

REF 201300 NeuMoDx™ HBV Quant Test Strip

R only

OPREZ: samo za izvoz u SAD

IVD Za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx 288 i NeuMoDx 96 Molecular System

 Za ažurirane upute posjetite stranicu: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Detaljnije upute potražite u korisničkom priručniku za sustav NeuMoDx 288 Molecular System; br. dijela 40600108

Detaljnije upute potražite u korisničkom priručniku za sustav NeuMoDx 96 Molecular System; br. dijela 40600317

NAMJENA

Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay automatizirani je *in vitro* test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za kvantifikaciju DNK virusa hepatitisa B (Hepatitis B Virus, HBV) u ispitcima humane plazme i seruma za genotipove virusa HBV od A do H u osoba zaraženih HBV-om. Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay provedeno na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System (sustav(i) NeuMoDx System) uključuje automatiziranu ekstrakciju DNK radi izolacije ciljne nukleinske kiseline iz ispitka i kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) u stvarnom vremenu radi ciljanja vrlo konzerviranih sekvenci u genomu virusa hepatitisa B.

Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay namijenjeno je za pomoć u zbrinjavanju pacijenata s infekcijama HBV-om. Rezultati dobiveni s pomoću ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay moraju se tumačiti u kontekstu svih relevantnih kliničkih i laboratorijskih nalaza. Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay nije namijenjeno za uporabu kao test probira za krv ili krvne pripravke niti kao dijagnostički alat za dijagnosticiranje kliničkog statusa infekcije HBV-om.

SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Za pripremu plazme može se upotrebljavati humana puna krv prikupljena u sterilne epruvete za prikupljanje krvi koje sadrže etilendiamintetraoctenu kiselinu (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) ili kiselu citratnu dekstrozu (Acid Citrate-Dextrose, ACD) kao antikoagulacijska sredstva ili u epruvete za pripremu plazme (Plasma Preparation Tube, PPT), dok bi se serum trebao prikupljati u epruvete za prikupljanje seruma ili epruvete za odvajanje seruma (Serum Separation Tube, SST). Kako bi se pripremili za testiranje, plazma ili serum u sekundarnoj epruveti za ispitke ili frakcionirana krv u primarnoj epruveti za ispitak kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se na sustav NeuMoDx System u predviđeni nosač epruveta za ispitke. Za svaki se ispitak alikvot uzorka plazme ili seruma miješa s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 1, a sustav NeuMoDx System automatski izvodi sve korake potrebne za ekstrakciju ciljne nukleinske kiseline, pripremu izolirane DNK za PCR amplifikaciju u stvarnom vremenu i, ako su prisutni, amplifikaciju i detekciju produkata amplifikacije (segmenti ciljnih sekvenci genoma HBV-a u vrlo konzerviranoj regiji u kojoj su kodirani *X-protein* i *prekursor* proteina C). Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay uključuje kontrolu obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) DNK za pomoć s praćenjem prisutnosti potencijalno inhibirajućih tvari kao i pogrešaka sustava NeuMoDx System ili reagensa koje se mogu dogoditi tijekom postupaka ekstrakcije i amplifikacije.

Virus hepatitisa B (Hepatitis B Virus, HBV) uzročnik je infekcije jetre hepatitisom B i predstavlja globalni zdravstveni problem. Hepatitis B može uzrokovati akutni hepatitis ili može napredovati u kronično stanje koje rezultira cirozom ili rakom jetre. Rizik od razvijanja kroničnog stanja uglavnom je vezan uz dob; ako se virus prenosi prilikom poroda, vjerojatnost razvijanja kroničnog stanja jest > 90 %, dok odrasla osoba koja se zarazi ima vjerojatnost razvijanja kroničnog stanja od 2 % – 6 %.¹ HBV se prenosi kontaktom s krvi zaražene osobe, spolnim putem, dijeljenjem igala sa zaraženom osobom prilikom intravenskog ubrizgavanja droga ili vertikalnim prijenosom s majke na dijete tijekom poroda. U SAD-u živi otprilike 850.000 ljudi s infekcijom HBV-om, među kojima je većina novih infekcija uzrokovanih prijenosom spolnim putem ili ubrizgavanjem droga.² Poznato je da je u Africi i na zapadu Tihog oceana zaraženo čak 5 % populacije. Infekcija HBV-om 2015. je godine uzrokovala 885.000 smrti diljem svijeta, uglavnom od ciroze ili hepatocelularnog karcinoma.³ Postoji cjepivo koje je 95 % učinkovito u sprječavanju infekcije HBV-om, što dovodi do manjeg broja dijagnosticiranih slučajeva svake godine.⁴

Trenutačni standard skrbi za liječenje infekcije HBV-om je antivirusna terapija koja zahtijeva stalno praćenje kako bi se osigurao željeni napredak liječenja. Praćenje liječenja s pomoću ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay liječnicima može pružiti informacije potrebne za zbrinjavanje pacijenata s infekcijama HBV-om.

NAČELA POSTUPKA

Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay kombinira automatiziranu ekstrakciju DNK, amplifikaciju i detekciju izvođenjem PCR-a u stvarnom vremenu. Ispitci pune krvi prikupljaju se u epruvete s EDTA-om ili ACD-om ili PPT epruvete radi pripreme plazme i/ili u SST epruvete radi pripreme seruma. Ispitak primarne (frakcionirane) krvi ili alikvot plazme/seruma u kompatibilnoj sekundarnoj epruveti za ispitak označuje se crtičnim kodom i postavlja na sustav NeuMoDx System. Sustav NeuMoDx System automatski aspirira alikvot plazme/seruma kako bi ga pomiješao s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 1 i agensima sadržanima u pločici NeuMoDx Extraction Plate za početak obrade. Sustav NeuMoDx System automatizira i integrira ekstrakciju i koncentriranje DNK, pripremu reagensa i amplifikaciju nukleinske kiseline / detekciju ciljnih sekvenci primjenom PCR-a u stvarnom vremenu. Uključena kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) pomaže u praćenju prisutnosti inhibirajućih tvari i grešaka sustava, postupka ili reagensa. Jednom kada je ispitak postavljen na sustav NeuMoDx System, intervencija korisnika nije potrebna.

Za automatsko provođenje lize i ekstrakcije DNK te za uklanjanje inhibitora sustav NeuMoDx System služi se kombinacijom topline, litičkog enzima i ekstrakcijskih reagensa. Paramagnetske čestice hvataju oslobođene nukleinske kiseline. Čestice s vezanom nukleinskom kiselinom postavljaju se u uložak NeuMoDx Cartridge gdje se nevezani elementi ispiru s pomoću reagensa NeuMoDx Wash Reagent. Vezana DNK zatim se eluira s pomoću reagensa NeuMoDx Release Reagent. U sustavu NeuMoDx System eluirana DNK zatim se upotrebljava za rehidraciju patentiranih NeuDry™ reagensa za amplifikaciju koji sadrže sve elemente neophodne za amplifikaciju ciljnih sekvenci specifičnih za HBV i SPC1. To omogućava istovremenu amplifikaciju i detekciju ciljne sekvence i kontrolnih DNK sekvenci. Nakon rekonstitucije suhih reagensa za PCR, sustav NeuMoDx System pipetira pripremljenu mješavinu za PCR u jednu PCR komoru (po ispitku) uložka NeuMoDx Cartridge. Amplifikacija i detekcija kontrolnih i ciljnih DNK sekvenci (ako su prisutne) odvija se u PCR komori. Uložak NeuMoDx Cartridge osmišljen je da zadrži amplikon nakon PCR-a i na taj način gotovo ukloni rizik od kontaminacije nakon amplifikacije.

Amplificirane ciljne sekvence detektirane su u stvarnom vremenu s pomoću kemijskog protokola na temelju proba za hidrolizu (obično se naziva TaqMan® kemijski protokol) u kojem se upotrebljavaju fluorogene oligonukleotidne molekularne probe specifične za amplikone odgovarajućih ciljnih sekvenci. TaqMan probe sastoje se od fluorokroma kovalentno vezanog na 5' kraj oligonukleotidne probe i prigušivača na 3' kraju. Dok je proba netaknuta, fluorokrom i prigušivač nalaze se u blizini, što omogućava molekuli prigušivača da suzbija fluorescenciju koju fluorokrom emitira putem Försterov prijenos rezonantne energije. Försterova prijenosa rezonantne energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

TaqMan probe osmišljene su za sparivanje unutar regije DNK amplificirane određenim kompletom početnica. Kako DNK polimeraza Taq produžuje početnicu i sintetizira novi lanac, 5' do 3' egzonukleazna aktivnost DNK polimeraze Taq degradira probu sparenu s predložkom. Degradacijom probe oslobađa se fluorokrom i prekida se njegova blizina prigušivaču, čime se zbog FRET-a prevladava učinak prigušivanja i omogućava detekcija fluorokroma. Dobiveni fluorescentni signal detektiran u kvantitativnom PCR termocikleru sustava NeuMoDx System izravno je proporcionalan oslobođenom fluorokromu i može se korelirati s količinom prisutne ciljne sekvence.

TaqMan proba označena fluorokromom (pobuda: 490 nm i emisija: 521 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju upotrebljava se za detekciju DNK HBV-a. Za detekciju SPC1, TaqMan proba označena je drugom fluorescentnom bojom (pobuda: 535 nm i emisija: 556 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju. Softver sustava NeuMoDx System prati fluorescentni signal koji emitiraju TaqMan probe na kraju svakog ciklusa amplifikacije. Kada amplifikacija završi, softver sustava NeuMoDx System analizira podatke i izvještava konačni rezultat (POSITIVE (POZITIVNO) / NEGATIVE (NEGATIVNO) / INDETERMINATE (NEODREĐENO) / UNRESOLVED (NERAZRIJEŠENO) / NO RESULT (NEMA REZULTATA)). Ako je rezultat pozitivan i izračunata koncentracija je unutar granica kvantifikacije, softver sustava NeuMoDx System također daje kvantitativnu vrijednost koja se odnosi na uzorak.

REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Jedinica po pakiranju	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
201300	Testna traka NeuMoDx HBV Quant Test Strip <i>Suhi reagensi za PCR koji sadrže TaqMan probu i početnice specifične za HBV i SPC1.</i>	6	16	96

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni (mogu se naručiti zasebno od tvrtke NeuMoDx)

REF.	Sadržaj
100200	Pločica NeuMoDx Extraction Plate <i>Suhe paramagnetske čestice, litički enzim i kontrole obrade uzorka</i>
800100 ili 800102	Kalibratori NeuMoDx HBV Calibrators <i>Kompleti kalibratora za HBV visoke i niske razine za jednokratnu uporabu za utvrđivanje valjanosti kalibracijske krivulje</i>
900101 ili 900102	Kontrole NeuMoDx HBV External Controls <i>Kompleti pozitivnih i negativnih kontrola za jednokratnu uporabu</i>
400400	Pufer NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	Reagens NeuMoDx Wash Reagent
400200	Reagens NeuMoDx Release Reagent
100100	Uložak NeuMoDx Cartridge
235903	Vršci s filtrima (300 µl) Hamilton® CO-RE / CO-RE II
235905	Vršci s filtrima (1000 µl) Hamilton CO-RE / CO-RE II

Potrebni instrumenti

Sustav **NeuMoDx 288 Molecular System** [REF. 500100] ili sustav **NeuMoDx 96 Molecular System** [REF. 500200]

UPOZORENJA I MJERE OPREZA

- Testna traka NeuMoDx HBV Quant Test Strip namijenjena je samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx Systems.
- Ne upotrebljavajte reagense ili potrošni materijal nakon navedenog datuma isteka roka trajanja.
- Ne upotrebljavajte reagense ako je zaštitna folija potrgana ili ako je pakiranje oštećeno po dolasku.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal ili reagense ako je zaštitna vrećica otvorena ili oštećena pri dolasku.
- Valjana kalibracija testa (dobivena obradom kalibratora visoke i niske razine iz kompleta kalibratora NeuMoDx HBV Calibrators) mora biti dostupna prije dobivanja rezultata testa za kliničke uzorke.
- Vanjske kontrole NeuMoDx HBV External Controls moraju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay.
- Minimalni volumen ispitka ovisi o veličini epruvete, nosaču epruveta za ispitke i volumenu ispitka koji se obrađuje kako je navedeno u nastavku. Volumen manji od navedenog minimuma može rezultirati pogreškom „Quantity Not Sufficient” (Nedovoljna količina).
- Uporaba ispitaka koji su se čuvali pri neprikladnim temperaturama ili dulje od navedenog vremena pohrane može dati nevažne ili pogrešne rezultate.
- Izbjegavajte kontaminaciju svih reagensa i potrošnih materijala mikroorganizmima i deoksiribonukleazama (DNaza). Prilikom uporabe sekundarnih epruveta preporučuje se uporaba sterilnih jednokratnih pipeta za prijenos bez DNaze. Za svaki ispitak upotrebljavajte novu pipetu.
- Kako biste izbjegli kontaminaciju, ne rukujte uloškom NeuMoDx Cartridge i ne rastavljajte ga nakon amplifikacije. Nemojte vaditi uloške NeuMoDx Cartridges iz spremnika za biološki opasan otpad (NeuMoDx 288 Molecular System) ili koša za biološki otpad (NeuMoDx 96 Molecular System) ni u kojem slučaju. Uložak NeuMoDx Cartridge osmišljen je za sprječavanje kontaminacije.
- U slučajevima kada se u laboratoriju provode PCR testovi na otvorenim epruvetama, potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip, dodatnog potrošnog materijala i reagensa potrebnih za testiranje, osobne zaštitne opreme poput rukavica i laboratorijskih kuta te sustava NeuMoDx System.
- Pri rukovanju reagensima i potrošnim materijalom NeuMoDx potrebno je nositi čiste nitrilne rukavice bez pudera. Pazite da ne dodirujete gornju površinu uloška NeuMoDx Cartridge, površinu folije testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip i pločice NeuMoDx Extraction Plate ili gornju površinu pufera NeuMoDx Lysis Buffer 1; pri rukovanju potrošnim materijalom i reagensima smiju se dodirivati samo bočne površine.
- Sigurnosno-tehnički listovi (Safety Data Sheets, SDS) dostupni su (prema potrebi) za svaki reagens na www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Nakon izvođenja testa temeljito operite ruke.
- Ne pipetirajte ustima. Ne pušite, ne konzumirajte hranu i piće u područjima u kojima se rukuje ispitcima ili reagensima.
- Ispitcima uvijek rukujte kao da su infektivni te u skladu sa sigurnim laboratorijskim postupcima poput onih opisanih u *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁵ i dokumentu M29-A4 instituta CLSI.⁶
- Odložite nekorištene reagense i otpad u skladu s državnim, saveznim, pokrajinskim i lokalnim propisima.
- Nije za ponovnu uporabu.

POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

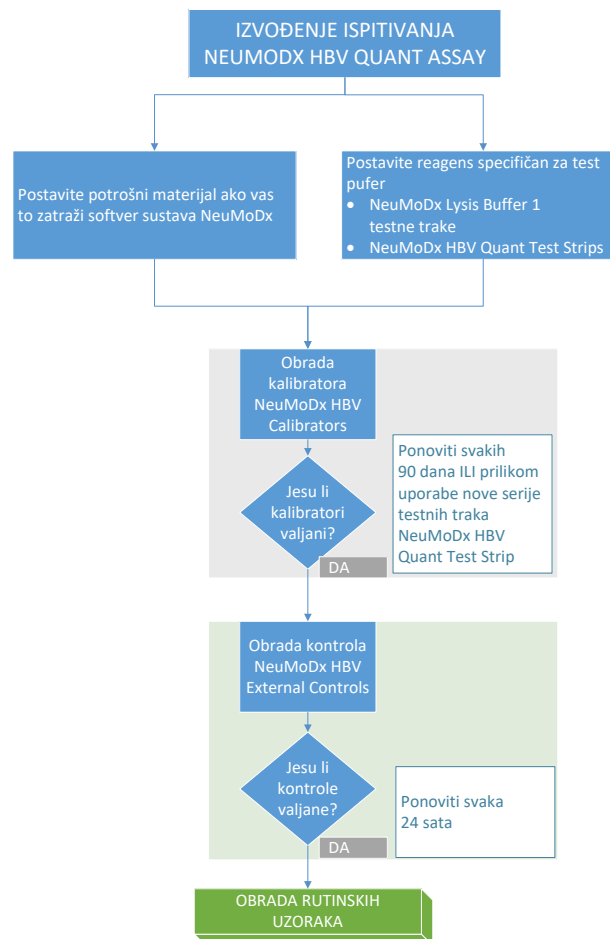
- Testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strips stabilne su u primarnom pakiranju do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci proizvoda kada se čuvaju na temperaturi od 4 do 28 °C.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal i reagense nakon datuma isteka roka trajanja.
- Ne upotrebljavajte bilo koji proizvod za testiranje ako je primarno ili sekundarno pakiranje vidljivo oštećeno.
- Nemojte ponovno postavljati nikakve proizvode za testiranje koji su prethodno bili postavljeni na drugi sustav NeuMoDx System.
- Nakon postavljanja testna traka NeuMoDx HBV Quant Test Strip može ostati na sustavu NeuMoDx System 62 dana. Softver prati preostali uporabni vijek postavljenih testnih traka i obavještava korisnika u stvarnom vremenu. Sustav će zatražiti uklanjanje testne trake koja se upotrebljava dulje od dopuštenog razdoblja.

PRIKUPLJANJE, PRIJEVOZ I POHRANA ISPITAKA

1. Rukujte svim ispitcima, kalibratorima i kontrolama kao da mogu prenijeti infektivne agense.
2. Nemojte zamrzavati punu krv ni bilo kakve ispitke pohranjene u primarnim epruvetama.
3. Za pripremu ispitaka plazme punu krv treba prikupiti u sterilne epruvete uz primjenu antikoagulansa EDTA ili ACD. Slijedite upute proizvođača epruvete za prikupljanje ispitaka o pripremi i pohrani.
4. Za pripremu ispitaka seruma punu krv treba prikupiti u SST epruvete. Slijedite upute proizvođača epruvete za prikupljanje ispitaka o pripremi i pohrani.

5. Ispitci se mogu testirati u primarnim epruветama za prikupljanje ili sekundarnim epruветama za ispitke. Preporučeno za testiranje primarnih epruвета:
 - a. Ispitci plazme: epruвета BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD #368589) ili epruвета BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
 - b. Ispitci seruma: epruвета BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) ili epruвета BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
6. Pripremljeni ispitci mogu biti pohranjeni na sustavu NeuMoDx System do 8 sati prije obrade za plazmu i do 24 sata prije obrade za serum. Ako je potrebno dodatno vrijeme pohrane, preporučuje se stavljanje ispitaka u hladnjak ili zamrzavanje u obliku sekundarnih alikvota.
7. Pripremljeni ispitci do testiranja bi trebali biti pohranjeni na temperaturi od 2 do 8 °C najviše 7 dana i na sobnoj temperaturi najviše 8 sati za plazmu i 24 sata za serum.
8. Pripremljeni ispitci mogu se pohraniti na temperaturi ≤ -20 °C do 4 tjedna (serum) ili 6 mjeseci (plazma) prije obrade; zamrznuti ispitci ne bi trebali proći više od 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije uporabe za plazmu i više od 4 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije uporabe za serum.
 - a. Ako su uzorci zamrznuti, ostavite ih da se u potpunosti odmrznu dok ne dosegnu sobnu temperaturu (15 – 30 °C); promiješajte na vorteks miješalici za dobivanje ravnomjerno raspodijeljenog uzorka.
 - b. Nakon odmrzavanja uzoraka testiranje treba provesti u roku od 24 sati.
 - c. Zamrzavanje plazme/seruma u primarnim epruветama za prikupljanje se ne preporučuje.
9. Ako se ispitci otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.
10. Jasno označite ispitke i naznačite da su ispitci za testiranje na HBV.
11. Nastavite s odjeljkom *Priprema testa*.

Sažetak sveukupnog postupka izvođenja ispitivanja NeuMoDxs HBV Quant Assay prikazan je u nastavku na slici 1.



Slika 1: Tijek rada izvođenja ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay

UPUTE ZA UPOTREBU

Priprema za test

Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay može se izvoditi izravno iz primarnih epruveta za prikupljanje krvi ili iz alikvota ispitaka u sekundarnim epruvetama. Obrada se može vršiti primjenom jednog od dvaju tijekova rada obrade volumena ispitaka – tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl ili tijekom rada obrade za volumen ispitka od 200 µl. Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom za ispitak na epruvetu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System.

- Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom za ispitak na epruvetu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System. Primarna epruveta za prikupljanje krvi može se označiti i postaviti izravno na nosač epruveta za ispitke za 32 epruvete nakon centrifugiranja prema uputama proizvođača. Također, alikvot plazme/seruma može se prenijeti u sekundarnu epruvetu za obradu na sustavu NeuMoDx System.
- Ako ispitak testirate u primarnoj epruveti za prikupljanje, postavite epruvetu označenu crtičnim kodom u nosač epruveta za ispitke i pobrinite se da uklonite čep prije postavljanja na sustav NeuMoDx System. Minimalni volumeni **iznad** sloja gela / leukocita i trombocita definirani su u nastavku i bit će zadovoljeni ako se ispitci prikupe i obrade u skladu s uputama proizvođača epruveta. Radni učinak nije zajamčen za ispitke koji su prikupljeni nepravilno.

Vrsta epruvete	Minimalni potreban volumen ispitka	
	Tijek rada za 550 µl	Tijek rada za 200 µl
SST epruveta – 3,5 ml	1550 µl	1200 µl
PPT/SST epruveta – 5,0 ml	1800 µl	1450 µl
PPT/SST epruveta – 8,5 ml	2500 µl	2200 µl
K ₂ EDTA/serum – 4,0 ml	1050 µl	700 µl
K ₂ EDTA/serum – 6,0 ml	1250 µl	900 µl
K ₂ EDTA/serum – 10,0 ml	1600 µl	1250 µl

- Ako upotrebljavate sekundarnu epruvetu, prenesite alikvot plazme/seruma u epruvetu za ispitak s crtičnim kodom kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System u skladu s volumenima definiranim u nastavku:

Nosač epruvete za ispitak	Veličina epruvete	Minimalni potreban volumen ispitka	
		Tijek rada za 550 µl	Tijek rada za 200 µl
32-Tube Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke za 32 epruvete)	promjer 11 – 14 mm, visina 60 – 120 mm	700 µl	400 µl
24-Tube Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke za 24 epruvete)	promjer 14,5 – 18 mm, visina 60 – 120 mm	1100 µl	800 µl
Low Volume Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke malog volumena)	epruveta od 1,5 ml za mikrocentrifugu sa stožastim dnom	650 µl	300 µl

Rad sustava NeuMoDx Systems

Detaljnije upute potražite u korisničkim priručnicima za sustave NeuMoDx 288 i 96 Molecular System (br. dijelova 40600108 i 40600317)

- Učitajte nalog za test u sustav NeuMoDx System prema željenoj vrsti tijeka rada za određeni volumen obrade ispitka i željenoj vrsti epruvete za ispitak:
 - volumen ispitka od 550 µl testira se definiranjem vrste ispitka kao „**Plasma**” (Plazma) ili „**Serum**”
 - volumen ispitka od 200 µl testira se definiranjem vrste ispitka kao „**Plasma2**” (Plazma2) ili „**Serum2**”
 - Ako nije definirano u nalogu za test, prema zadanim se postavkama upotrebljava vrsta ispitka **Plasma** (Plazma) u epruveti **Secondary Tube** (Sekundarna epruveta).
- Popunite jedan ili više nosača NeuMoDx System Test Strip carrier(s) testnim trakama NeuMoDx HBV Quant Test Strip(s) i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač/e testnih traka u sustav NeuMoDx System.

3. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, u nosače potrošnog materijala sustava NeuMoDx System dodajte potreban potrošni materijal i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač/e u sustav NeuMoDx System.
4. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, zamijenite reagense NeuMoDx Wash Reagent i NeuMoDx Release Reagent te prema potrebi ispraznite otpad od ispiranja, spremnik za biološki opasan otpad (samo za sustav NeuMoDx 288 Molecular System), koš za otpad za vrške (samo za sustav NeuMoDx 96 Molecular System) ili koš za biološki otpad (samo za sustav NeuMoDx 96 Molecular System).
5. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, prema potrebi obradite kalibratore NeuMoDx HBV Calibrators i/ili kontrole NeuMoDx HBV External Controls. Dodatne informacije o kalibratorima i kontrolama možete pronaći u odjeljku *Obrada rezultata*.
6. Postavite epruvetu/e s ispitkom/kalibratorom/kontrolom u nosač epruveta za ispitke i pobrinite se da uklonite čepove sa svih epruveta.
7. Postavite nosač(e) epruveta za ispitke na policu za automatsko postavljanje i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač(e) u sustav NeuMoDx System. To će pokrenuti obradu postavljenih ispitaka za identificirane testove ako u sustavu postoji valjani nalog za test.

OGRANIČENJA

1. Testna traka NeuMoDx HBV Quant Test Strip može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx Systems.
2. Radni učinak testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip utvrđen je za ispitke plazme pripremljene s antikoagulansima EDTA/ACD ili ispitke seruma pripremljene u epruvetama za odvajanje seruma. Uporaba testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip s drugim izvorima nije procijenjena i radne značajke za ostale vrste ispitaka nisu poznate.
3. Radni učinak testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip utvrđen je za testiranje primarnih epruveta s pomoću epruveta BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube i BD Vacutainer SST Tube.
4. Malo povećanje granice detekcije i donje granice kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay zabilježeno je tijekom primjene tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl.
5. Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay upotrebljava se isključivo u svrhe kvantitativnog praćenja. Nije namijenjeno za primjenu u svrhu kvalitativnog otkrivanja.
6. Ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay ne smije se upotrebljavati s uzorcima heparinizirane humane krvi.
7. Budući da detekcija virusa HBV ovisi o broju čestica ciljne sekvence DNK prisutnih u uzorku, pouzdani rezultati ovise o propisnom prikupljanju, rukovanju i pohrani ispitaka.
8. Kalibratori NeuMoDx HBV Calibrators i kontrole NeuMoDx HBV External Controls moraju se obraditi prema preporukama na uputama proizvođača kada to zatraži softver sustava NeuMoDx System prije obrade rutinskih kliničkih uzoraka.
9. Pogrešni rezultati mogu se pojaviti zbog nepropisnog prikupljanja, rukovanja i pohrane ispitaka, tehničke pogreške ili pogrešne identifikacije epruvete za ispitke. Dodatno, lažno negativni rezultati mogu se javiti jer je broj virusnih čestica u uzorku niži od granice detekcije ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay.
10. Rad na sustavu NeuMoDx System ograničen je na osoblje obučeno za uporabu sustava NeuMoDx System.
11. Ako ne dođe do amplifikacije ciljne sekvence HBV-a i ciljne sekvence SPC1, prijavljuje se nevažeci rezultat (Indeterminate (Neodređeno), No Result (Nema rezultata) ili Unresolved (Nerazriješeno)) te je potrebno ponoviti test.
12. Ako ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay ima rezultat Positive (Pozitivno), ali je vrijednost kvantifikacije izvan granica kvantifikacije, sustav NeuMoDx System prijavit će je li detektirani HBV bio *ispod* donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ili *iznad* gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
13. U slučaju da je detektirani HBV *ispod* LLoQ-a, ispitivanje se može (po želji) ponoviti s drugim alikvotom ispitka.
14. U slučaju da je detektirani HBV *iznad* ULoQ-a, ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay može se ponoviti s razrijeđenim alikvotom originalnog ispitka. Preporučuje se razrjeđenje u omjeru 1:1000 plazmom negativnom na HBV ili diluansom Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Koncentracija originalnog ispitka može se izračunati na sljedeći način:

$$\text{koncentracija originalnog ispitka} = \log_{10}(\text{faktor razrjeđivanja}) + \text{prijavljena koncentracija razrijeđenog uzorka}$$
15. Povremena prisutnost inhibitora PCR-a u plazmi može uzrokovati kvantifikacijsku pogrešku sustava. Ako do toga dođe, preporučuje se ponoviti test s istim ispitkom razrijeđenim diluansom Basematrix u omjeru 1:10 ili 1:100.
16. Pozitivan rezultat ne naznačava nužno prisutnost vijabilnih organizama. Međutim, pozitivan rezultat upućuje na vjerojatnu prisutnost DNK virusa hepatitisa B.
17. Delecije ili mutacije u konzerviranim regijama koje su ciljane ispitivanjem NeuMoDx HBV Quant Assay mogu utjecati na detekciju ili mogu dovesti do pogrešnih rezultata kada se upotrebljava testna traka NeuMoDx HBV Quant Test Strip.
18. Rezultati ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay trebaju se upotrebljavati kao dodatak kliničkim opažanjima i ostalim informacijama koje su liječniku dostupne; ispitivanje nije namijenjeno dijagnostičiranju infekcije.
19. Preporučuje se dobra laboratorijska praksa, uključujući mijenjanje rukavica između rukovanja ispitcima pacijenata, kako bi se izbjegla kontaminacija.

OBRADA REZULTATA

Dostupni rezultati mogu se pregledavati ili ispisivati s kartice „Results“ (Rezultati) u prozoru Results (Rezultati) na zaslonu osjetljivom na dodir sustava NeuMoDx System. Rezultate ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay automatski generira softver sustava NeuMoDx System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay (HBV Assay Definition File, HBV ADF). Rezultat se može prijaviti kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom HBV-a, Positive (Pozitivno) iznad gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), Positive (Pozitivno) ispod donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), Indeterminate (IND) (Neodređeno), Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ili No Result (NR) (Nema rezultata) na temelju statusa amplifikacije ciljne sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultati se prijavljuju na temelju algoritma odlučivanja u ADF-u, koji je sažet u nastavku u *tablici 1*.

Tablica 1: Sažetak algoritma odlučivanja ispitivanja HBV Quant Assay

REZULTAT	Ciljna sekvenca HBV-a	Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1)	Tumačenje rezultata
Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom	Amplified (Amplificirano) $0,9 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 550 μl) $1,4 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 200 μl)	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK HBV-a detektiran unutar kvantitativnog raspona
Positive (Pozitivno), iznad ULoQ-a	Amplified (Amplificirano) $[\text{HBV}] > 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK HBV-a detektiran iznad kvantitativnog raspona
Positive (Pozitivno), ispod LLoQ-a	Amplified (Amplificirano) $[\text{HBV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 550 μl) $[\text{HBV}] < 1,4 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 200 μl)	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK HBV-a detektiran ispod kvantitativnog raspona
Negative (Negativno)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	DNK HBV-a nije detektiran
Indeterminate (Neodređeno)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka završena)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeći; ponovno testirajte uzorak†
No Result (Nema rezultata)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka prekinuta)		Obrada uzorka je prekinuta; ponovno testirajte uzorak†
Unresolved (Nerazriješeno)	Not Amplified (Nije amplificirano), No System Error Detected (Nema uočenih pogrešaka sustava)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeći; ponovno testirajte uzorak†

* Oznaka No Result (Nema rezultata) prijavljuje se samo u inačicama softvera sustava NeuMoDx System 1.8 i novijima

†Sustav NeuMoDx System opremljen je automatskom opcijom Rerun (Ponovna obrada) / Repeat (Ponavlanje testa) koju krajnji korisnik može odabrati kako bi osigurao da se rezultat IND/UNR/NR automatski ponovno obradi kako bi se minimizirala kašnjenja u izvještavanju rezultata.

Izračun testa

- Za uzorke unutar raspona kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay koncentracija DNK HBV-a u uzorcima računa se s pomoću pohranjene standardne krivulje u kombinaciji s koeficijentom kalibracije i volumenom ispitka.
 - Koeficijent kalibracije izračunava se na temelju rezultata dobivenih kalibratorima NeuMoDx HBV Calibrators koji su obrađeni kako bi se utvrdila valjanost standardne krivulje za danu seriju testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip na određenom sustavu NeuMoDx System.
 - Koeficijent kalibracije uključen je u konačno određivanje koncentracije DNK HBV-a.
 - Softver sustava NeuMoDx uzima u obzir ulazni volumen ispitka prilikom određivanja koncentracije DNK HBV-a po ml ispitka.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay izraženi su u $\log_{10} \text{ IU/ml}$.
- Dobivena kvantifikacija nepoznatih uzoraka sljediva je do 4. Međunarodnog standarda za HBV SZO-a.

Kalibracija testa

Valjana kalibracija na temelju standardne krivulje neophodna je za kvantifikaciju DNK HBV-a u ispitcima. Za dobivanje valjanih rezultata kalibracija testa mora se obaviti s pomoću vanjskih kalibratora koje isporučuje tvrtka NeuMoDx Molecular, Inc.

kalibratori

1. Komplet kalibratora NeuMoDx HBV calibrators treba se obraditi sa svakom novom serijom testnih traka NeuMoDx HBV Quant Test Strips ako se nova datoteka definicije ispitivanja HBV Quant Assay učita na sustav NeuMoDx System ili ako je trenutčno postavljeni komplet kalibratora premašio razdoblje valjanosti (trenutačno postavljeno na 90 dana) ili ako je softver sustava NeuMoDx System izmijenjen.
2. Softver sustava NeuMoDx System obavijestit će korisnika kada treba obraditi kalibratore. Nova serija testnih traka ne može se upotrebljavati dok kalibratori nisu uspješno obrađeni.
3. Valjanost kalibracije određuje se na sljedeći način:
 - a) Komplet koji sadrži dva kalibratora – jedan (1) visoke i jedan (1) niske razine – treba obraditi kako bi se utvrdila valjanost.
 - b) Najmanje dva (2) od tri (3) ponavljanja moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara. Nominalna ciljna vrijednost kalibratora niske razine iznosi $3,7 \log_{10}$ IU/ml, a nominalna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi $5,7 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Koeficijent kalibracije izračunat je kako bi se ispravila očekivana varijacija između serija testnih traka. Taj koeficijent kalibracije upotrebljava se za određivanje konačne koncentracije virusa HBV.
4. Ako provjera valjanosti nije uspjela za jedan ili oba kalibratora, ponovite obradu neuspjelog/ih kalibratora primjenom nove bočice. U slučaju neuspjele provjere valjanosti jednog kalibratora, moguće je ponoviti obradu samo neuspjelog kalibratora jer sustav od korisnika ne zahtijeva ponovnu obradu oba kalibratora.
5. Ako provjera valjanosti kalibratora uzastopno ne uspije, obratite se tvrtki NeuMoDx Molecular, Inc.

Kontrola kvalitete

Lokalni propisi obično navode da je laboratorij odgovoran za postupke kontrole kojima se prati točnost i preciznost cijelog analitičkog postupka te da mora utvrditi broj, vrstu i učestalost primjene materijala za kontrolu testa s pomoću provjerenih specifikacija radnog učinka za nemodificirani, odobreni sustav testa.

Vanjske kontrole

1. Pozitivne i negativne vanjske kontrole trebaju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay. Ako nema rezultata kompleta valjanih vanjskih kontrola, softver sustava NeuMoDx System od korisnika će zatražiti da obradi kontrole prije nego što se mogu iskazati rezultati za uzorak.
2. Valjanost vanjskih kontrola procijenit će se na sustavu NeuMoDx System na temelju očekivanih rezultata. Pozitivna kontrola trebala bi dati rezultat Positive (Pozitivno) na HBV, a negativna kontrola trebala bi dati rezultat Negative (Negativno) na HBV.
3. U slučaju nepodudarnih rezultata vanjskih kontrola treba postupiti na sljedeći način:
 - a) Rezultat testiranja Positive (Pozitivno) prijavljen za negativan kontrolni uzorak ukazuje na problem kontaminacije ispitka.
 - b) Rezultat testiranja Negative (Negativno) prijavljen za pozitivan kontrolni uzorak može ukazivati na problem povezan s reagensima ili instrumentom.
 - c) U bilo kojem od gore navedenih slučajeva ili u slučaju rezultata Indeterminate (IND) (Neodređeno) ili No Result (NR) (Nema rezultata) ponovite obradu kontrola NeuMoDx HBV External Controls sa svježim bočicama kontrole/a čije testiranje valjanosti nije uspjelo.
 - d) Ako se za pozitivnu kontrolu NeuMoDx HBV External Control i dalje dobiva rezultat Negative (Negativno), obratite se tehničkoj službi tvrtke NeuMoDx.
 - e) Ako se za negativnu kontrolu NeuMoDx HBV External Control i dalje dobiva rezultat Positive (Pozitivno), pokušajte ukloniti sve izvore potencijalne kontaminacije, što uključuje zamjenu svih reagensa, prije nego što se obratite tehničkoj službi tvrtke NeuMoDx.

Kontrole obrade uzorka (unutarnje)

Egzogena kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) uključena je u pločicu NeuMoDx Extraction Plate i podvrgnuta cijelom postupku ekstrakcije nukleinske kiseline i PCR amplifikacije u stvarnom vremenu sa svakim uzorkom. Početnice i proba specifične za SPC1 također su uključene u svaku testnu traku NeuMoDx HBV Quant Test Strip što omogućuje detekciju SPC1 s ciljnom sekvencom DNK HBV-a (ako je prisutna) putem multipleksnog PCR-a. Detekcija amplifikacije SPC1 softveru sustava NeuMoDx System omogućava praćenje učinkovitosti postupaka ekstrakcije DNK i PCR amplifikacije.

Nevažeći rezultati

Ako ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat nakon završetka obrade uzorka, on se prijavljuje kao Indeterminate (IND) (Neodređeno), No Result (NR) (Nema rezultata) ili Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ovisno o vrsti pogreške koja se pojavila.

Rezultat IND (Neodređeno) prijavljuje se ako se tijekom obrade uzorka detektira pogreška sustava NeuMoDx System. U slučaju da je prijavljen rezultat IND (Neodređeno), preporučuje se ponovno testiranje.

Rezultat UNR (Nerazriješeno) prijavljuje se ako nije detektirana valjana amplifikacija DNK HBV-a ili SPC1 u slučaju nepostojanja pogrešaka sustava, što ukazuje na moguću pogrešku reagensa ili na prisutnost inhibitora. U slučaju da je prijavljen rezultat UNR (Nerazriješeno), kao prvi korak preporučuje se ponovno testiranje. U slučaju da ponovno testiranje ne uspije, može se upotrijebiti razrjeđenje ispitka kako bi se ublažili učinci inhibicije uzorka.

Ako ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat, a obrada uzorka se prekine prije završetka, on se prijavljuje kao No Result (NR) (Nema rezultata). U slučaju da je prijavljen rezultat NR (Nema rezultata), preporučuje se ponovno testiranje.

RADNE ZNAČAJKE

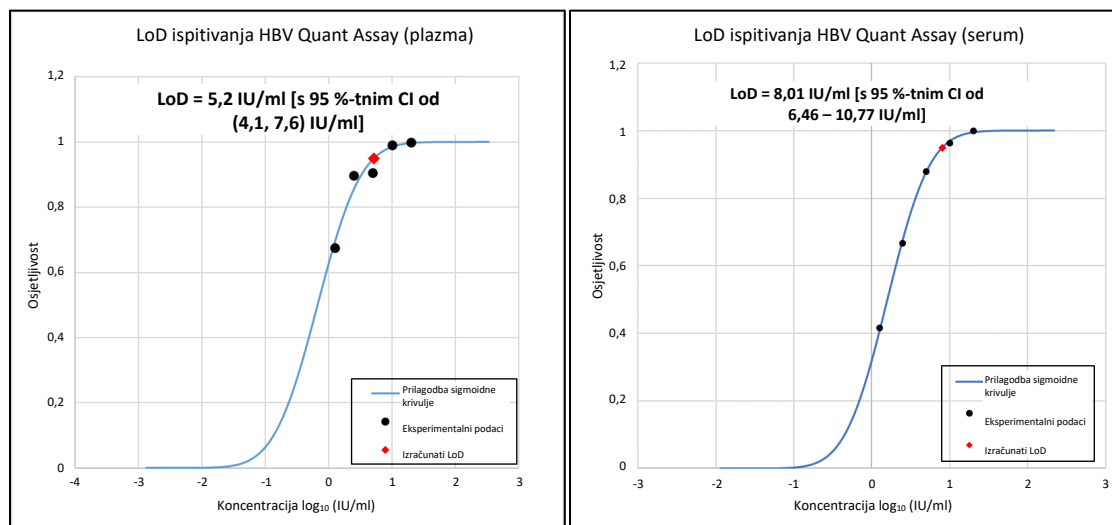
Analitička osjetljivost – granica detekcije primjenom standarda SZO-a

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay utvrđena je testiranjem negativnih ispitaka i serije razrjeđenja 4. Međunarodnog standarda SZO-a u probranoj negativnoj humanoj plazmi i serumu za određivanje granice detekcije (Limit of Detection, LoD) na sustavima NeuMoDx Systems. LoD je definirana kao najniža ciljna razina detektirana pri stopi od 95 % određena Probit analizom. Ispitivanja su provedena tijekom 3 dana na više sustava NeuMoDx Systems s više serija reagensa NeuMoDx. Dodatno ispitivanje provedeno je radi potvrđivanja granice detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl. Stope detekcije iz obaju ispitivanja prikazane su u *tablici 2*.

Tablica 2: Pozitivne stope detekcije za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay

	Ciljna koncentracija [IU/ml]	Ciljna koncentracija [log ₁₀ IU/ml]	PLAZMA			SERUM		
			Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
550 µl	20	1,30	108	108	100 %	107	107	100 %
	10	1	108	107	99 %	108	104	96 %
	5	0,70	108	98	91 %	108	95	88 %
	2,5	0,40	108	97	90 %	108	72	67 %
	1,25	0,10	108	73	68 %	108	44	42 %
	NEG.	N/P	108	0	0 %	107	0	0 %
200 µl	25	1,40	43	43	100 %	44	44	100 %

Utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay za genotip A HBV-a (4. Međunarodni standard SZO-a) u plazmi iznosi 5,2 IU/ml (95 %-tni CI 4,1 – 7,6 IU/ml) [(0,72 log₁₀ IU/ml) (95 %-tni CI 0,61 – 0,88 log₁₀ IU/ml)] u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl (*slika 2*). Utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay za ispitke serum iznosi 8,0 IU/ml (95 %-tni CI 6,5 – 10,8 IU/ml) [(0,9 log₁₀ IU/ml) (95 %-tni CI 0,8 – 1,0 log₁₀ IU/ml)] u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl (*slika 2*).



Slika 2: Probit analiza upotrebljava se za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay, plazma (lijevo) i serum (desno)

Analička osjetljivost – granica kvantifikacije – donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) primjenom standarda SZO-a
Donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) definira se kao donja ciljna razina pri kojoj se postiže stopa detekcije > 95 % I TAE ≤ 1,0. Kako bi se odredio LLoQ, ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) izračunata je za svaku ciljnu razinu HBV-a za koju je dobivena detekcija > 95 % u sklopu izračuna LoD-a. TAE se definira na sljedeći način:

$$\text{TAE} = \text{odstupanje} + 2 \cdot \text{SD} \quad [\text{Westgardova statistička pravila}]$$

Odstupanje je apsolutna vrijednost razlike između prosječne izračunate koncentracije i očekivane koncentracije. SD se odnosi na standardnu devijaciju od vrijednosti kvantificirane za uzorak.

Objedinjeni rezultati za 5 razina ispitaka s virusom HBV koji su se upotrebljavali u ispitivanju LLoQ-a uz primjenu 4. Međunarodnog standarda SZO-a prikazani su u *tablici 3*. Donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) za 4. Međunarodni standard SZO-a u plazmi uz primjenu ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay (tijek rada za volumen ispitka od 550 µl) iznosi 5,5 IU/ml (0,74 log₁₀ IU/ml). Odvojeno ispitivanje provedeno je kako bi se potvrdio LLoQ u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl i rezultati su ukazali na LLoQ od 25 IU/ml, što je prikazano i u *tablici 3*.

Utvrđeno je da donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay za ispitke seruma iznosi 6,0 IU/ml u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl te 25 IU/ml u slučaju primjene tijekom rada za nizak volumen ispitka (200 µl), kao što je prikazano u *tablici 3*.

Tablica 3: LLoQ ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay s odstupanjem i TAE

	Ciljna konc. [IU/ml]	Ciljna konc. [log ₁₀ IU/ml]	Plazma					Serum				
			Prosječna konc. [log ₁₀ IU/ml]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE	Prosječna konc. [log ₁₀ IU/ml]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE
550 µl	20	1,30	1,29	100	0,23	0,16	0,63	1,43	100	0,20	0,13	0,52
	10	1,00	1,07	99	0,25	0,20	0,71	1,21	96	0,24	0,21	0,69
	5	0,70	0,89	91	0,35	0,34	1,04	1,00	88	0,40	0,30	1,09
	2,5	0,40	0,75	90	0,44	0,51	1,39	0,96	67	0,44	0,56	1,46
	1,25	0,10	0,73	68	0,41	0,68	1,50	0,95	42	0,38	0,85	1,61
200 µl	25	1,40	1,61	100	0,35	0,21	0,91	1,81	100	0,18	0,41	0,78

Analička osjetljivost – LoD i LLoQ za sve genotipove HBV-a

LoD je prvenstveno utvrđen za genotip A (4. međunarodni standard SZO-a), a zatim je provedeno dodatno testiranje utvrđenog LoD-a korištenjem svakog od preostalih 7 genotipova. Trideset i šest (36) ponavljanja na razinama koje odgovaraju 2 X, 1 X i 0,5 X gornje granice LoD-a (~7 IU/ml) uz 95 %-tni CI testirana su s pomoću ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay korištenjem plazme i primjenom tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl. Pozitivni postotak svakog genotipa na svakoj od testiranih razina unesen je u tablicu te se upotrebljavao za izračunavanje LoD-a s pomoću probit analize.

Izračunata je i ukupna analitička pogreška pri testiranim razinama. Najniža razina s 95 %-tnom pozitivnom detekcijom i izračunatim TAE od ≤ 1,0 smatrala se LLoQ-om genotipa. Kod raznih genotipova utvrđeno je da granica detekcije ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay za ispitke plazme u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl iznosi 6,2 IU/ml (0,79 log₁₀ IU/ml) te da LLoQ iznosi 7,6 IU/ml (0,88 log₁₀ IU/ml), kako je prikazano u *tablici 4*.

Tablica 4. Genotipovi HBV-a testirani u plazmi primjenom tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl

GENOTIP	LoD [IU/ml]	LLoQ [IU/ml]
Genotip A	5,2	5,2
Genotip B	6,2	6,2
Genotip C	3,5	6,2
Genotip D	5,2	5,7
Genotip E	3,5	3,5
Genotip F	5,1	6,2
Genotip G	3,5	3,5
Genotip H	5,2	7,6

Na temelju rezultata ovih ispitivanja, NeuMoDx je utvrdio **LoD i LLoQ od 25 IU/ml (1,4 log₁₀ IU/ml)** za ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay u **plazmi i serumu** u slučaju primjene tijekom rada za **volumen ispitka od 200 µl**.

NeuMoDx je utvrdio **LoD i LLoQ od 8,0 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml)** za ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay u **plazmi i serumu** u slučaju primjene tijekom rada za **volumen ispitka od 550 µl**.

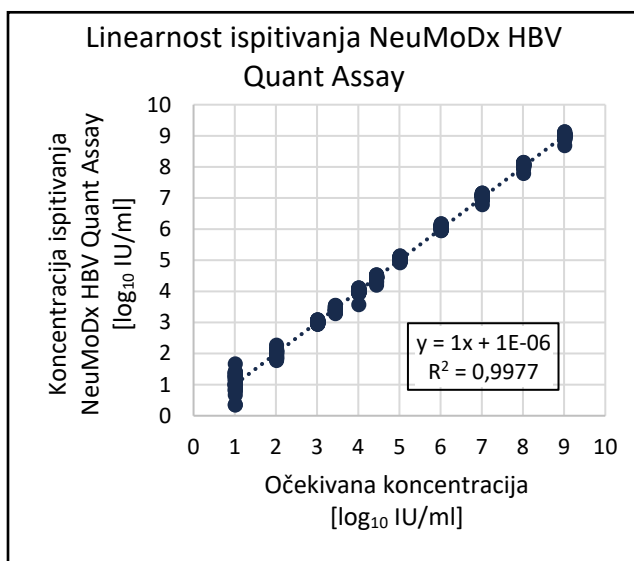
Analitička osjetljivost – linearnost i određivanje gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearnost i gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay utvrđene su iz plazme pripremom serije razrjeđenja s pomoću visoko pozitivnog kliničkog uzorka s HBV-om (Access Biologicals, Vista, CA) s utvrđenom sljedivosti do 4. Međunarodnog standarda SZO-a. Panel s 11 sastavnica pripremljen je u poolu plazme negativne na HBV za izradu panela testiranja koji obuhvaća raspon koncentracije 9,02 – 1,02 log₁₀ IU/ml. Panel testiranja obrađen je u 6 ponavljanja na svakoj razini na 2 sustava NeuMoDx Systems i u 3 serije kritičnih reagensa. Ispitivanjem NeuMoDx HBV Quant Assay dokazana je mogućnost kvantificiranja HBV-a u linearnom rasponu od 8 log₁₀ (uključujući kritične medicinske točke odlučivanja) s devijacijom od ±0,22 log₁₀ IU/ml. Nije bilo značajne koristi od uporabe regresije 2. i 3. stupnja. S pomoću podataka iz ovog ispitivanja utvrđeno je da gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) iznosi 9,02 log₁₀ IU/ml [tablica 5 i slika 3].

Tablica 5: Linearnost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay (procijenjeno s genotipom A)

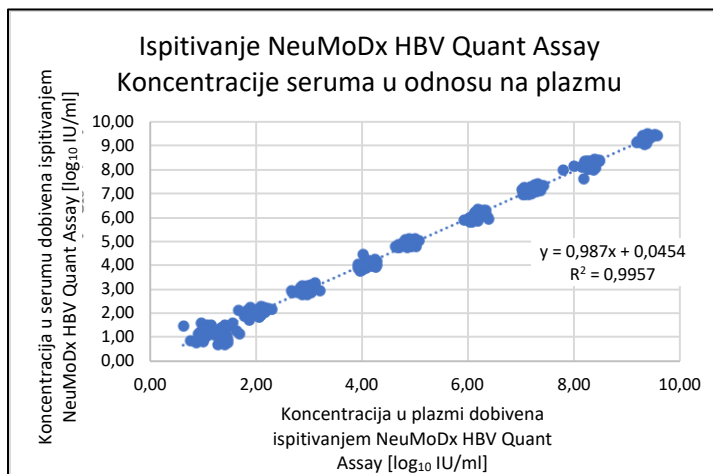
Ciljna konc. (IU/ml)	Ciljna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Srednja konc. (log ₁₀ IU/ml)	Standardna devijacija	Odstupanje	Predviđena prilagodba linearne regresije	Devijacija od prilagodbe nelinearne regresije
1,05E+09	9,02	8,99	0,08	0,06	9,02	-0,04
1,05E+08	8,02	8,05	0,07	0,05	8,02	0,03
1,05E+07	7,02	7,05	0,07	0,06	7,02	0,04
1,05E+06*	6,02	6,05	0,05	0,05	6,02	0,03
1,05E+05	5,02	5,04	0,05	0,04	5,02	0,00
2,82E+04*	4,45	4,43	0,07	0,05	4,45	-0,01
1,05E+04	4,02	3,99	0,09	0,05	4,02	-0,02
2,82E+03*	3,45	3,41	0,07	0,06	3,45	-0,03
1,05E+03	3,02	3,00	0,04	0,04	3,02	-0,03
1,05E+02	2,02	1,99	0,11	0,09	2,02	-0,01
1,05E+01	1,02	1,09	0,29	0,23	1,02	0,06

*Blizu medicinskih točaka odlučivanja



Slika 3: Linearni raspon ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay u plazmi

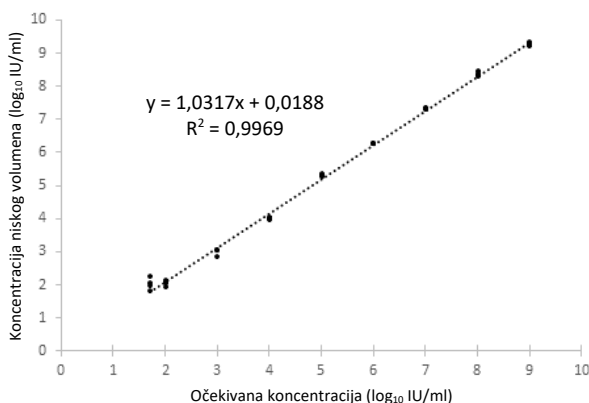
Sljedeće ispitivanje provedeno je kako bi se dokazala ekvivalentnost matrica, a analizom su s pomoću dvaju različitih modela prilagodbe regresije, uključujući alat za regresiju programa MS Excel i Passing-Bablokovu regresiju, uspoređeni kvantitativni rezultati ispitivanja NeuMoDx HBV za uzorke pripremljene u plazmi i serumu. Rezultati su pokazali veliku korelaciju predstavljenu vrijednostima nagiba i odsječka koje su bile vrlo blizu 1,00 odnosno 0,00, te vrijednosti R^2 od 0,99 (alat za regresiju programa MS Excel) ili p-vrijednosti od 0,270 (Passing-Bablokova regresija). Koncentracije ispitivanja za HBV Quant koje je prijavio sustav NeuMoDx System za matricu plazme uspoređene s odgovarajućim uzorcima seruma prikazane su na slici 4.



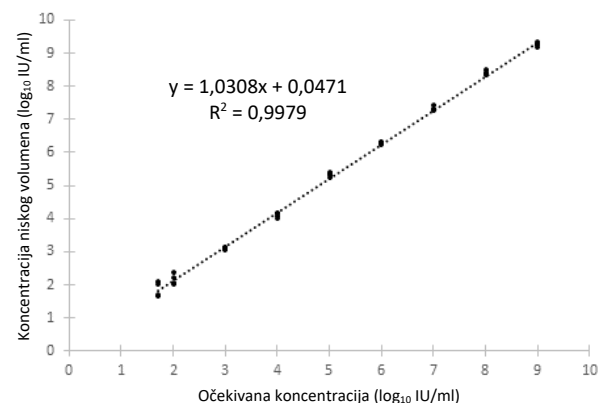
Slika 4: Linearni raspon ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay između matrica

Linearnost i gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) zatim su potvrđene za tijek rada za ispitke volumena 200 μ l rasponu od 9,31 – 1,71 \log_{10} IU/ml. Usporedbe ekvivalentnosti provedene su između koncentracija koje je prijavio softver sustava NeuMoDx za tijekom rada za volumene od 200 μ l i 550 μ l. Demingova i Passing-Bablokova regresijska analiza pokazale su odličnu korelaciju i nagib blizu vrijednosti 1 te minimalne odsječke (odstupanje) prijavljenih koncentracija i za uzorke plazme i za uzorke seruma unutar linearnog raspona. Bland-Altmanova usporedba prijavljene koncentracije za tijek rada za ispitke volumena 200 μ l u odnosu na srednju prijavljenu koncentraciju za tijekom rada za ispitke volumena 200 μ l i 550 μ l pokazala je minimalno odstupanje, pripisujući točnost algoritmu koji se upotrebljava za generiranje rezultata iz tijeka rada za volumen od 200 μ l. Osim toga, jednostavna linearna regresija kojom se uspoređuje očekivana koncentracija u odnosu na prijavljenu koncentraciju za tijek rada za volumen od 200 μ l imala je nagib blizu vrijednosti 1, pokazujući izvrsnu korelaciju [slika 5]. Ako ih se promatra zajedno, te usporedbe pokazuju točnu kvantifikaciju HBV-a unutar linearnog raspona ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 200 μ l.

A Jednostavna linearna regresija za uzorke plazme



B Jednostavna linearna regresija za uzorke seruma



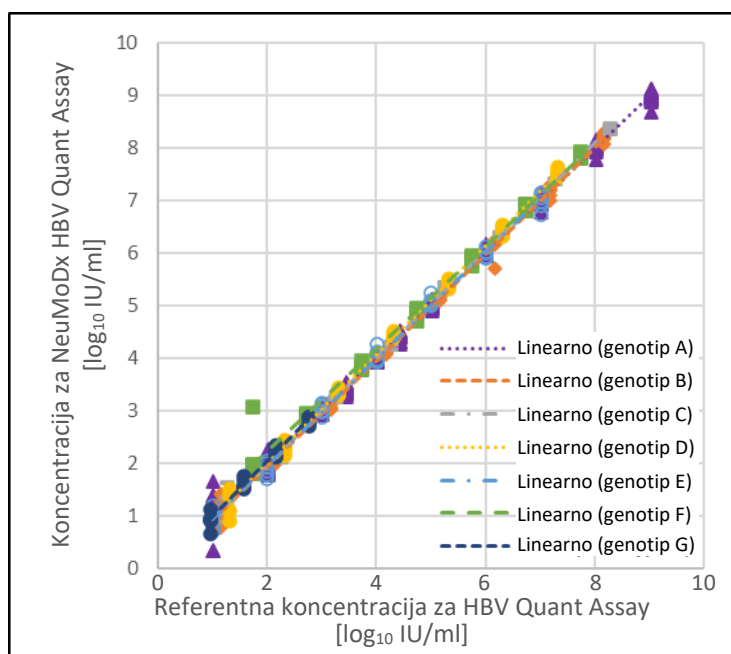
Slika 5: Linearni odnos između očekivane koncentracije i koncentracije koju je prijavio sustav NeuMoDx za tijek rada za volumen od 200 μ l u a) plazmi i b) serumu

Linearnost za genotipove

Linearnost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay na ispitku plazme za genotipove HBV-a određena je testiranjem najmanje četiriju (4) različitih koncentracija svakog genotipa HBV-a pripremljenog u poolu plazme negativne na HBV. Razine testiranih ciljnih sekvenci HBV-a korištenih u ovom ispitivanju ovisile su o koncentraciji izvornog ispitka i stoga su se razlikovale za razne genotipove. Ispitivanje je za svaki genotip provedeno u 6 ponavljanja za svaku razinu. Linearnost po HBV genotipovima prikazana je u tablici 6 i na slici 6.

Tablica 6: Linearnost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay za genotipove

Genotip	Jednadžba linearnosti y = kvantifikacija ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay x = očekivano određivanje	R ²
A	$y = 1x + 1E-06$	0,9977
B	$y = 1,0129x - 0,0964$	0,9975
C	$y = 1,0250x - 0,0898$	0,998
D	$y = 1,0379x - 0,0896$	0,9975
E	$y = 1,0182x - 0,096$	0,9956
F	$y = 0,9736x + 0,276$	0,9906
G	$y = 1,0547x - 0,0835$	0,9813


Slika 6: Linearnost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay za genotipove

Analička specifičnost i križna reaktivnost

Analička specifičnost dokazana je probirom na 32 organizama koji se mogu često pronaći u ispitcima krvi/plazme te na vrste filogenetski slične HBV-u radi utvrđivanja križne reaktivnosti. Organizmi su pripremljeni u poolovima koji su sadržavali između 4 i 6 organizama i testirani su pri visokim koncentracijama. Testirani organizmi prikazani su u *tablici 7*. Nije uočena križna reaktivnost s bilo kojim od testiranih organizama, čime je potvrđena 100 %-tna analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay.

Tablica 7: Patogeni korišteni za dokazivanje analitičke specifičnosti – križna reaktivnost

Adenovirus 2	Denga V1	Hepatitis A	HPV 16	Ilheus (ILHV)	Žuta groznica
Adenovirus 5	Denga V2	Hepatitis C	HPV 18	Influenca A	Zika virus
Banži virus	Denga V3	Humani herpes virus 6a	HSV1	Parvovirus B19	
BK virus	Denga V4	Humani herpes virus 8	HSV 2	Rubeola	
Citomegalovirus	Epstein-Barrov virus	HIV 1	HTLV 1	St. Louis encefalitis	
VZV	Virus vakcinije	HIV 2	HTLV 2	Virus Zapadnog Nila	

Interferirajuće tvari – komenzalni organizmi

Interferencija ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay procijenjena je u prisutnosti organizama koji nisu ciljani ispitivanjem primjenom istih poolova organizama kao što su oni pripremljeni za testiranje analitičke specifičnosti. Organizmi su testirani pojedinačno ili dodani u poolove od 4 – 6 organizama u probranoj plazmi negativnoj na HBV u koju su dodane kontrole za HBV u koncentraciji od 3,7 log₁₀ IU/ml. Nije uočena značajna interferencija u prisutnosti tih komenzalnih organizama, na što ukazuje minimalna devijacija kvantifikacije u odnosu na kontrolne ispitke koji ne sadrže interferirajuće agense [tablica 8].

Tablica 8: Testiranje interferencije – komenzalni organizmi

Organizmi koji nisu ciljani ispitivanjem	Prosječna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odstupanje (log ₁₀ IU/ml)
Skupina 1 [BK virus, citomegalovirus, Epstein-Barrov virus, humani herpes virus 6a, humani herpes virus 8]	3,51	0,10
Skupina 2 [adenovirus 2, adenovirus 5, denga V2, denga V3, denga V4]	3,38	0,22
Skupina 3 [parvovirus B19, HTLV 1, HTLV 2, Ilheus (ILHV), žuta groznica, Zika virus]	3,62	0,06
Skupina 4 [HPV 16, HPV 18, HSV 1, HSV 2, denga V1]	3,57	0,04
Skupina 5 [St. Louis encefalitis, VZV, virus vakcinije, virus Zapadnog Nila]	3,57	0,03
HAV	3,58	0,05
Banži virus	3,41	0,19
HIV-1	3,47	0,15
HIV-2	3,56	0,05
Rubeola	3,16	0,44
Influenca A	3,60	0,03
HCV	3,58	0,04

Interferirajuće tvari – endogene i egzogene tvari

Radni učinak testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip procijenjen je u prisutnosti uobičajenih egzogenih i endogenih interferirajućih tvari pronađenih u kliničkim ispitcima plazme s HBV-om. To je uključivalo abnormalno visoke razine komponenti krvi te uobičajene antivirusne lijekove koji su klasificirani u *tablici 9*. Svaka od endogenih i egzogenih tvari navedenih u *tablici 10* u nastavku dodana je u probranu humanu plazmu negativnu na HBV u koju je dodano $3,7 \log_{10}$ IU/ml HBV-a i njihovi su se podaci pratili radi interferencije. Osim toga, plazme pacijenata s uobičajenim stanjima bolesti povezanim s infekcijom hepatitisom B također su testirane kako bi se utvrdila potencijalna interferencija.

Tablica 9: testiranje interferencije – egzogeni agensi (klasifikacija lijekova)

Pool	Lijek	Klasifikacija
1	Zidovudin (Zidovudine, ZDV)	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Sakvinavir	Inhibitor HIV-proteaze
	Ritonavir	Inhibitor HIV-proteaze
	Klaritromicin	Antibiotik
	Interferon alfa-2a	Imunomodulator
	Interferon alfa-2b	Imunomodulator
2	Abakavir sulfat	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Amprenavir	Inhibitor proteaze
	Ribavirin	Imunomodulator
	Entekavir	Antivirusno za HBV
	Fluoksetin	SSRI antidepresiv
	Valaciklovir hidroklorid	Antivirusno
3	Tenofovidizoprosil	Antivirusno za HBV/HIV
	Lamivudin	Antivirusno za HBV/HIV
	Ganciklovir	Antivirusno za CMV
	Valganciklovir	Antivirusno za CMV
	Nevirapin	Inhibitor reverzne transkriptaze
4	Efavirenz	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Lopinavir	Inhibitor proteaze
	Enfuvirtid	Inhibitor fuzije HIV-a
	Ciprofloksacin	Antibiotik
	Paroksetin	SSRI antidepresiv
5	Adefovir (dipivoksil)	Antivirusno
	Azitromicin	Antibiotik
	Indinavir sulfat	Inhibitor HIV-proteaze
	Sertralin	SSRI antidepresiv

Tablica 10: Testiranje interferencije – egzogeni i endogeni agensi

Endogeni	Prosječna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odstupanje (log ₁₀ IU/ml)
Hemoglobin	3,50	0,20
Trigliceridi	3,51	0,09
Bilirubin	3,56	0,13
Albumin	3,51	0,17
Egzogeni (lijekovi)	Prosječna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odstupanje (log ₁₀ IU/ml)
Pool 1: zidovudin (Zidovudine, ZDV), sakvinavir, ritonavir, klaritromicin, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b	3,58	0,08
Pool 2: abakavir sulfat, amprenavir, ribavirin, entekavir, fluoksetin, valaciklovir hidroklorid	3,56	0,04
Pool 3: tenofovir dizoproksil, lamivudin, ganciklovir, valganciklovir, nevirapin	3,59	0,06
Pool 4: efavirenz, lopinavir, enfuvirtid, ciprofloksacin, paroksetin,	3,60	0,07
Pool 5: Adefovir (dipivoksil), azitromicin, indinavir sulfat, sertralin	3,56	0,19
Stanje bolesti	Prosječna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odstupanje (log ₁₀ IU/ml)
Antinuklearno protutijelo (Antinuclear Antibody, ANA)	3,61	0,10
Sistemska eritemski lupus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,63	0,10
Reumatoidni artritis (Rheumatoid Arthritis, RA)	3,57	0,09
HCV protutijela	3,58	0,07
HBV protutijela	3,64	0,11
Alkoholna ciroza	3,68	0,15
Reumatoidni faktor (Rheumatoid Factor, RF)	3,63	0,10
Nealkoholna steatohepatitis (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	3,49	0,06

Preciznost unutar laboratorija

Preciznost testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip određena je testiranjem panela s 8 sastavnica ispitaka HBV-a koji obuhvaćaju genotipove A do C s pomoću triju sustava NeuMoDx Systems u razdoblju od 12 dana. Određene su preciznosti unutar obrade, unutar dana i unutar sustava i utvrđena je sveukupna standardna devijacija od $\leq 0,22 \log_{10}$ IU/ml. Preciznost između korisnika nije određena jer korisnik ne igra značajnu ulogu u obradi uzoraka na sustavu NeuMoDx System. Rezultati preciznosti unutar laboratorija prikazani su u *tablici 11*.

Tablica 11: Rezultati ispitivanja preciznosti unutar laboratorija

SASTAVNICA PANELA	CILJNA KONC. [log ₁₀ IU/ml]	SREDNJA KONC. [log ₁₀ IU/ml]	N	Odstupanje	SD unutar obrade	SD unutar dana	SD unutar sustava	Sveukupni SD
Genotip A	7,75	7,89	36	0,14	0,06	0,07	0,07	0,07
	5,75	5,83	36	0,11	0,07	0,10	0,10	0,10
	3,75	3,70	36	0,11	0,11	0,13	0,15	0,15
	1,75	1,54	36	0,23	0,16	0,22	0,22	0,22
Genotip C	6,27	6,23	36	0,10	0,08	0,09	0,10	0,10
	4,27	4,18	36	0,08	0,08	0,10	0,10	0,10
	3,27	3,14	36	0,09	0,08	0,12	0,12	0,12
	2,27	2,08	36	0,12	0,12	0,15	0,16	0,16

Obnovljivost među serijama

Obnovljivost među serijama testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip određena je s pomoću tri različite serije ključnih reagensa – pufera NeuMoDx Lysis Buffer 1, pločice NeuMoDx Extraction Plate i testne trake NeuMoDx HBV Quant Test Strip. Panel HBV-ovih genotipova A i C s 8 sastavnica upotrebljavao se za procjenu radnog učinka. Testiranje je provedeno s pomoću tri serije reagensa na tri sustava NeuMoDx Systems tijekom 6 dana. Analizirane su varijacije unutar serija i među serijama. Maksimalno sveukupno odstupanje iznosilo je 0,12 log₁₀ IU/ml, a maksimalna sveukupna standardna devijacija (SD) iznosila je 0,24 log₁₀ IU/ml. Nije uočena značajna razlika u radnom učinku među serijama jer je kvantifikacija svih sastavnica panela bila unutar specifikacije tolerancije. Rezultati obnovljivosti među serijama prikazani su u nastavku u *tablici 12*.

Tablica 12: Rezultati ispitivanja obnovljivosti među serijama

SASTAVNICA PANELA	CILJNA KONC. [log ₁₀ IU/ml]	SREDNJA KONC. [log ₁₀ IU/ml]	N	Odstupanje	SD unutar SERIJE	SD među SERIJAMA	Sveukupno SD
Genotip A	8,02	7,99	36	0,03	0,15	0,09	0,17
	6,02	5,96	36	0,06	0,17	0,06	0,18
	4,02	3,90	36	0,12	0,14	0,09	0,17
	2,02	1,92	36	0,10	0,21	0,12	0,24
Genotip C	6,27	6,32	36	0,05	0,06	0,08	0,10
	4,27	4,31	36	0,04	0,22	0,09	0,24
	3,27	3,30	36	0,03	0,20	0,07	0,21
	2,27	2,32	36	0,05	0,13	0,13	0,18

Učinkovitost kontrole

Učinkovitost kontrole SPC1 uključene u ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay za prijavljivanje neuspjelih koraka obrade ili inhibicija koje utječu na radni učinak ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay procijenjena je s pomoću dva uobičajena genotipa HBV-a (A i C). Testirani uvjeti predstavljaju ključne neuspjele korake obrade koji bi se potencijalno mogli dogoditi tijekom obrade uzoraka i koje *možda nisu detektirali* senzori za praćenje radnog učinka sustava NeuMoDx System. Učinkovitost kontrole SPC1 procijenjena je simuliranjem takvih uvjeta. Neučinkovitosti obrade koje su imale negativan utjecaj na detekciju/kvantifikaciju HBV-a odražavale su učinkovitost detekcije ciljne sekvence SPC1 (prisutnost inhibitora i nedostatak koraka ispiranja). Za uvjete ispod kojih nije bilo utjecaja na amplifikaciju SPC1 pokazalo se da je i ciljna sekvenca HBV-a amplificirana u okviru prijavljene kvantifikacije od 0,2 log₁₀ IU/ml kontrolnih uzoraka.

Tablica 13: Učinkovitost kontrole obrade uzorka

Testiran neuspjeli korak obrade	Status amplifikacije kontrole obrade uzorka	Status amplifikacije ciljne sekvence HBV-a	Rezultat ispitivanja
Presence of Inhibitor (Prisutnost inhibitora)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Unresolved (Nerazriješeno)
No Wash Delivered (Nije doveden reagens za ispiranje)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Unresolved (Nerazriješeno)
No Wash Blowout (Nema ispuštanja reagensa za ispiranje)	Amplified (Amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	Positive (Pozitivno) s kvantifikacijom unutar 0,2 log ₁₀ IU/ml kontrole

Križna kontaminacija

Stopa križne kontaminacije ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay određena je testiranjem tri kompleta ispitaka HBV-a uz naizmjenično testiranje visoko pozitivnih i negativnih ispitaka. Ukupno, to je uključivalo testiranje 144 ponavljanja normalnih humanih ispitaka plazme s EDTA negativnih na HBV i 144 ponavljanja ispitaka s visokim titrom HBV-a pri koncentraciji od 8,0 log₁₀ IU/ml. Svih 144 ponavljanja obrade negativnog ispitka dalo je negativan rezultat, što dokazuje da nije došlo nikakve križne kontaminacije tijekom obrade uzoraka na sustavu NeuMoDx System.

Ekvivalentnost matrice ispitka

Testiranje je provedeno kako bi se dokazali rezultati ekvivalentni ispitcima plazme prikupljenima u epruvete za prikupljanje s etilendiamintetraoctenom kiselinom (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) i kiselom citratnom dekstrozom (Acid Citrate-Dextrose, ACD). Osim toga, provedeno je testiranje kako bi se dokazala ekvivalentnost svježih i zamrznutih ispitaka. Četrdeset ispitaka pojedinačnih davatelja dobivenih od tvrtke BioIVT prikupljeno je u epruvete za prikupljanje koje sadržavaju EDTA i ACD. U te su svježije uzorke dodane četiri razine HBV genotipa A ili C te je provedeno testiranje ekvivalentnosti. Zatim su uzorci zamrznuti u trajanju od najmanje 24 sata, nakon čega su odmrznuti i ponovno testirani. Regresijska analiza pokazala je izvrsnu ekvivalentnost između svježih i zamrznutih ispitaka te ispitaka s antikoagulansima EDTA i ACD.

Tablica 14: Regresijska analiza rezultata ekvivalentnosti ispitaka

Parametar [kriteriji prihvatljivosti]	Svježi u odnosu na zamrznute ispitke	ACD u odnosu na K2EDTA
Nagib [0,9 – 1,1]	1,002	0,996
Odsječak [< 0,5]	-0,031	0,018
Koeficijent determinacije [$R^2 > 0,95$]	0,995	0,993

Provedeno je dodatno testiranje u svrhu dokazivanja ekvivalentnosti radnog učinka ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay na ispitcima u primarnim epruvetama za prikupljanje u odnosu na sekundarne epruvete za prikupljanje. Paneli ispitaka davatelja negativnih na HBV u koje je dodana ciljna sekvenca virusa HBV (AccuPlex™ HBV Control) najprije su obrađeni iz primarnih epruveta za ispitke. Preostala plazma iz svakog ispitka podijeljena je u alikvotne u sekundarnu epruvetu za ispitak i ponovno je obrađena. Nije zabilježena nikakva značajna razlika u zabilježenim rezultatima između obrade u primarnim i sekundarnim epruvetama za ispitke.

Također je procijenjena ekvivalentnost radnog učinka ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay u svježim u odnosu na zamrznute ispitke seruma s pomoću panela svježih ispitaka seruma pojedinačnih davatelja u koje je dodan HBV u koncentracijama u rasponu linearnog raspona ispitivanja. Nakon obrade svježih ispitaka uzorci seruma zamrznuti su na najmanje 24 sata na temperaturi od -20 °C. Zamrznuti uzorci zatim su odmrznuti i ponovno testirani. Linearna ekvivalentnost između identičnih svježih i zamrznutih uzoraka procijenjena je primjenom Passing-Bablokove i Demingove regresijske analize. P-vrijednost Passing-Bablokove regresije od 0,329 (veća od 0,05) i koeficijent korelacije Demingove regresije od 0,989 pokazuju odličnu ekvivalentnost između uzoraka koji su obrađeni svježi i prethodno zamrznutih uzoraka. Bland-Altmanovom analizom utvrđeno je da odstupanje između svježih i zamrznutih ispitaka ima iznimno zanemarivu vrijednost od -0,002 log₁₀ IU/ml, što dodatno dokazuje ekvivalentnost obrade svježih i zamrznutih ispitaka. Konačno, korelacija između koncentracija HBV-a koje je prijavio sustav i očekivanih koncentracija za svježe i zamrznute uzorke utvrđena je jednostavnom linearnom regresijom s prijavljenim vrijednostima R² od 0,991 i 0,985.

Stabilnost ispitka

U ispitke plazme i seruma s EDTA negativne na HBV dodan je HBV pri koncentraciji 3,7 log₁₀ IU/ml te su ispitci ispitani u različitim vremenskim točkama dok su bili pohranjeni na sustavu NeuMoDx System – odmah (vrijeme 0), nakon 4 sata, nakon 8 sati i nakon 24 sata. Nije zabilježena značajna razlika u radnom učinku u različitim vremenskim točkama, što ukazuje na to da ispitak može biti postavljen na sustavu NeuMoDx System do 24 sata bez ikakvog utjecaja na radni učinak ispitivanja.

Slično je testiranje također provedeno na ispitcima plazme i seruma pohranjenima u hladnjaku laboratorija (na temperaturi između 2 i 8 °C) do 7 dana prije testiranja i nije uočena značajna razlika u radnom učinku.

Na kraju su testirani ispitci pohranjeni na temperaturi od ≤ -20 °C do 6 mjeseci (plazma) i do 4 mjeseca (serum) prije obrade te nije uočena značajna razlika u odnosu na svježe ispitke. Ciklus zamrzavanja/odmrzavanja se ponovio, a promjena u radnom učinku nije uočena ni nakon 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (za plazmu) ili 4 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (za serum).

Korelacija metoda

Ispitci plazme

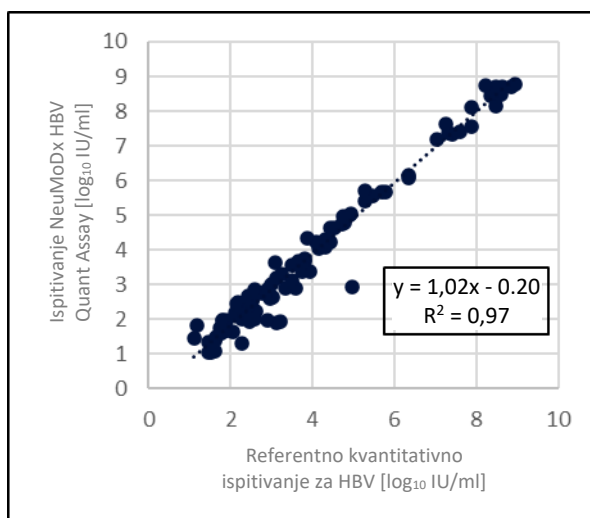
Kvalitativni i kvantitativni radni učinak ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay procijenjeni su usporedbom s komparativnim ispitivanjima koje je odobrila agencija FDA / koji nose oznaku CE testiranjem nerazrijeđenih kliničkih ispitaka plazme pacijenata zaraženih HBV-om. Testiranje je provedeno interno u tvrtki NeuMoDx jednostruko slijepim ispitivanjem na kliničkim ispitcima dobivenim iz triju nezavisnih referentnih laboratorija. Rezultati ukupno 308 uzoraka pozitivnih i negativnih na HBV objedinjeni su u kvalitativnoj analizi kako bi se izračunale klinička osjetljivost i specifičnost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay. Kvalitativna analiza provedena je sa i bez pozitivnih uzoraka ispod LLoQ-a jer se klasifikacija uzoraka s tako niskom koncentracijom može razlikovati od testa do testa. Za izradu linearne regresije radi definiranja kvantitativnog radnog učinka upotrebljavalo se ukupno 97 kliničkih ispitaka pozitivnih na HBV unutar linearnog raspona uobičajenog za oba testa. Osim što pruža odličnu osjetljivost i specifičnost, pokazalo se da testna traka NeuMoDx HBV Quant Test Strip ima i izvrsnu kvantitativnu korelaciju s komparativnim ispitivanjem. Na temelju ovih rezultata procijenjeno je da osjetljivost ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay iznosi 100 % (CI 96,4 % – 100 %), a specifičnost 95,6 % (CI 91,9 % – 97,7 %). Ti 95 %-tni intervali pouzdanosti izračunati su s pomoću metode određivanja 95 %-tnog intervala pouzdanosti u skladu s dokumentom EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance, Approved Guideline, volumen 28, br. 3.⁶

Tablica 15: Metrike kliničke osjetljivosti i specifičnosti ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay za ispitke plazme na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System

	Referentno ispitivanje (POZ)	Referentno ispitivanje (NEG)	UKUPNO
NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ)	103	9	112
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
UKUPNO	103	205	308
OSJETLJIVOST = 100 % 95 %-tni CI (96,4 % – 100 %) SPECIFIČNOST = 95,6 % 95 %-tni CI (91,9 % – 97,7 %)			

Tablica 16: Metrike kliničke osjetljivosti i specifičnosti ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System s isključenim uzorcima plazme koji su < LLoQ

	Referentno ispitivanje (POZ)	Referentno ispitivanje (NEG)	UKUPNO
NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ)	99	5	104
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
UKUPNO	99	201	300
OSJETLJIVOST = 100 % 95 %-tni CI (96,3 % – 100 %) SPECIFIČNOST = 97,5 % 95 %-tni CI (94,3 % – 98,9 %)			



Slika 7: Korelacijsko ispitivanje kvantitativnih metoda s pomoću ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay

Dodatno testiranje provedeno je na sustavu NeuMoDx 96 Molecular System korištenjem 159 preostalih kliničkih ispitaka plazme. Kao i kod prethodnog testiranja provedenog na sustavu NeuMoDx 288, rezultati dobiveni na sustavu NeuMoDx 96 uspoređeni su s rezultatima dobivenima ispitivanjima koja je odobrila agencija FDA i/ili koja nose oznaku CE te koje izvorni laboratoriji upotrebljavaju za testiranje standarda skrbi. Rezultati koji uključuju tablicu istinitosti s kliničkom osjetljivosti i specifičnosti prikazani su s 95 %-tnim CI u *tablici 17*.

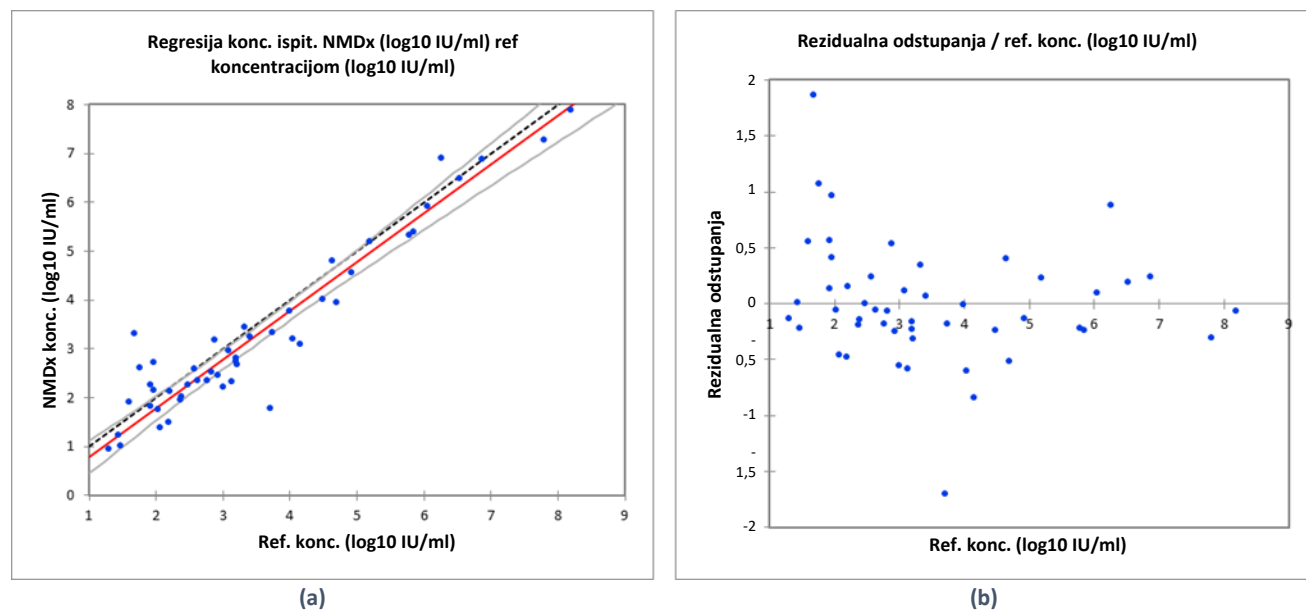
Tablica 17: Sažetak kliničkog radnog učinka – ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay na sustavu NeuMoDx 96 Molecular System

	Referentno ispitivanje (POZ)	Referentno ispitivanje (NEG)	UKUPNO
NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ)	60	2	62
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	1	95	96
UKUPNO	61	97	158
OSJETLJIVOST = 98 % 95 %-tni CI (90 % – 100 %) SPECIFIČNOST = 98 % 95 %-tni CI (92 % – 100 %)			

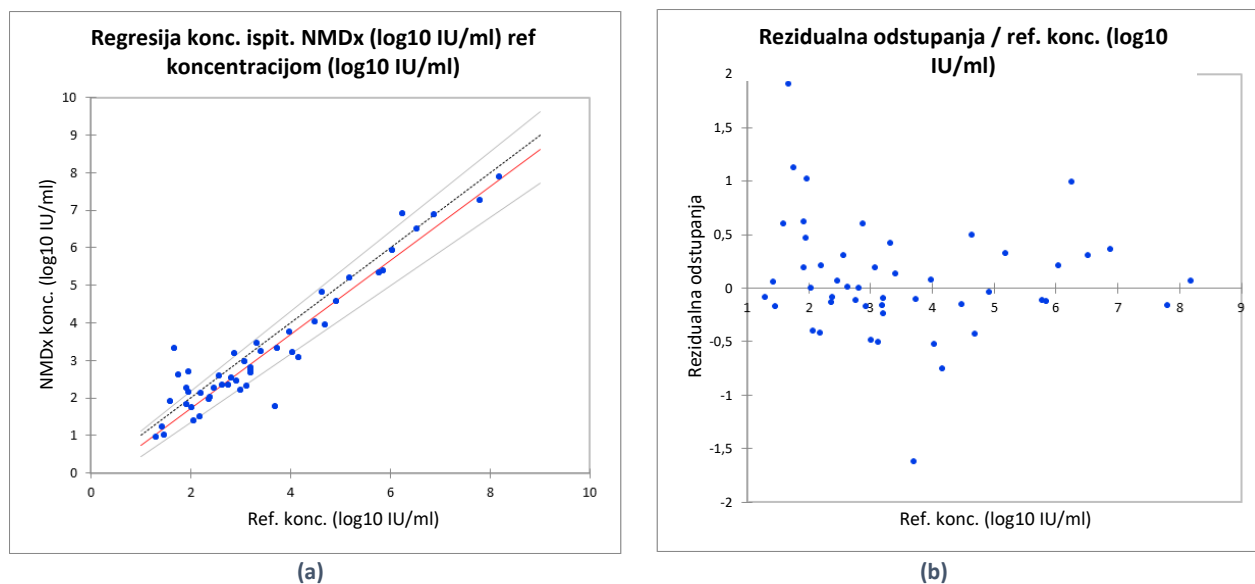
Ispitci seruma

Kvantitativni radni učinak ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay procijenjen je usporedbom s komparativnim ispitivanjima koja je odobrila agencija FDA / koja nose oznaku CE testiranjem deidentificiranih rezidualnih ispitaka seruma pozitivnih na HBV dobivenih od pacijenata zaraženih HBV-om. Ukupno 66 klinički poznatih ispitaka seruma pozitivnih na HBV dobivenih od dvaju neovisnih referentnih laboratorija testirano je s pomoću ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay interno u tvrtki NeuMoDx. Od poznatih pozitivnih ispitaka seruma koji su testirani, za 58 je identificiran pozitivan rezultat, a devet (9) rezultata bilo je ispod LLoQ-a i iznad ULoQ-a za ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay i/ili referentni test. Za izradu regresijske analize radi definiranja kvantitativnog radnog učinka upotrebljavalo se ukupno 49 kliničkih ispitaka pozitivnih na HBV unutar linearnog raspona uobičajenog za oba testa.

Dijagrami ekvivalentnosti i rezidualnog odstupanja izrađeni su za prikaz korelacije između vrijednosti koncentracija dobivenih ispitivanjem NeuMoDx HBV Quant Assay i referentnim testom za sve uzorke testirane primjenom Demingove i Passing-Bablokove regresijske analize, kako je prikazano na slikama 8 i 9. Kvaliteta prilagodbe Demingovom regresijom ilustrirana je koeficijentom nagiba od 0,99 s 95 %-tnim CI (0,93, 1,07) i odsječkom (odstupanjem) od -0,22 s 95 %-tnim CI (-0,56, 0,12), što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx HBV Quant Assay i referentnim testovima imaju visoku korelaciju s prihvatljivim odstupanjem. Kvaliteta prilagodbe Passing-Bablokovom metodom linearne regresije ilustrirana je koeficijentom nagiba od 0,99 s 95 %-tnim CI (0,91, 1,06) i odsječkom (odstupanjem) od -0,25 s 95 %-tnim CI (-0,48, 0,06), što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx HBV Quant Assay i referentnim testovima imaju visoku korelaciju s prihvatljivim odstupanjem kao što je prikazano u *tablici 18*.



Slika 8: Dijagrami ekvivalentnosti (a) i rezidualnog odstupanja (b) – kumulativna analiza rezultata testa NeuMoDx HBV Test u odnosu na referentne testove – Demingova analiza.



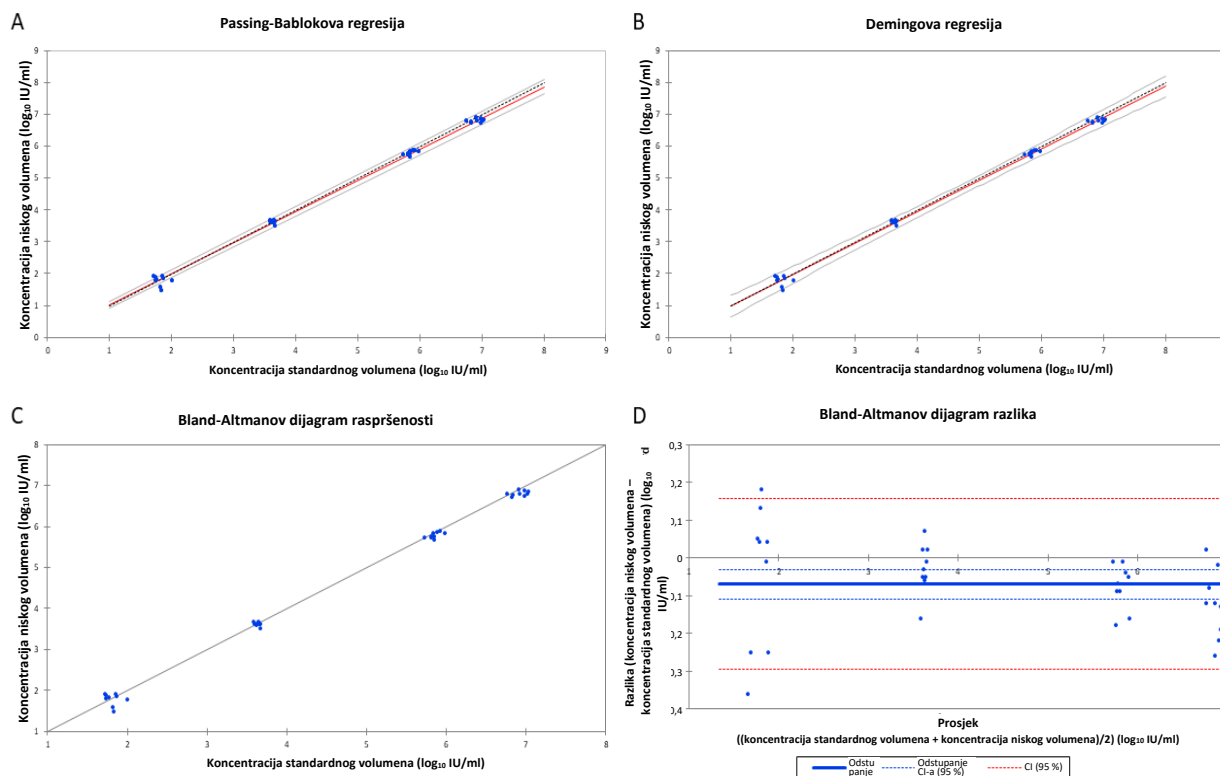
Slika 9: Dijagrami ekvivalentnosti (a) i rezidualnog odstupanja (b) – kumulativna analiza rezultata ispitivanja NeuMoDx HBV Quant Assay u odnosu na referentne testove – Passing-Bablokova analiza.

Tablica 18. Sažetak Demingove i Passing-Bablokove linearne regresijske analize za ispitke seruma

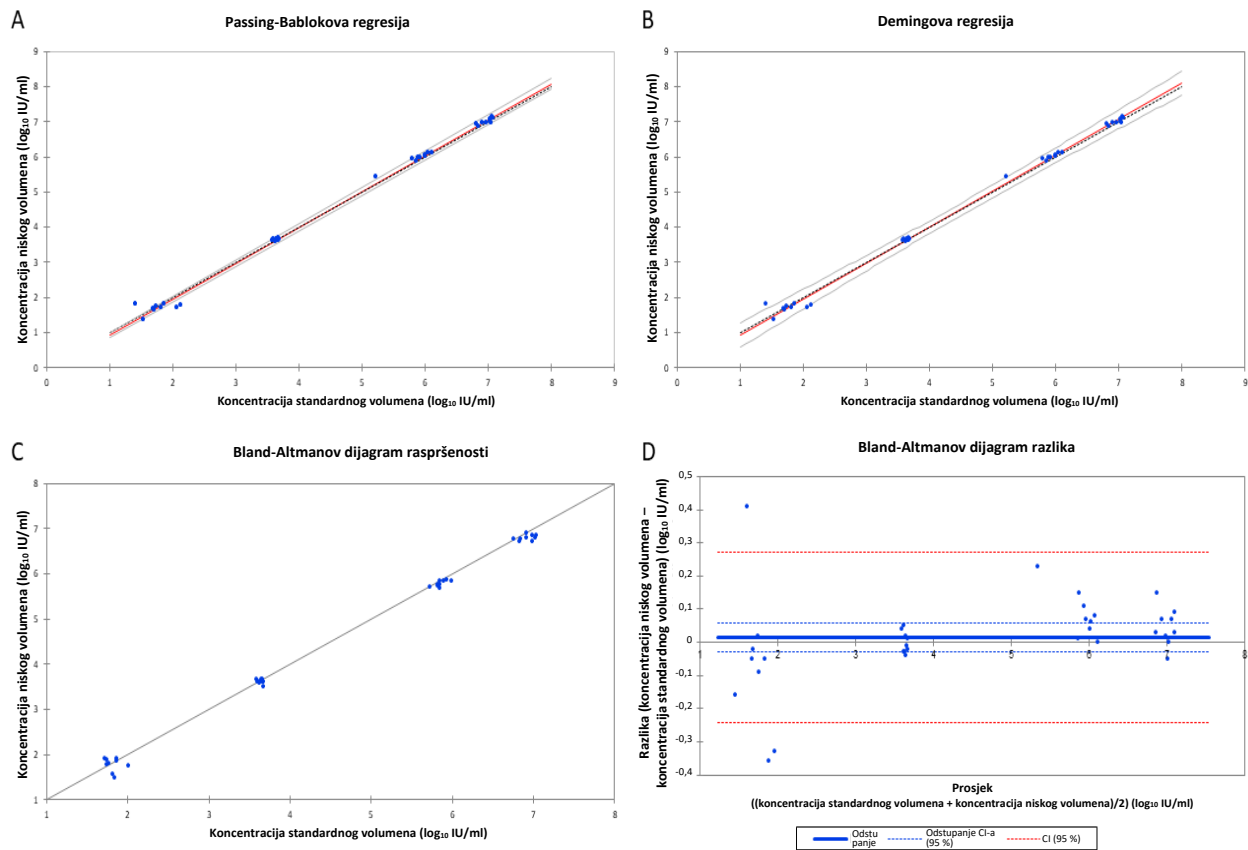
Demingova analiza			Passing-Bablokova analiza		
Odsječak	Koeficijent nagiba	R2	Odsječak	Koeficijent nagiba	p-vrijednost
-0,22 95 %-tni CI (-0,56, 0,12)	0,99 95 %-tni CI (0,93, 1,07)	0,95	-0,25 95 %-tni CI (-0,48, 0,06)	0,99 95 %-tni CI (0,91, 1,06)	0,89

Testiranje surogat ispitaka – tijekom rada za ispitke volumena 200 µl

Kvantitativna korelacija između tijekom rada za ispitke volumena 200 µl i 550 µl potvrđena je primjenom panela koji se sastojao pojedinačnih uzoraka plazme i seruma negativnih na HBV kojima su dodane četiri poznate razine kontrolnog materijala za HBV, sljedive do 4. Međunarodnog standarda SZO-a za DNK HBV-a za testove na temelju nukleinske kiseline. Ti pojedinačni ispitci plazme i seruma obrađeni su primjenom radnih postupaka za ispitke volumena 550 µl i 200 µl te je na kraju provedeno ukupno 288 testova. Usporedbe ekvivalentnosti između koncentracija koje je prijavio softver sustava NeuMoDx za tijekom rada za ispitke volumena 200 µl i 550 µl i surogat panela provedene su na bazi pojedinačnih uzoraka. Demingova i Passing-Bablokova regresijska analiza imale su nagib od 0,985 i 0,998 s odsječcima od -0,001 odnosno 0,053 u plazmi te nagib od 1,024 i 1,018 s odsječcima od 0,095 odnosno 0,070 u serumu, što dokazuje odlično podudaranje kvantifikacija HBV-a između dvaju volumena obrade. Bland-Altmanova usporedba pokazala je minimalno odstupanje između dvaju radnih tijekom. Osim toga, jednostavne linearne regresijske analize s očekivanom koncentracijom i prijavljenom koncentracijom za tijekom rada za volumen od 200 µl imale su nagib od 1,047 i koeficijent korelacije od 0,998 (za plazmu) te 1,113 i 0,992 (za serum), što dodatno potvrđuje odlični radni učinak primjene tijekom rada za ispitke volumena 200 µl za ispitivanje NeuMoDx HBV Quant Assay. Rezultati tih ispitivanja sažeti su u nastavku na *slici 10* i *slici 11*.



Slika 10: Usporedbe dijagrama ekvivalentnosti prijavljenih koncentracija niskih volumena u odnosu na prijavljene koncentracije standardnih volumena ispitaka. A) Passing-Bablokova regresija. B) Demingova regresija. C) Bland-Altmanov dijagram raspršenosti D) Bland-Altmanov dijagram razlika – ispitci plazme



Slika 11: Usporedbe dijagrama ekvivalentnosti prijavljenih koncentracija niskih volumena u odnosu na prijavljene koncentracije standardnih volumena ispitaka. A) Passing-Bablokova regresija. B) Demingova regresija. C) Bland-Altmanov dijagram raspršenosti D) Bland-Altmanov dijagram razlika – ispitci seruma

REFERENCE















1. Mother-to-child transmission of hepatitis B virus in sub-Saharan Africa: time to act. Andersson, Monique I et al. The Lancet Global Health, Volume 3, Issue 7, e358 - e359
2. Schillie S, Vellozzi C, Reingold A, et al. Prevention of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. MMWR Recomm Rep 2018;67(No. RR-1):1–31. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6701a1>.
3. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet. April 2017. <http://www.who.int> (last accessed 20 November 2017)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

ZAŠTITNI ZNAKOVI

NeuMoDx™ je zaštitni znak tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.
 NeuDry™ je zaštitni znak tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.
 TaqMan® je registrirani zaštitni znak tvrtke Roche Molecular Systems, Inc.

Svi drugi nazivi proizvoda, zaštitni znakovi i registrirani zaštitni znakovi koji se mogu pojaviti u ovom dokumentu u vlasništvu su svojih vlasnika.

LEGENDA SIMBOLA

 Rx only	Za uporabu samo uz recept		Temperaturno ograničenje
	Proizvođač		Nije za ponovnu uporabu
	Medicinski proizvod za <i>in vitro</i> dijagnostiku		Sadrži dovoljno za <n> testova
	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici		Pročitajte upute za upotrebu
	Kataloški broj		Oprez
	Kôd šarže		Biološke opasnosti
	Upotrijebiti do		Oznaka CE



NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, USA

Naručitelj (Australija):
QIAGEN Pty Ltd
Level 2 Chadstone Place
1341 Dandenong Rd
Chadstone VIC 3148
Australia



Emergo Europe B.V.
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

 2797

Tehnička podrška / izvještaj o kontroli sigurnosti: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents