (kodi 5006, 5007, 5008 un 5009*) * Šajā sarastā nav uzskaitīti visi KĻŪDA (ERROR) kodi.	Zondes pārbaudes kļūme	Atkārtojiet analīzi ar oriģinālo paraugu (ja pieejams) vai izmantojot saglabāto lizātu un ar jaunu kārtidžu, izpildot Sadaļa 19.1 "Atkārtotas testēšanas procedūra rezultāta KĻŪDA (ERROR) vai NEDERĪGS (INVALID) gadījumā (1. tips)" aprakstīto procedūru.
NAV REZULTĀTA (NO RESULT)	Datu apkopošanas kļūme. Piemēram, operators apturēja notiekošu analīzi vai arī radās energoapgādes kļūme.	Atkārtojiet analīzi ar oriģinālo paraugu (ja pieejams) vai izmantojot saglabāto lizātu un ar jaunu kārtidžu, izpildot Sadaļa 19.1 "Atkārtotas testēšanas procedūra rezultāta KĻŪDA (ERROR) vai NEDERĪGS (INVALID) gadījumā (1. tips)" aprakstīto procedūru.

19 Atkārtota testēšana

19.1 Atkārtotas testēšanas procedūra rezultāta KĻŪDA (ERROR) vai NEDERĪGS (INVALID) gadījumā (1. tips)

Atkārtoti testējiet paraugus, kam iegūts rezultāts **KĻŪDA (ERROR)** vai **NEDERĪGS (INVALID)**, jo ABL cikla sliekšnis (Ct) pārsniedz maksimālo derīgo Ct robežvērtību (Ct > 20) vai arī galapunkta vērtība ir zem sliekšņa iestatījuma (< 100). Skatiet arī Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis.

1. Ja ir pieejams pietiekams asins parauga tilpums, veiciet atkārtotu testēšanu no sākotnējās asins parauga savākšanas mēģenes, izpildot Sadaļa 12.2 aprakstīto procedūru.

-VAI-

Ja asins parauga tilpums ir nepietiekams, atkārtotu testēšanu var veikt, izmantojot Sadaļa 12.2.1 12. darbībā saglabāto lizātu.

- a. Ja Sadaļa 12.2.1 12. darbībā saglabātais lizāts ir uzglabāts sasaldēts, pirms lietošanas atkausējiet to līdz istabas temperatūrai.
 - b. Nodrošiniet, lai lizāts būtu labi samaisīts, maisot paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu, un nolieciet to malā uz 3 minūtēm, lai nosēžas burbuļi.
2. Pārnēsiet 1 ml sagatavotā lizāta jaunā 50 ml konusveida mēģenē.
 3. Izpildiet Sadaļa 12.2.1 13.–17. darbību, lai pagatavotu gala lizātu.
 4. Atveriet kārtidzi, paceļot kārtidža vāku, un pārnēsiet visu vienas (1) mazgāšanas reaģenta ampulas saturu uz mazgāšanas reaģenta nodalījumu (ar mazo atveri). Skatiet Attēls 1.
 5. Pipetējiet visu sagatavotā parauga saturu parauga nodalījumā (lielā atvere). Skatiet Attēls 1.
 6. Aizveriet kārtidža vāku. Sāciet analīzi (skatiet Sadaļa 12.4 Analīzes sākšana).

19.2 Atkārtotas testēšanas procedūra rezultāta KĻŪDA (ERROR) (kods 2008) vai NEDERĪGS (INVALID) gadījumā (2. tips)

Atkārtoti testējiet paraugus, kuru NPM1 mutācijas un/vai ABL transkriptu līmeņi ir zem derīgās minimālās Ct robežvērtības (Ct > 0 un Ct < 6), un/vai, ja ir pārsniegta spiediena robeža. Skatiet arī Sadaļa 18 Problēmu novēršanas ceļvedis.

1. Jaunas 50 ml konusveida mēģenes apakšā pievienojiet 100 µl PK (proteināzes K).
2. Nodrošiniet, lai asins paraugs vai Sadaļa 12.2 12. darbībā pāri palikušais lizāts būtu labi samaisīts, tieši pirms pipetēšanas 8 reizes apgriežot mēģeni.
3. Mēģenē, kurā jau ir proteināze K, pievienojiet 250 µl asins parauga un 3,75 ml PBS (pH 7,4, lietotāja nodrošinātu), ja pieejams, vai 60 µl Sadaļa 12.2.1 12. darbībā saglabātā lizāta.
 - a. Ja Sadaļa 12.2.1 12. darbībā saglabātais lizāts ir uzglabāts sasaldēts, pirms lietošanas atkausējiet to līdz istabas temperatūrai.
 - b. Nodrošiniet, lai lizāts būtu labi samaisīts, maisot paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu, un nolieciet to malā uz 3 minūtēm, lai nosēžas burbuļi.
4. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 3 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
5. Inkubējiet 1 minūti istabas temperatūrā.
6. Lai atkārtoti testētu asins paraugu ar PBS, izpildiet Sadaļa 12.2.1 6.–17. darbību, lai pagatavotu gala lizātu. Lai atkārtoti testētu saglabātā lizāta paraugu, izpildiet tālāk aprakstītās a–g darbības, lai pagatavotu gala lizātu.
 - a. Mēģenē, kurā ir saglabātā lizāta atkārtotas testēšanas paraugs, pievienojiet 2,5 ml LY.
 - b. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
 - c. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
 - d. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu.
 - e. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
 - f. Tajā pašā mēģenē pievienojiet 2 ml reaģenta pakāpes absolūtā etanola (lietotāja nodrošinātu).
 - g. Maisiet paraugu vorteksa maisītājā nepārtraukti 10 sekundes, izmantojot maksimālo iestatījumu. Nolieciet malā.
7. Atveriet kārtidzi, paceļot kārtidža vāku, un pārnēsiet visu vienas (1) mazgāšanas reaģenta ampulas saturu uz mazgāšanas reaģenta nodalījumu (ar mazo atveri). Skatiet Attēls 1.
8. Pipetējiet visu sagatavotā parauga saturu parauga nodalījumā (lielā atvere). Skatiet Attēls 1.
9. Aizveriet kārtidža vāku. Sāciet analīzi (skatiet Sadaļa 12.4 Analīzes sākšana).

20 Paredzamās vērtības

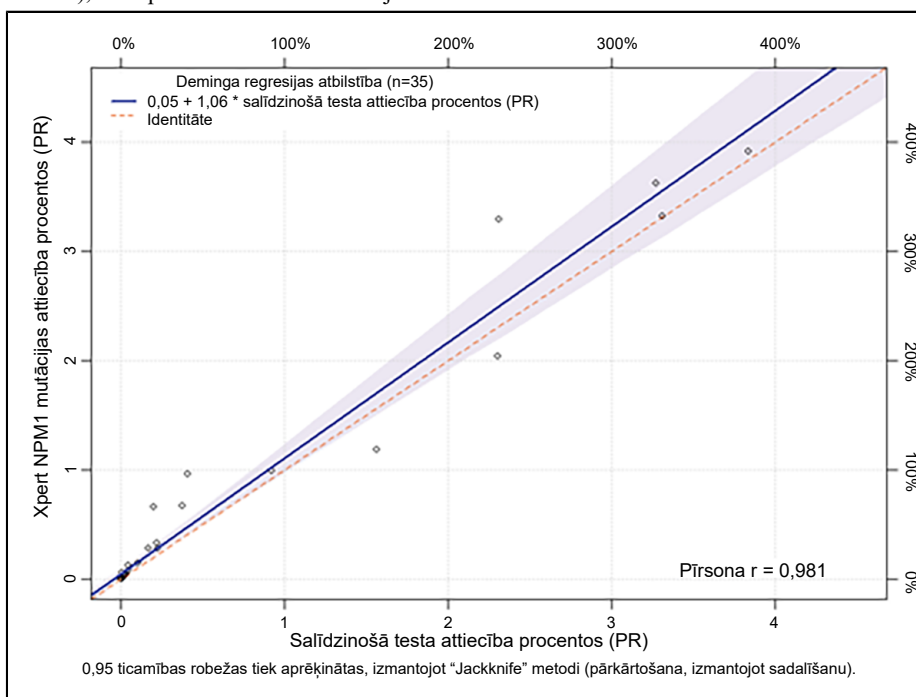
Xpert NPM1 Mutation diapazons aptver galvenos klīnisko lēmumu punktus AML uzraudzībai. Paredzamās vērtības tiek izteiktas kā attiecība procentos starp NPM1 mutācijas mRNS un ABL mRNS, un to diapazons sniedzas no 0,030% līdz 500%. Mērījumi zem šī diapazona tiek ziņoti kā nenoteikti vai kā rezultāti zem noteikšanas robežas (LoD). Mērījumi virs šī diapazona tiek ziņoti kā rezultāti virs kvantitatīvās noteikšanas robežas (LoQ). Papildinformāciju skatiet Sadaļa 15.

21 Klīniskā veikspēja

Tika veikts daudzcentru novērošanas metodes salīdzināšanas pētījums trīs centros Amerikas Savienotajās Valstīs un vienā centrā ārpus Amerikas Savienotajām Valstīm. Pētījumā tika iekļauti paraugi no 40 diskrētiem AML pacientiem ar NPM1 mutāciju no viena laika punkta un visā Xpert NPM1 Mutation testa dinamiskajā diapazonā. Tika apkopota informācija par to pacientu vecumu un dzimumu, no kuriem tika iegūti paraugi. Dzimumu attiecība bija šāda: 11 vīrieši (27,5%) un 29 sievietes (72,5%). Visi paraugi tika iegūti no 16–81 gadu veciem pacientiem, kuru vidējais vecums ir 59,7 gadi.

Visi 40 paraugi uzrādīja derīgus testa rezultātus. Trīsdesmit seši no 40 paraugiem uzrādīja rezultātus abu testu kvantitatīvajā diapazonā. Četri paraugi tika izslēgti no Deminga regresijas, jo šie paraugi bija negatīvi Xpert NPM1 Mutation un/vai salīdzinošajā testā. Tika izslēgts papildu paraugs, jo tam bija izlecoša vērtība. Kopumā Deminga regresijas analizē tika iekļauti 35 paraugi.

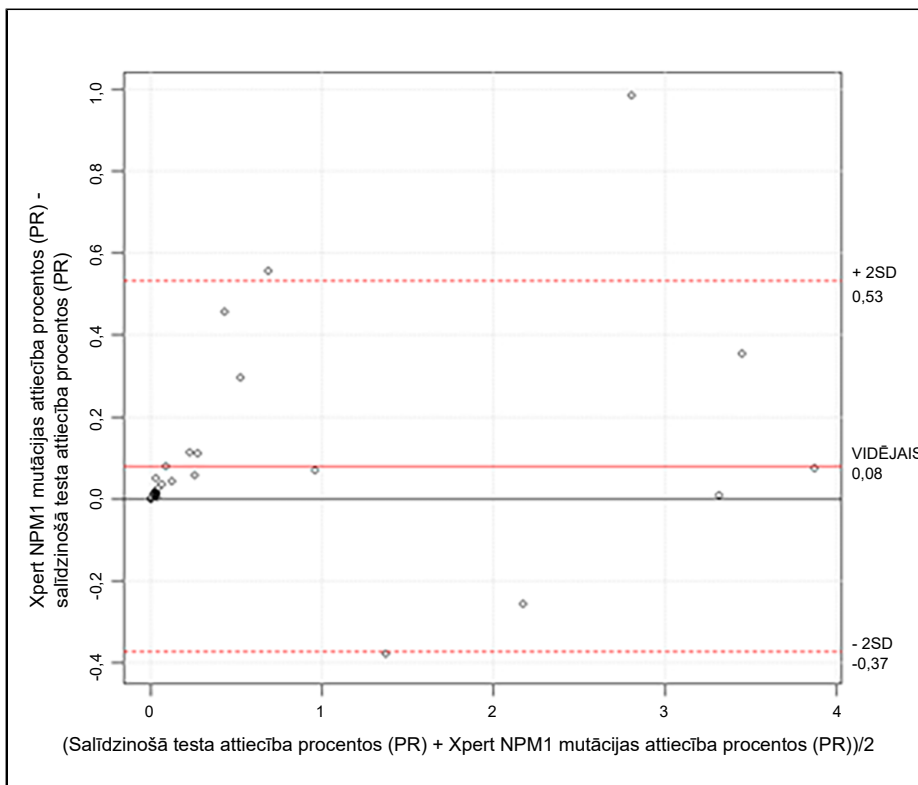
Xpert NPM1 Mutation testa veikspēja salīdzinājumā ar salīdzinošo analīzi tika izvērtēta, izmantojot Deminga regresiju, lai noteiktu slīpumu un krustpunktu. Attēls 12 parādīti Deminga regresijas analīzes rezultāti 35 paraugiem, tostarp slīpums, krustpunkts un identitātes līnija. 95% ticamības robežas tika aprēķinātas, izmantojot "Jackknife" metodi (pārkārtošana, izmantojot sadalīšanu), un ir parādīts Pīrsona korelācijas koeficients.



Attēls 12. Attiecība procentos Deminga regresijas analizē

Deminga regresijas analizē iegūtās attiecības procentos slīpums un krustpunkts bija attiecīgi 1,06 un 0,05, savukārt Pīrsona korelācija bija 0,981 starp Xpert NPM1 Mutation testa un salīdzinošā testa mērījumiem.

Lai parādītu attiecības procentos atšķirības, tika izmantota Blanda un Altmaņa analīze 35 paraugiem ar kvantitatīvajiem rezultātiem, kas bija Xpert NPM1 Mutation un salīdzinošā testa lineārajā diapazonā. Attēls 13 parādīta Blanda un Altmaņa diagramma ar attiecības procentos atšķirībām starp abiem testiem salīdzinājumā ar vidējiem attiecības procentiem rādītājiem katram paraugam. Diagrammā parādīta arī augšējā un apakšējā divkārsā standartnovirze (2SD) no vidējās atšķirības, kas tika novērota pētījumā.



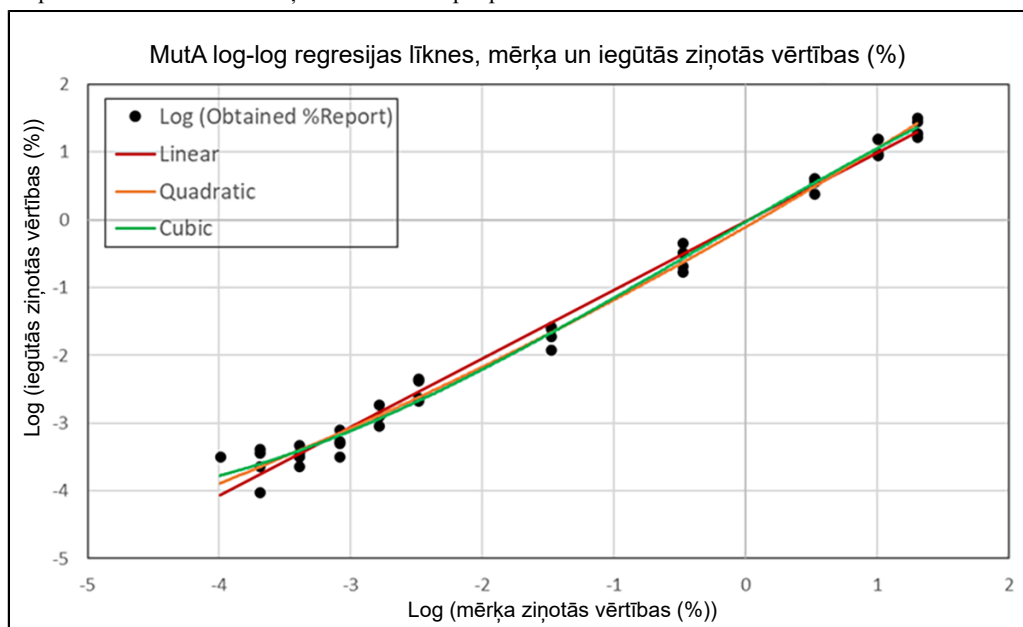
Attēls 13. Xpert NPM1 Mutation un salīdzinošā testa attiecības procentos Blanda un Altmaņa diagramma

Vidējā atšķirība bija 0,08 attiecībai procentos starp Xpert NPM1 Mutation un salīdzinošā testa rezultātu. Lielākā daļa (91,4%, 32/35) no rezultātiem bija vidējās atšķirības divkārsās standartnovirzes robežās.

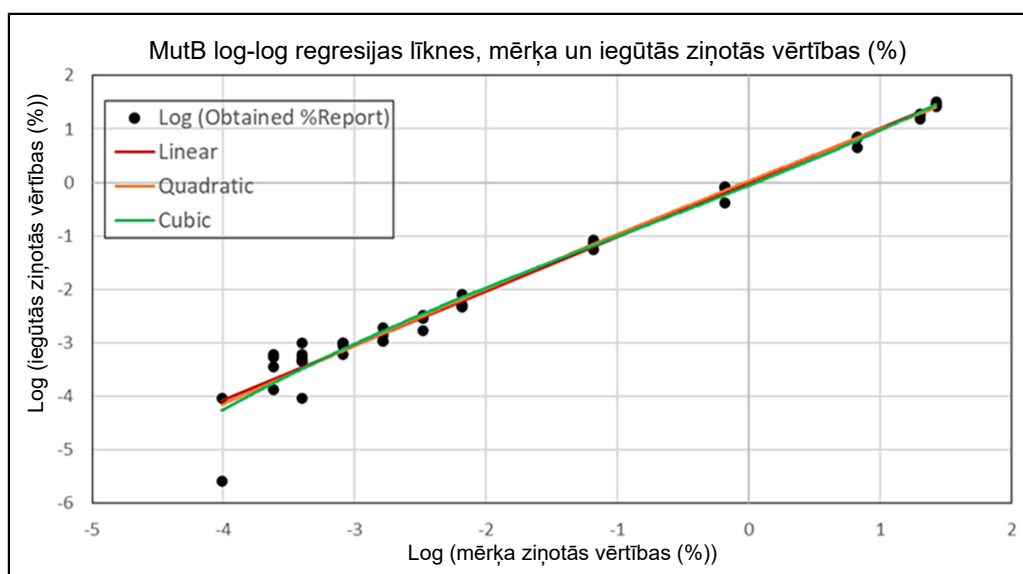
22 Analītiskie dati

22.1 Linearitāte/dinamiskais diapazons

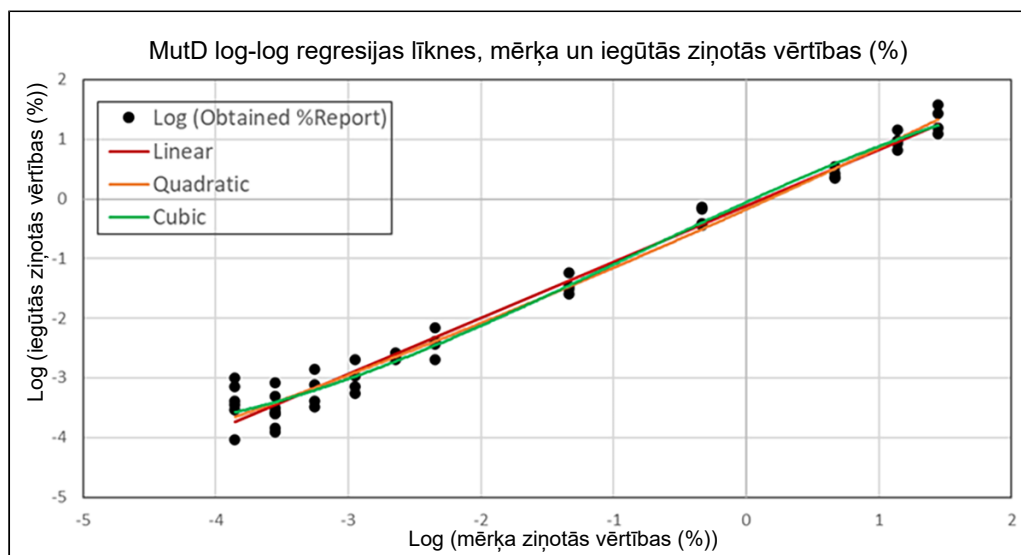
Linearitāte tika noteikta katram no trīs NPM1 mutāciju apakštipiem, proti, mutA, mutB un mutD, izmantojot šūnu lizātus, kas satur katra apakštipa transkriptu augstā koncentrācijā. Šie lizāti tika atšķaidīti fona lizātā, kas sagatavots no NPM1 mutācijas iespējami negatīviem donoriem iegūta parauga, līdz mērķa diapazonam: ~0,01–2500% NPM1 mutācija/ABL. Visi līmeņi tika testēti ar vienu reaģentu sēriju četros eksemplāros. Testēšana un statistiskās analīzes tika veiktas saskaņā ar CLSI P06-A⁹. Katra apakštipa regresijas līknes ir parādītas Attēls 14, Attēls 15 un Attēls 16. Katra apakštipa lineārais diapazons un to lineārā modeļa koeficienti ir apkopoti Tabula 4.



Attēls 14. mutA regresijas līknes



Attēls 15. mutB regresijas līknes



Attēls 16. mutD regresijas līknes

Tabula 4. Lineāro diapazonu un lineārā modeļa koeficientu kopsavilkums

Apakštīps	Lineārais diapazons	Krustpunkts	Slīpums	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

Kopā Xpert NPM1 Mutation tests parādīta linearitāti šajā diapazonā: 0,014–2020% NPM1 mutācija/ABL. Ziņojamais dinamiskais diapazons, ko ierobežo LoQ un programmatūras augšējā robeža, ir 0,030–500%.

22.2 Analītiskais jutīgums (noteikšanas robeža, kvantitatīvās noteikšanas robeža, tukšā parauga robeža)

Noteikšanas robeža (LoD) ir zemākais NPM1 mutācijas/ABL līmenis, kurā 95% paraugu tiek konsekventi uzrādīts rezultāts “**NOTEIKTA NPM1 mutācija [##,##%] (NPM1 Mutation DETECTED [##,##%])**”. LoD tika noteikta atsevišķi apakštīpiem mutA, mutB un mutD, testējot sērijveida atšķaidījumus no NPM1 mutācijas pozitīviem šūnu lizātiem un klīniskiem lizātiem, kas satur katru mutācijas apakštīpu. Atbilstošās LoD tika aprēķinātas un apstiprinātas saskaņā ar CLSI EP17-A2¹⁰. Iegūtajās analizēs tika uzrādītas šādas LoD: 0,025% apakštīpam mutA, 0,023% apakštīpam mutB un 0,030% apakštīpam mutD (Tabula 5). No šiem trīs apakštīpiem augstākā iegūtā LoD ir 0,030%, un tā tiek pieņemta kā Xpert NPM1 Mutation testa kopējā LoD.

Kvantitatīvās noteikšanas robeža (LoQ) ir zemākais NPM1 mutācijas/ABL līmenis, virs kura paraugus var kvantificēt ar logaritmiskā samazinājuma (LR) standartnovirzi $\leq 0,36$ vidējiem LR, kas pārsniedz 3,5. Atbilstoši CLSI EP17-A2¹⁰ LoQ tika aprēķinātas un apstiprinātas šādos līmeņos: 0,025% apakštīpam mutA, 0,023% apakštīpam mutB un 0,030% apakštīpam mutD (Tabula 5). No šiem trīs apakštīpiem augstākā iegūtā LoQ ir 0,030%, un tā tiek pieņemta kā Xpert NPM1 Mutation testa kopējā LoQ.

Tukšā parauga robeža (LoB) ir augstākais NPM1 mutācijas/ABL rezultāts, kas sagaidāms no 95% tukšiem paraugiem, kas iegūti no NPM1 mutācijas iespējami negatīviem donoriem. Atbilstoši CLSI EP17-A2¹⁰ Xpert NPM1 Mutation testa LoB tika aprēķināta un apstiprināta 0,0085% līmenī (Tabula 5).

Tabula 5. Xpert NPM1 Mutation testa noteikšanas robeža, kvantitatīvās noteikšanas robeža un tukšā parauga robeža [NPM1 mutācijas/ABL %]

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

22.3 Analītiskais specifiskums

Xpert NPM1 Mutation testa analītiskais specifiskums tika noteikts, testējot ar EDTA apstrādātus perifēro asiņu paraugus, kas paņemti no divdesmit pieciem veselīgiem donoriem.

Nevienam no šajā pētījumā novērtētajiem NPM1 mutācijas iespējami negatīvajiem paraugiem netika iegūts rezultāts **NOTEIKTA NPM1 mutācija (NPM1 Mutation DETECTED)**. Tādējādi Xpert NPM1 Mutation tests ir specifisks attiecībā pret NPM1 mutācijas mRNS transkriptiem (A, B un D tipiem 12. eksonā), kas saistīti ar AML, un tas uzrāda 100% analītisko specifiskumu EDTA perifēro asiņu paraugiem.

22.4 Piesārņojuma pārneses novērtējums

Tika veikts pētījums, lai pierādītu, ka vienreizlietojamie, autonomie GeneXpert kārtidži novērš piesārņojuma pārnesi no kārtidžiem, kas tiek secīgi izpildīti tajā pašā iekārtas modulī. Pēc NPM1 mutācijas iespējami negatīva parauga tajā pašā GeneXpert modulī tika testēti NPM1 mutācijas izteikti pozitīvi paraugi. Šī testēšanas shēma tika atkārtota 10 reizu divos GeneXpert moduļos (kopumā veicot 22 negatīvas un 20 pozitīvas izpildes). Visās pozitīvā parauga izpildēs tika uzrādīts gaidītais rezultāts “**NOTEIKTA NPM1 mutācija [##,###] (NPM1 Mutation DETECTED [##.###])**”, un visās negatīvā parauga izpildēs tika uzrādīts gaidītais rezultāts “**NAV NOTEIKTA NPM1 mutācija [pietiekams ABL transkripta līmenis] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])**”.

22.5 Potenciāli traucējošas vielas

Šajā pētījumā tika novērtētas piecas vielas, kuras var būt EDTA perifēro asiņu paraugos un kuras var traucēt testa veikspējai. Testēto savienojumu un līmeņu (skatiet Tabula 6) pamatā bija CLSI EP07-ED3 sniegtās norādes¹¹. Traucējošas vielas tika testētas EDTA perifēro asiņu paraugos, kas tika izveidoti mākslīgi ar kultivētu NPM1 mutācijas pozitīvu šūnu lizātiem, iekļaujot trīs līmeņus: > 1%, 0,1–0,5% un negatīvu. Testa kontrole ietvēra tos pašus paraugus, bet bez potenciāli traucējošajām vielām. Katrs līmenis tika testēts piecu atsevišķo traucējošo vielu klātbūtnē un bez tām, izmantojot 4 replikātus katram stāvoklim. Viela tika uzskatīta par netraucējošu, ja tās klātbūtnē vidējai attiecības procentos vērtībai tika novērota ne vairāk kā trīskārtīga atšķirība salīdzinājumā ar kontroli.

Nevienas no šajā pētījumā novērtēto traucējošo vielu klātbūtnē netika novērots klīniski nozīmīgs inhibējošs efekts uz Xpert NPM1 Mutation testu. Nevienā testētajā stāvoklī netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības (p vērtība < 0,05), un ziņotās testa un kontroles stāvokļu attiecības procentos bija pieņemamajā trīskārtīgajā diapazonā.

Tabula 6. Testētās potenciāli traucējošas vielas, izmantojot Xpert NPM1 Mutation

Traucējošas vielas	Testētā koncentrācija
Nekonjugēts bilirubīns	20 mg/dl
Holesterīns, kopējais	500 mg/dl
Triglicerīdi, kopējie (lipīdi)	3000 mg/dl
Heparīns	3500 U/l
EDTA (īss iepildījums)	930 mg/dl

23 Reproducējamība un precizitāte

Šis pētījums tika veikts saskaņā ar vispārīgajiem principiem, kas daudzfaktoru pētījumiem izvirzīti CLSI EP05-A3. Tas tika veikts trīs centros. Pētījuma dizainā bija iekļauti paraugu paneļa komponenti, kas ietvēra mutācijas A, B un D divās koncentrācijās. Divi operatori katrs kopumā 6 dienas trīs dažādos centros testēja septiņus paneļa komponentus divos eksemplāros, veicot divas izpildes dienā (3 centri × 2 operatori × 3 partijas × 2 dienas × 2 izpildes × 2 replikāti = 144 testa rezultāti/paneļa komponents). Reproducējamības un precizitātes paneļus sagatavoja Cepheid, un tie ietver septiņus paneļa komponentus, kā parādīts Tabula 7. Paneļi tika mākslīgi izveidoti simulētā EDTA perifēro asiņu (PB) matricā.

Tabula 7. Reproducējamības un precizitātes paneļi

Paneļa dalībnieks	Mērķis	Līmeņa attiecība procentos (PR)
1	Negatīvs	NA
2	NPM1 mutācija A	Vidēji pozitīvs (~5%)
3	NPM1 mutācija A	Vāji pozitīvs (~0,2%)
4	NPM1 mutācija B	Vidēji pozitīvs (~5%)
5	NPM1 mutācija B	Vāji pozitīvs (~0,2%)
6	NPM1 mutācija D	Vidēji pozitīvs (~5%)
7	NPM1 mutācija D	Vāji pozitīvs (~0,2%)

Paraugu skaits ar derīgiem rezultātiem katram paneļa dalībniekam, ko analizēja abi operatori trīs centros, ir parādīts Tabula 8.

Tabula 8. Reproducējamība un precizitāte: Paraugu skaits ar derīgiem rezultātiem

Paneļa dalībnieks	1. centrs			2. centrs			3. centrs			Kopējais paraugu skaits
	1. oper.	2. oper.	Centrs	1. oper.	2. oper.	Centrs	1. oper.	2. oper.	Centrs	
1 Negatīvs	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: mutA (~5% attiecība)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
3 LR 2,7: mutA (~0,2% attiecība)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
4 LR 1,3: mutB (~5% attiecība)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
5 LR 2,7: mutB (~0,2% attiecība)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
6 LR 1,3: mutD (~5% attiecība)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
7 LR 2,7: mutD (~0,2% attiecība)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24) ^c	(24/24)	(48/48) ^c	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)

^a Diviem negatīviem paraugiem bija derīgi, taču noteikti rezultāti (FP)

^b Vienam negatīvam paraugam bija derīgs, taču noteikts rezultāts (FP)

^c Viens LR 2,7: mutD (~0,2% attiecība) paraugam bija derīgs, taču nenoteikts rezultāts (FN)

Kvantitatīvie rezultāti tika analizēti, izmantojot dispersijas analīzi (ANOVA) ar nejaušu ietekmi un variācijas koeficientu (CV). ANOVA aprēķinu rezultāti katra pozitīvā parauga standartnovirzei un dispersijai ir sniegti Tabula 9. Dispersija un kopējās dispersijas procentuālā vērtība, ko ietekmē katrs komponents (centrs/iekārta, operators, partija, diena, izpilde), ir norādīti kā SD un katra komponenta procentuālā ietekme.

Tabula 9. Rezultāti no variācijas koeficienta (CV): Attiecība procentos (PR)

Paneļa dalībnieks	N	Vidējais	Centrs		Operators		Partija		Diena		Izpilde		Analīzes ietvaros		Kopā	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
LR 1,3: mutA (~5% attiecība)	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: mutA (~0,2% attiecība)	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: mutB (~5% attiecība)	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: mutB (~0,2% attiecība)	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: mutD (~5% attiecība)	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: mutD (~0,2% attiecība)	143 ^a	0,2%	0,00	10,86	0,00	0,00	0,00	12,91	0,00	6,77	0,00	0,00	0,00	22,83	0,00	29,18

^a Xpert NPM1 nenoteica vienu paraugu, un tas tika izslēgts no analīzes, jo nebija kvantitatīva mērījuma.

Kopējā variācijas koeficienta (CV) procentuālā vērtība no attiecības procentos rādītāju kvantitatīvajām vērtībām vidēji pozitīviem paraugiem LR 1,3: mutA, mutB un mutD (~5% attiecība) bija diapazonā no 21,74 līdz 26,23, savukārt vāji pozitīviem paraugiem LR 2,7: mutA, mutB un mutD (~0,2% attiecība) bija diapazonā no 20,68 līdz 79,22.

24 References

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>. Pieklūts 2020. gada 16. septembrī.
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 (skatiet jaunāko izdevumu).
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 Cepheid galveno biroju atrašanās vietas

Uzņēmuma galvenais birojs

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

Tālrunis: + 1 408 541 4191
Fakss: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Eiropas galvenais birojs

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tālrunis: + 33 563 825 300
Fakss: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

26 Tehniskā palīdzība

Pirms sazināties ar Cepheid tehniskā atbalsta biroju, apkopojiet šādu informāciju:

- Produkta nosaukums
- Partijas numurs
- Iekārtas sērijas numurs
- Kļūdu ziņojumi (ja tādi ir)
- Programmatūras versija un, ja piemērojams, datora apkopes etiķetes numurs

Amerikas Savienotās Valstis





















Tālrunis: + 1 888 838 3222
E-pasta adrese: techsupport@cepheid.com

Francija

Tālrunis: + 33 563 825 319
E-pasta adrese: support@cepheideurope.com

Visu Cepheid tehniskā atbalsta biroju kontaktinformācija ir pieejama mūsu tīmekļa vietnē: www.cepheid.com/en_US/support/contact-us.

27 Simbolu tabula

Simbols	Nozīme
	Kataloga numurs
	CE zīme – Eiropas atbilstība
	<i>In vitro</i> diagnostikas medicīniskā ierīce
	Partijas kods
	Nelietot atkārtoti
	Skatīt lietošanas pamācību
	Ražotājs
	Ražotāja valsts
	Satur pietiekamu daudzumu <i>n</i> testiem
	Kontrole
	Derīguma termiņš
	Temperatūras ierobežojums
	Bioloģiskie riski
	Uzmanību!
	Uzliesmojoši šķidrumi
	Toksiska ietekme uz reproduktīvo sistēmu un orgāniem
	Brīdinājums
	Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā
	Pilnvarotais pārstāvis Šveicē
	Importētājs



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
ASV
Tālrunis: + 1 408 541 4191
Fakss: + 1 408 541 4192



Cepheid Europe SAS
Vira Soleih
81470 Maurens-Scopont
Francija
Tālrunis: + 33 563 825 300
Fakss: + 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 Pārstrādāto izdevumu vēsture

Sadaļa	Izmaiņu apraksts
23	Labota kļūda sadaļā Reproducējamība un precizitāte.