

Xpert[®] NPM1 Mutation

REF GXNPM1-CE-10

Pokyny na používanie

IVD CE

Vyhlasenia o ochranných známkach, patentoch a autorských právach

Trademark, Patents, and Copyright Statements

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

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

© 2022–2023 Cepheid.

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

Cepheid[®], logo Cepheid, GeneXpert[®] a Xpert[®] sú obchodné známky spoločnosti Cepheid registrované v USA a iných krajinách.

Všetky ostatné obchodné známky sú majetkom ich príslušných vlastníkov.

KÚPOU TOHTO PRODUKTU SA NA KUPUJÚCEHO PRENÁŠA NEPRENOSNÉ PRÁVO NA POUŽITIE V SÚLADE S TÝMTO NÁVODOM NA POUŽÍVANIE. ŽIADNE ĎALŠIE PRÁVA SA NEPRENÁŠAJÚ VÝSLOVNE, DOMNENE ANI FORMOU ESTOPPELU. KÚPOU TOHTO PRODUKTU SA TAKISTO NEPRENÁŠAJÚ ŽIADNE PRÁVA NA ĎALŠÍ PREDAJ TOHTO PRODUKTU.

© 2022–2023 Cepheid.

Popis zmien uvádza časť Časť 28 História revízií.

Xpert[®] NPM1 Mutation

Na *in vitro* diagnostiku.

1 Obchodný názov

Xpert[®] NPM1 Mutation

2 Bežne používaný názov

Xpert NPM1 Mutation

3 Zamýšľaný účel

3.1 Určené použitie

Test Xpert NPM1 Mutation vykonávaný na prístroji GeneXpert[®] Dx System od spoločnosti Cepheid je diagnostický test *in vitro* na kvantifikáciu mutovaných transkriptov NPM1 mRNA (typy A, B a D v exóne 12) vo vzorkách periférnej krvi od pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (AML). Test využíva automatizovanú reverznú transkripčnú polymerázovú reťazovú reakciu (RT-PCR) v reálnom čase a uvádza percentuálny pomer mutantných transkriptov NPM1 k endogénnym kontrolným transkriptom mRNA ABL1. Test je určený ako pomôcka pri monitorovaní pacientov s AML s mutáciou NPM1 na hladinu transkriptu mutovanej NPM1 mRNA. Test by sa mal používať v spojení s ďalšími klinicko-patologickými faktormi.

Test Xpert NPM1 Mutation nerozlišuje medzi mutantnými transkriptmi NPM1 typu A, B alebo D a nezisťuje ani nesleduje iné zriedkavé typy mutantných NPM1. Tento test nie je určený na diagnostiku AML.

3.2 Zamýšľaný používateľ/Životné prostredie

Test Xpert NPM1 Mutation majú vykonávať vyškolení používatelia v laboratórnych podmienkach.

4 Súhrn a vysvetlenie

Akútna myeloidná leukémia (AML) je rakovina myeloidných krvných kmeňových buniek v kostnej dreni¹² a je známa rôznymi mutáciami exónu 12 nukleofosmínu (NPM1)³. Vloženie nukleotidov do exónu 12 vedie k mutácii posunu rámca a vytvoreniu jadrového exportného signálu (NES). Mutácie v géne NPM1 vedú k aberantnej cytoplazmatickej lokalizácii NPM1 a proteínov interagujúcich s NPM1. NPM1 je jedným z najviac mutovaných génov pri AML a mutácie sa vyskytujú v 28 % až 35 % všetkých prípadov AML. Hoci sa v súčasnosti skúma niekoľko liekov zameraných na mutovaný NPM1, v súčasnosti nie je k dispozícii žiadna cieľená liečba schválená FDA.⁴

Gén NPM1 kóduje jadrový posunovací proteín, ktorý zohráva úlohu v biológii centrozómov a ribozómov, ako aj v regulácii iných bunkových systémov vrátane dráh nádorových supresorov. NPM1 je jadrový fosfoproteín, ktorý slúži ako transfer medzi jadrom a cytoplazmou. Reguluje transport ribozomálnych častíc cez jadrovú membránu. Mutácie NPM1 boli prvýkrát objavené u jedincov s AML po pozorovaní abnormálnej cytoplazmatickej lokalizácie namiesto normálnej jadrovej lokalizácie. Genetické hodnotenie leukemických blastov v kombinácii s cytoplazmatickou lokalizáciou NPM1 viedlo k poznaniu známych mutácií exónu 12 s posunom rámca.³ Najčastejšie sa vyskytujúce mutácie NPM1 sú typ A (~75-80 %), typ B (~10 %) a typ D (~5 %), všetky v exóne 12, čo vedie k mutácii typu frameshift z inzercie štyroch nukleotidov. Mutácia spôsobuje stratu jadrového lokalizačného signálu a aberantnú cytoplazmatickú lokalizáciu proteínu u pacientov s AML.⁵

5 Princíp postupu

Test Xpert NPM1 Mutation je automatizovaný test na kvantifikáciu množstva transkriptov mutácie NPM1 ako pomer mutácia NPM1/ABL1. Test sa vykonáva na zariadení Cepheid od spoločnosti GeneXpert Dx System, ktoré automatizuje a integruje čistenie vzoriek, amplifikáciu nukleových kyselín a detekciu cieľovej sekvencie v jednoduchých alebo komplexných vzorkách pomocou analýz RT-PCR v reálnom čase a vnorenej PCR. Systém sa skladá z prístroja, počítača a predinštalovaného softvéru na vykonávanie analýz a prezeranie výsledkov. Systém si vyžaduje použitie jednorazových zásobníkov GeneXpert, ktoré obsahujú RT-PCR činidlá a činidlá vnorenej PCR a v ktorých prebieha proces RT-PCR a proces vnorenej PCR. Kompletný popis systému uvádza *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Test Xpert NPM1 Mutation obsahuje činidlá na detekciu mutácie NPM1 a transkriptu ABL1 ako endogénnej kontroly vo vzorkách periférnej krvi. Množstvo transkriptu mutácie NPM1 sa kvantifikuje ako percentuálny pomer mutácie NPM1/ABL1. Test Xpert NPM1 Mutation obsahuje dve kontroly – endogénnu kontrolu (ABL1) a kontrolu skúšky sondy (PCC). Endogénna kontrola ABL1 normalizuje cieľ mutácie NPM1 a zabezpečuje, že sa v analýze použije dostatočné množstvo vzorky. PCC overuje rehydratáciu činidla, naplnenie skúmavky PCR a prítomnosť a funkčnosť všetkých reakčných zložiek vrátane sond a farbív v zásobníku.

6 Činidlá a nástroje

6.1 Poskytované materiály

Súprava Xpert NPM1 Mutation (GXNPM1-CE-10) obsahuje dostatočné množstvo činidiel na spracovanie 10 vzoriek analýzy alebo kontrol kvality. Súprava obsahuje nasledujúce:

Xpert NPM1 Mutation Činidlá

po 10 na súpravu

Proteináza K (PK)	10 x 130 µl v každej liekovke
Komponent	Zložka činidla
Proteináza K	< 5 %

Činidlo na lýzu (LY) (guanidíniumtiokyanát)	10 x 5,3 ml v každej liekovke
Komponent	Zložka činidla
Guanidíniumchlorid	25 - 50%
Močovina	25 - 50%
Dodecylsírán sodný	< 2 %

Premývacie činidlo	10 x 2,9 ml v každej ampulke
Komponent	Zložka činidla
Etanol	< 50 %
Guanidíniumtiokyanát	< 50 %

Xpert NPM1 Mutation Zásobníky s integrovanými reakčnými skúmavkami		10 v každej súprave
Komponent	Zložka činidla	Množstvo
Guľôčka 1 (lyofilizovaná)	Enzým: Taq DNA polymeráza < 50 U/ guľôčku	1 z každého na zásobník
	dNTPs < 0,05 %	
Guľôčka 2 (lyofilizovaná)	Priméry a sondy < 0,005 %	1 z každého na zásobník
Guľôčka 3 (lyofilizovaná)	Priméry a sondy < 0,005 %	1 z každého na zásobník
Guľôčka 4 (lyofilizovaná)	Enzým: Taq DNA polymeráza < 50 U/ guľôčku	1 z každého na zásobník
	dNTPs < 0,05 %	
Činidlo na vymývanie	Chlorid sodný < 4 %	2 ml na každý zásobník
	Azid sodný < 0,1 %	
	Polyetylén glykol < 40 %	
	Tween 20 < 0,2 %	
Elučné činidlo	Trizma zásada < 0,3 %	2,5 ml na každý zásobník
	Trizma hydrochlorid < 0,1 %	
	Azid sodný < 0,05 %	

CD**1 v každej súprave**

- Súbor s definíciou analýzy (ADF)
- Pokyny na importovanie ADF do softvéru GeneXpert
- Pokyny na používanie (IFU)

Poznámka

Hovädzí sérový albumín (BSA) v guľôčkach tohto produktu bol vyprodukovaný a vyrobený výhradne z hovädzej plazmy pochádzajúcej z USA. Zvieratám nebol podávaný žiadny proteín z prežúvavcov ani iné živočíšne bielkoviny; zvieratá prešli testovaním pred porážkou a po nej. Počas spracovania nedochádzalo k miešaniu materiálu s inými živočíšnymi materiálmi.

Poznámka

Osvedčenia o analýze a listy údajov so špecifikáciami šarží sú k dispozícii na oddelení technickej podpory spoločnosti Cepheid.

7 Požadované materiály, ktoré nie sú súčasťou balenia

- GeneXpert Dx System (katalógové číslo sa líši podľa konfigurácie): prístroj GeneXpert, počítač, snímač čiarového kódu a návod na obsluhu.
- Pre GeneXpert Dx System: verzia softvéru GeneXpert Dx 6.2 alebo novšia.
- Tlačiareň: Ak sa vyžaduje tlačiareň, vhodnú tlačiareň vám odporučí technická podpora spoločnosti Cepheid.
- Vortexový mixér
- Mikrocentrifúga (minimálne 1 000 x g)
- Pipety a pipetovacie špičky s aerosólovým filtrom
- 50 ml kónické skúmavky
- Absolútny etanol vhodný na použitie ako činidlo
- 1X PBS, pH 7,4

8 Skladovanie a manipulácia

- Obsah súpravy Xpert NPM1 Mutation skladujte pri teplote 2 °C – 8 °C až do dátumu expirácie uvedeného na štítku.
- Veko zásobníka otvárajte, až keď ste pripravení na vykonanie testu.
- Nepoužívajte zásobníky, ktoré sú po dátume expirácie.
- Nepoužívajte zásobník, z ktorého uniká tekutina.
- Premývacie činidlo je číra, bezfarebná kvapalina. Nepoužívajte premývacie činidlo, ak sa zakalilo alebo došlo k zmene jeho zafarbenia.
- Dvadsať (20) minút pred začatím postupu vyberte vzorku krvi, činidlá na prípravu vzorky zo skladu a nechajte ich stuhnúť na izbovú teplotu (20 – 30 °C).

9 Varovania a bezpečnostné opatrenia

9.1 Všeobecné

- Na *in vitro* diagnostiku.
- So všetkými biologickými vzorkami vrátane použitých zásobníkov a činidiel zaobchádzajte, akoby boli schopné prenosu infekčných látok. Nakoľko často nie je možné zistiť, ktoré vzorky môžu byť infekčné, so všetkými biologickými vzorkami je potrebné zaobchádzať so štandardnými bezpečnostnými opatreniami.
- Usmernenia pre manipuláciu so vzorkou sú k dispozícii v Centrách na kontrolu a prevenciu ochorení v USA⁶ a v Inštitúte pre klinické a laboratórne normy (CLSI).⁷
- Pri práci s chemikáliami a pri manipulácii s biologickými vzorkami dodržiavajte bezpečnostné postupy určené vašou inštitúciou.
- Výkonnosť charakteristiky tohto testu boli stanovené len pre krv odobratú do skúmaviek EDTA. Funkcia analýzy nebola hodnotená s inými typmi vzoriek.
- Spoľahlivé výsledky závisia od primeraného odberu, prepravy, uskladnenia a spracovania vzoriek. Nesprávne výsledky analýzy sa môžu vyskytnúť pri nesprávnom odbere, manipulácii alebo skladovaní vzoriek, technickej chybe, zámene vzoriek alebo preto, že cieľový transkript vo vzorke je pod limitom detekcie analýzy. Aby sa zabránilo chybným výsledkom, je potrebné dôsledne dodržiavať pokyny na použite *GeneXpert Dx System Operator Manual*.
- Uskutočnenie testu Xpert NPM1 Mutation mimo odporúčaných teplotných rozsahov a času skladovania vzorky môže mať za následok chybné alebo neplatné výsledky.
- Biologické vzorky, prenosové zariadenia a použité zásobníky sa považujú za zdroj prenosu infekčných agens, čo si vyžaduje štandardné bezpečnostné opatrenia. Pri správnom zneškodňovaní použitých zásobníkov a nepoužitých činidiel sa riadte postupmi ochrany životného prostredia pri zneškodňovaní odpadov svojej inštitúcie. Tieto materiály môžu mať vlastnosti chemicky nebezpečného odpadu vyžadujúceho osobitné národné alebo regionálne postupy zneškodňovania. Ak národné alebo regionálne predpisy neposkytujú jasné pokyny pre správnu likvidáciu, biologické vzorky a použité zásobníky je potrebné likvidovať podľa pokynov WHO (Svetová zdravotnícka organizácia) pre nakladanie so zdravotníckym odpadom a jeho zneškodňovanie.⁸

9.2 Vzorka

- Dodržiavajte správne podmienky skladovania, aby ste zabezpečili integritu vzorky (pozrite si Časť 11, Odber a skladovanie vzoriek). Stabilita vzoriek v podmienkach prepravy iných ako odporúčaných nebola vyhodnotená.
- Vzorku periférnej krvi EDTA nezmrazujte.
- Pre správnosť výsledkov je nevyhnutný správny odber, uskladnenie a preprava vzoriek.

9.3 Test/činidlo


- Činidlá testu Xpert NPM1 Mutation nezamieňajte za iné činidlá.
- Neotvárajte veko zásobníka Xpert NPM1 Mutation s výnimkou pridávania vzorky a premývacieho činidla.
- Nepoužívajte zásobník, ktorý vám po vybalení spadol.
- Zásobníkom netraste. Ak po otvorení veka zásobníka dôjde k traseniu zásobníkom alebo jeho pádu, výsledok testu môže byť neplatný.
- Štítok s ID vzorky neumiestňujte na veko zásobníka ani na štítok s čiarovým kódom zásobníka.
- Nepoužívajte zásobník s poškodeným štítkom s čiarovým kódom.

- Nepoužívajte zásobník, ktorý má poškodenú reakčnú skúmavku.
- Pri používaní zásobníkov Xpert NPM1 Mutation na testovanie sa odporúča, aby mali izbovú teplotu (20 °C až 30 °C).
- Každý jednorazový zásobník testu Xpert NPM1 Mutation sa používa na spracovanie jedinej analýzy. Spracované zásobníky nepoužívajte opakovane.
- Preneste celý obsah jednej (1) ampulky s premývacím činidlom do komory s premývacím činidlom. Chýbajúce prídanie premývacieho činidla môže spôsobiť falošný výsledok **NEDETEGOVANÉ** (NOT DETECTED).
- Jednorazové pipetové špičky nepoužívajte opakovane.
- Nepoužívajte zásobník, ak je vlhký alebo ak je poškodené tesnenie veka.
- Ak je činidlo pridané do nesprávneho otvoru, zásobník Xpert NPM1 Mutation nepoužívajte.
- Po skončení analýzy zásobník Xpert NPM1 Mutation neatváraajte.
- Vyhradte si súpravu pipiet a činidiel výlučne na prípravu vzoriek.
- Noste čistý laboratórny plášť a rukavice. Medzi manipuláciou s každou vzorkou si vymeňte rukavice.
- V prípade, ak dôjde k úniku vzorky alebo kontrol, majte rukavice a uniknutú tekutinu utrite papierovými utierkami. Následne dôkladne očistite kontaminovanú plochu čerstvo pripraveným chlórovým bielidlom pre domácnosť zriedeným v pomere 1 : 10. Konečná koncentrácia aktívneho chlóru by mala byť 0,5 % bez ohľadu na koncentráciu bielidla pre domácnosti vo vašej krajine. Nechajte pôsobiť minimálne 2 minúty.
- Pred použitím 70% denaturovaného etanolu na odstránenie zvyškov bielidla sa ubezpečte, že pracovná plocha je suchá. Skôr, ako budete pokračovať, pracovné povrchy nechajte oschnúť. Prípadne postupujte podľa štandardných postupov vašej inštitúcie pre prípady kontaminácie alebo úniku. V prípade zariadenia postupujte podľa odporúčaní výrobcu pre dekontamináciu.

10 Chemické nebezpečenstvo

Poznámka

Nižšie uvedené informácie sa vzťahujú na celý produkt obsahujúci proteínázu K, lyzačné, premývacie a oplachovacie činidlá.

- Piktogram nebezpečenstva CLP/OSN: 
- Signalizačné heslo: NEBEZPEČENSTVO
- **Výstražné upozornenia GHS OSN**
 - Vysoko horľavá kvapalina a para – H225.
 - Dráždi kožu – H315.
 - Spôsobuje vážne podráždenie očí – H319.
 - Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty – H336.
 - Podozrenie, že spôsobuje genetické poškodenie – H341.
- **Bezpečnostné vyhlásenia GHS OSN**
 - **Prevenia**
 - Pred použitím si pozrite kartu bezpečnostných údajov, kde nájdete osobitné pokyny.
 - Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
 - Nepoužívajte, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
 - Chráňte pred teplom, iskrami, otvoreným ohňom a/alebo horúcimi povrchmi. Zákaz fajčenia.
 - Nádobu uchováajte tesne uzavretú.
 - Vyhňte sa vdychovaniu hmly, výparov alebo postreku.
 - Po manipulácii starostlivo umyte.
 - Používajte iba na voľnom priestranstve alebo v dobre vetranom priestore.
 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
 - Používajte predpísané osobné ochranné prostriedky.
 - **Reakcia**
 - V prípade POŽIARU: Na hasenie použite vhodné hasiace médium.
 - PO VDÝCHNUTÍ: Presuňte postihnutého na čerstvý vzduch a nechajte ho oddychovať v polohe, ktorá mu umožní pohodlné dýchanie.
 - Pri zdravotných problémoch volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára.
 - PRI KONTAKTE S POKOŽKOU (alebo vlasmi): Odstráňte/vyzlečte všetky kontaminované časti odevu. Pokožku opláchnite vodou/sprchou.
 - V prípade špecifického ošetrenia si pozrite doplňujúce informácie o prvej pomoci.

- Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.
- Ak sa prejaví podráždenie pokožky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
- PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.
- Ak podráždenie očí pretrváva: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
- Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
- **Skladovanie/Likvidácia**
 - Uchovávajte v chlade.
 - Uchovávajte na dobre vetranom mieste.
 - Nádobu uchovávajte tesne uzavretú.
 - Uchovávajte uzamknuté.
 - Obsah a/alebo nádobu zlikvidujte v súlade s miestnymi, regionálnymi, národnými a/alebo medzinárodnými predpismi.

11 Odber a uskladnenie vzoriek

- Vzorky periférnej krvi by sa mali odberať do skúmaviek EDTA podľa pokynov vašej inštitúcie. Plazma by sa nemala oddeľovať od buniek.
- Vzorky by sa mali pred testovaním skladovať pri teplote 2 °C až 8 °C najviac 3 dni (72 hodín).
- Pre funkciu tejto analýzy sú správny odber a uskladnenie vzoriek veľmi dôležité. Stabilita vzoriek v podmienkach skladovania iných ako uvedených v Časť 12, postupe nižšie, nebola v prípade testu Xpert NPM1 Mutation vyhodnotená.

12 Postupy

12.1 Predtým, ako začnete

Dvadsať (20) minút pred začatím postupu vyberte vzorku krvi, činidlá na prípravu vzoriek a kazety z chladiaceho zariadenia, aby mali izbovú teplotu. Proteinázu K (PK) krátko odstredíte v mikrocentrifúge.

Dôležité Test spustíte do 1 hodiny od pridania vzorky ošetrenej vzorkovacím činidlom do kazety.

Dôležité Pred prípravou vzorky vyberte kazetu z kartónového obalu. (Pozrite si Časť 12.3, Príprava kazety).

12.2 Príprava vzorky

12.2.1 Príprava vzorky s neznámym počtom bielych krviniek (WBC) alebo vzorky s menej ako 30 miliónmi WBC/ml

1. Na dno novej označenej 50 ml kónickej skúmavky pridajte 100 µl proteináza K (PK).
2. Bezprostredne pred pipetovaním sa uistite, že je vzorka krvi dobre premiešaná 8-krát prevrátením skúmavky na odber krvi. Pozrite si návod na použitie skúmavky na odber krvi EDTA od výrobcu.
3. Do skúmavky, ktorá už obsahuje PK, pridajte 4 ml vzorky krvi.
4. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 3 sekúnd.
5. Inkubujte pri izbovej teplote 1 minútu.
6. Do tej istej skúmavky pridajte 2,5 ml činidla na lýzu (LY).

Poznámka Zvyšné činidlo na lýzu si ponechajte na ďalšie použitie v kroku 13.

7. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 10 sekúnd.
8. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
9. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 10 sekúnd.
10. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
11. Vzorku premiešajte 10-krát poklepaním na dno skúmavky.
12. Preneste 1 ml pripraveného lyzátu do novej označenej 50 ml kónickej skúmavky.

Poznámka Zvyšný lyzát sa môže skladovať pri teplote 2 – 8 °C až 48 hodín alebo pri teplote –20 °C alebo nižšej až 1 mesiac.

13. Do novej kónickej skúmavky obsahujúcej lyzát pridajte 1,5 ml zadržaného LY z kroku 6.
14. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 10 sekúnd.
15. Inkubujte pri izbovej teplote 10 minút.
16. Do tej istej kónickej skúmavky pridajte 2 ml absolútneho etanolu reagenčnej kvality (poskytne používateľ).
17. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 10 sekúnd. Odložte.
18. Zlikvidujte všetky zvyšné činidlá PK alebo LY.

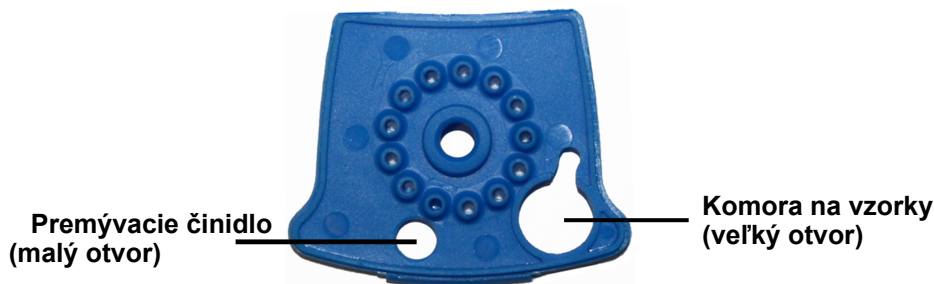
12.2.2 Príprava vzorky s počtom WBC rovným alebo väčším ako 30 miliónov WBC/ml

1. Na dno novej 50 ml kónickej skúmavky pridajte 100 µl PK.
2. Bezprostredne pred pipetovaním sa uistite, že je vzorka krvi dobre premiešaná 8-krát prevrátením skúmavky na odber krvi. Pozrite si návod na použitie skúmavky na odber krvi EDTA od výrobcu.
3. Do skúmavky, ktorá už obsahuje PK, pridajte 250 µl vzorky krvi a 3,75 ml 1 x PBS (pH 7,4, poskytne používateľ).
4. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 3 sekúnd.
5. Inkubujte pri izbovej teplote 1 minútu.
6. Na vytvorenie konečného lyzátu postupujte podľa krokov 6 až 17 v Časť 12.2.1.
7. Zlikvidujte všetky zvyšné činidlá PK alebo LY.

12.3 Príprava zásobníka

Pridajte vzorku do testovacieho zásobníka Xpert NPM1 Mutation:

1. Vyberte zásobník z kartónového obalu.
2. Skontrolujte, či zásobník nie je poškodený. Ak je poškodený, nepoužívajte ho.
3. Otvorte zásobník zdvihnutím veka zásobníka a preneste celý obsah ampulky s jedným (1) premývacím činidlom do komory s premývacím činidlom (s malým otvorom). Pozrite Obrázok 1.
4. Pipetujte celý obsah pripravenej vzorky do komory na vzorky (4,5 ml) (veľký otvor). Pozrite Obrázok 1.



Obrázok 1. Xpert NPM1 Mutation Zásobník (pohľad zhora)

5. Zatvorte kryt zásobníka. Uistite sa, že veko pevne zacvaklo na miesto. Spustíte analýzu (pozrite si Časť 12.4, Spustenie analýzy).

12.4 Spustenie analýzy

Dôležité Pred začiatkom analýzy sa presvedčte, že systém používa softvér GeneXpert Dx verzie 6.2 alebo novší a že do softvéru je importovaný správny súbor s definíciou analýzy. V tejto časti sú uvedené predvolené kroky na prevádzku systému GeneXpert Dx System.

Poznámka Konkrétne kroky sa môžu líšiť, ak administrátor systému zmenil predvolený tok činností systému.

1. Systém GeneXpert zapnete tak, že najprv zapnete prístroj GeneXpert Dx a potom počítač. Softvér GeneXpert Dx sa spustí automaticky, prípadne môže byť potrebné dvakrát kliknúť na ikonu softvéru GeneXpert Dx na ploche systému Windows®.
2. Do softvéru GeneXpert sa prihláste pomocou svojho mena používateľa a hesla.

3. V okne **systému GeneXpert** kliknite na položku **Vytvoriť test (Create Test)** (GeneXpert Dx). Otvorí sa okno **Vytvoriť test (Create Test)** .
4. Naskenujte alebo zadajte ID pacienta. Ak ID pacienta zadávate pomocou klávesnice, uistite sa, že je správne. ID pacienta je spojené s výsledkami testu a zobrazuje sa v okne **Zobrazíť výsledky (View Results)** a vo všetkých správach. Zobrazí sa kontextové okno na skenovanie čiarového kódu **Skenovať ID vzorky (Scan Sample ID)** .
5. Naskenujte alebo zadajte ID vzorky. Ak ID vzorky zadávate pomocou klávesnice, uistite sa, že je správne. ID vzorky sa zobrazuje na ľavej strane okna **Zobrazíť výsledky (View Results)** a vo všetkých správach. Zobrazí sa kontextové okno **Skenovať čiarový kód zásobníka (Scan Cartridge Barcode)** .
6. Naskenujte čiarový kód zásobníka Xpert NPM1 Mutation. Softvér prostredníctvom informácií z čiarového kódu automaticky vyplní údaje do nasledujúcich polí: ID šarže reagentie (Reagent Lot ID), Sériové č. zásobníka (Cartridge SN) a Dátum expirácie (Expiration Date).

Poznámka

Ak nie je čiarový kód na zásobníku Xpert NPM1 Mutation možné oskenovať, analýza zopakujte s novým zásobníkom. Ak ste v softvéri naskenovali čiarový kód a súbor s definíciou analýzy nie je dostupný, zobrazí sa obrazovka, ktorá informuje, že v systéme nie je nahratý súbor s definíciou analýzy. Ak sa zobrazí táto obrazovka, kontaktujte technickú podporu spoločnosti Cepheid.

7. Kliknite na položku **Spustiť test (Start Test)** . V zobrazenom dialógovom okne môže byť potrebné zadať heslo.
8. Otvorte dvierka modulu prístroja s blikajúcim zeleným svetlom a vložte zásobník.
9. Zatvorte dvierka. Test sa spustí a zelené svetlo prestane blikať. Po ukončení analýzy sa svetlo vypne.
10. Počkajte, kým systém neodomkne dvierka pre modul, následne vyberte zásobník.
11. Použité zásobníky zlikvidujte v príslušnej nádobe na odpad vzoriek v súlade so štandardnými postupmi vašej inštitúcie.

Poznámka

Čas potrebný na dosiahnutie výsledku je menej ako 3 hodiny (približne 30 minút na prípravu vzorky mimo paluby a menej ako 2,5 hodiny na vykonanie analýzy).

13 Zobrazenie a tlač výsledkov

Táto časť uvádza základné kroky na zobrazenie a tlač výsledkov. Podrobnejšie pokyny na prezeranie a tlač výsledkov uvádza *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

- Na zobrazenie výsledkov kliknite na ikonu **Zobrazíť výsledky (View Results)** .
- Po dokončení analýzy kliknutím na tlačidlo **Správa (Report)** na obrazovke **Zobrazenie výsledkov (View Results)** zobrazíte a/alebo vygenerujete PDF súbor so správou.

14 Kontrola kvality

Každý zásobník obsahuje endogénnu kontrolu ABL1 a kontrolu skúšky sondy (Probe Check Control, PCC).

Endogénna kontrola ABL1 – endogénnou kontrolou ABL1 sa overuje, či sa pri analýze používa dostatočné množstvo vzorky. Táto kontrola okrem toho deteguje inhibíciu testu PCR v reálnom čase súvisiacu so vzorkou. Ak sú určené kritériá splnené, kontrola ABL1 je úspešná.

Kontrola skúšky sondy (Probe Check Control, PCC) – pred začiatkom reakcie PCR meria systém GeneXpert fluorescenčný signál zo sond na monitorovanie rehydratácie guľôčok, plnenia reakčných skúmaviek a či sú všetky reakčné komponenty v zásobníku funkčné. Ak sú určené kritériá splnené, kontrola PCC je úspešná.

15 Interpretácia výsledkov

Výsledky sa interpretujú automaticky systémom GeneXpert z nameraných fluorescenčných signálov a zo zabudovaných výpočtových algoritmov a sú zobrazené v okne **Zobrazíť výsledky (View Results)** . Možné výsledky a interpretácie sú uvedené na obrázku Tabuľka 1.

Tabuľka 1. Xpert NPM1 Mutation Výsledky testu a interpretácia

Výsledok	Interpretácia
Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ (NPM1 Mutation DETECTED) Pozrite Obrázok 2, Obrázok 3, Obrázok 4	Zistil sa transkript mutácie NPM1. <ul style="list-style-type: none"> Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ (NPM1 Mutation DETECTED) – transkript mutácie NPM1 sa detegoval a prahová hodnota cyklu je v platnom rozsahu a koncový bod je nad nastavením hraničnej hodnoty. Možné zistené výsledky: <ul style="list-style-type: none"> Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [#.##%] (NPM1 Mutation DETECTED [#.##%]); Obrázok 2 MUTÁCIA NPM1 DETEGOVANÁ [Nad horným limitom] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ]); Obrázok 3. MUTÁCIA NPM1 DETEGOVANÁ [pod LoD; <#.###%] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; <#.###%]); Obrázok 4. ABL – PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS) – transkript ABL sa detegoval a prahová hodnota cyklu je v platnom rozsahu a koncový bod je nad nastavením hraničnej hodnoty. Kontrola sondy – PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS); všetky výsledky kontroly sondy sú platné.
Mutácia NPM1 NEDETEGOVANÁ (NPM1 Mutation NOT DETECTED) Pozrite Obrázok 5	Nezistil sa transkript mutácie NPM1. <ul style="list-style-type: none"> Mutácia NPM1 NEDETEGOVANÁ [dostatočný transkript ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]) – transkript mutácie NPM1 sa nedetegoval a prahová hodnota cyklu je nula alebo vyššia ako platný rozsah a koncový bod je pod nastavením hraničnej hodnoty. ABL – PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS) – transkript ABL sa detegoval a prahová hodnota cyklu je v platnom rozsahu a koncový bod je nad nastavením hraničnej hodnoty. Kontrola sondy – PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS); všetky výsledky kontroly sondy sú platné.
NEPLATNÝ (INVALID) Pozrite Obrázok 6, Obrázok 7, Obrázok 8, Obrázok 9, Obrázok 10	Hladina transkriptu mutácie NPM1 sa nedá určiť, pretože vzorka obsahuje nadbytočný transkript mutácie NPM1 a/alebo nadbytočný alebo nedostatočný transkript ABL. Ďalšie pokyny na opätovné testovanie vzorky nájdete v časti Časť 18, Príručka na riešenie problémov. <ul style="list-style-type: none"> Mutácia NPM1 NEPLATNÁ (NPM1 Mutation INVALID) – prah cyklu NPM1 (Ct) bol nad nulou a pod dolnou hranicou platného rozsahu (Obrázok 8, Obrázok 9) ABL ZLYHANIE (FAIL) – prahová hodnota cyklu (Ct) ABL nebola v platnom rozsahu, alebo koncový bod bol pod nastavením hraničnej hodnoty (Obrázok 6, Obrázok 7, Obrázok 8, Obrázok 10) Kontrola sondy – PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS); všetky výsledky kontroly sondy sú platné.
CHYBA (ERROR) Pozrite Obrázok 11	Hladina transkriptu mutácie NPM1 sa nedá určiť. Ďalšie pokyny na opätovné testovanie vzorky nájdete v časti Časť 18, Príručka na riešenie problémov. <ul style="list-style-type: none"> ŽIADNY VÝSLEDOK pre mutáciu NPM1 (NPM1 Mutation NO RESULT) ŽIADNY VÝSLEDOK PRE ABL (ABL NO RESULT) Kontrola sondy – ZLYHANIE (FAIL) – všetky alebo jeden z výsledkov kontroly sondy zlyhal. Kontrola sondy PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS) alebo neuplatňuje sa (NA) a prerušenie tlaku*. * Ak mala kontrola sondy platný výsledok, chyba bola spôsobená limitom maximálneho tlaku presahujúcim prijateľný rozsah alebo zlyhaním komponentu systému.
ŽIADEN VÝSLEDOK (NO RESULT)	Hladina transkriptu mutácie NPM1 sa nedá určiť. Na výsledok analýzy neboli získané dostatočné údaje. Toto sa môže napríklad stať, keď operátor pozastavil analýzu, ktorý prebiehal. Ďalšie pokyny na opätovné testovanie vzorky nájdete v časti Časť 18, Príručka na riešenie problémov. <ul style="list-style-type: none"> ŽIADNY VÝSLEDOK pre mutáciu NPM1 (NPM1 Mutation NO RESULT) ŽIADNY VÝSLEDOK PRE ABL (ABL NO RESULT) Kontrola sondy – neuplatňuje sa (not applicable)

16 Kvantitatívne výsledky

Kvantitatívne výstupy testu Xpert NPM1 Mutation sú uvedené ako percentuálny pomer mutácia NPM1/ABL1. Súpravam sú priradené hodnoty účinnosti ($E_{\Delta Ct}$) a škálovacieho faktora (SF) špecifické pre jednotlivé šarže, ktoré spájajú kvantifikáciu transkriptov mutácie NPM1 (A, B a D) a ABL1 s počtom kópií syntetických primárnych štandardov mutácie NPM1 a *in vitro* transkribovanej RNA (IVT-RNA) ABL1.

Tabuľka 2. Príklady výsledkov testu Xpert NPM1 Mutation

Analýza	Mutácia NPM1		ABL		Xpert NPM1 Mutation Výsledky testu	Poznámky
	Ct	Výsledok ^a	Ct	Výsledok ^a		
1	5,2	NEPLATNÝ (INVALID)	5,8	ZLYHANIE (FAIL)	NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoká mutácia NPM1 a transkripty ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcripts])	–
2	9	NEPLATNÝ (INVALID)	5,5	ZLYHANIE (FAIL)	NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoký transkripty ABL] (INVALID [Too high ABL transcripts])	–
3	5,5	NEPLATNÝ (INVALID)	8,5	PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS)	NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoké transkripty mutácie NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcripts])	–
4	25,0	NEPLATNÝ (INVALID)	21,8	ZLYHANIE (FAIL)	NEPLATNÝ VÝSLEDOK [neplatiný transkript ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	–
5	0	NEPLATNÝ (INVALID)	0	ZLYHANIE (FAIL)	NEPLATNÝ VÝSLEDOK [žiadny transkript ABL] INVALID [No ABL transcript]	–
6	8,5	POZ.	13,6	PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS)	Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [Nad horným limitom] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])	–
7	22,5	POZ.	14,8	PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS)	Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [1,05 %] (NPM1 Mutation DETECTED [1.05%])	Nahlásená hodnota: 1,05 %
8	27,9	POZ.	14,0	PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS)	Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [pod LoD; <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])	–
9	0	NEG.	14,6	PLATNÝ VÝSLEDOK (PASS)	NEGATÍVNY VÝSLEDOK [dostatočný transkript ABL]. NEGATIVE [Sufficient ABL transcript]	–
10	0	ŽIADEN VÝSLEDOK (NO RESULT)	0	ŽIADEN VÝSLEDOK (NO RESULT)	CHYBA (ERROR)	Napríklad: Chyba 5017 [ABL] kontrola sondy zlyhala

^a Podrobnosti nájdete na karte Výsledky analýzy v softvéri systému GeneXpert Dx.

16.1 Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [#.##%] (NPM1 Mutation DETECTED [#.##%]),

Mutácia NPM1 bola zistená na úrovni #.## %.

V prípade výsledku „**Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ**“ (NPM1 Mutation DETECTED) je mutácia NPM1 detekovateľná s Ct mutácie NPM1 väčšou alebo rovnou „6“ a menšou alebo rovnou „32“ a Ct ABL väčšou alebo rovnou „6“ a menšou alebo rovnou „20“. Softvér GeneXpert vypočíta % pomocou nasledujúcej rovnice, kde sa hodnota Delta Ct (ΔCt) získa z ABL Ct mínus NPM1 Mutation Ct:

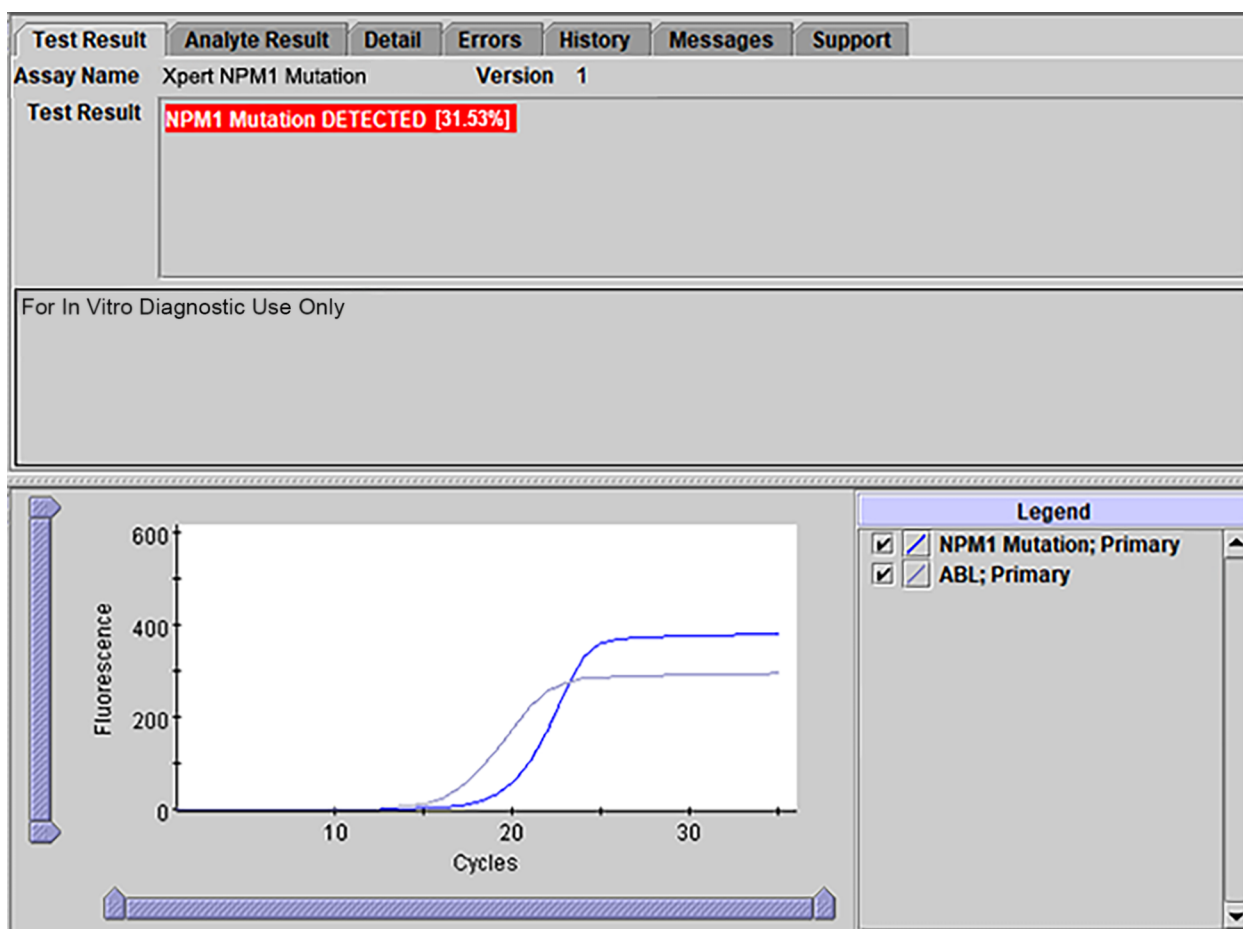
$$\% = E_{\Delta Ct}(\Delta Ct) \times 100 \times \text{škálovací faktor}$$

Škálovací faktor (*SF*) je parameter špecifický pre danú šaržu, ktorý je vložený do čiarového kódu testovacej kazety. Hodnota tohto faktora a účinnosť testu špecifická pre danú šaržu ($E_{\Delta Ct}$) sa určuje pri testovaní kontroly kvality každej šarže testu pomocou primárnych štandardov kalibrovaných podľa počtu kópií syntetickej mutácie NPM1 a kalibrátorov *in vitro* transkribovanej RNA (IVT-RNA) ABL1 na kvantifikáciu transkriptu mutácie NPM1. Hodnota $E_{\Delta Ct}$ je nastavená na 1,95 a hodnota *SF* je nastavená na 1,79 na použitie v uvedenom príklade.

Poznámka

Príklad: $E_{\Delta Ct}$ špecifické pre šaržu = 1,95; *SF* = 1,79
 Ct ABL analýzy = 14,5; Ct mutácie NPM1 = 17,1; $\Delta Ct = -2,6$
 $\% = 1,95^{(-2,6)} \times 100 \times 1,79 = 31,53 \%$

Výsledok: **Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [31,53 %] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%]).** Pozrite Obrázok 2.



Obrázok 2. GeneXpert Dx Zobrazenie okna s výsledkami: Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [31,53 %] (NPM1 Mutation DETECTED [31.53%])

16.2 Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [Nad horným limitom] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

Mutácia NPM1 bola zistená na úrovni > 500 %.

V prípade výsledku „**Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [nad horným LoQ]**“ (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ]) je mutácia NPM1 detekovateľná s Ct mutácie NPM1 väčšou alebo rovnou „6“ a menšou alebo rovnou „32“ a Ct ABL väčšou alebo rovnou „6“ a menšou alebo rovnou „20“. Softvér GeneXpert vypočíta % pomocou nasledujúcej rovnice, kde sa hodnota Delta Ct (ΔCt) získa z ABL Ct mínus NPM1 Mutation Ct:

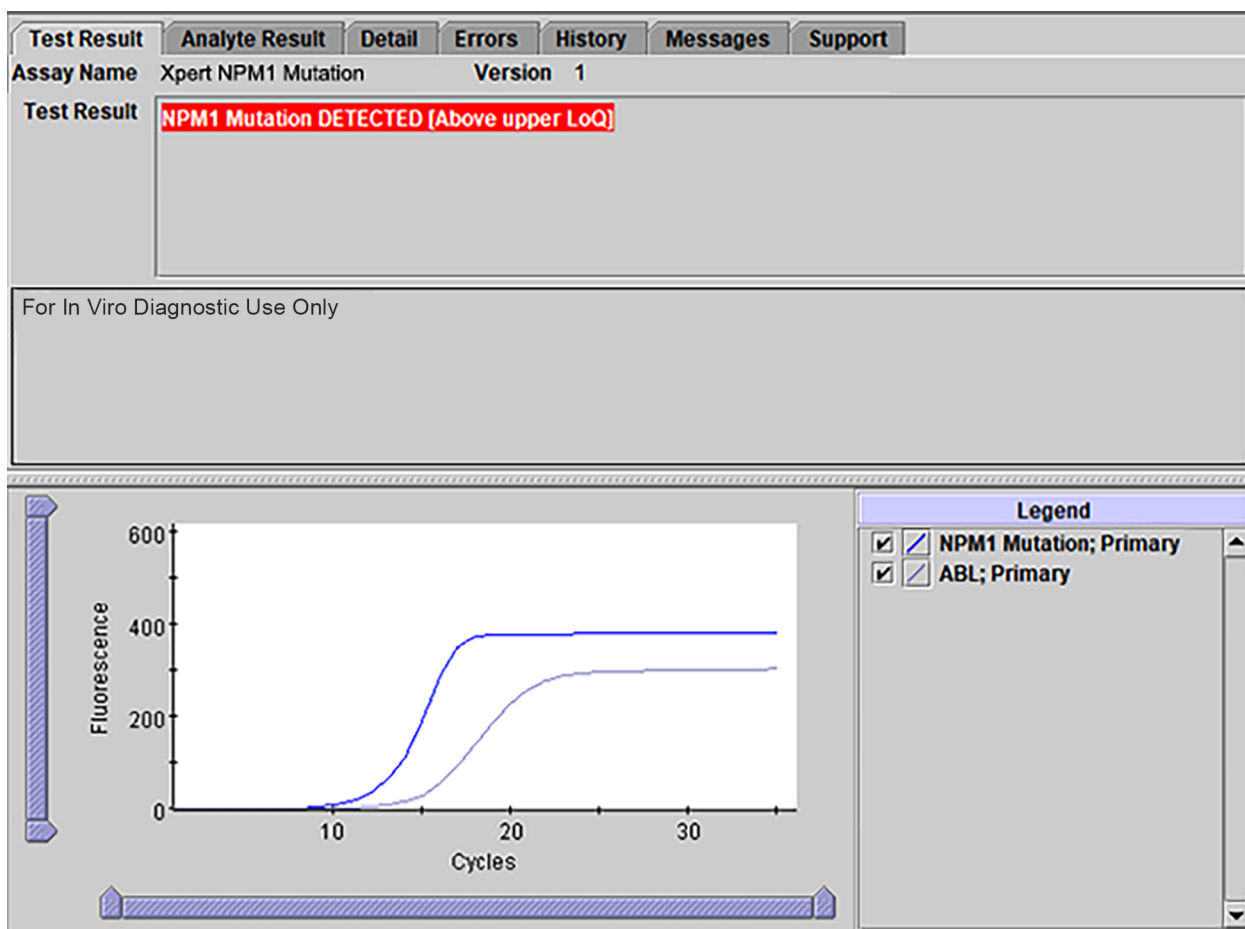
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{škálovací faktor (SF)}$$

Škálovací faktor (SF) je parameter špecifický pre danú šaržu, ktorý je vložený do čiarového kódu testovacej kazety. Hodnota tohto faktora a účinnosť testu špecifická pre danú šaržu ($E_{\Delta Ct}$) sa určuje pri testovaní kontroly kvality každej šarže testu pomocou primárnych štandardov kalibrovaných podľa počtu kópií syntetickej mutácie NPM1 a kalibrátorov *in vitro* transkribovanej RNA (IVT-RNA) ABL1 na kvantifikáciu transkriptu mutácie NPM1. Hodnota $E_{\Delta Ct}$ je nastavená na 1,95 a hodnota SF je nastavená na 1,79 na použitie v uvedenom príklade.

Poznámka

Príklad: $E_{\Delta Ct}$ špecifické pre šaržu = 1,95; SF = 1,79
Ct ABL analýzy = 13,4; Ct mutácie NPM1 = 10,2; ΔCt = 3,2
 $\% = 1,95^{(3,2)} \times 100 \times 1,79 = 1\,516,92\%$ je väčší ako definovaný horná medzná hodnota testu pri 500 %

Výsledok: **Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [Nad horným limitom] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ].** Pozrite Obrázok 3.



Obrázok 3. GeneXpert Dx Zobrazenie okna s výsledkami: Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [Nad horným limitom] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

16.3 Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [pod LoD; <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

Mutácia NPM1 bola zistená na úrovni < 0,030 %.

V prípade výsledku „**Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [pod LoQ <0,030 %]**“ (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%]) je mutácia NPM1 detekovateľná s Ct mutácie NPM1 väčšou alebo rovnou „6“ a menšou alebo rovnou „32“ a Ct ABL väčšou alebo rovnou „6“ a menšou alebo rovnou „20“. Softvér GeneXpert vypočíta % pomocou nasledujúcej rovnice, kde sa hodnota Delta Ct (ΔCt) získa z ABL Ct mínus NPM1 Mutation Ct:

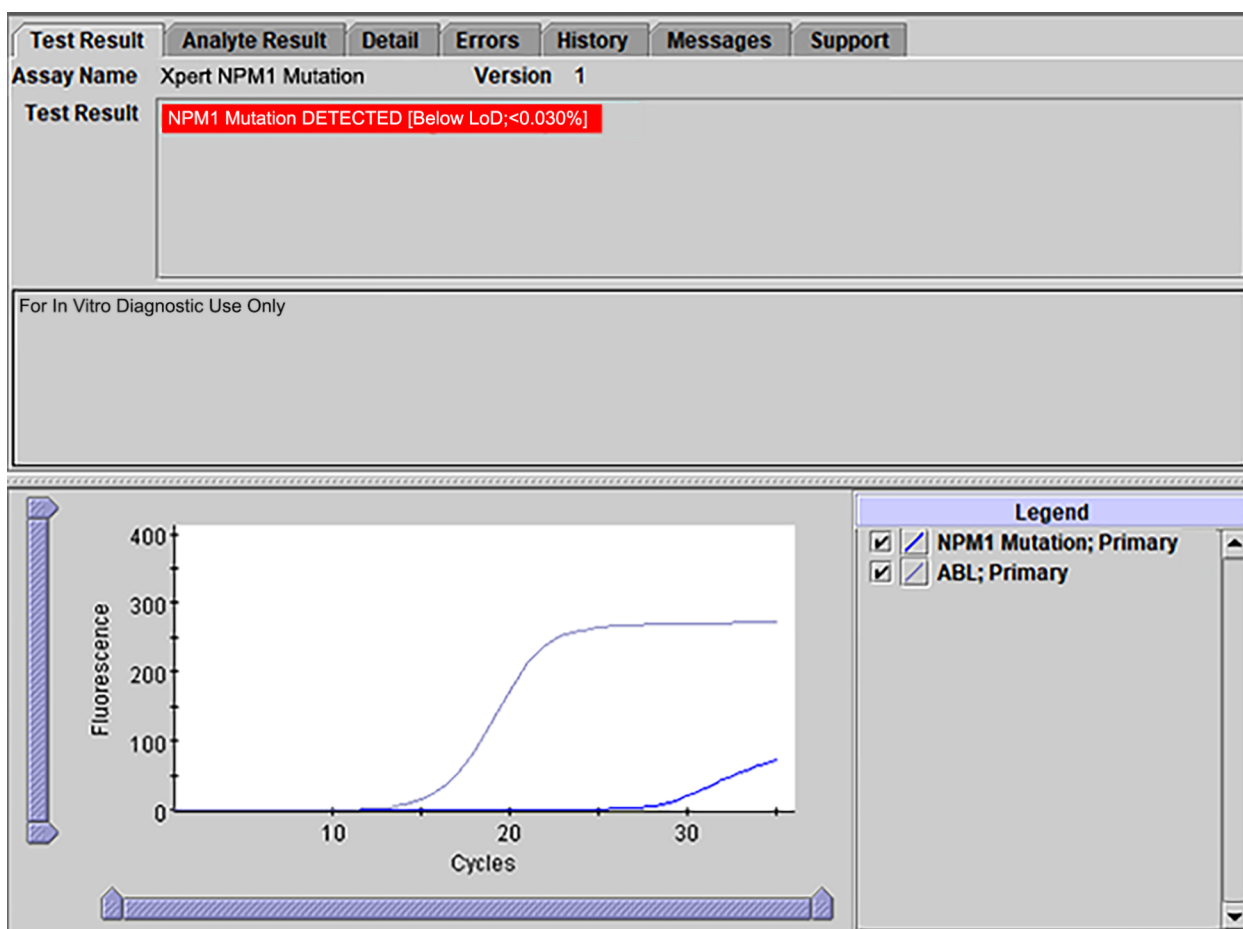
$$\% = E_{\Delta Ct}^{\Delta Ct} \times 100 \times \text{škálovací faktor (SF)}$$

Škálovací faktor (SF) je parameter špecifický pre danú šaržu, ktorý je vložený do čiarového kódu testovacej kazety. Hodnota tohto faktora a účinnosť testu špecifická pre danú šaržu ($E_{\Delta Ct}$) sa určuje pri testovaní kontroly kvality každej šarže testu pomocou primárnych štandardov kalibrovaných podľa počtu kópií syntetickej mutácie NPM1 a kalibrátorov *in vitro* transkribovanej RNA (IVT-RNA) ABL1 na kvantifikáciu transkriptu mutácie NPM1. Hodnota $E_{\Delta Ct}$ je nastavená na 1,95 a hodnota SF je nastavená na 1,79 na použitie v uvedenom príklade.

Poznámka

Príklad: $E_{\Delta Ct}$ špecifické pre šaržu = 1,95; SF = 1,79
 Ct ABL analýzy = 14,3; Ct mutácie NPM1 = 28,8; $\Delta Ct = -14,5$
 $\% = 1,95^{(-14,5)} \times 100 \times 1,79 = 0,011 \%$ je menej ako definovaný LoD analýzy pri 0,030 %

Výsledok: **Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [pod LoD; <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])**; . Pozrite Obrázok 4.



Obrázok 4. Okno zobrazenia výsledkov softvéru GeneXpert: Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [pod LoD; <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; <0.030%])

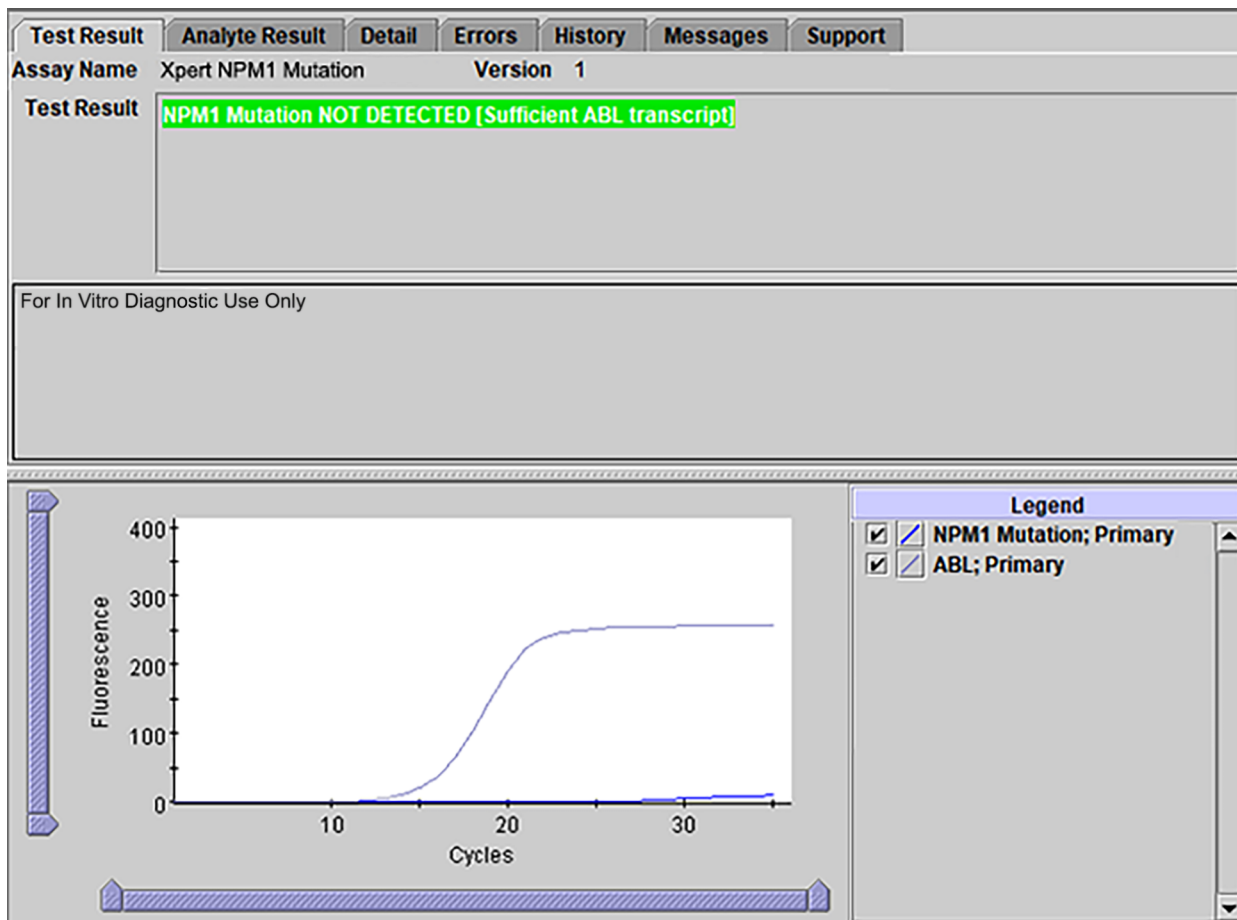
16.4 Mutácia NPM1 NEDETEGOVANÁ [dostatočný transkript ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

Mutácia NPM1 nebola zistená s Ct mutácie NPM1 rovnou „0“ a väčšou ako „32“ a Ct ABL väčšou ako „6“ a menšou alebo rovnou „20“.

Softvér GeneXpertvyžaduje, aby hodnota ABL Ct bola väčšia alebo rovná „6“ a menšia alebo rovná „20“, aby test Xpert NPM1 Mutation zabezpečil „dostatočný transkript ABL“. Pozrite si Časť 15, Interpretácia výsledkov, tabuľka č. 1.

Príklad: Ct mutácie NPM1 analýzy = 0; Ct ABL = 14,0 je medzi „6“ a „20“.

Výsledok: **Mutácia NPM1 NEDETEGOVANÁ [dostatočný transkript ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]).** Pozrite Obrázok 5.



Obrázok 5. Okno zobrazenia výsledkov softvéru GeneXpert: Mutácia NPM1 NEDETEGOVANÁ [dostatočný transkript ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

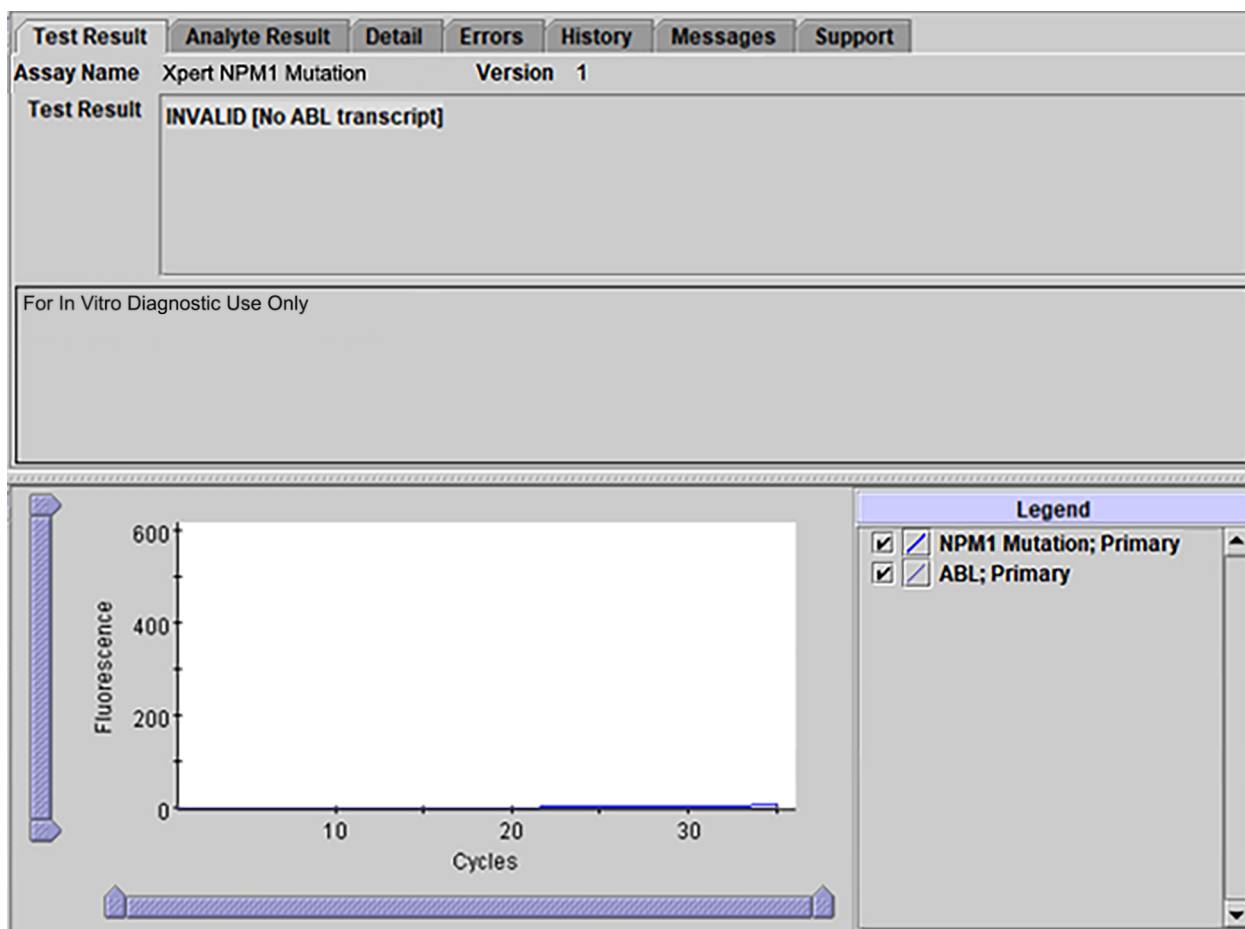
16.5 NEPLATNÝ VÝSLEDOK [žiadny transkript ABL] INVALID [No ABL transcript]

Mutácia NPM1 bola zistená alebo nebola zistená pri ABL Ct rovnvej „0“.

Softvér GeneXpertvyžaduje, aby hodnota ABL Ct bola väčšia alebo rovná „6“ a menšia alebo rovná „20“, aby test Xpert NPM1 Mutation zabezpečil „dostatočný transkript ABL“. Pozrite si časť Časť 18, Príručka na riešenie problémov.

Príklad: Ct mutácie NPM1 analýzy = 0; Ct ABL = 0.

Výsledok: **NEPLATNÝ VÝSLEDOK [žiadny transkript ABL] INVALID [No ABL transcript]**. Pozrite Obrázok 6.



Obrázok 6. Okno zobrazenia výsledkov softvéru GeneXpert: NEPLATNÝ VÝSLEDOK [žiadny transkript ABL] INVALID [No ABL transcript]

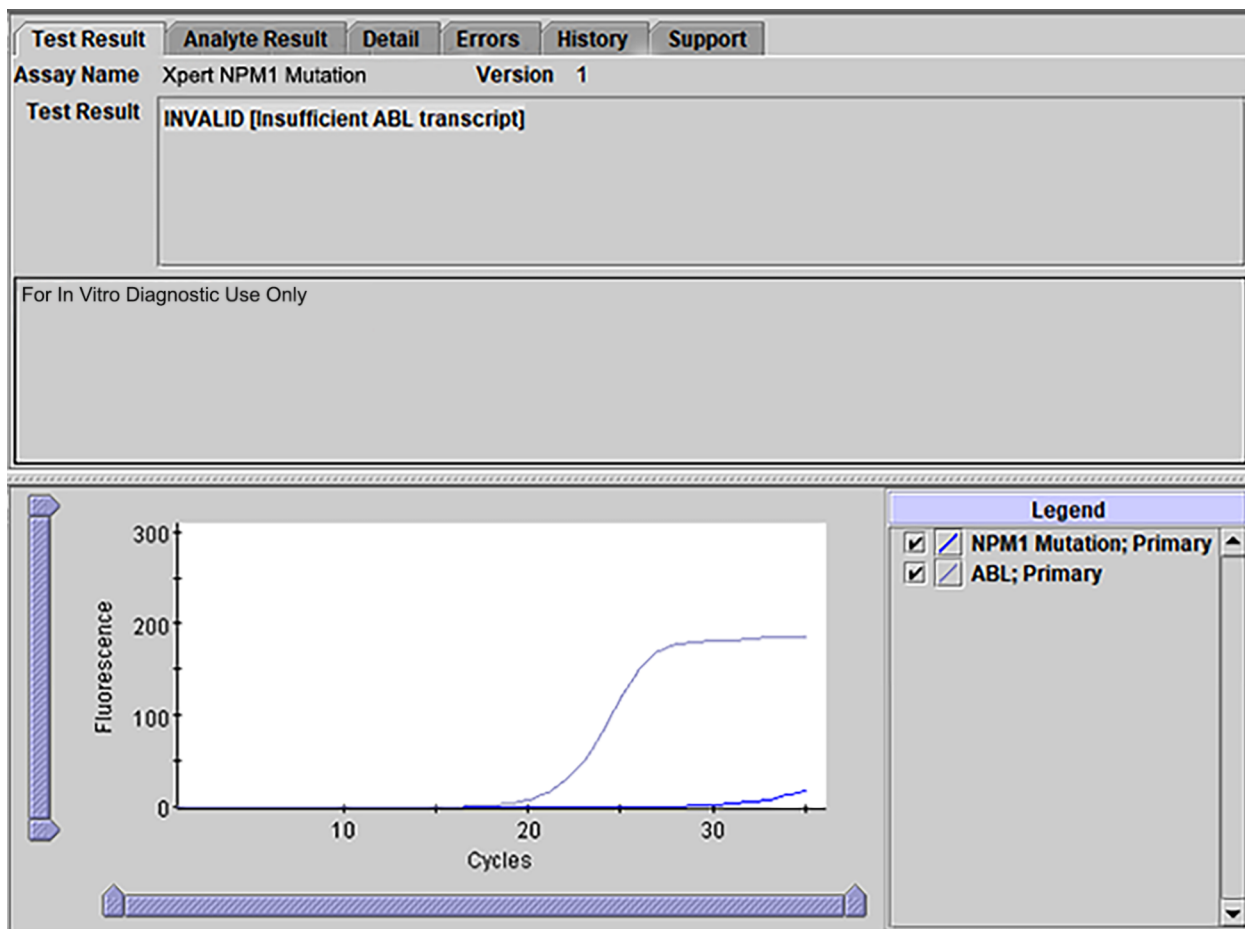
16.6 NEPLATNÝ VÝSLEDOK [neplatný transkript ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

Mutácia NPM1 bola zistená alebo nebola zistená pri ABL Ct väčšej ako „20“.

Softvér GeneXpertvyžaduje, aby hodnota ABL Ct bola väčšia alebo rovná „6“ a menšia alebo rovná „20“, aby test Xpert NPM1 Mutation zabezpečil „dostatočný transkript ABL“. Pozrite si časť Časť 18, Príručka na riešenie problémov.

Príklad: Ct mutácie NPM1 testu = 33,3; ABL Ct = 20,2 je vyššie ako „20“.

Výsledok: **NEPLATNÝ VÝSLEDOK [neplatný transkript ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])**. Pozrite Obrázok 7.



Obrázok 7. Okno zobrazenia výsledkov softvéru GeneXpert: **NEPLATNÝ VÝSLEDOK [neplatný transkript ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])**

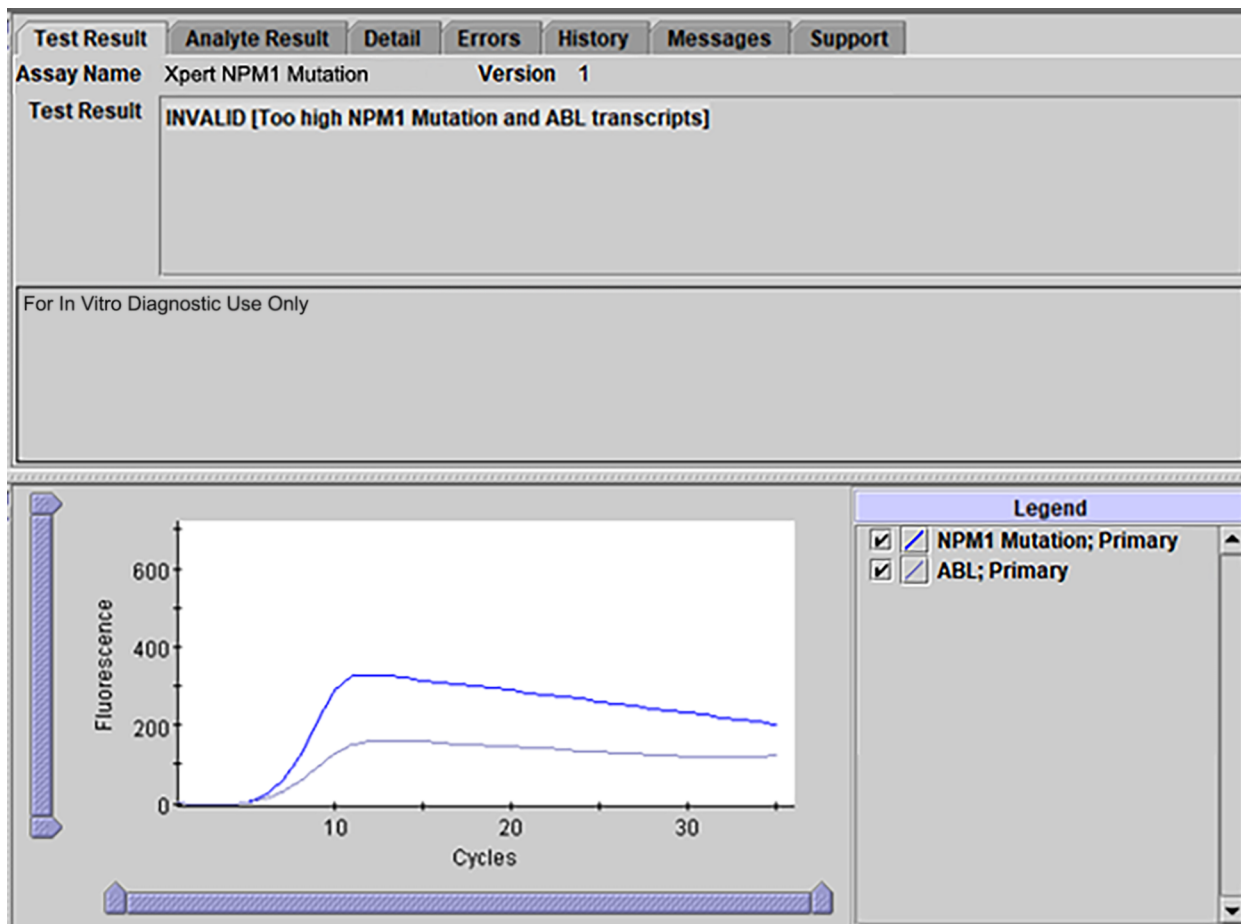
16.7 NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoká mutácia NPM1 a transkript ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

Mutácia NPM1 bola zistená pri mutácii NPM1 aj ABL Ct väčšej ako „0“ a menšej ako „6“.

Softvér GeneXpertvyžaduje, aby hodnota ABL Ct bola väčšia alebo rovná „6“ a menšia alebo rovná „20“, aby test Xpert NPM1 Mutation zabezpečil „dostatočný transkript ABL“. Pozrite si časť Časť 18, Príručka na riešenie problémov.

Príklad: Ct mutácie NPM1 analýzy = 5,4 je väčšia ako „0“ a menšia ako „6“; Ct ABL = 5,9 je menšia ako „6“.

Výsledok: **NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoká mutácia NPM1 a transkript ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript]).** Pozrite Obrázok 8.



Obrázok 8. GeneXpert Dx Zobrazenie okna s výsledkami: NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoká mutácia NPM1 a transkript ABL] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

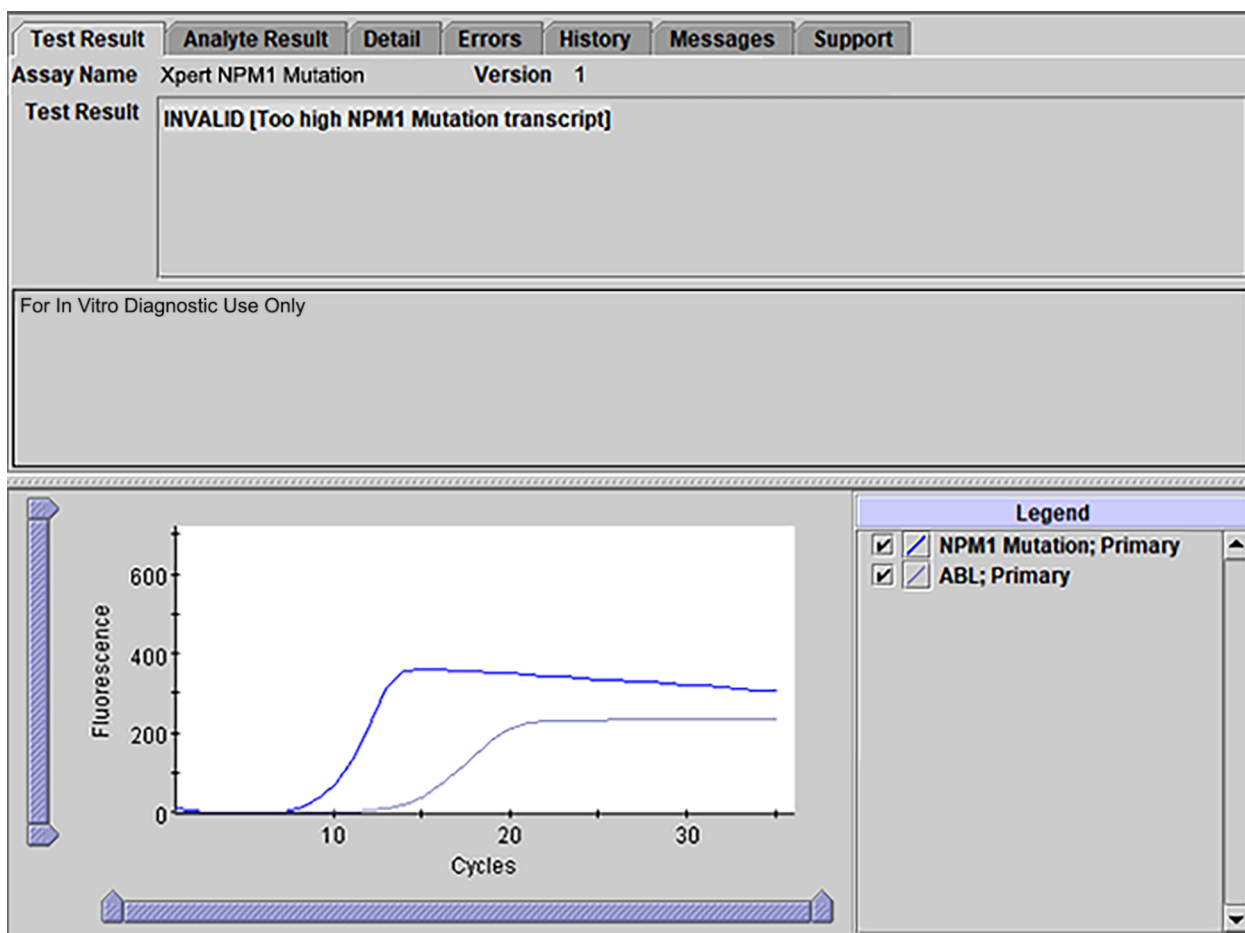
16.8 NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoký transkript mutácie NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

Mutácia NPM1 bola zistená s Ct mutácie NPM1 väčšou ako „0“ a menšou ako „6“ a Ct ABL väčšou ako „6“ a menšou alebo rovnou „20“.

Softvér GeneXpert vyžaduje, aby hodnota ABL Ct bola väčšia alebo rovná „6“ a menšia alebo rovná „20“, aby test Xpert NPM1 Mutation zabezpečil „dostatočný transkript ABL“. Pozrite si časť Časť 18, Príručka na riešenie problémov.

Príklad: Ct mutácie NPM1 analýzy = 5,8 je väčšia ako „0“ a menšia ako „6“; Ct ABL = 13 je medzi „6“ a „20“.

Výsledok: **NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoký transkript mutácie NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])**. Pozrite Obrázok 9.



Obrázok 9. Okno zobrazenia výsledkov softvéru GeneXpert: NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoký transkript mutácie NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

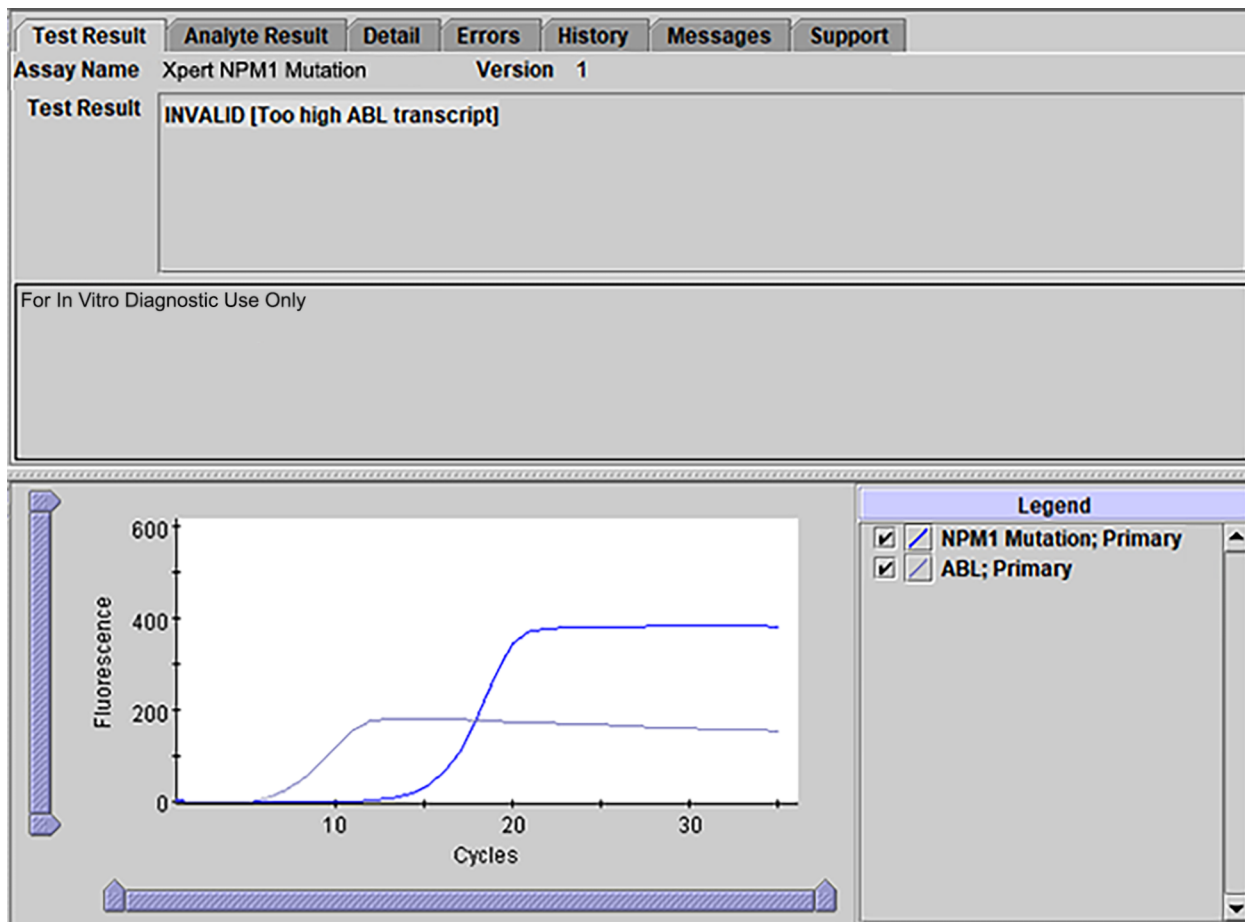
16.9 NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoký transkript mutácie ABL] (INVALID [Too high ABL Mutation transcript])

Mutácia NPM1 bola zistená s Ct mutácie NPM1 väčšou ako „6“ a menšou alebo rovnou „32“ a Ct ABL väčšou ako „0“ a menšou ako „6“.

Softvér GeneXpertvyžaduje, aby hodnota ABL Ct bola väčšia alebo rovná „6“ a menšia alebo rovná „20“, aby test Xpert NPM1 Mutation zabezpečil „dostatočný transkript ABL“. Pozrite si časť Časť 18, Príručka na riešenie problémov.

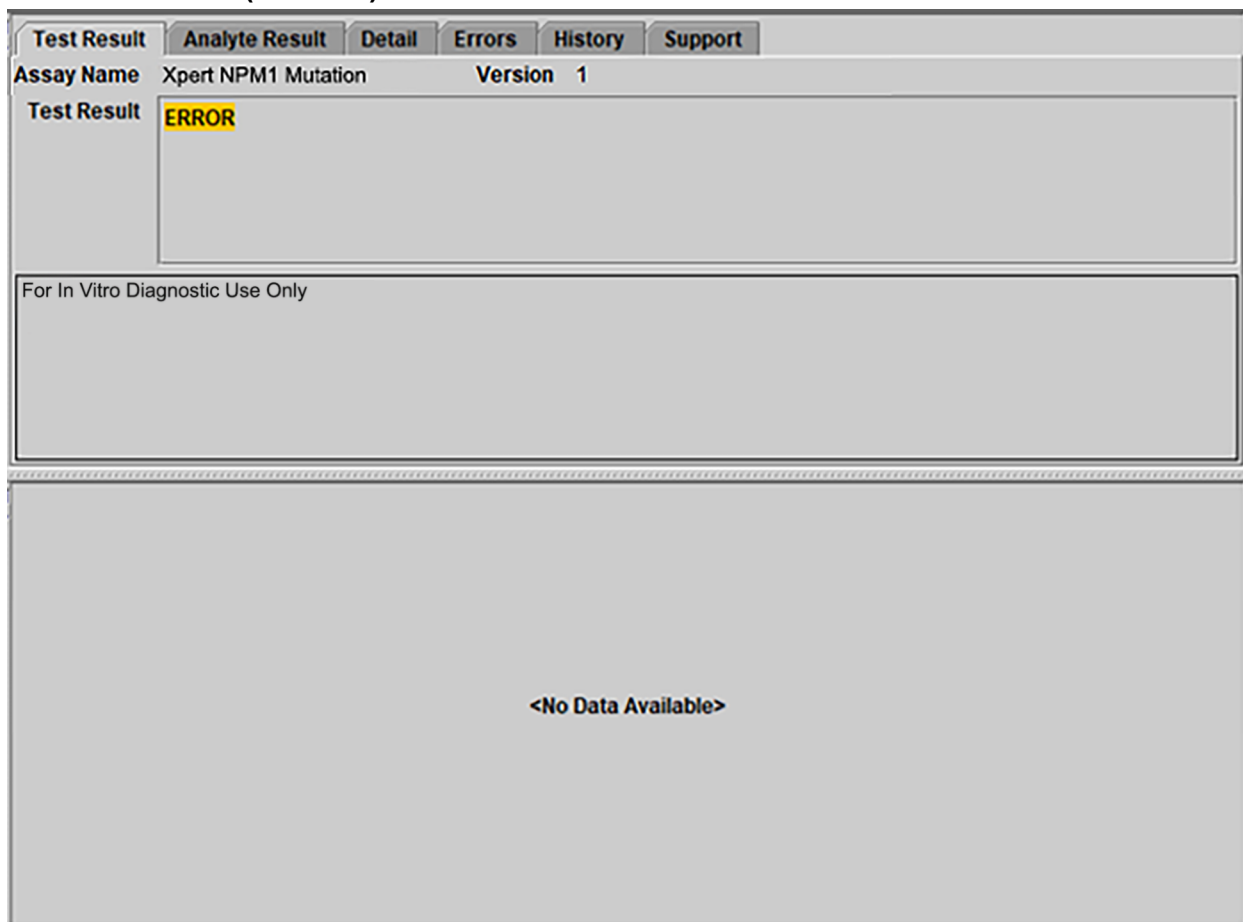
Príklad: Ct mutácie NPM1 testu = 13,2; ABL Ct = 5,8 je menšie ako „6“.

Výsledok: **NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoký transkript ABL] (INVALID [Too high ABL transcripts]).** Pozrite Obrázok 10.



Obrázok 10. Okno zobrazenia výsledkov softvéru GeneXpert: NEPLATNÝ VÝSLEDOK [príliš vysoký transkript ABL] (INVALID [Too high ABL transcripts])

16.10 CHYBA (ERROR)



Obrázok 11. Okno zobrazenia výsledkov softvéru GeneXpert: CHYBA (ERROR)

17 Obmedzenia analýzy

- Analýza nie je určená na použitie s externými kalibrátormi.
- Úprava týchto postupov môže mať za následok zmenu fungovania analýzy.
- Tento výrobok bol navrhnutý len na použitie s krvou odobratou do skúmaviek EDTA.
- Ako antikoagulant nepoužívajte heparín, pretože môže inhibovať reakciu PCR.
- Citrát sodný, leukocyto-doštičková vrstva a vzorky kostnej drene neboli validované.
- Chybné výsledky analýzy sa môžu vyskytnúť v dôsledku nesprávneho odberu, manipulácie alebo uskladnenia vzoriek, prípadne zameny vzoriek. Aby sa zabránilo chybným výsledkom, je potrebné dôsledne dodržiavať pokyny na použitie.
- Mutácie alebo polymorfizmy vo väzbových oblastiach priméru alebo sondy môžu ovplyvniť detekciu nových alebo neznámych variantov a viesť k falošne negatívnemu výsledku.
- Nadmerne vysoký počet bielych krviniek môže spôsobiť vznik tlaku v kazete a viesť k prerušeniu testovania alebo k nepresným výsledkom.
- Niektoré vzorky s veľmi nízkymi hladinami transkriptu ABL alebo s počtom bielych krviniek nižším ako 150 000 buniek/ml môžu byť vykazované ako **NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID)** (typ 1). Neurčitý výsledok nevyučuje prítomnosť veľmi nízkych hladín leukemických buniek u pacienta.

18 Príručka na riešenie problémov

Tabuľka 3. Príručka na riešenie problémov

Výsledok analýzy	Možné príčiny	Návrhy
NEPLATNÝ (INVALID)	Typ 1: Zlyhanie endogénnej kontroly ABL: <ul style="list-style-type: none"> Nízka kvalita vzorky Inhibícia RT-PCR ABL Ct > 20 a/alebo koncový bod < 100 	<ul style="list-style-type: none"> Skontrolujte kvalitu vzorky (napr. prekročenie požiadaviek na skladovanie vzorky vrátane času a teploty). Zopakujte analýzu s pôvodnou vzorkou (ak je k dispozícii) alebo zo zadržaného lyzátu a novej kazety podľa postupu opísaného v časti Časť 19.1, Postup opakovaného testu pre CHYBA (ERROR) alebo NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID) (typ 1).
	Typ 2: Hladina transkriptu mutácie NPM1 sa nedá určiť, pretože vzorka obsahuje nadbytočný transkripty mutácie NPM1 a/alebo transkripty ABL (Ct < 6).	Zopakujte analýzu s pôvodnou vzorkou (ak je k dispozícii) alebo zo zadržaného lyzátu a novej kazety podľa postupu opísaného v časti Časť 19.2, Postup opakovaného testu pre CHYBA (ERROR) (kód 2008) alebo NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID) (typ 2).
CHYBA (ERROR) (kód 2008)	Tlak prekračuje limit (chybové hlásenie 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola kvality vzorky Kontrola výrazne zvýšeného počtu WBC Zopakujte analýzu s pôvodnou vzorkou (ak je k dispozícii) alebo zo zadržaného lyzátu a novej kazety podľa postupu opísaného v časti Časť 19.2, Postup opakovaného testu pre CHYBA (ERROR) (kód 2008) alebo NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID) (typ 2).
CHYBA (ERROR) (kód 5006, 5007, 5008 a 5009*) * Toto nie je úplný zoznam kódov CHYBA (ERROR).	Zlyhanie kontroly sondy	Zopakujte analýzu s pôvodnou vzorkou (ak je k dispozícii) alebo zo zadržaného lyzátu a novej kazety podľa postupu opísaného v časti Časť 19.1, Postup opakovaného testu pre CHYBA (ERROR) alebo NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID) (typ 1).
ŽIADEN VÝSLEDOK (NO RESULT)	Zlyhanie zberu údajov. Operátor napríklad pozastavil analýzu, ktorý prebiehal, alebo došlo k výpadku napájania.	Zopakujte analýzu s pôvodnou vzorkou (ak je k dispozícii) alebo zo zadržaného lyzátu a novej kazety podľa postupu opísaného v časti Časť 19.1, Postup opakovaného testu pre CHYBA (ERROR) alebo NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID) (typ 1).

19 Opakovanie testov

19.1 Postup opakovaného testovania pre CHYBA (ERROR) alebo NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID) (typ 1)

Opätovné testovanie vzoriek s výsledkami **CHYBA (ERROR)** alebo **NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID)** z dôvodu, že prah cyklu ABL (Ct) prekračuje maximálnu platnú hodnotu Ct ($Ct > 20$) alebo koncový bod je nižší ako nastavený prah (< 100). Pozrite si tiež časť Časť 18, Príručka na riešenie problémov.

1. Ak je k dispozícii dostatočný objem vzorky krvi, vykonajte opakovaný test z pôvodnej skúmavky na odber vzorky krvi podľa postupu uvedeného v Časť 12.2.

–ALEBO–

Ak je objem vzorky krvi nedostatočný, môže sa vykonať opakovaný test so zadržaným lyzátom z Časť 12.2.1, kroku 12.

- a. Ak sa zadržaný lyzát z Časť 12.2.1, kroku 12 skladuje zmrazený, pred použitím ho rozmrazte na izbovú teplotu.
 - b. Uistite sa, že je lyzát dobre premiešaný miešaním vzorky vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení nepretržite počas 10 sekúnd a odložte ho na 3 minúty, aby sa usadili bubliny.
2. Preneste 1 ml pripraveného lyzátu do novej 50 ml kónickej skúmavky.
 3. Na vytvorenie konečného lyzátu postupujte podľa krokov 13 až 17 v Časť 12.2.1.
 4. Otvorte zásobník zdvihnutím veka zásobníka a preneste celý obsah ampulky s jedným (1) premývacím činidlom do komory s premývacím činidlom (s malým otvorom). Pozrite Obrázok 1.
 5. Pipetujte celý obsah pripravenej vzorky do komory na vzorky (veľký otvor). Pozrite Obrázok 1.
 6. Zatvorte kryt zásobníka. Spustite analýzu (pozrite si Časť 12.4, Spustenie analýzy).

19.2 Postup opakovaného testovania pre CHYBA (ERROR) (kód 2008) alebo NEPLATNÝ VÝSLEDOK (INVALID) (typ 2)

Opätovne testujte vzorky s hladinami transkriptu mutácie NPM1 a/alebo ABL pod platnou minimálnou hodnotou Ct ($Ct > 0$ a $Ct < 6$) a/alebo pri prekročení limitu tlaku. Pozrite si tiež časť Časť 18, Príručka na riešenie problémov.

1. Na dno novej 50 ml kónickej skúmavky pridajte 100 μ l PK (proteináza K).
2. Bezprostredne pred pipetovaním sa uistite, že je vzorka krvi alebo zvyšný lyzát z Časť 12.2, kroku 12, dobre premiešaný 8-krát prevrátením skúmavky.
3. Do skúmavky, ktorá už obsahuje proteinázu K, pridajte 250 μ l vzorky krvi a 3,75 ml PBS (pH 7,4, poskytné používateľ), ak je k dispozícii, alebo 60 μ l zadržaného lyzátu z Časť 12.2.1, kroku 12.
 - a. Ak sa zadržaný lyzát z Časť 12.2.1, kroku 12 skladuje zmrazený, pred použitím ho rozmrazte na izbovú teplotu.
 - b. Uistite sa, že je lyzát dobre premiešaný miešaním vzorky vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení nepretržite počas 10 sekúnd a odložte ho na 3 minúty, aby sa usadili bubliny.
4. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 3 sekúnd.
5. Inkubujte pri izbovej teplote 1 minútu.
6. Pri opakovanom testovaní vzorky krvi s PBS postupujte podľa krokov 6 – 17 v Časť 12.2.1, aby ste pripravili konečný lyzát. Pri opakovanom testovaní vzorky zadržaného lyzátu postupujte podľa nižšie uvedených krokov a – g, aby ste vytvorili konečný lyzát.
 - a. Do skúmavky s opätovne testovanou vzorkou zadržaného lyzátu pridajte 2,5 ml LY.
 - b. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 10 sekúnd.
 - c. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
 - d. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 10 sekúnd.
 - e. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
 - f. Do tej istej skúmavky pridajte 2 ml absolútneho etanolu reagenčnej kvality (poskytné používateľ).
 - g. Vzorku nepretržite miešajte vírivým miešadlom pri maximálnom nastavení počas 10 sekúnd. Odložte.
7. Otvorte zásobník zdvihnutím veka zásobníka a preneste celý obsah ampulky s jedným (1) premývacím činidlom do komory s premývacím činidlom (s malým otvorom). Pozrite Obrázok 1.
8. Pipetujte celý obsah pripravenej vzorky do komory na vzorky (veľký otvor). Pozrite Obrázok 1.
9. Zatvorte kryt zásobníka. Spustite analýzu (pozrite si Časť 12.4, Spustenie analýzy).

20 Očakávané hodnoty

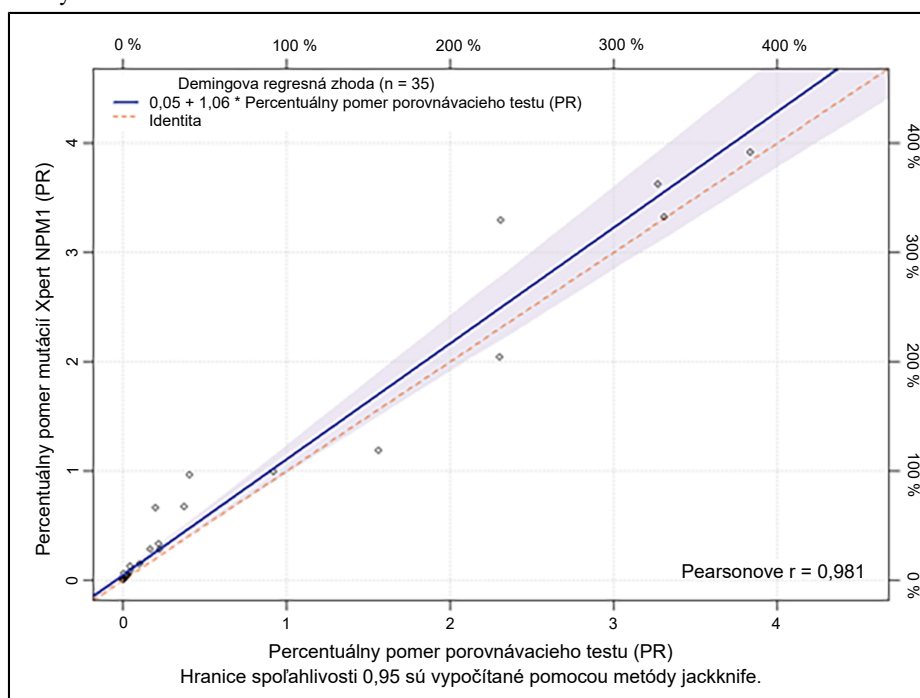
Rozsah Xpert NPM1 Mutation zahŕňa kľúčové body klinického rozhodovania pri monitorovaní AML. Očakávané hodnoty sú vyjadrené ako percentuálny pomer mRNA mutácie NPM1 k mRNA ABL a pohybujú sa od 0,030 % do 500 %. Merania pod týmto rozsahom sa uvádzajú ako nezistené alebo pod hranicou detekcie (LoD). Merania nad týmto rozsahom sa uvádzajú ako merania nad hranicou stanovenia (LoQ). Podrobnosti nájdete v časti Časť 15.

21 Klinická výkonnosť

Porovnávacia štúdia s viacerými pozorovacími metódami sa uskutočnila na troch miestach v Spojených štátoch amerických a na jednom mieste mimo Spojených štátov amerických. Do štúdie boli zaradené vzorky od 40 diskretných pacientov s AML s mutáciou NPM1 z jedného časového bodu a v celom dynamickom rozsahu testu Xpert NPM1 Mutation. U pacientov, od ktorých sa vzorky získali, sa zisťoval vek a pohlavie. Podľa pohlavia bolo 11 mužov (27,5 %) a 29 žien (72,5 %). Všetky vzorky boli od pacientov vo veku od 16 do 81 rokov s priemerom 59,7 roka.

Všetkých 40 vzoriek poskytlo platné výsledky testov. Tridsaťšesť zo 40 vzoriek poskytlo výsledky v kvantitatívnom rozmedzí oboch testov. Štyri vzorky boli vylúčené z Demingovej regresie, pretože vzorky boli negatívne v a/alebo komparatívnom teste Xpert NPM1 Mutation. Ďalšia vzorka bola vylúčená, pretože predstavovala odľahlú hodnotu. Do Demingovej regresnej analýzy bolo zahrnutých celkovo 35 vzoriek.

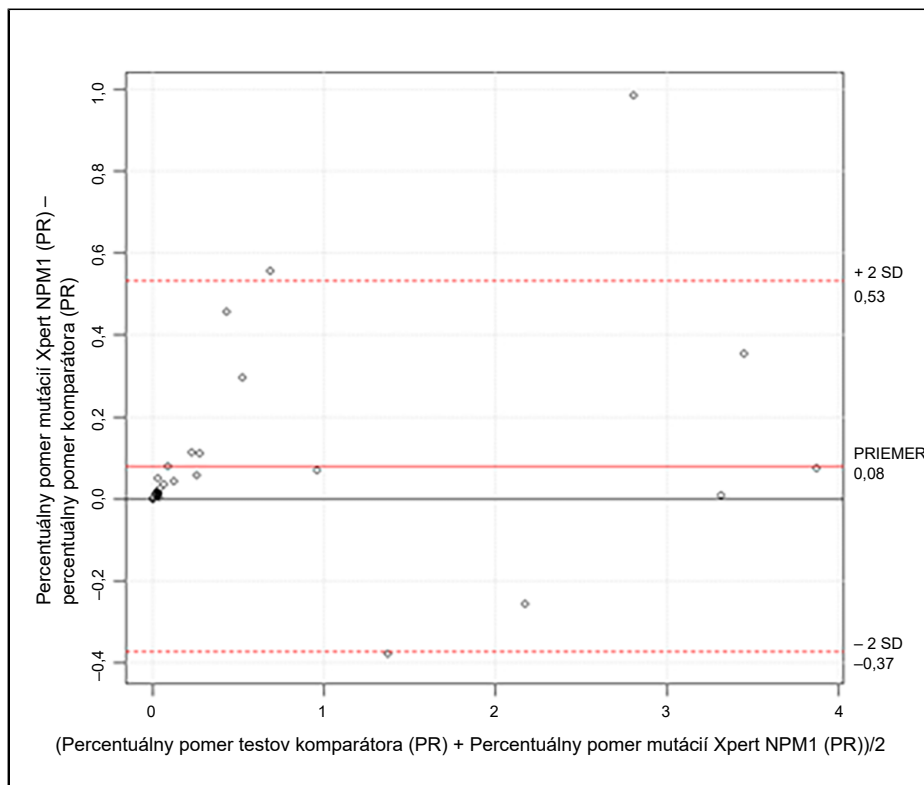
Výkonnosť testu Xpert NPM1 Mutation v porovnaní s porovnávacím testom sa hodnotila pomocou Demingovej regresie na určenie sklonu a intercepce. Test Obrázok 12 uvádza výsledky Demingovej regresnej analýzy vrátane sklonu, intercepce a priamky totožnosti na 35 vzorkách. Hranice spoľahlivosti 95 % boli vypočítané pomocou metódy jackknife a zobrazené je Pearsonov korelačný koeficient.



Obrázok 12. Demingova regresia pre percentuálny pomer

Sklon a intercept percentuálneho pomeru z Demingovej regresnej analýzy boli 1,06 a 0,05 a Pearsonova korelácia bola 0,981 medzi meraniami testu Xpert NPM1 Mutation a porovnávacieho testu.

Bland-Altmanova analýza rozdielu v percentuálnom pomere sa vyhodnotila pre 35 vzoriek s kvantitatívnymi výsledkami, ktoré boli v lineárnom rozsahu testu Xpert NPM1 Mutation a porovnávacieho testu. Test Obrázok 13 zobrazuje Bland-Altmanov graf s rozdielom v percentuálnom pomere medzi oboma testami oproti priemerným výsledkom percentuálneho pomeru pre každú vzorku. Graf zobrazuje aj horné a dolné dve štandardné odchýlky (2SD) priemerného rozdielu, ktorý bol pozorovaný v štúdiu.



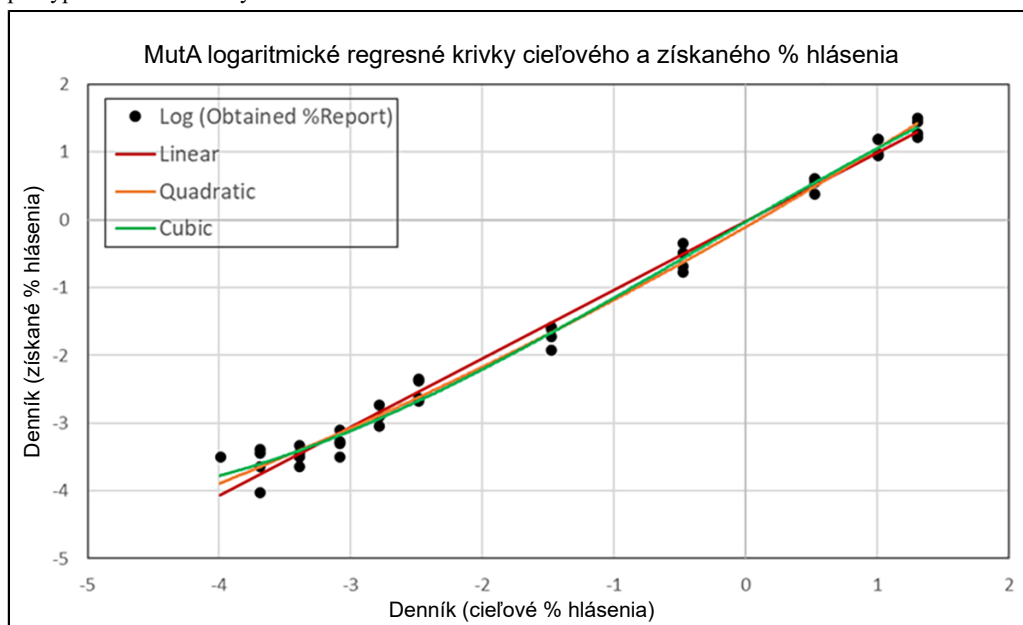
Obrázok 13. Bland-Altmanov graf pre percentuálny pomer mutácie Xpert NPM1 a porovnávacieho testu

Priemerný rozdiel bol 0,08 v percentuálnom pomere medzi výsledkom testu Xpert NPM1 Mutation a porovnávacieho testu. Väčšina (91,4 %, 32/35) výsledkov bola v rámci 2SD priemerného rozdielu.

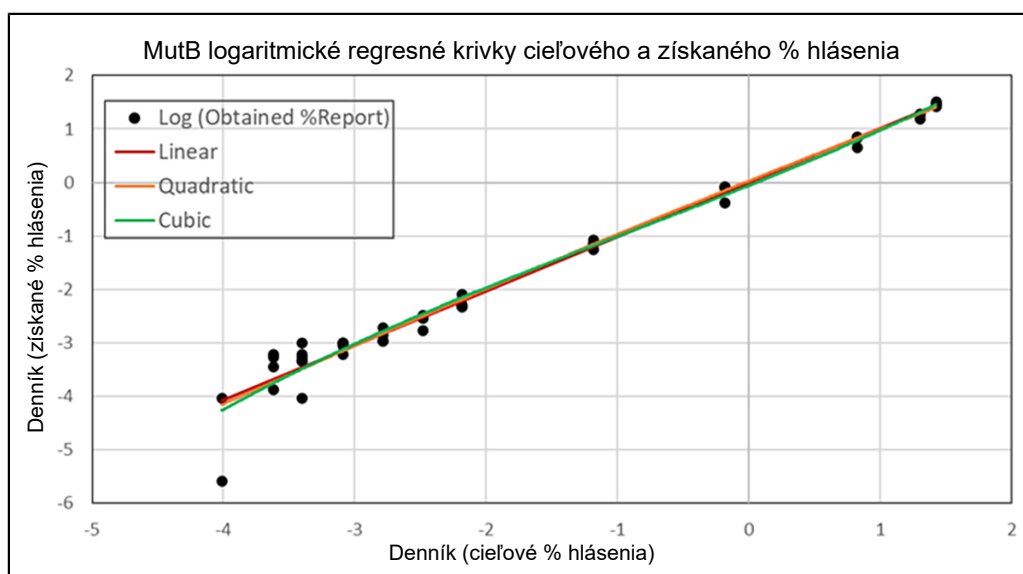
22 Analytické údaje

22.1 Linearita/dynamický rozsah

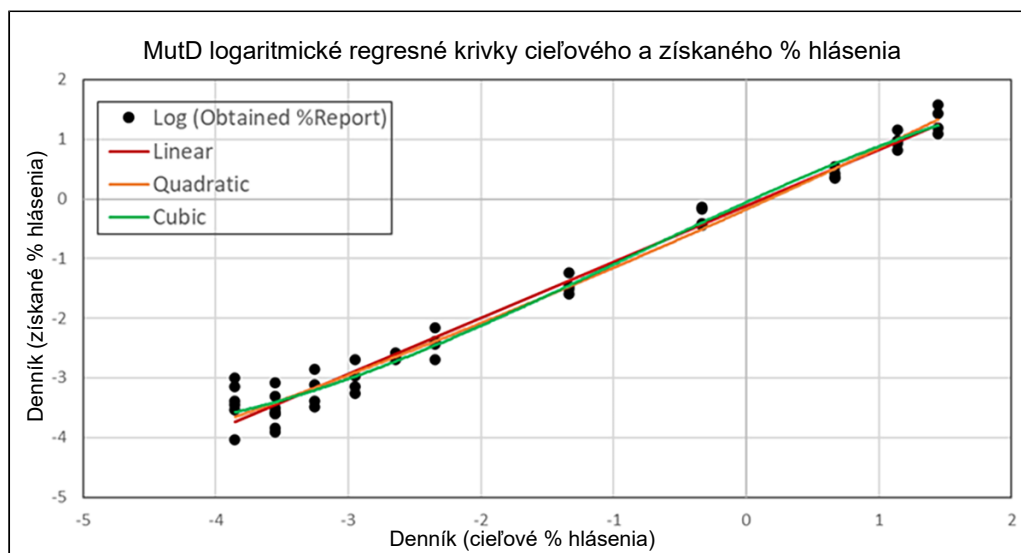
Linearita bola stanovená pre každý z troch mutantných podtypov NPM1, mutA, mutB a mutD, s použitím bunkových lyzáto, ktoré obsahujú vysoké hladiny transkriptu každého podtypu. Takéto lyzáty sa riedili v lyzáte pozadia pripravenom z darcov s pravdepodobne negatívnou mutáciou NPM1 na cieľové rozmedzie ~0,01 – 2 500 % mutácie NPM1/ABL. Všetky hladiny sa testovali na jednej dávke činidla v štyroch opakovaniach. Testovanie a štatistické analýzy sa vykonali v súlade s CLSI EP06-A⁹. Regresné krivky pre každý podtyp sú uvedené v Obrázok 14, Obrázok 15, a Obrázok 16. Lineárny rozsah každého podtypu a ich koeficienty lineárneho modelu sú zhrnuté v Tabuľka 4.



Obrázok 14. Regresné krivky pre mutA



Obrázok 15. Regresné krivky pre mutB



Obrázok 16. Regresné krivky pre mutD

Tabuľka 4. Súhrn lineárnych rozsahov a koeficientov lineárneho modelu

Podtyp (Subtype)	Lineárny rozsah	Priešecník	Sklon	R ²
mutA	0,010 – 2 020 %	-0,0223	1,0134	0,989
mutB	0,010 – 2 673 %	-0,0061	1,0174	0,978
mutD	0,014 – 2 783 %	-0,1163	0,9389	0,981

Súhrnne test Xpert NPM1 Mutation preukázal linearitu v rozsahu 0,014 – 2 020 % mutácie NPM1/ABL. Ohraničený hornou hranicou LoQ a hornou hranicou softvéru je ohlasovaný dynamický rozsah 0,030 – 500 %.

22.2 Analytická citlivosť (limit detekcie, limit kvantifikácie, limit slepého pokusu)

Limit detekcie (LoD) je najnižšia úroveň mutácie NPM1/ABL, pri ktorej sa 95 % vzoriek konzistentne hlási ako „**Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ [##.##%]**“ (NPM1 Mutation DETECTED [##.##%]). LoD sa stanovila pre podtypy mutA, mutB a mutD jednotlivito testovaním sériových zriedení bunkových lyzátov pozitívnych na mutáciu NPM1 a klinických lyzátov s každým podtypom mutácie. Príslušné LoD boli odhadnuté a overené v súlade s CLSI EP17-A2.¹⁰ Výsledné analýzy poskytli LoD 0,025 % pre mutA, 0,023 % pre mutB a 0,030 % pre mutD (Tabuľka 5). Najvyššia hodnota LoD spomedzi troch podtypov 0,030 % sa považuje za celkovú hodnotu LoD testu Xpert NPM1 Mutation.

Limit kvantifikácie (LoQ) je najnižšia úroveň mutácie NPM1/ABL, nad ktorou možno vzorky kvantifikovať so štandardnou odchýlkou $\leq 0,36$ log redukcie (LR) pre priemerné LR nad 3,5. V súlade s CLSI EP17-A2¹⁰ sa LoQ odhadli a overili na 0,025 % pre podtyp mutA, 0,023 % pre podtyp mutB a 0,030 % pre podtyp mutD (Tabuľka 5). Najvyššia hodnota LoQ spomedzi troch podtypov 0,030 % sa považuje za celkovú hodnotu LoQ testu Xpert NPM1 Mutation.

Hranica slepého pokusu (LoB) je najvyšší výsledok mutácie NPM1/ABL, ktorý sa očakáva medzi 95 % slepých vzoriek od darcov pravdepodobne negatívnych na mutáciu NPM1. V súlade s CLSI EP17-A2¹⁰ bola LoB testu Xpert NPM1 Mutation odhadnutá a overená na 0,0085 % (Tabuľka 5).

Tabuľka 5. Limit detekcie, limit kvantifikácie a limit slepého pokusu testu Xpert NPM1 Mutation [% mutácie NPM1/ABL]

Podtyp (Subtype)	LoD [%NPM1 mutácia/ABL] ([%NPM1 Mutation/ABL])	LoQ [%NPM1 mutácia/ABL] ([%NPM1 Mutation/ABL])	LoB [%NPM1 mutácia/ABL] ([%NPM1 Mutation/ABL])
mutA	0,025 %	0,025 %	0,0085 %
mutB	0,023 %	0,023 %	
mutD	0,030 %	0,030 %	

22.3 Analytická špecifickosť

Analytická špecifickosť testu Xpert NPM1 Mutation bola stanovená testovaním vzoriek periférnej krvi ošetrených EDTA, odobratých dvadsiatim piatim zdravým darcom.

Zo žiadnej z pravdepodobne NPM1 mutácie negatívnych vzoriek hodnotených v tejto štúdií nebol získaný výsledok Mutácia NPM1 **DETEGOVANÁ** (NPM1 Mutation DETECTED). Test Xpert NPM1 Mutation je teda špecifický pre mutantné transkripty NPM1 mRNA (typy A, B a D v exóne 12) spojené s AML a má 100 % analytickú špecifickosť pre vzorky periférnej krvi s EDTA.

22.4 Hodnotenie kontaminácie prenosom

Vykonala sa štúdia s cieľom preukázať, že jednorazové autonómne zásobníky GeneXpert zabráňujú prenosu kontaminácie zo zásobníkov prevádzkovaných postupne v tom istom module nástroja. Pravdepodobne NPM1-negatívna vzorka bola testovaná po vzorke s vysokou NPM1-mutáciou v tom istom module GeneXpert. Testovacia schéma sa opakovala 10-krát na dvoch moduloch GeneXpert (spolu 22 negatívnych a 20 pozitívnych výsledkov). Všetky behy pozitívnej vzorky priniesli očakávaný výsledok „**Mutácia NPM1 DETEGOVANÁ** [#.###%]“ (NPM1 Mutation DETECTED [#.###%]) a všetky behy negatívnych vzoriek priniesli očakávaný výsledok „**Mutácia NPM1 NEDETEGOVANÁ** [dostatočný transkript ABL]“ (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]).

22.5 Potenciálne interferujúce látky

V tejto štúdií sa hodnotilo päť látok, ktoré môžu byť prítomné vo vzorkách periférnej krvi EDTA a ktoré môžu interferovať s výkonnosťou testu. Testované zlúčeniny a hladiny (pozrite si Tabuľka 6) boli založené na pokynoch z dokumentu CLSI EP07-ED3¹¹. Interferenčné zložky sa testovali vo vzorkách periférnej krvi s EDTA a lyzátach kultivovaných buniek pozitívnych na mutáciu NPM1, čo predstavuje tri úrovne: > 1 %, 0,1 – 0,5 %, a negatívnych. Testovacie kontroly pozostávali z rovnakých vzoriek bez potenciálne rušivých látok. Každá úroveň sa testovala v neprítomnosti a prítomnosti piatich jednotlivých interferentov v 4 opakovaniach pre každú podmienku. Látka sa považovala za neinterferujúcu, ak v jej prítomnosti bol priemerný pozorovaný percentuálny pomer v rámci 3-násobného rozdielu v porovnaní s kontrolou.

Pri žiadnej z interferujúcich látok hodnotených v tejto štúdií neboli pozorované klinicky významné inhibičné účinky na test Xpert NPM1 Mutation. Hoci sa v žiadnych testovaných podmienkach nepozorovali žiadne štatisticky významné rozdiely (p-hodnota < 0,05) a uvádzané percentuálne pomery medzi testovanými a kontrolnými podmienkami boli v prijateľnom 3-násobnom rozmedzí.

Tabuľka 6. Testované potenciálne interferujúce substancie s použitím Xpert NPM1 Mutation

Interferujúce látky	Testovaná koncentrácia
Nekonjugovaný bilirubín	20 mg/dl
Cholesterol, celkový	500 mg/dl
Triglyceridy, celkové (lipidy)	3 000 mg/dl
Heparín	3 500 U/l
EDTA (krátky odber)	930 mg/dl

23 Presnosť a reprodukovateľnosť

Štúdia bola navrhnutá v súlade so všeobecnými zásadami uvedenými v norme CLSI EP05-A3 pre viacfaktorové štúdie. Uskutočnila sa na troch pracoviskách. Návrh štúdie zahŕňal členov panelu vzoriek, ktorý obsahoval mutácie A, B a D v dvoch koncentráciách. Sedem členov panelu bolo testovaných duplicitne, dve série za deň, celkovo 6 dní každým z dvoch operátorov na troch rôznych miestach (3 miesta × 2 operátori × 3 série × 2 dni × 2 série × 2 repliky = 144 výsledkov testov/člen panelu). Panely reprodukovateľnosti a presnosti pripravila spoločnosť Cepheid a pozostávajú zo siedmich členov panelu, ako je uvedené v Tabuľka 7. Panely boli vytvorené v simulovanej matrici periférnej krvi EDTA (PB).

Tabuľka 7. Panely presnosti a reprodukovateľnosti

Členovia panelu	Cieľ	Percentuálny pomer (PR) úrovne
1	Negatívne	–
2	Mutácia NPM1 A	Stredne pozitívne (~ 5 %)
3	Mutácia NPM1 A	Nízko pozitívne (~ 0,2 %)
4	Mutácia NPM1 B	Stredne pozitívne (~ 5 %)
5	Mutácia NPM1 B	Nízko pozitívne (~ 0,2 %)
6	Mutácia NPM1 D	Stredne pozitívne (~ 5 %)
7	Mutácia NPM1 D	Nízko pozitívne (~ 0,2 %)

Počet vzoriek s platnými výsledkami pre každého člena panelu analyzovaného každým z dvoch prevádzkovateľov na troch miestach je uvedený v Tabuľka 8.

Tabuľka 8. Presnosť a reprodukovateľnosť: Počet vzoriek s platnými výsledkami

Členovia panelu	Pracovisko 1			Pracovisko 2			Pracovisko 3			Celkový počet vzoriek
	Op 1	Op 2	Pracovisko	Op 1	Op 2	Pracovisko	Op 1	Op 2	Pracovisko	
1 Negatívne	24/24 ^a	(24/24)	(48/48) ^a	(24/24) ^b	(24/24)	(48/48) ^b	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
2 LR1.3: mut A (~ 5 % pomer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
3 LR2.7: mut A (~ 0,2 % pomer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
4 LR1.3: mut B (~ 5 % pomer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
5 LR2.7: mut B (~ 0,2 % pomer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
6 LR1.3: mut D (~ 5 % pomer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
7 LR2.7: mut D (~ 0,2 % pomer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24) ^c	(24/24)	(48/48) ^c	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)

^a Dve negatívne vzorky mali platné, ale zistené výsledky (FP)

^b Jedna negatívna vzorka mala platný, ale zistený výsledok (FP)

^c Jedna vzorka LR 2,7: mut D (~0,2 % pomer) mala platný, ale nezistený výsledok (FN)

Kvantitatívne výsledky boli analyzované vnorenou analýzou rozptylu (ANOVA) s náhodnými efektmi a variačným koeficientom (CV). Výsledky výpočtov ANOVA pre štandardnú odchýlku a rozptyl pre každú pozitívnu vzorku sú uvedené v Tabuľka 9. Rozptyl a percento celkového rozptylu, na ktorom sa podieľa každá zložka (pracovisko/prístroj, operátor, dávka, deň, cyklus), sa uvádza ako SD a percentuálny podiel každej zložky.

Tabuľka 9. Výsledky z variačného koeficientu (CV): Percentuálny pomer (PR)

Členovia panelu	N	Priemer	Pracovisko		Op		Šarža		Deň		Cyklus		V rámci analýzy		Celkovo	
			Št. odch.	CV (%)	Št. odch.	CV (%)	Št. odch.	CV (%)	Št. odch.	CV (%)	Št. odch.	CV (%)	Št. odch.	CV (%)	Št. odch.	CV (%)
LR1.3: mut A (~ 5 % pomer)	144	4,3 %	0,00	6,14	0,00	0,00	0,00	4,29	0,00	8,91	0,00	4,36	0,01	17,83	0,01	21,74
LR2.7: mut A (~0,2 % pomer)	144	0,2 %	0,00	0,00	0,00	12,43	0,00	0,00	0,00	23,71	0,00	0,00	0,00	74,56	0,00	79,22
LR1.3: mut B (~ 5 % pomer)	144	5 %	0,00	8,24	0,00	0,00	0,01	11,50	0,00	7,19	0,00	0,00	0,01	20,88	0,01	26,23
LR2.7: mut B (~0,2 % pomer)	144	0,2 %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,28	0,00	20,68
LR1.3: mut D (~ 5 % pomer)	144	4,2 %	0,00	5,15	0,00	0,00	0,01	12,91	0,00	8,78	0,00	0,00	0,01	18,30	0,01	24,60
LR2.7: mut D (~0,2 % pomer)	143 ^a	0,2 %	0,00	10,86	0,00	0,00	0,00	12,91	0,00	6,77	0,00	0,00	0,00	22,83	0,00	29,18

^a Jedna vzorka nebola detegovaná pomocou Xpert NPM1 a bola vylúčená z analýzy, pretože v nej nebolo vykonané kvantitatívne meranie.

Celkový percentuálny variačný koeficient (CV) percentuálneho pomeru uvádzajúceho kvantitatívne hodnoty pre stredne pozitívne vzorky LR1.3: mut A, mut B a mut D (~5 % pomer) sa pohyboval od 21,74 do 26,23 a pre nízko pozitívne vzorky LR2.7: mut A, mut B a mut D (~0,2 % pomer) sa pohyboval od 20,68 do 79,22.

24 Referencie

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>. Prístup 16. septembra 2020.
4. Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2018; 32(3): 167-183. doi:10.1016/j.blre.2017.11.001
5. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017; 31(4): 798-807. doi:10.1038/leu.2017.30
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories (refer to latest edition). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
8. Health-care Waste. Svetová zdravotnícka organizácia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste>
9. CLSI EP06-A:2003 Vyhodnocovanie linearity postupov kvantitatívneho merania: Štatistický prístup, 1. vydanie
10. CLSI EP17-A2:2012 Vyhodnocovanie detekčnej schopnosti pre postupy klinického laboratórneho merania; 2. vydanie
11. CLSI EP07-ED3:2018 Interferenčné testovanie v klinickej chémii, 3. vydanie
12. CLSI EP05-A3:2014 Vyhodnocovanie presnosti postupov kvantitatívneho merania; Schválené usmernenie – 3. vydanie

25 Umiestnenia ústredí spoločnosti Cepheid

Ústredia spoločnosti

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
USA

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

Európske ústredie

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

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

26 Technická podpora

Pred kontaktovaním technickej podpory spoločnosti Cepheid majte nasledovné:

- Názov produktu
- Číslo šarže
- Sériové číslo prístroja
- Chybové hlásenia (ak nejaké sú)
- Verziu softvéru a prípadne číslo servisnej značky počítača

Spojené štáty americké





















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

Francúzsko

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

Kontaktné údaje všetkých pobočiek technickej podpory spoločnosti Cepheid sú k dispozícii na našej webovej stránke:
www.cepheid.com/en_US/support/contact-us.

27 Tabuľka symbolov

Symbol	Význam
	Katalógové číslo
	Označenie CE – značka Európskej zhody
	<i>In vitro</i> diagnostické zdravotnícke zariadenie
	Kód šarže
	Nepoužívajte opakovane
	Pozrite si návod na použitie
	Výrobca
	Krajina výroby
	Obsah postačuje na vykonanie <i>n</i> testov
	Kontrola
	Dátum expirácie
	Teplotné obmedzenie
	Biologické riziká
	Upozornenie
	Horľavé tekutiny
	Reprodukčná a orgánová toxicita
	Varovanie
	Authorizovaný zástupca pre Európske spoločenstvo
	Autorizovaný zástupca vo Švajčiarsku
	Dovozca



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



Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francúzsko
Telefón: + 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 História revízií

Časť	Opis zmeny
23	Oprava chyby v časti „Presnosť a reprodukovateľnosť“.