

**REF** 201300 NeuMoDx™ HBV Quant Test Strip

**R only**

POZOR: Samo za izvoz v ZDA

**IVD** Za diagnostično uporabo *in vitro* s sistemoma NeuMoDx 288 in NeuMoDx 96 Molecular Systems

 Posodobljena navodila najdete na: [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu)

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 288 Molecular System; št. dela 40600108

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 96 Molecular System; št. dela 40600317

### NAMEN UPORABE

NeuMoDx HBV Quant Assay je avtomatiziran, *in vitro* test amplifikacije nukleinske kisline za kvantifikacijo DNK virusa hepatitisa B (HBV) v primerkih človeške plazme in seruma za genotipe A do H pri posameznikih, okuženih z virusom HBV. Test NeuMoDx HBV Quant Assay, implementiran na NeuMoDx 288 Molecular System in NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System(s)) vključuje avtomatizirano ekstrakcijo DNK za izolacijo ciljne nukleinske kisline iz primerka ter verižno reakcijo polimeraze v realnem času (qPCR) za targetiranje visoko ohranjenih zaporedij v genomu virusa hepatitisa B.

Test NeuMoDx HBV Quant Assay je namenjen kot pripomoček pri ravnanju s pacienti, ki so okuženi s HBV. Rezultati testa NeuMoDx HBV Quant Assay morajo biti interpretirani v kontekstu vseh relevantnih kliničnih in laboratorijskih ugotovitev. Test NeuMoDx HBV Quant Assay ni namenjen za uporabo kot presejalni test v krvi oziroma krvnih produktih ali kot diagnostično orodje za določanje kliničnega statusa okužbe s HBV.

### POVZETEK IN RAZLAGA

Človeška polna kri, odvzeta v sterilne epruvete za odvzem krvi, ki vsebujejo etilendiamin tetraacetno kislino (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ali kislinsko citratno dekstrozo (Acid Citrate Dextrose, ACD) kot agent za antikoagulacijo ali v epruveh za pripravo plazme (Plasma Preparation Tubes, PPT) medtem ko je treba serum shraniti v epruvete za odvzem seruma ali epruveh za ločevanje seruma (Serum Separator Tube, SST). Med pripravo na testiranje se plazmo ali serum v sekundarni epruveti s primerki ali frakcionirano krvjo v prvotni epruveti s primerki, ki sta združljivi s sistemom NeuMoDx System, naloži v sistem NeuMoDx System z uporabo določenega prenosnika za epruvete s primerki. Za vsak primerek se alikvot plazme ali vzorec seruma zmeša s pufrom NeuMoDx Lysis Buffer 1 in sistem NeuMoDx System samodejno izvede vse potrebne korake za ekstrakcijo ciljne nukleinske kisline, pripravi izolirano DNK za amplifikacijo PCR v realnem času ter amplificira in zazna produkte amplifikacije, če so prisotni (razdelki tarče genoma HBV v visoko ohranjeni regiji, ki kodira *beljakovine X* in *beljakovino preC*). Test NeuMoDx HBV Quant Assay vključuje kontrolo obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) za DNK za lažje spremljanje prisotnosti morebitnih inhibitornih snovi ter napak sistema NeuMoDx System ali reagentov, do katerih lahko pride med postopkoma ekstrakcije in amplifikacije.

Virus hepatitisa B (Hepatitis B Virus, HBV) je vzročni agent za okužbo jeter s hepatitisom B ter predstavlja globalno zdravstveno težavo. Hepatitis B lahko povzroči akutni hepatitis ali se razvije v kronično stanje, ki privede do ciroze ali raka na jetrih. Tveganje pred razvojem kroničnega stanja je primarno povezano s starostjo: če se virus prenese ob rojstvu, obstaja > 90 % možnost, da se bo razvilo kronično stanje, pri odraslih pa možnost nastanka kroničnega stanja okužbe znaša 2–6 %.<sup>1</sup> HBV se prenaša s krvjo okužene osebe, je spolno prenosljiv, prenaša se s souporabo igel z okuženo osebo, ki mamila uživa intravenozno, ali z vertikalnim prenosom od mame do otroka med rojevanjem. V združenih državah živi približno 850.000 ljudi z okužbo s HBV, med katerimi pride do največ okužb med spolnimi odnosi oziroma z vnosom mamil.<sup>2</sup> V Afriki in zahodnem Tihem oceanu je znano, da je okuženih kar 5 % prebivalstva. Leta 2015 je okužba s HBV privedla do 885.000 smrti po celem svetu, največ zaradi ciroze ali hepatocelularnega karcinoma.<sup>3</sup> Obstaja cepivo, ki je 95 % učinkovito pri preprečevanju okužbe s HBV, zaradi česar se število diagnosticiranih primerov vsako leto zmanjšuje.<sup>4</sup>

Trenutno standardno zdravljenje okužbe s HBV je protivirusna terapija, ki zahteva stalni nadzor za zagotavljanje ustreznega poteka zdravljenja. Nadzor terapije z NeuMoDx HBV Quant Assay lahko zdravnikom zagotovi informacije, ki pomagajo pri ravnanju s pacientu, ki so okuženi s HBV.

### NAČELA POSTOPKA

Test NeuMoDx HBV Quant Assay združuje samodejno ekstrakcijo, amplifikacijo in zaznavo DNK s PCR v realnem času. Primerki polne krvi se za pripravo plazme zbirajo v epruveh EDTA, ACD ali PPT in/ali v epruveh SST za pripravo seruma. Prvotni (frakcionirani) primerki krvi ali alikvot plazme/seruma v združljivi sekundarni epruveti s primerkom je označen s črtno kodo in nameščen v sistem NeuMoDx System. Sistem NeuMoDx System samodejno aspirira alikvot plazme/seruma, da ga zmeša s pufrom za lizo NeuMoDx Lysis Buffer 1 ter z agenti, ki jih za začetek obdelave vsebuje ekstrakcijska plošča NeuMoDx Extraction Plate. Sistem NeuMoDx System avtomatizira in integrira ekstrakcijo ter koncentracijo DNK, pripravo reagenta ter amplifikacijo/zaznavanje nukleinske kisline v ciljni sekvenci z uporabo PCR v realnem času. Vključena kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) pomaga nadzirati prisotnost inhibitornih snovi ter napak sistema, postopka ali reagenta. Ko je primerek enkrat naložen v NeuMoDx System, upravljavcu ni več treba posredovati.

Sistem NeuMoDx System uporablja kombinacijo toplote, litičnih encimov in ekstrakcijskih reagentov za samodejno izvedbo lize, ekstrakcije DNK in odstranitev inhibitorjev. Sproščene nukleinske kisline ujamejo paramagnetni delci. Delci z vezano nukleinsko kislino se naložijo v kartušo NeuMoDx Cartridge, kjer se nevezani elementi izperejo s pralnim reagentom NeuMoDx Wash Reagent. Vezana DNK se nato izluži z reagentom za sprostitvev NeuMoDx Release Reagent. NeuMoDx System nato uporabi izluženo DNK za rehidracijo amplifikacijskih lastniških reagentov NeuDry™, ki vsebujejo vse potrebne elemente za amplifikacijo tarč, specifičnih za HBV in SPC1. To omogoči hkratno amplifikacijo in zaznavanje tako ciljnih kot kontrolnih sekvenc DNK. Po rekonstituciji posušenih reagentov PCR NeuMoDx System sprosti pripravljeno mešanico za PCR v eno od komor PCR (na vsak primerki) kartuše NeuMoDx Cartridge. Amplifikacija in zaznava sekvenc DNK kontrole in tarče (če so prisotne) se izvede v komori PCR. Kartuša NeuMoDx Cartridge je zasnovana tako, da vsebuje amplikon po PCR, tako da praktično odpravlja tveganje kontaminacije po amplifikaciji.

Amplificirane tarče so zaznane v realnem času s pomočjo kemikalij v šobi za hidrolizo (splošno imenovano kemija TaqMan®) z uporabo fluorogenih oligonukleotidnih molekul šobe, specifičnih za amplikone za svoje določene tarče. TaqMan šobe so sestavljene iz fluorofora, ki je kovalentno vezan na 5'-koncu oligonukleotidne šobe in dušilec na 3'-koncu. Dokler je šoba nedotaknjena, sta fluorofor in dušilec v bližini, zaradi česar lahko molekula dušilca zaduši fluorescenco, ki jo fluorofor oddaja prek Försterjev resonančni prenos energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Šobe TaqMan so zasnovane tako, da se prilegajo znotraj regije DNK, ki jo amplificira specifični komplet primerjev. Ko polimeraza DNK Taq razširi primer in sintetizira novo verigo, aktivnost eksonukleaze v smeri 5' proti 3' koncu polimeraze Taq DNA degradira šobo, ki se prilega predlogi. Degradacija šobe sprosti fluorofor in zlomi bližino dušilca ter tako premaga učinek dušenja zaradi FRET ter omogoči zaznavanje fluorofora. Nastali fluorescentni signal, zaznan v kvantitativnem PCR termopomnoževalniku sistema NeuMoDx System je neposredno povezan s sproščenim fluoroforom in je možno vzpostaviti korelacijo s prisotno tarčo.

Šoba TaqMan, označena s fluoroforom (vzbujanje: 490 nm in emisija: 521 nm) na koncu 5' dušilec na koncu 3' pa se uporablja za zaznavanje DNK HBV. Šoba TaqMan je za zaznavo kontrole obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) označena z drugačnim fluorescentnim barvilom (vzbujanje: 535 nm in emisija: 556 nm) na koncu 5' temnim dušilec na koncu 3'. Programska oprema sistema NeuMoDx System nadzoruje fluorescentni signal, ki ga oddajajo šobe TaqMan na koncu vsakega amplifikacijskega cikla. Ko je amplifikacija končana, programska oprema NeuMoDx System analizira podatke in sporoči končni rezultat (POSITIVE (POZITIVNO))/NEGATIVE (NEGATIVNO)/INDETERMINATE (NEDOLOČEN)/UNRESOLVED (NEREŠENO)/NO RESULT (NI REZULTATA)). Če je rezultat pozitiven in izračunana koncentracija v mejah kvantifikacije, programska oprema NeuMoDx System navede tudi kvantitativno vrednost, povezano z vzorcem.

### REAGENTI/POTROŠNI MATERIAL

#### Priloženi materiali

REF.	Vsebina	Enote na paket	Testi na enoto	Testi na paket
201300	<b>NeuMoDx HBV Quant Test Strip</b> <i>Posušeni reagenti PCR, ki vsebujejo šobo in primerje TaqMan, specifične za HBV in SPC1</i>	6	16	96

#### Potrebni materiali, ki niso priloženi (na voljo ločeno pri družbi NeuMoDx)

REF.	Vsebina
100200	<b>NeuMoDx Extraction Plate</b> <i>Posušeni paramagnetni delci, litični encim in kontrole obdelave vzorca</i>
800100 ali 800102	<b>NeuMoDx HBV Calibrators</b> <i>Kompleti visokih in nizkih kalibratorjev HBV za enkratno uporabo za določanje veljavnosti krivulje kalibracije</i>
900101 ali 900102	<b>NeuMoDx HBV External Controls</b> <i>Kompleti pozitivnih in negativnih kontrol za enkratno uporabo</i>
400400	<b>NeuMoDx Lysis Buffer 1</b>
400100	<b>NeuMoDx Wash Reagent</b>
400200	<b>NeuMoDx Release Reagent</b>
100100	<b>NeuMoDx Cartridge</b>
235903	<b>Konice Hamilton® CO-RE/CO-RE II (300 µl) s filtri</b>
235905	<b>Konice Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µl) s filtri</b>

#### Potrebni instrumenti

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] ali NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]

### OPOZORILA IN VARNOSTNI UKREPI

- NeuMoDx HBV Quant Test Strip je namenjen samo za diagnostično uporabo *in vitro* s sistemi NeuMoDx Systems.
- Ne uporabljajte reagentov ali potrošnega materiala po navedenem roku uporabe.
- Ne uporabljajte reagentov, če je varnostni pečat prelomljen oziroma če je embalaža ob prejemu poškodovana.
- Ne uporabljajte potrošnega materiala ali reagentov, če je zaščitna vrečka ob prejemu odprta ali poškodovana.
- Veljavna testna kalibracija (ustvarjena z obdelavo visokih in nizkih kalibratorjev iz opreme NeuMoDx HBV Calibrator) mora biti na voljo, preden je možno ustvariti rezultate testa za klinične vzorce.
- Zunanje kontrole NeuMoDx HBV External Control je treba obdelati vsakih 24 ur med testiranjem s testom NeuMoDx HBV Quant Assay.

- Minimalni volumen primerka je odvisen od velikosti epruvete, prenosnika za primerek in obdelave volumna primerka, kot je določeno spodaj. Če je volumen pod navedenim minimumom, se lahko pojavi napaka »Quantity Not Sufficient« (Količina ni zadostna).
- Če so primerki shranjeni pri nepravilnih temperaturah ali dlje od navedenega obdobja shranjevanja, so rezultati lahko neveljavni ali napačni.
- Vselej preprečite kontaminacijo katerega koli reagenta in potrošnega materiala z mikrobi ali dezoksiribonukleazo (DNaza). Priporočena je uporaba sterilnih pipet za prenos brez Dnaze pri uporabi sekundarnih epruvet. Za vsak primerek uporabite novo pipeto.
- Kartuše NeuMoDx Cartridge po amplifikaciji ne prijemajte oziroma je ne odlopite, da se izognete kontaminaciji. Kartuš NeuMoDx Cartridge v nobenem primeru ne odstranjujte iz zabojnikov za biološke odpadke (NeuMoDx 288 Molecular System) oziroma koša za biološke odpadke (NeuMoDx 96 Molecular System). Kartuša NeuMoDx Cartridge je zasnovana tako, da preprečuje kontaminacijo.
- Kadar laboratorij izvaja tudi teste PCR z odprtimi epruvetami, je treba zagotoviti, da NeuMoDx HBV Quant Test Strip, dodatni potrošni material in reagenti, potrebni za testiranje, osebna zaščitna oprema, kot so rokavice in laboratorijskih plašči, ter sistem NeuMoDx System niso kontaminirani.
- Pri ravnanju z reagenti in potrošnim materialom NeuMoDx uporabljajte čiste nitrilne rokavice brez pudra. Bodite previdni, da se ne dotaknete zgornje površine NeuMoDx Cartridge, tesnilne folije površine testnega traku NeuMoDx HBV Quant Test Strip ali ekstrakcijske plošče NeuMoDx Extraction Plate in zgornje površine NeuMoDx Lysis Buffer 1; s potrošnim materialom in reagenti ravnajte tako, da se dotikate samo stranskih površin.
- Varnostni listi (Safety Data Sheets, SDS) so za vsak reagent (kot je primerno) na voljo na spletni strani [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu).
- Po izvedbi testa si temeljito umijte roke.
- Pipete ne uporabljajte z usti. Ne kadite, pijte ali jejte v območjih, kjer ravnate s primerki ali reagenti.
- S primerki vedno ravnajte, kot da so kužni in v skladu z varnimi postopki v laboratorijih, kot so tisti, opisani v *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>5</sup> in dokumentu CLSI M29-A4.<sup>6</sup>
- Neuporabljene reagente in odpadke zavrzite v skladu z državnimi, zveznimi, okrajnimi in lokalnimi predpisi.
- Ne uporabljajte ponovno.



### SHRANJEVANJE, RAVNANJE IN STABILNOST IZDELKA

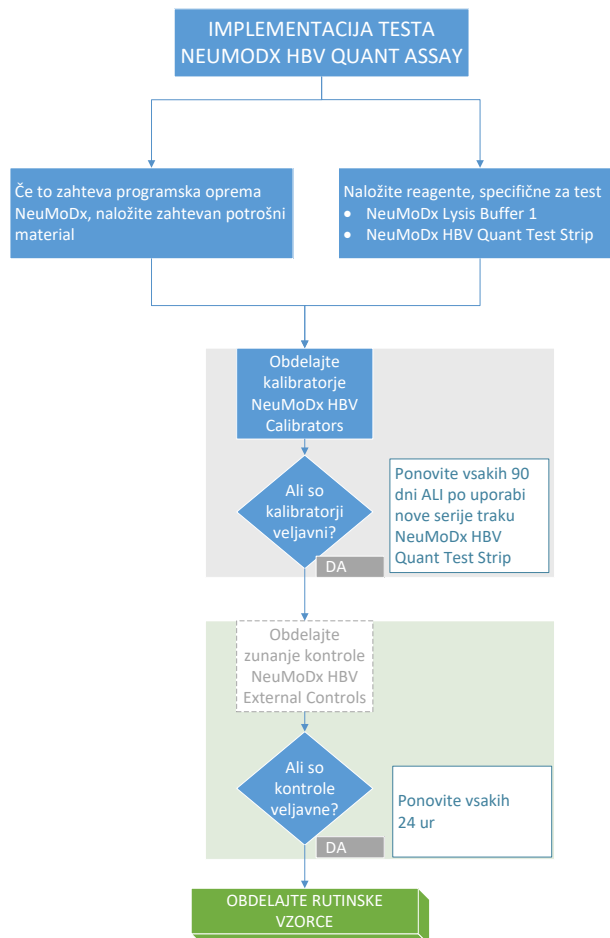
- Trakovi NeuMoDx HBV Quant Test Strip so stabilni v prvotni embalaži do navedenega roka uporabe na oznaki izdelka, ko je le-ta shranjen pri temperaturi od 4 do 28 °C.
- Ne uporabljajte potrošnega materiala in reagentov po poteku roka uporabe.
- Ne uporabljajte nobenih testnih izdelkov, če je primarna ali sekundarna embalaža vidno poškodovana.
- Ne uporabljajte nobenih testnih izdelkov, ki so bili predhodno naloženi na drug sistem NeuMoDx System.
- Ko je naložen, lahko NeuMoDx HBV Quant Test Strip ostane v sistemu NeuMoDx System 62 dni. Programska oprema spremlja preostali rok uporabnosti naloženih testnih trakov in ga sporoča uporabniku v realnem času. Sistem bo pozval k odstranitvi testnega traku, ki je v uporabi dlje, kot je dovoljeno.

### ZBIranJE, TRANSPORT IN SHRANJEVANJE PRIMERKOV

1. Z vsemi primerki, kalibratorji in kontrolami ravnajte, kot da lahko prenašajo povzročitelje okužb.
2. V primarnih epruvetah ne zamrzujte polne krvi ali katerihkoli primerkov.
3. Za pripravo primerkov plazme je treba plazmo zbrati v sterilnih epruvetah, ki za antikoagulate uporabljajo EDTA ali ACD. Upoštevajte navodila proizvajalca epruvete za zbiranje primerkov za pripravo in shranjevanje.
4. Za pripravo primerkov seruma, je treba polno kri zbirati v epruvetah SST. Upoštevajte navodila proizvajalca epruvete za zbiranje primerkov za pripravo in shranjevanje.
5. Primerke je možno testirati v prvotnih epruvetah za odvzem ali sekundarnih epruvetah s primerkom. Priporočila za testiranje s prvotno epruveto:
  - a. Primerki plazme: Epruveta BD Vacutainer® Plus Plastic K<sub>2</sub>EDTA Tube (BD #368589) ali epruveta za pripravo plazme BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
  - b. Primerki seruma: Epruveta BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) ali BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
6. Pripravljeni primerki se lahko shranijo v sistemu NeuMoDx System do 8 ur pred obdelavo za plazmo in 24 ur pred obdelavo za serum. Če je potreben dodaten čas shranjevanja, priporočamo da se primerki ohladijo ali zamrznejo kot sekundarni alikvoti.
7. Pripravljeni primerki naj bodo shranjeni pri temperaturi med 2 – 8 °C in ne več kot 7 dni pred testiranjem ter največ 8 ur pri sobni temperaturi za plazmo in 24 ur sobni temperaturi za serum.
8. Pripravljene primerke lahko pred obdelavo hranite pri ≤ -20 °C do 4 tedne (serum) ali 6 mesecev (plazma); zamrznjeni primerki pred uporabo ne smejo prestat več kot 2 cikla zamrzovanja/odtavanja za plazmo in 4 cikle zamrzovanja/odtavanja za serum.
  - a. Če so vzorci zamrznjeni, se morajo najprej popolnoma odtaliti pri sobni temperaturi (15–30 °C); zavrtite, da ustvarite enakomerno porazdeljen vzorec.
  - b. Ko so zamrznjeni vzorci odtajani, je testiranje treba izvesti v roku 24 ur.
  - c. Zamrzovanje plazme/seruma v primarnih epruvetah za odvzem ni priporočljivo.

9. Če bodo primerki poslani, jih je treba zapakirati in označiti v skladu z veljavnimi državnimi in/ali mednarodnimi predpisi.
10. Primerke jasno označite in navedite, da so namenjeni za testiranje HBV.
11. Nadaljujte na razdelek *Priprava testa*.

Celoten postopek za implementacijo testa NeuMoDx HBV Quant Assay je povzet v nadaljevanju na *sliki 1*.



Slika 1: Potek dela pri implementaciji testa NeuMoDx HBV Quant Assay

## NAVODILA ZA UPORABO

### Priprava testa

*Test NeuMoDx HBV Quant Assay se lahko izvaja neposredno iz primarnih epruvet za zbiranje krvi ali iz alikvotov primerkov iz sekundarnih epruvet. Obdelavo je mogoče izvesti z enim od dveh potekov dela za obdelavo primerkov glede na volumen: potek dela za primerke z volumnom 550 µl ali potek dela za primerke z volumnom 200 µl. Oznako s črtno kodo primerka namestite na epruveto s primerkom, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System.*

1. Oznako s črtno kodo primerka namestite na epruveto s primerkom, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System. Primarno epruveto za zbiranje krvi je mogoče označiti in jo postaviti neposredno v prenosnik za 32 epruvet s primerki, po centrifugiranju v skladu z navodili proizvajalca. Poleg tega lahko prenesete plazmo/serum v sekundarno epruveto za obdelavo v sistemu NeuMoDx System.
2. Če se testiranje primerka izvaja v primarni epruveti za zbiranje, postavite epruveto, označeno s črtno kodo, v prenosnik za epruvete s primerki in poskrbite, da bo pred nalaganjem v NeuMoDx System odstranjen pokrov. Najmanjši volumni **nad** slojem gela/mehkim slojem so opredeljeni spodaj in bodo izpolnjeni, če bodo primerki zbrani in obdelani v skladu z navodili proizvajalca epruvete. Učinkovitost ni zajamčena za primerke, ki niso bili odvzeti pravilno.

Vrsta epruvete	Minimalni zahtevani volumen primerka	
	Potek dela za 550 µl	Potek dela za 200 µl
SST – 3,5 ml	1550 µl	1200 µl
PPT/SST – 5,0 ml	1800 µl	1450 µl
PPT/SST – 8,5 ml	2500 µl	2200 µl
K <sub>2</sub> EDTA/serum – 4,0 ml	1050 µl	700 µl
K <sub>2</sub> EDTA/serum – 6,0 ml	1250 µl	900 µl
K <sub>2</sub> EDTA/serum – 10,0 ml	1600 µl	1250 µl

3. Pri uporabi sekundarne epruvete alikvot plazme/seruma prenesite v primerke v epruveti s črtno kodo, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System, v skladu s spodaj določenimi volumni:

Prenosnik za epruvete s primerki	Velikost epruvete	Minimalni zahtevani volumen primerka	
		Potek dela za 550 µl	Potek dela za 200 µl
<b>32-Tube Specimen Tube Carrier</b> (Prenosnik za epruvete s primerki z 32 epruvetami)	Premer 11–14 mm in višina 60–120 mm	700 µl	400 µl
<b>24-Tube Specimen Tube Carrier</b> (Prenosnik za epruvete s primerki s 24 epruvetami)	Premer 14,5–18 mm in višina 60–120 mm	1100 µl	800 µl
<b>Low Volume Specimen Tube Carrier</b> (Prenosnik za epruvete s primerki za nizki volumen)	1,5-ml epruveta s stožčastim dnom za mikrocentrifugo	650 µl	300 µl

### Delovanje sistemov NeuMoDx Systems

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistemov NeuMoDx 288 in 96 Molecular Systems (št. dela 40600108 in 40600317)

- Naložite naročilo testa v sistem NeuMoDx System v skladu z želenim potekom dela obdelanega volumna primerka in vrsto epruvete s primerkom:
  - Primerke z volumnom 550 µl se testira z opredelitvijo tipa primerka kot »Plasma« (Plazma) ali »Serum«
  - Primerke z volumnom 200 µl se testira z opredelitvijo tipa primerka kot »Plasma2« (Plazma2) ali »Serum2«
  - Če to v naročilu testa ni opredeljeno, bo privzeto uporabljen tip primerka **Plasma** (Plazma) v **Secondary Tube** (Sekundarna epruveta)
- Enega ali več prenosnikov testnih trakov NeuMoDx System Test Strip carrier napolnite s testnimi trakovi NeuMoDx HBV Quant Test Strip in uporabite zaslon na dotik, da jih naložite v sistem NeuMoDx System.
- Če to zahteva programska oprema NeuMoDx System, dodajte potrebno količino potrošnega materiala v vsebnike potrošnega materiala NeuMoDx System in uporabite zaslon na dotik, da prenosnik(e) naložite v NeuMoDx System.
- Če to zahteva programska oprema NeuMoDx System, zamenjajte NeuMoDx Wash Reagent, NeuMoDx Release Reagent, spraznite odpadke pri polnjenju, zabojnik za biološke odpadke (samo pri NeuMoDx 288 Molecular System), koš za odpadne konice (samo NeuMoDx 96 Molecular System) ali koš za biološke odpadke (samo NeuMoDx 96 Molecular System), kot je to potrebno.
- Če to zahteva programska oprema NeuMoDx System, obdelajte NeuMoDx HBV Calibrator in/ali NeuMoDx HBV External Control. Dodatne informacije glede kalibratorjev in kontrol so na voljo v razdelku *Obdelava rezultatov*.
- Epruveto(-e) s primerki/kalibratorjem/kontrolo naložite v prenosnike za epruvete s primerki in poskrbite, da so pokrovi odstranjeni z vseh epruвет.
- Prenosnike za epruvete s primerki postavite na polico samodejnega nalagalnika in uporabite zaslon na dotik, da naložite prenosnike v NeuMoDx System. To bo sprožilo obdelavo naloženih primerkov za opredeljene teste, če je v sistemu predhodno nastavljen veljaven vrstni red testiranja.

### OMEJITVE

1. Trak NeuMoDx HBV Quant Test Strip se lahko uporablja samo v sistemih NeuMoDx Systems.
2. Delovanje traku NeuMoDx HBV Quant Test Strip je bilo potrjeno za vzorce plazme, odvzete z EDTA/ACD kot antikoagulantom, oziroma primerke seruma, pripravljene v epruveh za ločevanje seruma. Uporaba testnega traku NeuMoDx HBV Quant Test Strip z drugimi viri ni bila ocenjena, zato karakteristike delovanja tega testa za druge tipe primerkov niso znane.
3. Delovanje traku NeuMoDx HBV Quant Test Strip je bilo potrjeno za testiranje primarnih epruveh z uporabo epruveh BD Vacutainer Plus Plastic K<sub>2</sub>EDTA Tubes, epruveh BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, epruveh BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube in epruveh BD Vacutainer SST Tube.
4. Pri uporabi poteka dela za primerke z volumnom 200 µl so opazili majhno povišanje meje zaznavanja in spodnje meje kvantifikacije pri testu NeuMoDx HBV Quant Assay.
5. Test NeuMoDx HBV Quant Assay se uporablja samo za kvantitativno spremljanje. Ni namenjen za kvalitativno zaznavanje.
6. Test NeuMoDx HBV Quant Assay se ne sme uporabljati z vzorci hepariniziranih ljudi.
7. Ker je zaznavanje HBV odvisno od števila prisotnih ciljnih delcev DNK v vzorcu, so zanesljivi rezultati odvisni od ustreznega zbiranja, ravnanja in shranjevanja primerkov.
8. Kalibratorji NeuMoDx HBV Calibrator in zunanje kontrole NeuMoDx HBV External Control morajo biti obdelani po priporočilih v priloženih navodilih in zahtevah programske opreme NeuMoDx System pred obdelavo rutinskih kliničnih vzorcev.
9. Do napačnih rezultatov lahko pride zaradi nepravilnega zbiranja, ravnanja, shranjevanja primerkov ali tehnične napake ali zaradi zmede pri epruveh s primerkom. Poleg tega se lahko pojavijo lažni negativni vzorci, če je število virusnih delcev v vzorcu pod mejo zaznave testa NeuMoDx HBV Quant Assay.
10. Sistem NeuMoDx System lahko uporablja izključno osebje, ki je bilo usposobljeno za uporabo sistema NeuMoDx System.
11. Če se tako tarča HBV kot tarča SPC1 ne amplificirata, bodo sporočeni neveljavni rezultati (Indeterminate (nedoločen), No Result (ni rezultata) ali Unresolved (nerešeno)), zato je test treba ponoviti.
12. Če je NeuMoDx HBV Quant Assay pozitiven, kvantifikacijska vrednost pa je pod mejo kvantifikacije, bo NeuMoDx System javil, če je bil zaznan HBV *pod* spodnjo mejo kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ali *nad* zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
13. V primeru, da je bil zaznan HBV *pod* spodnjo mejo kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), je test možno ponoviti (če je to zaželeno) z drugim alikvotom vzorca.
14. V primeru, da je zaznan HBV nad zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), je možno test NeuMoDx HBV Quant Assay ponoviti z razredčenim alikvotom prvotnega primerka. Priporočena je raztopina 1:1000 v HBV-negativni plazmi ali redčilu Basematrix 53 (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Koncentracijo prvotnega primerka je možno izračunati po naslednjem postopku:  
$$\text{koncentracija prvotnega primerka} = \log_{10}(\text{faktor redčenja}) + \text{dobljena koncentracija razredčenega vzorca}$$
15. Občasna prisotnost inhibitorjev PCR v plazmi lahko povzroči napako kvantifikacije sistema. Če se to zgodi, priporočamo, da se test ponovi z istim primerkom, razredčenim v Basematrix v razmerju 1 : 10 ali 1 : 100.
16. Pozitiven rezultat ne pomeni nujno prisotnosti živih organizmov. Pozitivni rezultat domneva prisotnost DNK z virusom hepatitisa B.
17. Brisanja ali mutacije v shranjenih regijah, ki so tarča testa NeuMoDx HBV Quant Assay, lahko vplivajo na zaznavo ali lahko privedejo do napačnih rezultatov pri uporabi testnih trakov NeuMoDx HBV Quant Test Strip.
18. Rezultati testa NeuMoDx HBV Quant Assay se naj uporabljajo kot dodatek kliničnim opazovanjem in drugim podatkom, ki so na voljo zdravniku; test ni namenjen diagnozi okužbe.
19. Priporočene so dobre laboratorijske prakse, vključno z menjavo rokavic med ravnanjem s primerki pacientov, da preprečite kontaminacijo.

### OBDELAVA REZULTATOV

Razpoložljive rezultate si je mogoče ogledati oziroma natisniti na zavihku »Results« (Rezultati) v oknu Results (Rezultati) na zaslonu na dotik sistema NeuMoDx System. Rezultate testa NeuMoDx HBV Quant Assay samodejno ustvari programska oprema NeuMoDx System z uporabo algoritma za odločanje in parametrov za obdelavo rezultatov, navedenih v definicijski datoteki testa NeuMoDx HBV Quant Assay (HBV ADF). Rezultat je lahko Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s sporočeno koncentracijo HBV, Positive (Pozitivno) nad ULoQ, Positive (Pozitivno) pod LLoQ, Indeterminate (Nedoločen) (IND), Unresolved (Nerešeno) (UNR) ali No Result (Ni rezultata) (NR) na podlagi statusa amplifikacije tarče in kontrole obdelave vzorca. Rezultati so sporočeni na podlagi algoritma odločanja ADF in povzeti spodaj v preglednici 1.

Preglednica 1: Povzetek algoritma za odločanje HBV Quant Assay

REZULTAT	Tarča HBV	Kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1)	Interpretacija rezultatov
<b>Positive (Pozitivno) s prijavljeno koncentracijo</b>	Amplified (Amplificirano) $0,9 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (potek dela za 550 $\mu\text{l}$ ) $1,4 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (potek dela za 200 $\mu\text{l}$ )	Amplified (Amplificirano) ali Not Amplified (Ni amplificirano)	DNK HBV zaznana v kvantitativnem območju
<b>Positive (Pozitivno), nad zgornjo mejo kvantifikacije</b>	Amplified (Amplificirano) $[\text{HBV}] > 9,0 \log_{10} \text{ IE/ml}$	Amplified (Amplificirano) ali Not Amplified (Ni amplificirano)	DNK HBV zaznana nad kvantitativnim območjem
<b>Positive (Pozitivno), pod spodnjo mejo kvantifikacije</b>	Amplified (Amplificirano) $[\text{HBV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/mL}$ (potek dela za 550 $\mu\text{l}$ ) $[\text{HBV}] < 1,4 \log_{10} \text{ IU/mL}$ (potek dela za 200 $\mu\text{l}$ )	Amplified (Amplificirano) ali Not Amplified (Ni amplificirano)	DNK HBV zaznana pod kvantitativnim območjem
<b>Negative (Negativno)</b>	Not Amplified (Ni amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	DNK HBV ni zaznana
<b>Indeterminate (Nedoločen)</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Ni amplificirano, zaznana napaka sistema, obdelava vzorca končana)		Vsi ciljni rezultati so bili neveljavni; ponovno preskusite vzorec†
<b>No Result (Ni rezultata)*</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Ni amplificirano, zaznana napaka sistema, obdelava vzorca prekinjena)		Obdelava vzorca je bila prekinjena; ponovno preskusite vzorec†
<b>Unresolved (Nerešeno)</b>	Not Amplified, No System Error Detected (Ni amplificirano, ni zaznane napake sistema)		Vsi ciljni rezultati so bili neveljavni; ponovno preskusite vzorec†

\*O zastavici No Result (Ni rezultata) se poroča samo na programski opremi sistema NeuMoDx System z različico 1.8 in novejšo

†Sistem NeuMoDx System je opremljen s samodejno funkcijo Rerun (Ponovni zagon)/Repeat (Ponovitev), ki jo lahko končni uporabnik izbere za zagotovitev, da se IND/UNR/NR rezultat samodejno ponovno obdelata, da se zmanjšajo zamude pri poročanju o rezultatih.

### Testna kalkucija

- Za vzorce znotraj obsega kvantifikacije testa NeuMoDx HBV Quant Assay je koncentracija DNK HBV v vzorcih izračunana z uporabo shranjene standardne krivulje, skupaj s koeficientom kalibracije in volumnom primerka.
  - Koeficient kalibracije je izračunan na podlagi rezultatov kalibratorjev NeuMoDx HBV Calibrator, ki so bili obdelani za vzpostavitev veljavnost standardne krivulje, za posebno serijo testnega traku NeuMoDx HBV Quant Test Strip, na določenem sistemu NeuMoDx System.
  - Koeficient kalibracije se vključi v končno določitev koncentracije DNK HBV.
  - Programska oprema NeuMoDx upošteva vhodni volumen primerka pri določanju koncentracije DNK HBV na ml primerka.
- Rezultati testa NeuMoDx HBV Quant Assay so izraženi v  $\log_{10} \text{ IE/ml}$ .
- Dobljena kvantifikacija neznanih vzorcev je sledljiva do 4. Mednarodnega standarda WHO za mednarodni standard HBV.

### Testna kalibracija

Za kvantifikacijo DNK HBV v primerkih je potrebna veljavna kalibracija, ki temelji na standardni krivulji. Za ustvarjanje veljavnih rezultatov je potrebno dokončati testno kalibracijo z uporabo zunanjih kalibratorjev, ki jih zagotavlja podjetje NeuMoDx Molecular, Inc.

### Kalibratorji

- Z vsako novo serijo NeuMoDx HBV Quant Test Strip je treba obdelati komplet kalibratorjev NeuMoDx HBV Calibrators, če je v NeuMoDx System naložena nova definicijska datoteka testa za HBV Quant Assay, če je trenutnemu kompletu kalibratorjev potekel rok veljavnosti (trenutno nastavljen na 90 dni) ali če je bila programska oprema NeuMoDx System spremenjena.
- Programska oprema NeuMoDx System bo uporabnika obvestila, ko je treba obdelati kalibratorje. Nove serije testnih trakov ni možno uporabiti, dokler kalibratorji niso uspešno obdelani.
- Veljavnost kalibracije je določena na naslednji način:
  - Za določanje veljavnosti mora biti obdelan komplet dveh kalibratorjev – enega (1) visokega in enega (1) nizkega.
  - Vsaj dva (2) od treh (3) ponovljenih vzorcev morata prikazati rezultate znotraj vnaprej določenih parametrov. Nazivna tarča nizkega kalibratorja je  $3,7 \log_{10} \text{ IE/ml}$  in nazivna tarča visokega kalibratorja je  $5,7 \log_{10} \text{ IE/ml}$ .

- c) Kalibracijski koeficient se izračuna tako, da se upošteva pričakovano odstopanje med serijami testnega traku. Ta kalibracijski koeficient se uporablja pri določanju končne koncentracije HBV.
4. Če sta en ali oba kalibratorja neuspešna pri preverjanju veljavnosti, ponovite obdelavo neuspešnega kalibratorja/neuspešnih kalibratorjev z novo vialo. Če en kalibrator ne presteje veljavnosti, je možno ponoviti samo neuspešen kalibrator, saj sistem od uporabnika ne zahteva ponovne izvedbe obeh kalibratorjev.
5. Če kalibrator(-ji) večkrat zaporedoma ne presteje(jo) testa veljavnosti, se obrnite na NeuMoDx Molecular, Inc.

### Nadzor kakovosti

Lokalni predpisi običajno določajo, da je laboratorij odgovoren za nadzorne postopke, ki spremljajo točnost in preciznost celotnega analitičnega postopka, in mora določiti število, vrsto in pogostost preskušanja kontrolnih materialov z uporabo preverjenih specifikacij učinkovitosti za nespremenjen, odobren testni sistem.

### Zunanje kontrole

1. Pozitivne in negativne zunanje kontrole je treba obdelati vsakih 24 ur med testiranjem s testom NeuMoDx HBV Quant Assay. Če komplet veljavnih zunanjih kontrol ne obstaja, bo programska oprema sistema NeuMoDx System uporabnika poznavala, naj obdelava kontrole, preden bo lahko sporočil rezultate vzorca.
2. Veljavnost zunanjih kontrol bo sistem NeuMoDx System ocenil na podlagi pričakovanega rezultata. Pozitivna kontrola bi morala imeti HBV-pozitiven rezultat, negativna kontrola pa HBV-negativen rezultat.
3. Odstopajoče rezultate glede zunanjih kontrol je treba obravnavati na naslednji način:
  - a) Positive (Pozitivno) rezultat testa pri negativnem kontrolnem vzorcu nakazuje težavo s kontaminacijo primerka.
  - b) Negative (Negativno) rezultat testa za pozitivni kontrolni vzorec lahko kaže na težavo z reagentom ali instrumentom.
  - c) V katerem koli od zgornjih primerov ali v primeru rezultata Indeterminate (nedoločen) (IND) ali No Result (brez rezultata) (NR) ponovite zunanjo kontrolo NeuMoDx HBV External Control s svežimi stekleničkami kontrol, ki niso prestale testa veljavnosti.
  - d) Če pozitivna zunanja kontrola NeuMoDx HBV external control še naprej javlja rezultat Negative (negativno), se obrnite na tehnično službo podjetja NeuMoDx.
  - e) Če negativna zunanja kontrola NeuMoDx HBV external control še naprej javlja rezultat Positive (pozitivno), skušajte izločiti vse vire morebitne kontaminacije, vključno z menjavo vseh reagentov, preden se obrnete na službo za stranke podjetja NeuMoDx.

### (Notranje) kontrole obdelave vzorca

Eksogena kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) je vključena v NeuMoDx Extraction Plate ter je z vsakim vzorcem vključena v celotni postopek ekstrakcije nukleinske kisline ter amplifikacije PCR v realnem času. Primerji in šoba, specifični za SPC1, so prav tako vključeni v vsak trak NeuMoDx HBV Quant Test Strip, ki omogoča zaznavanje prisotnosti SPC1, poleg ciljnega DNK HBV (če je prisoten) preko hkratne PCR. Zaznava amplifikacije SPC1 programski opremi sistema NeuMoDx System omogoča nadzor učinkovitosti ekstrakcije DNK in postopka amplifikacije PCR.

### Neveljavni rezultati

Če test NeuMoDx HBV Quant Assay izveden na sistemu NeuMoDx System po zaključku obdelave vzorca ne ustvari veljavnega rezultata, bo na podlagi tipa napake, ki se je pojavila, smatran kot Indeterminate (Nedoločen), No Result (Brez rezultata) (NR) ali Unresolved (Nerešeno) (UNR).

Rezultat IND (Nedoločen) bo javljen, če je med obdelavo vzorca zaznana napaka sistema NeuMoDx System. V primeru, da je sporočen rezultat IND (Nedoločen), je priporočen ponovni test.

Rezultat UNR bo javljen, če ni zaznana nobena veljavna amplifikacija DNK HBV ali SPC1, če systemske napake ne kažejo na morebitno napako reagenta ali prisotnost inhibitorjev. Če je sporočen rezultat UNR, je za prvi korak priporočen ponovni test. Če ponovni test ni uspešen, lahko uporabite razredčen primerek, da ublažite učinke oviranja kateregakoli vzorca.

Če test NeuMoDx HBV Quant Assay, ki se izvaja na sistemu NeuMoDx System ne ustvari veljavnega rezultata in se obdelava vzorca prekine pred zaključkom, bo sporočen kot No Result (brez rezultata) (NR). V primeru, da je sporočen NR (Ni rezultata), je priporočen ponovni test.

## KARAKTERISTIKE DELOVANJA

### Analitična občutljivost – meja zaznave z uporabo standarda WHO

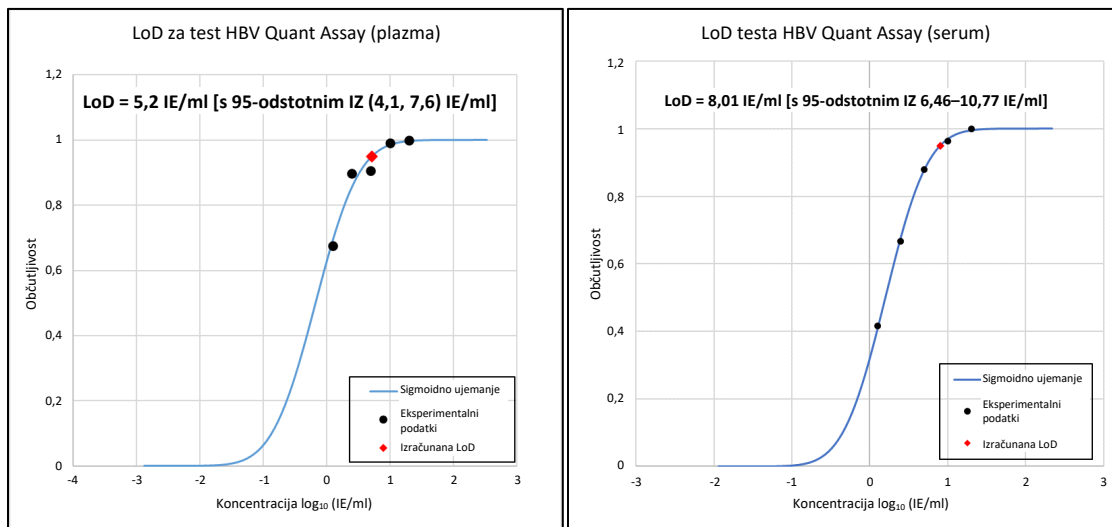
Analitična občutljivost testa NeuMoDx HBV Quant Assay je bila določena s testiranjem negativnih primerkov in razredčenjem serije 4. mednarodnega standarda WHO v presejani negativni človeški plazmi in serumu, za določitev meje zaznave (Limit of Detection, LoD) na sistemih NeuMoDx System. Meja zaznave (Limit of Detection, LoD) je bila definirana kot najnižja ciljna stopnja, zaznana pri stopnji 95 %, kot je bilo določeno z analizo tipa Probit. Študije so bile izvedene v obdobju 3 dni na več sistemih NeuMoDx System z več serijami reagentov NeuMoDx. Izvedena je bila dodatna študija za potrditev LoD testa NeuMoDx HBV Quant Assay pri uporabi poteka dela za primerek z volumnom 200 µl. Stopnje zaznavanja iz obeh študij so prikazane v *preglednici 2*.



Preglednica 2: Pozitivne stopnje zaznavanja za določanje LoD testa NeuMoDx HBV Quant Assay

	Ciljna koncentracija [IE/ml]	Ciljna koncentracija [ $\log_{10}$ IE/ml]	PLAZMA			SERUM		
			Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja	Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja
550 $\mu$ l	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	Ni na voljo	108	0	0 %	107	0	0 %
200 $\mu$ l	25	1,40	43	43	100 %	44	44	100 %

LoD testa NeuMoDx HBV Quant Assay za genotip A HBV (4. mednarodni standard WHO) v plazmi je bil določen na 5,2 IE/ml (95-odstotni interval zaupanja (IZ) 4,1–7,6 IE/ml) [(0,72  $\log_{10}$  IE/ml) (95-odstotni IZ 0,61–0,88  $\log_{10}$  IE/ml)] z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l (slika 2). LoD testa NeuMoDx HBV Quant Assay za primerke seruma je bil določen na 8,0 IE/ml (95-odstotni IZ 6,5–10,8 IE/ml) [(0,9  $\log_{10}$  IE/ml) (95-odstotni IZ 0,8–1,0  $\log_{10}$  IE/ml)] z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l (slika 2).



Slika 2: Analiza stila probit, uporabljena za določanje LoD testa NeuMoDx HBV Quant Assay, Plazma (levo) in Serum (desno)

**Analična občutljivost – kvantifikacijska meja – spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) z uporabo standarda WHO**  
 Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) je definirana kot najnižja ciljna stopnja, pri kateri je dosežena zaznava > 95 % IN kjer je TAE  $\leq$  1,0. Za določanje spodnje meje kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) je bila izračunana skupna analitična napaka (Total Analytical Error, TAE) za vsako od ciljnih stopenj HBV, ki so poročale zaznavo > 95 % kot del izračuna meje zaznave (Limit of Detection, LoD). TAE je opredeljena na naslednji način:

$$\text{TAE} = \text{odstopanje} + 2 \cdot \text{SD} \text{ [Westgard Statistic]}$$

Odstopanje je absolutna vrednost razlike med povprečjem izračunane koncentracije in pričakovano koncentracijo. SD se nanaša na standardno deviacijo kvantificirane vrednosti vzorca.

Zbrani rezultati za 5 ravni primerkov HBV, uporabljenih v študiji LLoQ z uporabo 4. mednarodnega standarda WHO so prikazani v preglednici 3. Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) za 4. mednarodni standard WHO v plazmi z uporabo testa NeuMoDx HBV Quant Assay (potek dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l) je bil določen na 5,5 IE/ml (0,74  $\log_{10}$  IE/ml). Izvedena je bila ločena študija za potrditev LLoQ z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 200  $\mu$ l in ti rezultati so pokazali LLoQ 25 IE/ml, kar je prikazano tudi v preglednici 3.

Ugotovljena LLoQ za test NeuMoDx HBV Quant Assay za primerke seruma je bila 6,0 IE/ml z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l in 25 IE/ml za potek dela z nizkim volumnom primerka (200  $\mu$ l), kot je prikazano v preglednici 3.

**Preglednica 3:** Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) testa NeuMoDx HBV Quant Assay, z odstopanjem in TAE

	Ciljna konc. [IE/ml]	Ciljna konc. [ $\log_{10}$ IE/ml]	Plazma					Serum				
			Povprečna konc. [ $\log_{10}$ IE/ml]	Zaznava (%)	SD	Odstopanje	TAE	Povprečna konc. [ $\log_{10}$ IE/ml]	Zaznava (%)	SD	Odstopanje	TAE
550 $\mu$ l	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 $\mu$ l	25	1,40	1,61	100	0,35	0,21	0,91	1,81	100	0,18	0,41	0,78

#### Analitična občutljivost – LoD in spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) v genotipih HBV

LoD je bil prvotno določen za genotip A (4. mednarodni standard WHO) in nato je bilo izvedeno dodatno testiranje okoli vzpostavljenega LoD, z uporabo vsakega od drugih 7 genotipov. Z uporabo testa NeuMoDx HBV Quant Assay je bilo testiranih šestintrideset (36) replikatov na ravneh, ki ustrezajo 2X, 1X in 0,5X s 95-odstotnim IZ zgornje meje LoD ( $\sim 7$  IE/ml) z uporabo plazme s potekom dela primerka z volumnom 550  $\mu$ l. Pozitivna stopnja odstotkov za vsak genotip na vsakem od teh testiranih stopenj je bila tabulirana in uporabljena pri izračunu LoD z analizo tipa Probit.

Izračunana je bila tudi skupna analitična napaka elektroforeznega tris-acetata (Tris-Acetate-Electrophoresis, TAE) na teh stopnjah. Najnižja stopnja s 95-odstotno pozitivno zaznavo in izračunanim TAE  $\leq 1,0$  je bila ponovno upoštevana kot spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) genotipa. Za vse genotipe je bilo ugotovljeno, da meja zaznavanja testa NeuMoDx HBV Quant Assay za primerke plazmo z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l znaša 6,2 IE/ml (0,79  $\log_{10}$  IE/ml), spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) pa znaša 7,6 IE/ml (0,88  $\log_{10}$  IE/mL), kot je prikazano v preglednici 4.

**Preglednica 4.** Genotipi HBV, testirani v plazmi z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l

GENOTIP	LoD [IE/ml]	Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) [IE/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 podlagi rezultatov teh študij družba NeuMoDx zatrjuje, da znašata **LoD in LLoQ 25 IE/ml (1,4  $\log_{10}$  IE/ml)** za test NeuMoDx HBV Quant Assay v **plazmi in serumu** z uporabo **poteka dela za primerke z volumnom 200  $\mu$ l**.

NeuMoDx zatrjuje, da znašata **LoD in LLoQ 8,0 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml)** za test NeuMoDx HBV Quant Assay v **plazmi in serumu** z uporabo **poteka dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l**.

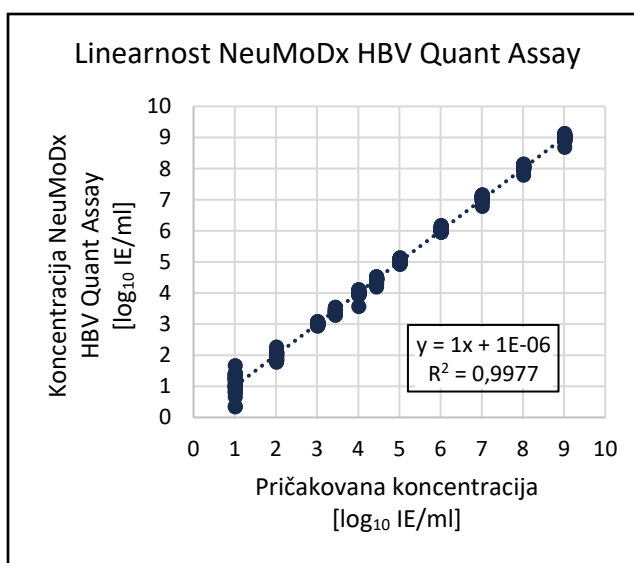
#### Analitična občutljivost – linearnost in določanje zgornje meje kvantifikacije (ULoQ)

Linearnost in zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) testa NeuMoDx HBV Quant Assay sta bili določeni v plazmi s pripravo serij redčenja z uporabo HBV visoko pozitivnih kliničnih vzorcev (Access Biologicals, Vista, CA) z določeno sledljivostjo do 4. mednarodnega standarda WHO. 11-članska plošča je bila pripravljena v združeni HBV-negativni plazmi, s katero je bila ustvarjena plošča za testiranje, ki bi pokrivala razpon koncentracije 9,02–1,02  $\log_{10}$  IE/ml. Plošča za testiranje je bila obdelana s 6 ponovitvami na vsaki ravni v 2 sistemih NeuMoDx System in 3 serijami kritičnih reagentov. Test NeuMoDx HBV Quant Assay je prikazal zmožnost kvantificiranja HBV čez linearni razpon 8  $\log_{10}$  (vključno s kritičnimi točkami zdravniških odločitev) z odklonom  $\pm 0,22$   $\log_{10}$  IE/ml. Pri uporabi 2. in 3. regresije ni bila pridobljena nobena pomembna korist. Zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) je bila z uporabo podatkov iz te študije določena v vrednosti 9,02  $\log_{10}$  IE/ml [preglednica 5 in slika 3].

Preglednica 5: Linearnost NeuMoDx HBV Quant Assay (ovrednoten z genotipom A)

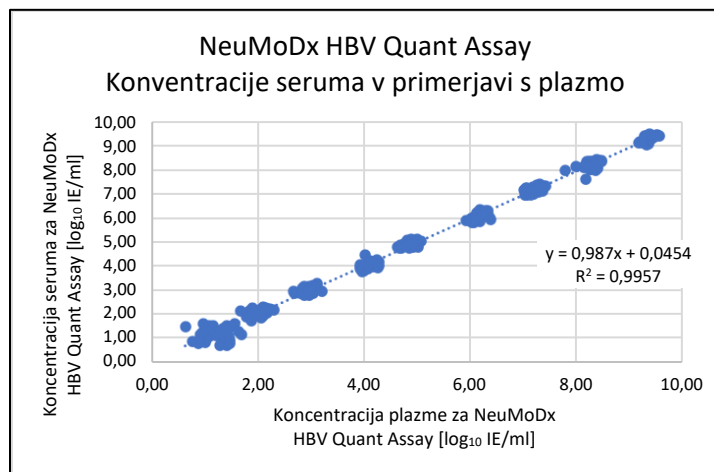
Ciljna konc. (IE/ml)	Ciljna konc. ( $\log_{10}$ IE/ml)	Srednja konc. ( $\log_{10}$ IE/ml)	Standardni odklon	Odstopanje	Predvideno linearno prileganje	Odstopanje od ne-linearne prileganja
1.05E+09	9,02	8,99	0,08	0,06	9,02	-0,04
1.05E+08	8,02	8,05	0,07	0,05	8,02	0,03
1.05E+07	7,02	7,05	0,07	0,06	7,02	0,04
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

\*Bližnje medicinske točke odločanja



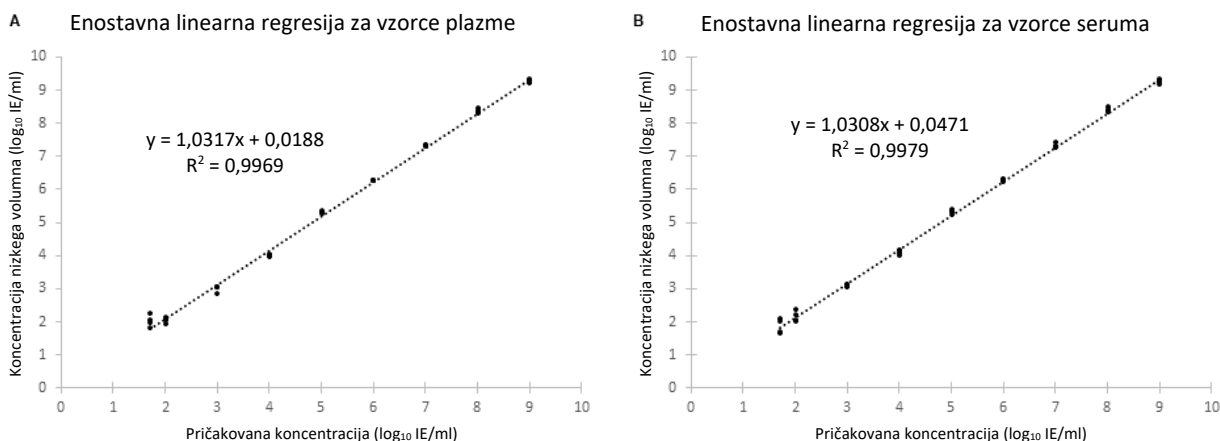
Slika 3: Linearni razpon testa NeuMoDx HBV Quant Assay v plazmi

Izvedena je bila posledična študija za prikaz ekvivalence matrice in analiza, ki primerja kvantitativne rezultate NeuMoDx HBV za vzorce, pripravljene v plazmi in v serumu z uporabo dveh različnih modelov ujemanja regresije, vključno orodji za regresijo MS Excel in Passing-Bablok. Rezultati kažejo močno korelacijo, ki jo predstavlja naklon in vrednosti prestopanja zelo blizu 1,00 in 0,00, ter vrednost  $R^2$  pri 0,99 (orodje za regresijo MS Excel) oziroma vrednost p pri 0,270 (Passing-Bablok). Koncentracije testa HBV Quant Assay, ki jih sporoča sistem NeuMoDx System za matrico plazme, v primerjavi z ustreznimi vzorci seruma, so predstavljene na *sliki 4*.



Slika 4: Linearni razpon testa NeuMoDx HBV Quant Assay med matricami

Linearnost in zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) sta bili potrjeni za potek dela za primerke z volumnom 200 µl v razponu, večjem od 9,31–1,71 log<sub>10</sub> IE/ml. Izvedene so bile primerjave ekvivalentnosti med koncentracijami, o katerih je poročala programska oprema NeuMoDx za potek dela za 200 µl in 550 µl. Analiza regresije Deming in Passing-Bablok je pokazala odlično korelacijo in naklon blizu 1 ter minimalno prestopanje (odstopanje) sporočenih koncentracij za vzorce plazme in seruma v linearnem območju. Primerjava Bland in Altman sporočene koncentracije za poteke dela za primerke z volumnom 200 µl in povprečne zabeležene koncentracije za potek dela za primerke z volumnom 200 µl in 550 µl je pokazala minimalno odstopanje, ki algoritmu, uporabljenemu za ustvarjanje rezultatov iz poteka dela z 200 µl pripisuje natančnost. Poleg tega je preprosta linearna regresija, ki je primerjala pričakovano koncentracijo s sporočeno koncentracijo za potek dela z 200 µl, imela naklon blizu 1, kar je pokazalo odlično korelacijo [slika 5]. Skupaj te primerjave dokazujejo natančno kvantifikacijo HBV v linearnem območju testa NeuMoDx HBV Quant Assay z uporabo poteka dela primerka z volumnom 200 µl.



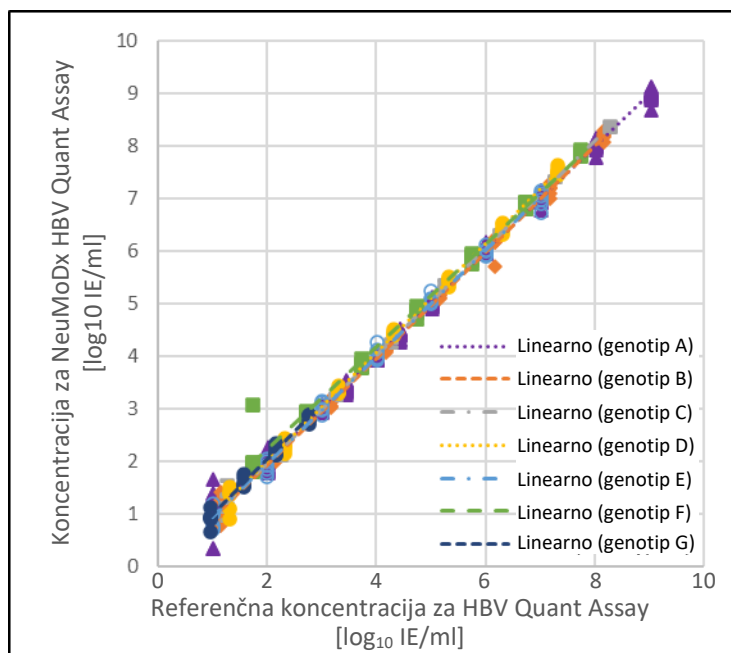
Slika 5: Linearno razmerje med pričakovanimi in sporočenimi koncentracijami NeuMoDx za potek dela z 200 µl v a) plazmi in b) serumu

### Linearnost med genotipi

Linearnost testa NeuMoDx HBV Quant Assay v primerku plazme za genotipe HBV je bila določena s testiranjem vsaj štirih (4) različnih koncentracij vsakega genotipa HBV, pripravljenega v združeni HBV-negativni plazmi. Testirane ravni tarče HBV, uporabljene v tej študiji, so bile odvisne od koncentracije izvornih primerkov in so se zato razlikovale med genotipi. Študija je bila izvedena z vsakim genotipom, na vsaki stopnji je bilo uporabljenih 6 ponovljenih vzorcev. Linearnost med genotipi HBV je predstavljena v preglednici 6 in na sliki 6.

**Preglednica 6:** Linearnost testa NeuMoDx HBV Quant Assay med genotipi

Genotip	Enačba linearnosti y = kvantifikacija NeuMoDx HBV Quant Assay x = pričakovano količinsko določanje	R <sup>2</sup>
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 testa NeuMoDx HBV Quant Assay med genotipi

### Analitična specifičnost in navzkrižna reaktivnost

Analitična specifičnost je bila prikazana s presejanjem 32 organizmov, ki jih za navzkrižno reaktivnost običajno najdemo v primerkih krvi/plazme, kot tudi v vrstah, ki so filogenetsko podobne HBV. Organizmi so bili združeni po 4 in 6 organizmov ter testirani pri visoki koncentraciji. Testirani organizmi so prikazani v *preglednici 7*. Pri nobenem testiranem organizmu ni bila opažena navzkrižna reaktivnost, s čimer je potrjena 100 % analitična specifičnost NeuMoDx HBV Quant Assay.

**Preglednica 7:** Uporabljeni patogeni za prikaz analitične specifičnosti – navzkrižna reaktivnost

Adenovirus 2	Denga V1	Hepatitis A	HPV 16	Ilheus (ILHV)	Rumena mrzlica
Adenovirus 5	Denga V2	Hepatitis C	HPV 18	Influenca A	Virus Zika
Banzi Virus	Denga V3	Človeški herpes virus 6a	HSV1	Parvo B19	
BK virus	Denga V4	Človeški herpesvirus 8	HSV 2	Rubella	
Citomegalovirus	Virus Epstein-Barr	HIV 1	HTLV 1	St. Louis encefalitis	
VZV	Virus vakcinije	HIV 2	HTLV 2	Virus zahodnega Nila	

**Moteče snovi – komezalni organizmi**

Test NeuMoDx HBV Quant Assay je bil ovrednoten glede interference v prisotnosti neciljnih organizmov z uporabo iste skupine organizmov, pripravljenih za testiranje analitične specifičnosti. Organizmi so bili testirani posamezno ali v skupinah 4–6 organizmov v presejani HBV-negativni plazmi ter obogateni s kontrolami HBV pri koncentraciji  $3,7 \log_{10}$  IE/ml. V prisotnosti teh komezalnih organizmov niso opazili nobenih pomembnih interferenc, kar kaže minimalni odklon kvantifikacije od kontrolnih primerkov, ki niso vsebovali motečega agenta [preglednica 8].

**Preglednica 8:** Testiranje interference – komezalni organizmi

Netarčni organizmi	Povprečna konc. ( $\log_{10}$ IE/ml)	Odstopanje ( $\log_{10}$ IE/ml)
Skupina 1 [BK virus, Citomegalovirus, Epstein Barr virus, človeški herpes virus 6a, človeški 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 [Parvo B19, HTLV 1, HTLV 2, Ilheus (ILHV), rumena mrzlica, virus Zika]	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 zahodnega Nila]	3,57	0,03
HAV	3,58	0,05
Banzi virus	3,41	0,19
HIV-1	3,47	0,15
HIV-2	3,56	0,05
Rubella	3,16	0,44
Influenca A	3,60	0,03
HCV	3,58	0,04

**Moteče snovi – endogene in eksogene snovi**

Delovanje traku NeuMoDx HBV Quant Test Strip je bilo ovrednoteno v prisotnosti tipičnih eksogenih in endogenih motečih snovi, s katerimi se srečujemo v primerkih klinične plazme s HBV. Vsebovale so nenavadno visoke stopnje krvnih komponent, pa tudi splošna protivirusna zdravila, ki so razvrščena v *preglednici 9*. Vsaka od spodaj navedenih endogenih in eksogenih snovi v *preglednici 10* je bila dodana presejani HBV-negativni človeški plazmi in obogatena s  $3,7 \log_{10}$  IE/ml HBV, podatki so bili pregledani glede motenj. Poleg tega je bila glede morebitne interference testirana tudi splošna plazma v bolezenskem stanju, povezana z okužbo s hepatitisom B.

**Preglednica 9: Testiranje interference – eksogene snovi (klasifikacije zdravil)**

Skupina	Zdravilo	Klasifikacija
1	Zidovudin (Zidovudine, ZDV)	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Sakvinavir	Inhibitor HIV proteaze
	Ritonavir	Inhibitor HIV proteaze
	Klaritromicin	Antibiotik
	Interferon alfa-2a	Modulator imunosti
	Interferon alfa-2b	Modulator imunosti
2	Abakavir sulfat	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Amprenavir	Inhibitor proteaze
	Ribavirin	Modulator imunosti
	Entekavir	Protivirusno zdravilo za HBV
	Fluoksetin	Antidepresiv SSRI
	Valaciklovir hidroklorid	Protivirusno zdravilo
3	Tenofovir dizoproksil	Protivirusno zdravilo za HBV/HIV
	Lamivudin	Protivirusno zdravilo za HBV/HIV
	Ganciklovir	Protivirusno zdravilo za CMV
	Valganciklovir	Protivirusno zdravilo za CMV
	Nevirapin	Inhibitor reverzne transkriptaze
4	Efavirenz	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Lopinavir	Inhibitor proteaze
	Enfuvirtid	Inhibitor fuzije HIV
	Ciprofloksacin	Antibiotik
	Paroksetin	Antidepresiv SSRI
5	Adefovir (dipivoksil)	Protivirusno zdravilo
	Azitromicin	Antibiotik
	Indinavir sulfat	Inhibitor HIV proteaze
	Sertralin	Antidepresiv SSRI

**Preglednica 10:** Testiranje interference – eksogeni in endogeni agenti

Endogena	Povprečna konc. (log <sub>10</sub> IE/ml)	Odstopanje (log <sub>10</sub> IE/ml)
Hemoglobin	3,50	0,20
Trigliceridi	3,51	0,09
Bilirubin	3,56	0,13
Albumin	3,51	0,17
Eksogena (zdravila)	Povprečna konc. (log <sub>10</sub> IE/ml)	Odstopanje (log <sub>10</sub> IE/ml)
Skupina 1: Zidovudin (Zidovudine, ZDV), Sakvinavir, Ritonavir, Klaritromicin, Interferon alfa-2a, Interferon alfa-2b	3,58	0,08
Skupina 2: Abakavir sulfat, Amprenavir, Ribavirin, Entekavir, Fluoksetin, Valaciklovir hidroklorid	3,56	0,04
Skupina 3: Tenofovir dizoproksil, Lamivudin, Ganciklovir, Valganciklovir, Nevirapin	3,59	0,06
Skupina 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtid, Cipprofloksacin, Paroksetin,	3,60	0,07
Skupina 5: Adefovir (dipivoksil), Azitromicin, Indinavir sulfat, Sertralin	3,56	0,19
Stanje bolezni	Povprečna konc. (log <sub>10</sub> IE/ml)	Odstopanje (log <sub>10</sub> IE/ml)
Antinuklearno protitelo (Antinuclear Antibody, ANA)	3,61	0,10
Sistemiški eritematozni lupus (SLE)	3,63	0,10
Revmatoidni artritis (RA)	3,57	0,09
Protitelesa HCV	3,58	0,07
Protitelesa HBV	3,64	0,11
Alkoholna ciroza	3,68	0,15
Revmatoidni faktor (RF)	3,63	0,10
Nealkoholni steatohepatitis (NASH)	3,49	0,06

**Natančnost znotraj laboratorija**

Natančnost za NeuMoDx HBV Quant Test Strip je bila določena s testiranjem 8-članske plošče primerkov HBV z genotipi A in C ter z uporabo treh sistemov NeuMoDx System v obdobju 12 dni. Opredeljena je bila natančnost znotraj izvedbe, znotraj dneva in znotraj sistema, skupni standardni odklon pa je bil določen pri  $\leq 0,22 \log_{10}$  IE/ml. Natančnost med upravljavci ni bila določena, saj upravljavec ne igra pomembne vloge pri obdelavi vzorcev z uporabo sistema NeuMoDx System. Rezultati natančnosti znotraj laboratorija so predstavljeni v *preglednici 11*.

**Preglednica 11:** Rezultati študije natančnosti v laboratoriju

ČLAN PLOŠČE	CILJNA KONC. [log <sub>10</sub> IE/ml]	SREDNJA KONC. [log <sub>10</sub> IE/ml]	N	Odstopanje	SD znotraj izvajanja	SD znotraj dneva	SD znotraj sistema	Skupna 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



### Ponovljivost med serijami

Ponovljivost med serijami testa NeuMoDx HBV Quant Test Strip je bila določena s tremi različnimi serijami ključnih reagentov – NeuMoDx Lysis Buffer 1, NeuMoDx Extraction Plate in NeuMoDx HBV Quant Test Strip. Za vrednotenje delovanja je bila uporabljena 8-članska plošča HBV genotipov A in C. Testiranje se je izvedlo s tremi serijami reagentov na treh sistemih NeuMoDx System v obdobju 6 dni. Analizirana je bila variacija znotraj in med serijami. Maksimalno celotno odstopanje je znašalo 0,12 log<sub>10</sub> IE/ml in maksimalna skupna SD je bila 0,24 log<sub>10</sub> IE/ml. Pomembne razlike pri delovanju med serijami niso bile odkrite, saj je bila kvantifikacija vseh članov plošče znotraj obsega specifikacije tolerance. Rezultati ponovljivost med serijami so predstavljeni v nadaljevanju v preglednici 12.

Preglednica 12: Rezultati študije ponovljivosti med serijami

ČLAN PLOŠČE	CILJNA KONC. [log <sub>10</sub> IE/ml]	SREDNJA KONC. [log <sub>10</sub> IE/ml]	N	Odstopanje	Znotraj SERIJE SD	Med SERIJAMI SD	Skupna 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 SPC1, vključene v NeuMoDx HBV Quant Assay za poročanje glede napak v kateremkoli koraku ali glede inhibicije, ki bi vplivala na delovanje NeuMoDx HBV Quant Assay, je bila ocenjena z uporabo dveh splošnih genotipov HBV (A in C). Testirani pogoji predstavljajo kritične napake pri procesnih korakih, ki bi se lahko pojavili med obdelavo vzorcev in jih *morda ni možno zaznati* z delovanjem nadzornih senzorjev NeuMoDx System. Učinkovitost SPC1 je bila ocenjena s simulacijo pogojev s takšnimi napakami. Neučinkovitosti v procesu, ki so negativno vplivale na zaznavanje/kvantifikacijo HBV, so bile prezrcaljene z delovanjem tarče SPC1 (prisotnost inhibitorja in izostanek koraka pranja). Za pogoje, pod katerimi amplifikacija SPC1 ni bila prizadeta, je tarča HBV prav tako pokazala amplifikacijo znotraj navedene kvantifikacije 0,2 log<sub>10</sub> IE/ml v kontrolnih vzorcih.

Preglednica 13: Učinkovitost kontrole obdelave vzorca

Testirana napaka koraka postopka	Status amplifikacije kontrole obdelave vzorcev	Status amplifikacije tarče HBV	Rezultat testa
Presence of Inhibitor (Prisotnost inhibitorja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Delivered (Brez izpiranja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Blowout (Brez izpihanja po izpiranju)	Amplified (Amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	Positive (Pozitivno) s kvantifikacijo znotraj 0,2 log <sub>10</sub> IE/ml kontrole

### Navzkrižna kontaminacija

Stopnja navzkrižne kontaminacije NeuMoDx HBV Quant Assay je bila določena s testiranjem treh sklopov primerkov s HBV, kjer so se visoko pozitivni in visoko negativni primerki izmenjevali. Skupno je to vključevalo testiranje 144 ponovljenih vzorcev normalnih, HBV-negativnih človeških vzorcev plazme EDTA in 144 ponovljenih vzorcev primerkov HBV z visokim titrom pri 8,0 log<sub>10</sub> IE/ml. Vseh 144 ponovljenih vzorcev negativnega primerka je bilo določenih kot negativnih, kar prikazuje, da se med obdelavo vzorca na NeuMoDx System navzkrižna kontaminacija ni pojavila.

### Ekvivalenca matrice primerka

Testiranje je bilo izvedeno za prikaz enakovrednih rezultatov s primerki plazme, zbranimi tako v epruvetah z etilendiamin tetraacetno kislino (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) kot z kislinsko citratno dekstrozo (Acid Citrate Dextrose, ACD). Poleg tega so bila opravljena testiranja za prikaz ekvivalence med svežimi in zamrznjenimi primerki. Štirideset posameznih primerkov darovalcev, pridobljenih iz BioIVT, je bilo zbranih v epruvete EDTA in ACD. Ti sveži vzorci so bili obogaten s štirimi stopnjami genotipa A ali C HBV in testirani glede ekvivalence. Nato so bili vzorci zamrznjeni najmanj 24 ur, oddaljeni in ponovno testirani. Z analizo regresije smo med svežimi in zamrznjenimi primerki ter vzorci EDTA in ACD pokazali odlično ekvivalenco.

**Preglednica 14:** Analiza regresije rezultatov ekvivalence primerkov

Parameter [kriterij sprejemljivosti]	Sveže proti zamrznjenemu	ACD proti K2EDTA
Naklon [0,9-1,1]	1,002	0,996
Prestrežanje [<0.5]	-0,031	0,018
Koefficient določanja [ $R^2 > 0,95$ ]	0,995	0,993

Dodatno testiranje je bilo izvedeno, da se dokaže ekvivalenco uspešnosti testa NeuMoDx HBV Quant Assay z uporabo primerkov v prvotnih in sekundarnih epruvetah za zbiranje. Plošče HBV-negativnih primerkov darovalcev, obogatene s tarčo HBV (AccuPlex™ HBV Control), so bile najprej obdelane iz prvotnih epruvet s primerki. Preostala plazma iz vsakega primerka je bila razdeljena v sekundarno epruveto s primerkom in ponovno obdelana. Pri ugotovljenih rezultatih med obdelavo prvotne in sekundarne epruvete s primerkom ni bilo ugotovljene bistvene razlike.

Ekvivalenca uspešnosti testa NeuMoDx HBV Quant Assay pri primerkih svežega in zamrznjenega seruma je bila ovrednotena tudi s pomočjo plošče posameznih vzorcev svežega seruma darovalcev, obogatene s HBV, v koncentracijah, ki so zajemale linearni obseg testa. Po obdelavi svežih primerkov so bili vzorci seruma zamrznjeni vsaj 24 ur pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nato so bili zamrznjeni vzorci odtaljeni in ponovno testirani. Linearno ekvivalenco med enakimi svežimi in zamrznjenimi vzorci smo ocenili z uporabo Analize regresije Passing-Bablok in Deming. P-vrednost regresije Passing-Bablok 0,329 (večja kot 0,05) in koeficient korelacije regresije Deming 0,989 kaže odlično ekvivalenco med vzorci, ki so bili obdelani sveži in tistimi, ki so bili prej zamrznjeni. S primerjavo Bland-Altman je bilo ugotovljeno, da je odstopanje med svežim in zamrznjenim stanjem izjemno zanemarljivo - 0,002  $\log_{10}$  IE/ml in še bolj dokazuje ekvivalenco obdelave svežih primerkov, v primerjavi s tistimi, ki so bili zamrznjeni. Prav tako je bila korelacija med koncentracijami HBV, o katerih poroča sistem, in pričakovanimi koncentracijami tako za sveže kot za zamrznjene vzorce določena s preprosto linearno regresijo s prijavljenimi vrednostmi  $R^2$  0,991 oziroma 0,985.

#### Stabilnost primerka

HBV-negativni primerki plazme in seruma EDTA so bili obogateni s HBV pri  $3,7 \log_{10}$  IE/ml in testirani v različnih časovnih točkah, medtem ko so bili shranjeni v sistemu NeuMoDx System – takoj (čas 0), po 4 urah, po 8 urah in po 24 urah. V časovnih točkah niso opazili nobene pomembne razlike v učinkovitosti, kar kaže na to, da je primerk mogoče v sistem NeuMoDx System naložiti za do 24 ur, ne da bi to vplivalo na učinkovitost testa.

Podobno testiranje je bilo izvedeno tudi s primerki plazme in seruma, ki so bili shranjeni v hladilniku laboratorija (med  $2$  do  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) do 7 dni pred testiranjem, kjer prav tako ni bila zaznana razlika pri delovanju.

Na koncu so bili testirani primerki, shranjeni pri  $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do 6 mesecev (plazma) in do 4 mesece (serum) pred obdelavo, kjer prav tako ni bila zaznana značilna razlika v primerjavi s svežimi primerki. Cikel zamrzovanja in odtajanja je bil ponovljen ponovno ter ni prikazal sprememb pri učinkovitosti po 2 ciklih zamrzovanja/odtajanja (plazma) ali 4 ciklih zamrzovanja/odtajanja (serum).

#### Korelacija metode

##### Primerki plazme

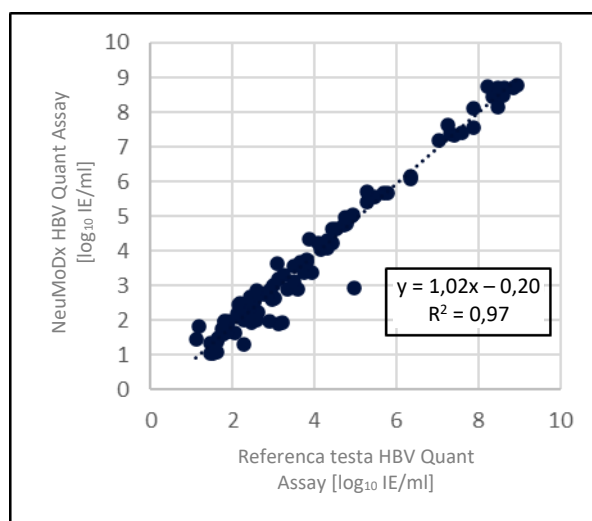
Kvalitativno in kvantitativno delovanje testa NeuMoDx HBV Quant Assay je bilo ocenjeno s primerjalnimi testi, odobrenimi s strani FDA/CE, kjer so bili testirani nerazredčeni klinični primerki plazme pacientov, okuženih s HBV. Testiranje je bilo izvedeno interno v podjetju NeuMoDx z enojno slepo študijo in uporabo kliničnih primerkov, pridobljenih iz treh neodvisnih referenčnih laboratorijev. Rezultati skupno 308 HBV-pozitivnih in negativnih vzorcev so bili zbrani v kvalitativni analizi za izračun klinične občutljivosti in specifičnosti testa NeuMoDx HBV Quant Assay. Kvalitativna analiza je bila dokončana vključujoč in izključujoč pozitivne vzorce pod spodnjo mejo kvantifikacije (lower limit of quantitation, LLoQ), saj lahko klasifikacija takih vzorcev z nizko vrednostjo variira med testi. Za ustvarjanje linearne regresije pri določanju kvantitativnega delovanja je bilo uporabljenih 97 HBV-pozitivnih kliničnih primerkov znotraj linearnega razpona, skupnega obema testoma. Poleg zagotavljanja odlične občutljivosti in specifičnosti je testni trak NeuMoDx HBV Quant Test Strip prikazal odlično kvantitativno korelacijo s komparativnim testom. Na podlagi teh rezultatov je bila občutljivost testa NeuMoDx HBV Quant Assay ocenjena na 100 % (IZ 96,4 %–100 %) in specifičnost je bila ocenjena na 95,6 % (IZ 91,9 %–97,7 %). Ti 95 % intervali zaupanja so bili izračunani z uporabo metode rezultata intervala zaupanja pri 95 % za EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance, odobrena smernica, Vol 28, št. 3.<sup>6</sup>

**Preglednica 15:** Klinična občutljivost in metrika občutljivosti testa NeuMoDx HBV Quant Assay za primerke plazme na sistemu NeuMoDx 288 Molecular System

	Referenčni test (POZ)	Referenčni test (NEG)	SKUPAJ
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	103	9	112
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
SKUPAJ	103	205	308
<b>OBČUTLJIVOST = 100 % IZ 95 % (96,4 %–100 %)</b> <b>SPECIFIČNOST = 95,6 % IZ 95 % (91,9 %–97,7 %)</b>			

**Preglednica 16:** Klinična občutljivost in metrika specifičnosti testa NeuMoDx HBV Quant Assay na molekularnem sistemu NeuMoDx 288 Molecular System z izključenimi vzorci plazme <spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

	Referenčni test (POZ)	Referenčni test (NEG)	SKUPAJ
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	99	5	104
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
SKUPAJ	99	201	300
<b>OBČUTLJIVOST = 100 % IZ 95 % (96,3 %–100 %)</b> <b>SPECIFIČNOST = 97,5 % IZ 95 % (94,3 %–98,9 %)</b>			



**Slika 7:** Korelacijska študija kvantitativne metode z uporabo NeuMoDx HBV Quant Assay

Izvedeno je bilo dodatno testiranje na molekularnem sistemu NeuMoDx 96 Molecular System, uporabljenih je bilo 159 preostalih primerkov klinične plazme. Kot pri predhodno izvedenem testiranju na NeuMoDx 288, so bili tudi rezultati, pridobljeni iz NeuMoDx 96, primerjani z rezultati, ki so jih objavili pri testih z oznakama FDA in/ali CE, in uporabili v laboratorijih s testiranjem standarda nege. Rezultati, vključno s tabelo resnice s klinično občutljivostjo in specifičnostjo so predstavljeni s 95-odstotnim IZ v *preglednici 17*.

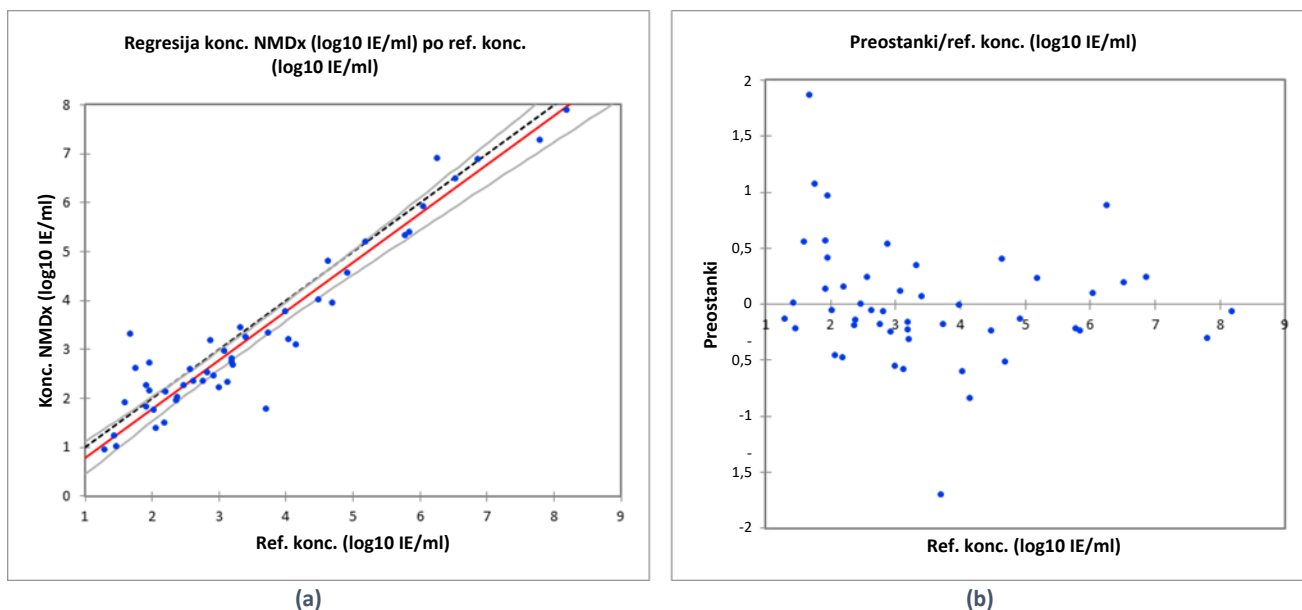
**Preglednica 17:** Povzetek kliničnega delovanja – test NeuMoDx HBV Quant Assay na sistemu NeuMoDx 96 Molecular System

	Referenčni test (POZ)	Referenčni test (NEG)	SKUPAJ
<b>NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)</b>	60	2	62
<b>NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)</b>	1	95	96
<b>SKUPAJ</b>	61	97	158
<b>OBČUTLJIVOST = 98 % IZ 95 % (90 %–100 %)</b> <b>SPECIFIČNOST = 98 % IZ 95 % (92 %–100 %)</b>			

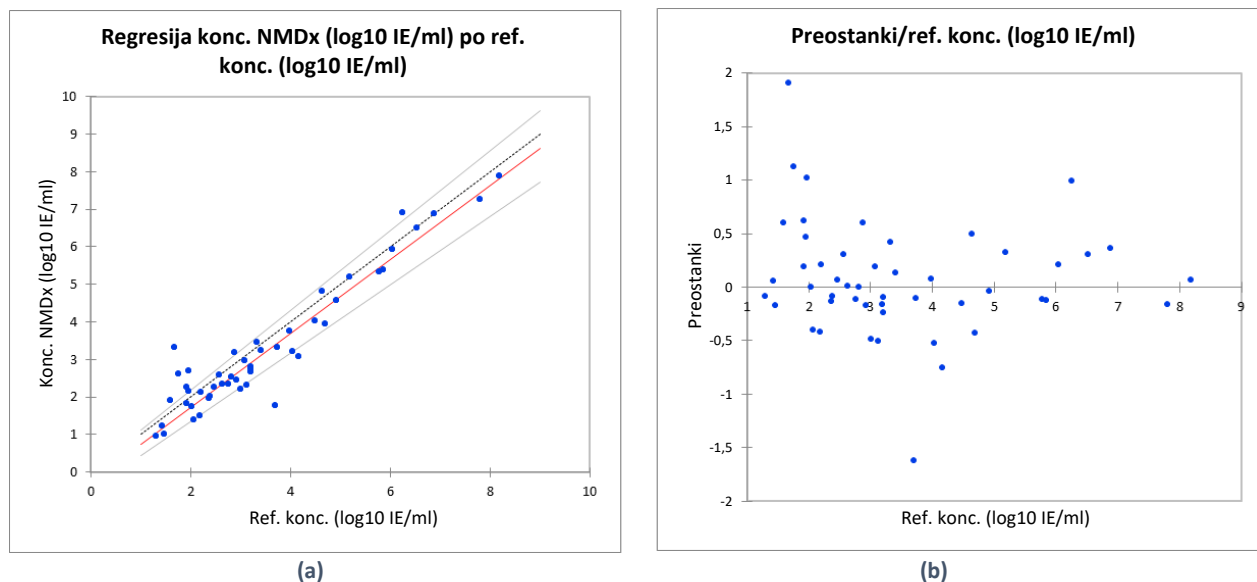
### Primerki seruma

Kvantitativno delovanje testa NeuMoDx HBV Quant Assay je bilo ocenjeno v primerjavi s primerjalnimi testi, odobrenimi s strani FDA/CE, kjer so bili testirani de-identificirani, preostali HBV-pozitivni primerki seruma pacientov, okuženih s HBV. Skupno 66 klinično znanih HBV-pozitivnih primerkov seruma, pridobljenih iz dveh neodvisnih referenčnih laboratorijev, je bilo testiranih z uporabo testa NeuMoDx HBV Quant Assay, interno v NeuMoDx. Od znanih pozitivnih testiranih primerkov seruma je bilo 58 ugotovljenih kot pozitivni rezultat, od tega je bilo devet (9) rezultatov pod LLoQ in nad ULoQ za test NeuMoDx HBV Quant Assay in/ali referenčni test. Za ustvarjanje analiz regresije pri določanju kvantitativnega delovanja je bilo uporabljenih 49 HBV-pozitivnih kliničnih primerkov znotraj linearnega razpona, skupnega obema testoma.

Grafični prikazi ekvivalence in ostanka so bili ustvarjeni za predstavitev korelacije med koncentracijami testa NeuMoDx HBV Quant Assay in referenčnimi testnimi vrednostmi koncentracije za vse vzorce, testirane z uporabo ujemanja z analizo regresije Deming in Passing-Bablok ter so predstavljeni na slikah 8 in 9. Kakovost ujemanja regresije Deming je prikazana s koeficientom naklona 0,99, z IZ 95 % (0,93, 1,07) in prestopanjem (odstopanje) -0,22 s 95-odstotnim IZ (-0,56, 0,12), kar prikazuje, da imajo dobljeni rezultati koncentracije med testom NeuMoDx HBV Quant Assay in referenčnimi testi visoko korelacijo ter sprejemljivo odstopanje. Kakovost linearnega ujemanja Passing-Bablok je prikazano s koeficientom naklona 0,99 z IZ 95 % (0,91, 1,06) in prestopanjem (odstopanjem) -0,25 z IZ 95 % (-0,48, 0,06), kar prikazuje, da imajo rezultati koncentracije, pridobljene med testom NeuMoDx HBV Quant Assay in referenčnimi testi visoko korelacijo in sprejemljivo odstopanje, kot je prikazano v *preglednici 18*.



**Slika 8:** Grafični prikazi za ekvivalentnost (a) in preostanke (b) – kumulativna analiza rezultatov testa NeuMoDx HBV Test v primerjavi z referenčnimi testi – analiza Deminga.



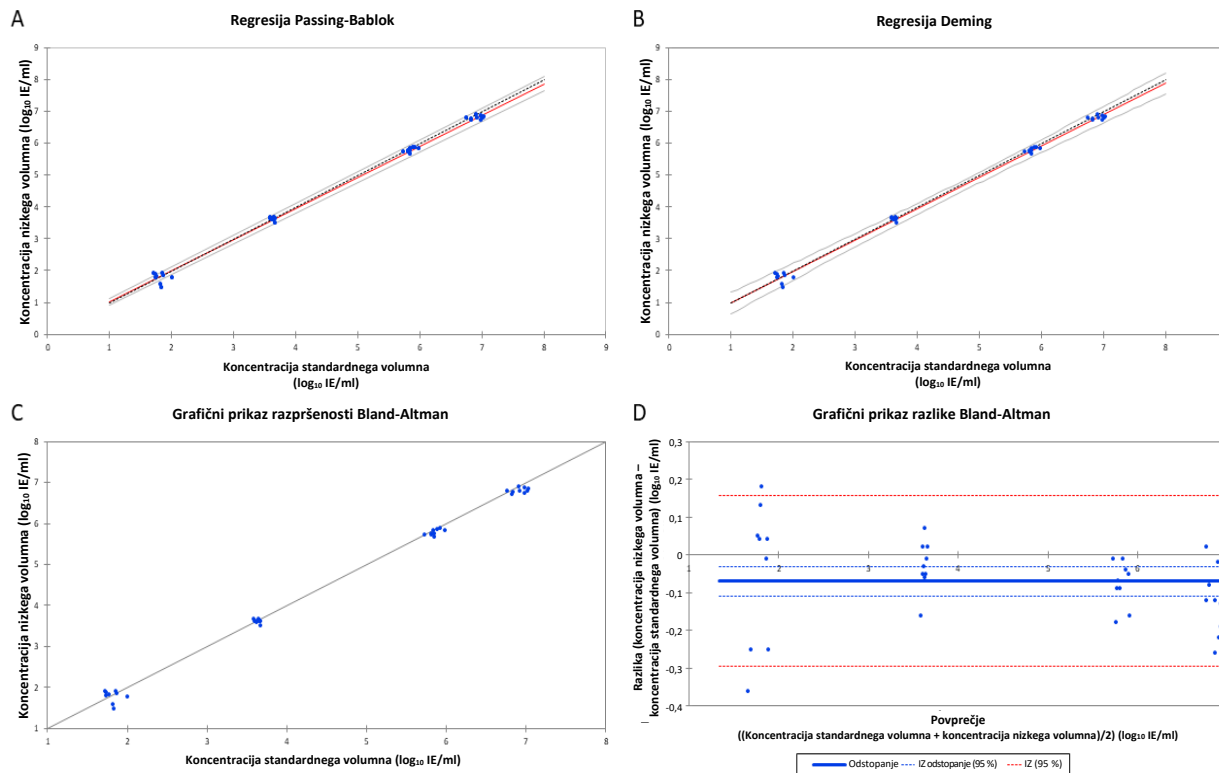
Slika 9: Grafični prikazi za ekvivalentnost (a) in preostanke (b) – kumulativna analiza rezultatov testa NeuMoDx HBV Quant Assay v primerjavi z referenčnimi testi – analiza Passing-Bablok.

Preglednica 18. Povzetek analize linearne regresije Deming in Passing-Bablok za primerke seruma

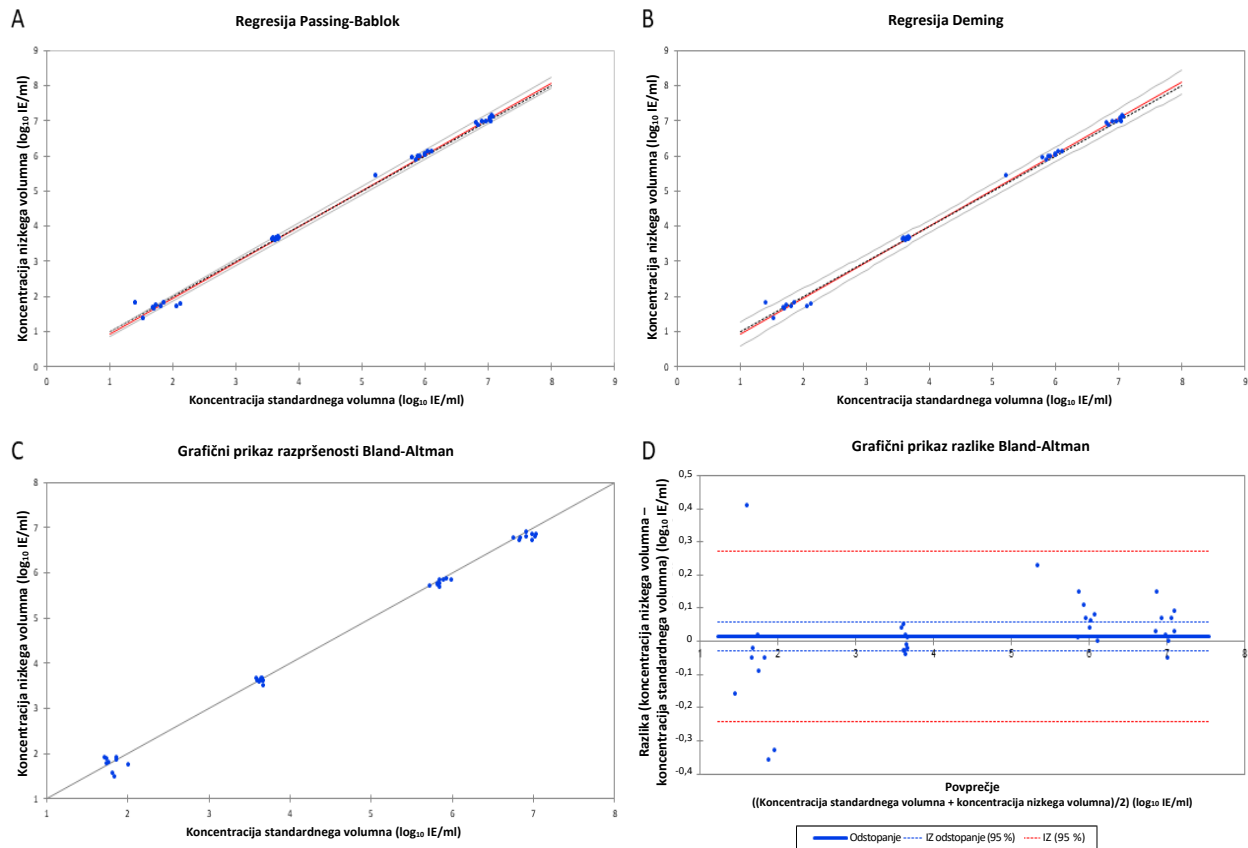
Demingova analiza			Analiza Passing-Bablok		
Prestrezanje	Koeficient naklona	R2	Prestrezanje	Koeficient naklona	p-vrednost
-0,22 95 % IZ (-0,56, 0,12)	0,99 95 % IZ (0,93, 1,07)	0,95	-0,25 95 % IZ (-0,48, 0,06)	0,99 95 % IZ (0,91, 1,06)	0,89

### Testiranje pripravljenih primerkov – potek dela za primerke z volumnom 200 µl

Kvantitativna korelacija med poteki del primerkov s prostornino 200 µl in 550 µl je bila potrjena z uporabo plošče, sestavljene iz posameznih, HBV-negativnih vzorcev plazme in seruma, ki so bili obogateni s štirimi znanimi nivoji kontrolnega materiala HBV, in je sledljiva do 4. Mednarodnega standarda WHO za DNK HBV za teste nukleinske kisline. Ti posamezni primerki plazme in seruma so bili obdelani z uporabo potekov dela primerkov z volumnom 550 µl in 200 µl za skupno 288 opravljenih testov. Primerjave ekvivalence med koncentracijami, o katerih je poročala programska oprema NeuMoDx za poteke dela za primerke z volumnom 200 µl in 550 µl z izdelano ploščo, so bile izvedene na podlagi posameznega vzorca. Analiza regresije Deming in Passing-Bablok imela naklon 0,985 in 0,998 s prestrežanjem -0,001 in 0,053 v plazmi ter 1,024 in 1,018 s prestrežanjem 0,095 in 0,070 v serumu, kar kaže na odlično skladnost kvantifikacij HBV med obdelovanjem obeh volumnov. Primerjava Bland-Altman je pokazala minimalno odstopanje med obema potekoma dela. Poleg tega so enostavne linearne analize regresije s pričakovano koncentracijo in sporočeno koncentracijo za potek dela z 200 µl imele naklon 1,047 in korelacijski koeficient 0,998 (plazma) ter 1,113 in 0,992 (serum), kar še dodatno podpira odlično delovanje z uporabo poteka dela primerka z volumnom 200 µl za test NeuMoDx HBV Quant Assay. Rezultati teh študij so povzeti v nadaljevanju na *sliki 10* in *sliki 11*.



**Slika 10:** Grafični prikaz ekvivalence primerjave sporočenih koncentracij z nizkim volumnom in sporočenih koncentracij s standardnim volumnom primerka. A) Regresija Passing-Bablok. B) Regresija Deming. C) Grafični prikaz razpršenosti Bland-Altman D) Grafični prikaz razlike Bland-Altman – primerki plazme



**Slika 11:** Grafični prikaz ekvivalence primerjave sporočenih koncentracij z nizkim volumnom in sporočenih koncentracij s standardnim volumnom primerka. A) Regresija Passing-Bablok. B) Regresija Deming. C) Grafični prikaz razpršenosti Bland-Altman D) Grafični prikaz razlike Bland-Altman – primerki 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, 5<sup>th</sup> edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5<sup>th</sup> 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.

### BLAGOVNE ZNAMKE

NeuMoDx™ je blagovna znamka družbe NeuMoDx Molecular, Inc.  
 NeuDry™ je blagovna znamka družbe NeuMoDx Molecular, Inc.  
 TaqMan® je registrirana blagovna znamka družbe Roche Molecular Systems, Inc.

Vsa druga imena proizvodov, blagovnih znamk in registriranih blagovnih znamk, ki se morda pojavijo v tem dokumentu, so last njihovih zadevnih lastnikov.

### POMEN SIMBOLOV

**R only** Samo na recept



Proizvajalec



Diagnostični medicinski pripomoček *in vitro*



Pooblaščen predstavniki v Evropski skupnosti



Kataloška številka



Koda serije



Rok uporabnosti



Temperaturna meja



Ne uporabljajte ponovno



Vsebuje zadostno količino za <n> testov



Glejte navodila za uporabo



Pozor



Biološka tveganja

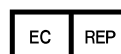


Oznaka CE



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

Sponsor (AUS):  
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

**CE** 2797

Tehnična podpora/poročanje v okviru vigilance: [support@qiagen.com](mailto:support@qiagen.com)

Patent: [www.neumodx.com/patents](http://www.neumodx.com/patents)