

REF 300901 NeuMoDx™ FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip

Rx only

UPOZORNĚNÍ: Pouze pro export do USA

IVD Pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System



Elektronická verze je k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com/neumodx-ifu

Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 288 Molecular System, výr. č. 40600108.

Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 96 Molecular System, výr. č. 40600317.

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je multiplexovaný diagnostický *in vitro* test RT-PCR v reálném čase určený k současně kvalitativní detekci a rozlišení RNA viru chřipky A (Flu A), viru chřipky B (Flu B), respiračního syncytiálního viru (Respiratory Syncytial Virus, RSV) a viru SARS-CoV-2 ze vzorků nazofaryngeálního stěru (nasopharyngeal, NP) odebraných do přepravního média od osob se známými a příznaky onemocnění podobného chřipce (Influenza like illness, ILI).

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay, prováděná na molekulární soustavě NeuMoDx 288 Molecular System a na molekulární soustavě NeuMoDx 96 Molecular System, zahrnuje automatickou extrakci RNA k izolaci cílových nukleových kyselin ze vzorku a RT-PCR v reálném čase zacílenou na jednu konzervovanou oblast pro viry Flu A a RSV a dvě konzervované oblasti pro viry SARS-CoV-2 a Flu B.

Výsledky tohoto testu by se neměly používat jako jediný podklad pro diagnostiku a ošetření pacientů či jiná rozhodnutí ohledně léčby pacientů. Pozitivní výsledek svědčí o přítomnosti RNA viru SARS-CoV-2 a/nebo Flu A a/nebo Flu B a/nebo RSV, ale nevylučují bakteriální infekci nebo koinfekci s dalšími viry. Ke stanovení stavu infekce pacienta je nutná klinická korelace s anamnézou pacienta a dalšími diagnostickými informacemi.

Negativní výsledky infekci virem Flu A, Flu B, RSV či SARS-CoV-2 nevylučují a neměly by se používat jako jediný podklad pro diagnostiku a ošetření pacientů či jiná rozhodnutí ohledně léčby pacientů. Negativní výsledky musejí být kombinovány s klinickým pozorováním, anamnézou pacienta a/nebo epidemiologickými informacemi.

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je určena k použití vyškoleným personálem klinické laboratoře, který je speciálně poučen a vyškolen v technikách RT-PCR v reálném čase diagnostických postupech *in vitro* a/nebo molekulárních soustavách NeuMoDx Molecular System. Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay není určena pro samotestování ani pro použití v místě péče.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je kvalitativní analýza pro použití na přístrojových systémech NeuMoDx 96 a NeuMoDx 288 k detekci RNA viru SARS-CoV-2, chřipky A, chřipky B a/nebo RSV ve vzorcích nazofaryngeálního stěru. Analýza nerozlišuje mezi RNA viru RSV A a RSV B. Vzorky nazofaryngeálních stěrů jsou odebírány do přepravního média Copan Universal Transport Medium (UTM-RT®) (Copan UTM-RT, Copan, CA, USA) nebo BD™ Universal Viral Transport System (UVT) (BD™ UVT, BD, NJ, USA). Test používá interní kontrolu zpracování vzorků RNA (Sample Process Control, SPC2), která je začleněna během přípravy vzorku a slouží k monitorování celého procesu přípravy vzorku, reverzní transkripce a amplifikace PCR. Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay umožňuje až dva pracovní postupy zpracování vzorků podle potřeb laboratoře, a to přímý pracovní postup a pracovní postup s předúpravou. Molekulární soustava NeuMoDx Molecular System automaticky provede všechny kroky nezbytné k extrakci cílových nukleových kyselin; připraví izolovanou RNA pro polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí v reálném čase (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR); a pokud jsou přítomny, reverzně transkribuje, amplifikuje a detekuje produkty amplifikace. Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je zacílena na konzervované oblasti genů Nsp2 a O-ribózy-metyltransferázy viru SARS-CoV-2, oblastí v matrixovém proteinu viru chřipky A a respiračního syncytiálního viru a geny matrixového proteinu a nestrukturálního proteinu NS1 viru chřipky B.

PRINCIPY POSTUPU

Současný stav techniky pro detekci akutní infekce virem FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 spočívá v amplifikaci nukleových kyselin v konzervovaných oblastech genomu cílového viru, což je v souladu s PCR s reverzní transkripcí v reálném čase, kterou používá analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay, prováděná na molekulární soustavě NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System.

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay v sobě spojuje automatickou extrakci RNA a amplifikaci/detekci RNA viru SARS-CoV-2, Flu A, Flu B a/nebo RSV pomocí RT-PCR v reálném čase. Vzorky nazofaryngeálních stěrů jsou odebírány do systémů přepravních médií Copan UTM-RT System nebo BD™ UVT System. Přímý pracovní postup umožňuje u primární odběrové zkumavky s tampónem nebo alikvotního podílu přepravního média v sekundární zkumavce odečíst čárový kód a vložit je do soustavy NeuMoDx System pro zpracování. Alternativně lze vzorek stěru v přepravním médiu nejprve upravit se stejným objemem pufru NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) a poté jej vložit do soustavy bez dalšího zásahu uživatele. U přímého pracovního postupu soustava NeuMoDx System automaticky nasaje alikvotní podíl vzorku a smíchá jej s pufrům NeuMoDx Lysis Buffer 3, případně soustava nasaje alikvotní podíl předupraveného vzorku a smíchá jej s pufrům Lysis Buffer 2 a reagensy obsaženými na extrakční destičce NeuMoDx Extraction Plate. Poté je zahájeno zpracování. Konkrétně jsou při použití přímého pracovního postupu primární odběrová zkumavka (s vyjmutým tampónem a sejmutým víčkem) nebo alikvotní podíl vzorku média v sekundární zkumavce označeny čárovým kódem a vloženy do soustavy NeuMoDx System pomocí určeného stojanu na zkumavku se vzorkem. U pracovního postupu s předúpravou se vzorek v přepravním médiu před vložením do soustavy nejprve ošetří stejným objemem pufru NeuMoDx VVLB. Při přímém pracovním postupu soustava NeuMoDx System nasaje 400 µl vzorku a smíchá se stejným objemem pufru NeuMoDx Lysis Buffer 3, zatímco při pracovním postupu s předúpravou se 550 µl předupraveného vzorku smíchá se stejným objemem pufru Lysis Buffer 2. Soustava NeuMoDx System automatizuje a integruje extrakci a zkoncentrování RNA, přípravu reagensů a amplifikaci/detekci nukleové kyseliny cílových sekvencí pomocí RT-PCR v reálném čase. Kontrola zpracování vzorku (Sample Process Control, SPC2) pomáhá monitorovat přítomnost inhibičních látek, selhání soustavy, procesu nebo reagensů. Jakmile je vzorek vložen do soustavy NeuMoDx System, není nutný žádný zásah obsluhy.

Soustava NeuMoDx System k automatickému provedení lýzy, extrakce RNA a odstranění inhibitorů využívá kombinaci zahřívání, lytického enzymu a extrakčních reagensů. Uvolněné nukleové kyseliny jsou zachyceny paramagnetickými částicemi. Částice s navázanou nukleovou kyselinou jsou vloženy do kazety NeuMoDx Cartridge, kde jsou nenavázané prvky vymyty promývací reagensí NeuMoDx Wash Reagent. Navázaná RNA se potom eluuje za použití uvolňovací reagensie NeuMoDx Release Reagent. Soustava NeuMoDx System eluovanou RNA využije k rehydrataci patentově chráněných amplifikačních reagensů NeuDry™, které obsahují všechny prvky nezbytné k amplifikaci cílů Flu A, Flu B, RSV, SARS-CoV-2 a SPC2. Tímto je umožněna simultánní amplifikace a detekce všech cílů i sekvencí RNA kontroly zpracování vzorku. Po rekonstituci suchých reagensů RT-PCR nadávkuje soustava NeuMoDx System připravenou RT-PCR-ready směs do jedné PCR komory (na každý vzorek) kazety NeuMoDx Cartridge. K reverzní transkripci, amplifikaci a detekci kontrolních a cílových (pokud jsou přítomné) sekvencí dochází v PCR komoře. Kazeta NeuMoDx Cartridge je navržena tak, aby obsahovala generovaný amplikon po RT-PCR, čímž se prakticky eliminuje riziko kontaminace po amplifikaci.

Amplifikované cíle jsou detekovány v reálném čase pomocí chemizmu hydrolyzační sondy (běžně označovaný jako chemizmus TaqMan®) za použití fluorogenních oligonukleotidových molekul sondy, specifických pro amplikony jejich příslušných cílů. Sonda TaqMan sestává z fluoroforu, kovalentně připojeného k 5' konci oligonukleotidové sondy, a zhašedla na 3' konci. Když je sonda neporušená, fluorofor a zhašedlo jsou v blízkosti, což umožňuje, aby molekula zhašedla potlačila fluorescenci emitovanou fluoroforem prostřednictvím Försterův rezonanční přenos energie (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Sondy TaqMan jsou určeny k reasociaci v úseku cDNA amplifikovaném specifickou sadou primerů. Jak polymeráza Taq DNA prodlužuje primer a syntetizuje nové vlákno, 5' až 3' exonukleázová aktivita polymerázy Taq DNA degraduje sondu, která reasociovala na templát. Degradací sondy se uvolňuje fluorofor a narušuje její blízkost ke zhašedlu, takže účinek zhašení je v důsledku FRET překonán a detekce fluoroforu je možná. Výsledný fluorescenční signál, detekovaný RT-PCR v termocykleru soustavy NeuMoDx System, je přímo úměrný uvolněnému fluoroforu a může být korelován s množstvím přítomného cíle.

Fluorescenční detekční kanál pro jednotlivé cíle analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je uveden v tabulce níže. Software soustavy NeuMoDx System monitoruje fluorescenční signál vydávaný TaqMan sondami na konci každého amplifikačního cyklu. Když je proces tepelného cyklování hotov, software soustavy NeuMoDx System údaje analyzuje a podá zprávu o výsledku (POSITIVE (POZITIVNÍ) / NEGATIVE (NEGATIVNÍ) / INDETERMINATE (NEURČITÝ) / NO RESULT (BEZ VÝSLEDKU) / UNRESOLVED (NEROZLIŠENO)).

Tabulka 1. Detekční kanály

Cíl	Cílová oblast	Fluorofor sondy	Excitace/emise	Detekční kanál
Chřipka A	Matrixový protein	FAM	530/555 nm	Zelený
Chřipka B	Matrixový protein	HEX	470/510 nm	Žlutý
	Nestrukturální protein NS1			
SARS-CoV-2	Gen Nsp2	Texas Red	585/610 nm	Oranžový
	O-ribóza-metyltransferáza			
Respirační syncytiální virus	Matrixový protein	Q705	680/715 nm	Hraniční červená
SPC2	Spojovací protein (MS2)	Q670	625/660 nm	Červený

REAGENCIE / SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Dodaný materiál

REF.	Obsah	Počet jednotek v balení	Počet testů na jednotku	Počet testů v balení
300901	Testovací proužek NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip <i>Suché reagensie RT-PCR obsahující sondy TaqMan a primery specifické pro Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 spolu se sondou TaqMan a primery specifickými-pro SPC2. Obsahuje 21,1 % Tris-HCl, 8,4 % dNTP a další neaktivní složky</i>	6	16	96

Požadované, ale nedodávané materiály (k dispozici samostatně od společnosti NeuMoDx)

REF.	Obsah
901200	NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls <i>Jednorázové sady FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 pozitivních a negativních kontrol pro stanovení každodenní validity analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (1 ampulka na každou kontrolu = 1 sada)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Suché paramagnetické částice, lytický enzym a kontroly zpracování vzorků</i>
400500**	NeuMoDx Lysis Buffer 2
400600*	NeuMoDx Lysis Buffer 3
401500**	NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hroty Hamilton® CO-RE / CO-RE II (300 µl) s filtry
235905	Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (1000 µl) s filtry

* Vyžaduje se pouze pro zpracování vzorků pomocí přímého pracovního postupu – bez kroku předběžné úpravy. Viz níže uvedený oddíl „Návod k použití“.

** Vyžaduje se pouze při zpracování vzorků pomocí pracovního postupu s předúpravou – s krokem předběžné úpravy. Viz níže uvedený oddíl „Návod k použití“.

Odběrové tampony a přepravní médium (nedodávané)

Typ vzorku	Doporučené odběrové zařízení	Doporučený tampon
Nazofaryngeální stěr	Universal Transport Medium, 3 ml (Copan UTM-RT, Copan, CA, USA, 305C) nebo Universal Viral Transport System, 3 ml (BD UVT, BD, NJ, USA, BD 220531)	Flexible Minitip Nylon® Flocked Swab (Copan, CA, USA) nebo Flexible Minitip Flocked Swab (BD, NJ, USA)

Potřebné přístrojové vybavení

Molekulární soustava **NeuMoDx 288 Molecular System** [REF 500100] nebo **NeuMoDx 96 Molecular System** [REF 500200]
Software **NeuMoDx System Software** verze 1.9.2.6 nebo vyšší



VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je určena pouze pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx System.
- Spotřební materiál ani reagentie po uvedené době expirace nepoužívejte.
- Nepoužívejte žádné reagentie, pokud je bezpečnostní těsnění rozbito nebo je při dodání poškozen obal.
- Spotřební materiál nebo reagentie nepoužívejte, pokud je ochranný váček při dodání otevřený nebo rozbítý.
- Minimální objem vzorku sekundárních alikvotních podílů závisí na velikosti zkumavky / stojanu na zkumavky se vzorkem tak, jak je definováno níže. Objem vzorku menší, než je specifikované minimum, může vést k chybě „Quantity Not Sufficient“ (Nedostatečné množství).
- Použití vzorků skladovaných při nesprávných teplotách nebo po uplynutí specifikovaných dob skladování může vést k neplatným nebo chybným výsledkům.
- U všech reagentií a spotřebního materiálu zabraňte mikrobiální a ribonukleázové (RNázové) kontaminaci. Při používání sekundárních zkumavek se doporučuje používat sterilní jednorázové přenosové pipety bez RNázy. Na každý vzorek použijte novou pipetu.
- Abyste předešli kontaminaci, s kazetou NeuMoDx Cartridge po amplifikaci nemanipulujte ani ji nerozebírejte. Za žádných okolností nevyjímáte kazety NeuMoDx Cartridge z nádoby na biologicky nebezpečný odpad (NeuMoDx 288 Molecular System) nebo z koše na nebezpečný biologický odpad (NeuMoDx 96 Molecular System). Kazeta NeuMoDx Cartridge je zkonstruována tak, aby kontaminaci zabránila.
- V případě, že laboratoř provádí také testy PCR s otevřenými zkumavkami, musí být zajištěno, že testovací proužek NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip, doplňkový spotřební materiál a reagentie nezbytné k testování, ochranné osobní prostředky, jako například rukavice a laboratorní pláště, a soustava NeuMoDx System nejsou kontaminovány.
- Při manipulaci s reagentiemi a spotřebním materiálem NeuMoDx byste měli nosit čisté nitrilové rukavice bez obsahu pudru. Měli byste dávat pozor, abyste se nedotýkali vrchního povrchu kazety NeuMoDx Cartridge, povrchu fóliového těsnění testovacího proužku NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip a extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate ani vrchního povrchu nádoby s lýzačním pufrům NeuMoDx Lysis Buffer; při manipulaci se spotřebním materiálem a reagentiemi byste se měli dotýkat pouze bočních stran.
- Externí kontroly NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control [REF 901200] musejí být s analýzou NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay zpracovány každých 24 hodin.
- Pro každou reagentii jsou, v příslušných případech, poskytnuty bezpečnostní listy (BL), které jsou k dispozici na internetové stránce www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy. Nekuřte, nepijte ani nejzte v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo reagentiemi.
- Se vzorky vždy zacházejte tak, jako by byly infekční, a v souladu s bezpečnými laboratorními postupy, například těmi popsány v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹ a v dokumentu M29-A4 institutu CLSI².
- Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (BL).
- Nepoužité reagentie a odpad zlikvidujte v souladu s národními, federálními, provinčními, státními a místními předpisy.

Testovací proužky NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip



Obsahuje složky: borová voda, ethoxylovaný nonylfenol. Nebezpečí! Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Před použitím si obstarejte speciální instrukce. Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Skladujte uzamčené. Obsah/nádobu zlikvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

Informace pro případ nouze

CHEMTREC

Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

Likvidace

Produkt obsahuje ethoxylovaný nonylfenol, látku narušující endokrinní systém, která může mít nepříznivé účinky na životní prostředí.

Likvidujte jako nebezpečný odpad v souladu s místními a vnitrostátními předpisy. To platí i pro nepoužité produkty.

Nevylévejte tekutý odpad do kanalizace.

Dodržujte doporučení uvedená v bezpečnostním listu (BL).



UCHOVÁVÁNÍ, MANIPULACE A STABILITA PRODUKTU

- Testovací proužky NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip jsou stabilní v primárním obalu po dobu expirace, která je uvedena na štítku produktu, při uchování při teplotě mezi 15 °C až 28 °C.
- Nevkládejte žádný produkt testu, který byl již dříve vložen do jiné soustavy NeuMoDx System.
- Testovací proužek NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip může po vložení zůstat v přístroji soustavy NeuMoDx System po dobu 14 dnů. Zbývající životnost vložených testovacích proužků je sledována pomocí softwaru a hlášena uživateli v reálném čase. Soustava NeuMoDx System vyzve k vyjmutí testovacího proužku, který byl používán po uplynutí povolené doby.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

Se všemi vzorky manipulujte, jako kdyby byly schopné přenosu infekčních agens.

1. Vzorky by měly být odebírány pomocí systému Copan UTM-RT® System či BD™ UVT System pomocí validovaných nylonových odběrových tamponů (viz Odběrové tampony a přepravní médium). Kromě toho jsou přijatelnými typy tamponů vločkové tampony a tampony z polyesteru a nylonu. Při odběru, přepravě a skladování vzorků postupujte podle pokynů výrobce.
2. Vzorky lze testovat v kompatibilní primárních odběrových zkumavkách nebo v sekundárních vzorkových zkumavkách.
3. Vzorky mohou být před zpracováním uchovávány na soustavě NeuMoDx System po dobu až 8 hodin. Pokud je třeba delší doby skladování, doporučujeme vzorky buď zchladit, nebo zmrazit jako sekundární alikvotní podíly.
4. Připravené vzorky by při teplotě 2 až 8 °C neměly být před testováním skladovány déle než 7 dnů.
5. Pokud jsou vzorky přepravovány, měly by být zabaleny a označeny v souladu s platnými předpisy země a/nebo mezinárodními předpisy.
6. Přejděte k části *Příprava testu*.

PŘÍPRAVA TESTU

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay umožňuje dva různé pracovní postupy v závislosti na preferencích uživatele/laboratoře:

Pracovní postup 1: **PŘÍMÝ** – vzorek stěru v přepravním médiu je vložen přímo do soustavy NeuMoDx System v primární odběrové zkumavce nebo v sekundární zkumavce se vzorkem

-nebo-

Pracovní postup 2: **S PŘEDÚPRAVOU** – vzorek stěru v přepravním médiu je před vložením do soustavy NeuMoDx System v primární odběrové zkumavce nebo v sekundárních zkumavce se vzorkem předem upraven pomocí pufru NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer

Příprava testu – pracovní postup PŘÍMÝ pro přímé vzorky stěrů

1. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky, jak je popsáno v níže uvedeném bodu 3.
2. Pokud testujete vzorek v primární odběrové zkumavce, vložte zkumavku označenou čárovým kódem do stojanu na zkumavky se vzorky a před vložením do soustavy NeuMoDx System se ujistěte, že je sejmuta víčko a vyjmut tampón.
3. Alternativně lze alikvotní podíl přepravního média přenést do sekundární zkumavky označené čárovým kódem a umístit do stojanu na zkumavky se vzorky. Pokud používáte sekundární zkumavku, přeneste alikvotní podíl s přepravním médiem do zkumavky se vzorkem s čárovým kódem, která je kompatibilní se soustavou NeuMoDx System podle objemů definovaných níže:
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (32 zkumavek): průměr 11–14 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem je $\geq 600 \mu\text{l}$
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (24 zkumavek): průměr 14,5–18 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem je $\geq 1000 \mu\text{l}$
 - Stojan na zkumavky se vzorkem o malém objemu (32 zkumavek): 1,5ml mikrocentrifugační zkumavka s kónickým dnem; minimální plnicí objem je $\geq 500 \mu\text{l}$

Příprava testu – pracovní postup S PŘEDÚPRAVOU pro předem upravené vzorky stěrů

Poznámka: Pufry Vantage Viral Lysis Buffer nechte před použitím vytemperovat na teplotu místnosti (15–30 °C).

VAROVÁNÍ: Předběžná úprava vzorků stěrů pomocí lyzačního pufru NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer nezaručuje inaktivaci přítomného viru.

Se všemi vzorky je třeba zacházet tak, jako kdyby byly schopné přenosu infekčních agens.

1. Předem upravte přepravní médium se vzorkem objemem lyzačního pufru NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer v poměru 1 : 1. To lze provést v primární odběrové zkumavce, pokud je znám objem přepravního média. Alternativně lze předběžnou úpravu provést v sekundární zkumavce spojením alikvotního podílu přepravního média se stejným objemem lyzačního pufru NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. Výsledná směs by měla splňovat požadavky na minimální objem, které jsou uvedené v bodě 4 níže.
2. Jemně promíchejte pipetou, abyste zajistili rovnoměrnou distribuci pufru NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer.
3. Pokud testujete předupravený vzorek v primární odběrové zkumavce, vložte zkumavku označenou čárovým kódem do stojanu na zkumavky se vzorky a před vložením do soustavy NeuMoDx System se ujistěte, že je sejmuto víčko a vyjmut tampón.
4. Pokud používáte sekundární zkumavku, přeneste alikvotní podíl předupraveného vzorku do zkumavky se vzorkem s čárovým kódem, která je kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, a umístěte ji do nosiče zkumavek se vzorky podle objemů definovaných níže:
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (32 zkumavek): průměr 11–14 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem je $\geq 750 \mu\text{l}$
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (24 zkumavek): průměr 14,5–18 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem je $\geq 1100 \mu\text{l}$
 - Stojan na zkumavky se vzorkem o malém objemu (32 zkumavek): 1,5ml mikrocentrifugační zkumavka s kónickým dnem; minimální plnicí objem je $\geq 650 \mu\text{l}$

Provoz soustavy NeuMoDx System

Podrobné pokyny jsou uvedeny v návodech k obsluze molekulárních soustav NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System (výr. č. 40600108 a 40600317)

1. Podle pracovního postupu použitého pro přípravu testu načtete do soustavy NeuMoDx System objednávku testu:
 - Neupravené čisté vzorky stěrů připravené pomocí pracovního postupu PŘÍMÝ jsou testovány definováním vzorku jako „**Transport Medium**“ (Přepravní médium).
 - Vzorky stěrů předběžně upravené pomocí pufru NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer s použitím pracovního postupu S PŘEDÚPRAVOU jsou testovány definováním vzorku jako „**UserSpecified1**“ (Specifikováno uživatelem 1).
 Pokud to není v objednávce testu definováno, použije se jako výchozí typ vzorku Transport Medium (Transportní médium) ve zkumavce **Secondary Tube** (Sekundární zkumavka).
2. Osadte jeden nebo více stojanů na testovací proužky soustavy NeuMoDx System testovacím proužkem (testovacími proužky) NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip a k vložení stojanu (stojanů) na testovací proužky do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
3. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, přidejte do stojanů na spotřební materiál soustavy NeuMoDx System nezbytný spotřební materiál a k založení stojanu (stojanů) do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
4. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, vyměňte podle potřeby promývací reagenty NeuMoDx Wash Reagent a/nebo uvolňovací reagenty NeuMoDx Release Reagent a vyprázdněte odpadní reagenty z plnění, nádobu na biologicky nebezpečný odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 288 Molecular System), odpadní koš na hroty (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System) a/nebo koš na nebezpečný biologický odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System).
5. Zkumavku (zkumavky) se vzorkem vložte do příslušného stojanu na zkumavky se vzorky a ujistěte se, že jsou ze všech zkumavek sejmuta víčka a vyjmuty tampony.
6. Umístěte stojan na zkumavky se vzorkem na přihrádku automatického podavače a pomocí dotykové obrazovky vložte stojan (stojany) do soustavy NeuMoDx System. Tím se zahájí zpracování vzorků vložených pro identifikované testy, pokud je v soustavě přítomna platná objednávka testů.

OMEZENÍ

1. Testovací proužek NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip lze použít pouze na soustavách NeuMoDx System.
2. Funkce testovacího proužku NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip byla stanovena pomocí vzorků z nazofaryngeálních stěrů odebraných lékařem do přepravního média. Použití testovacích proužků NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip s jinými typy vzorků a jinými odběrovými médii nebylo hodnoceno a výkonová charakteristika není známa.
3. Vzhledem k tomu, že detekce virových cílů obecně závisí na množství virových částic přítomných ve vzorku, závisí spolehlivost výsledků na správném odběru vzorků, zacházení s nimi a jejich skladování.
4. K chybným výsledkům testů může dojít kvůli nesprávnému odběru vzorků, zacházení s nimi, jejich nevhodnému skladování, technické chybě nebo nesprávné identifikaci zkumavek se vzorkem. Kromě toho by se mohly objevit falešně negativní výsledky kvůli tomu, že množství virových částic ve vzorku je pod mezí detekce analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
5. Obsluha soustavy NeuMoDx System je omezena pouze na personál vyškolený v používání soustavy NeuMoDx System.
6. Pokud se ani cíle Flu A, Flu B, RSV a SARS-CoV-2, ani cílová SPC2 neamplifikují, bude oznámen neplatný výsledek (Indeterminate (neurčitý) nebo Unresolved (nerozlišeno)) a test by měl být zopakován.
7. Pokud před dokončením zpracování vzorku dojde k chybě systému, bude nahlášeno „No Result“ (Bez výsledku) a test by měl být zopakován.

8. Pozitivní výsledek nemusí nutně ukazovat na přítomnost životaschopného viru chřipky A, chřipky B, viru SARS-CoV-2 a/nebo viru RSV. Avšak pozitivní výsledek je pro přítomnost RNA viru chřipky A, chřipky B, viru SARS-CoV-2 a/nebo RSV presumpivní.
9. Delece nebo mutace v konzervovaných oblastech zacílených analýzou NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay mohou ovlivnit detekci nebo by mohly vést k chybnému výsledku.
10. Výsledky analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay by měly být použity jako doplněk klinických pozorování a dalších informací, které má lékař k dispozici.
11. Aby nedošlo ke kontaminaci, doporučujeme správnou laboratorní praxi, včetně výměny rukavic mezi manipulacemi s patientskými vzorky.

VÝSLEDKY

Dostupné výsledky lze prohlížet nebo vytisknout ze záložky „Results“ (Výsledky) v okně Results (Výsledky) na dotykové obrazovce soustavy NeuMoDx System. Výsledky analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay automaticky generuje software soustavy NeuMoDx System používající algoritmus rozhodování a parametry zpracování výsledků popsané v souboru definic analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (FluA-B-RSV-CoV-2 ADF verze 4.0.0 nebo vyšší). Výsledek analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay může být ohlášen jako Negative (negativní), Positive (pozitivní), Indeterminate (neurčitý), No Result (bez výsledku) nebo Unresolved (nerozlišeno), a to podle stavu amplifikace cíle (cílů) a kontroly SPC2. Výsledky jsou uváděny na základě rozhodovacího algoritmu ADF, shrnutého v *tabulce 2* uvedené níže.

Tabulka 2. Interpretace výsledků analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay

CELKOVÝ VÝSLEDEK	TARGET (CÍL) 1 (Flu A) FAM	TARGET (CÍL) 2 (Flu B) HEX	TARGET (CÍL) 3 (SARS-CoV-2) TX RED	TARGET (CÍL) 4 (RSV) Hraniční červená	KONTROLA ZPRACOVÁNÍ (Sample Process Control, SPC2) Červený	INTERPRETACE
POSITIVE (Target RNA Detected) (POZITIVNÍ (cílová RNA detekována))	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) [5 ≤ Ct < 25 AND (A) EPR > 2.0 AND (A) EP ≥ 750] OR(NEBO) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP ≥ 750)	–	–	–	–	Detekována RNA viru Flu A
	–	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) [5 ≤ Ct < 28 AND (A) EPR > 1.5 AND (A) EP ≥ 600] OR(NEBO) [28 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP ≥ 600]	–	–	–	Detekována RNA viru Flu B
	–	–	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) [5 ≤ Ct < 25 AND (A) EPR > 1.5 AND (A) EP ≥ 1200] OR(NEBO) [25 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP ≥ 1200]	–	–	Detekována RNA viru SARS- CoV-2
	–	–	–	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) [5 ≤ Ct < 30 AND (A) EPR > 1.15 AND (A) EP ≥ 1200] OR(NEBO) [30 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP ≥ 1200]	–	Detekována RNA viru RSV

CELKOVÝ VÝSLEDEK	TARGET (CÍL) 1 (Flu A) FAM	TARGET (CÍL) 2 (Flu B) HEX	TARGET (CÍL) 3 (SARS-CoV-2) TX RED	TARGET (CÍL) 4 (RSV) Hraniční červená	KONTROLA ZPRACOVÁNÍ (Sample Process Control, SPC2) Červený	INTERPRETACE
NEGATIVE (NEGATIVNÍ) (Target RNA Not Detected) (RNA cíle nebyla detekována)	NOT AMPLIFIED (NENÍ AMPLIFIKOVÁNO) – OR(NEBO) (5 ≤ Ct < 25 AND (A) EPR ≤ 2.0) OR(NEBO) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP < 750) OR(NEBO) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NENÍ AMPLIFIKOVÁNO) – OR(NEBO) (5 ≤ Ct < 28 AND (A) EPR ≤ 1.5) OR(NEBO) (28 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP < 600) OR(NEBO) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NENÍ AMPLIFIKOVÁNO) – OR(NEBO) (5 ≤ Ct < 25 AND (A) EPR ≤ 1.5) OR(NEBO) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP < 1200) OR(NEBO) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NENÍ AMPLIFIKOVÁNO) – OR(NEBO) (5 ≤ Ct < 30 AND (A) EPR ≤ 1.15) OR(NEBO) (30 ≤ Ct ≤ 37 AND (A) EP < 1200) OR(NEBO) (Ct > 37)	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) (24 ≤ Ct ≤ 31 AND (A) EP ≥ 1800)	RNA virů Flu A, Flu B, RSV a SARS-CoV-2 RNA nebyla detekována
NR*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků zrušeno)					Zpracování vzorku bylo přerušeno; otestujte vzorek znovu
IND*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků dokončeno)					Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu
UNR*	Not Amplified, No System Error Detected (Není amplifikováno, Nebyla zjištěna žádná chyba systému)					Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu

* Systém umožňuje volitelnou funkci opakovaného spuštění / opakování a umožňuje automatické opětovné zpracování v případě neplatného výsledku, aby se minimalizovaly prodlevy v ohlašování výsledků.

Neplatné výsledky

Pokud se analýze NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay prováděné na soustavě NeuMoDx System nepodaří vyprodukovat platný výsledek, bude výsledek ohlášen buď jako Indeterminate (Neurčitý), No Result (Bez výsledku), nebo Unresolved (Nerozlišeno) podle typu chyby, ke které došlo. Pro získání platného výsledku by měl být test zopakován.

Výsledek Indeterminate (Neurčitý) bude oznámen tehdy, pokud je během zpracování vzorků detekována chyba soustavy NeuMoDx System. V případě ohlášení výsledku Indeterminate (Neurčitý) se doporučuje opakování testu.

Výsledek No Result (Bez výsledku) bude ohlášen tehdy, pokud je detekována chyba soustavy NeuMoDx System a zpracování vzorku je přerušeno. V případě ohlášení výsledku No Result (Bez výsledku) se doporučuje opakování testu.

Výsledek Unresolved (Nerozlišeno) bude oznámen, pokud není detekován žádný cíl a nedojde k žádné amplifikaci kontroly zpracování vzorku, což naznačuje možné selhání reagentie nebo přítomnost inhibitorů. V případě ohlášení výsledku Unresolved (Nerozlišeno) se jako první krok doporučuje opakování testu. Pokud opakovaný test není úspěšný, lze použít zředěný vzorek pro snížení účinků možné inhibice.

Viz návod k obsluze molekulární soustavy NeuMoDx 288 Molecular System (výr. č.: 40600108) nebo návod k obsluze molekulární soustavy NeuMoDx 96 Molecular System (výr. č.: 40600317), kde je uveden seznam chybových kódů, které mohou být spojeny s neplatnými výsledky.

Soustava NeuMoDx System je opatřena automatickou funkcí Rerun (Nová analýza) / Repeat (Opakovat), kterou si může koncový uživatel zvolit k zajištění, že výsledek INVALID (NEPLATNÝ) bude automaticky znovu zpracován, a tak se minimalizovaly prodlevy v hlášení výsledků.

Kontrola kvality

Místní předpisy obvykle stanoví, že laboratoř je odpovědná za kontrolní postupy, které monitorují přesnost a preciznost celého analytického procesu, a musí stanovit počet, typ a četnost testů kontrolních materiálů pomocí ověřených specifikací výkonu pro nemodifikovaný a schválený testovací systém.

Externí kontroly

- 1) Uživatelé musejí každých 24 hodin a před zpracováním patientských vzorků zpracovat jednu sadu externích kontrol NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control [REF 901200]. Pokud sada validních výsledků externích kontrol neexistuje, software soustavy NeuMoDx System vyzve uživatele k provedení těchto kontrol dřív, než budou moci být ohlášeny výsledky vzorků.
- 2) Pokud jsou externí kontroly potřeba, kontroly zpracujte (1 pozitivní kontrolu a 1 negativní kontrolu):

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Schéma barevného značení
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control(s)	Červené
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control(s)	Černé

- 3) Při zpracovávání externích kontrol umístěte kontroly do stojanu na zkumavky se vzorkem a k založení stojanu do soustavy NeuMoDx System z příhrádky automatického podavače použijte dotykovou obrazovku. Soustava NeuMoDx System rozpozná čárové kódy a začne se zpracováním kontrolních materiálů, dokud nebudou k dispozici příslušné reagencie nebo spotřební materiál nutný k testování.
- 4) Validita těchto externích kontrol bude hodnocena soustavou NeuMoDx System na základě očekávaných výsledků.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Výsledek FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	Výsledek SPC2
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control(s)	RNA viru FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 byla detekována	–
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control(s)	RNA viru FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 nebyla detekována	Pozitivní SPC2

- 5) S neshodným výsledkem externích kontrol by mělo být zacházeno následovně:
 - a) Positive (pozitivní) výsledek testu hlášený u vzorku negativní kontroly může naznačovat kontaminaci a je třeba prověřit postupy kontroly kvality laboratoře, aby se zjistila příčina. Zajistěte oddělené prostory pro přípravu vzorků, manipulaci s kontrolami a přípravu RT-PCR. Tipy na další řešení problémů naleznete v návodu k obsluze molekulárních soustav *NeuMoDx 288 Molecular System* nebo *NeuMoDx 96 Molecular System*.
 - b) Negative (negativní) výsledek testu vykázaný pro vzorek pozitivní kontroly může indikovat, že existuje problém související s reagencí nebo soustavou NeuMoDx System. Tipy pro řešení problémů naleznete v návodu k obsluze molekulárních soustav *NeuMoDx 288 Molecular System* nebo *NeuMoDx 96 Molecular System*.
 - c) V každém výše uvedeném případě anebo v případě výsledku No Result (NR, bez výsledku), Unresolved (UNR, nerozlišeno) nebo Indeterminant (IND, neurčitý) neúspěšnou kontrolu zopakujte s čerstvě rozmrazenou ampulkou / rozmrazenými ampulkami kontroly/kontrol, které testem validity neprošly.
 - d) Pokud pozitivní kontrola nepřestává hlásit Negative (negativní) výsledek testu, kontaktujte technickou podporu společnosti QIAGEN.
 - e) Pokud negativní kontrola nepřestává hlásit Positive (pozitivní) výsledek testu, pokuste se eliminovat všechny zdroje možné kontaminace, včetně výměny všech reagentů, a dřív, než kontaktujete technickou podporu společnosti QIAGEN, cyklus zopakujte.
 - f) Pokud externí kontroly neposkytnou očekávané výsledky, je nutné zopakovat sadu pozitivních i negativních kontrol. Výsledky patientských vzorků nebudou ohlášeny, pokud kontroly neposkytnou očekávané výsledky.

Kontroly (interní) zpracování vzorků

Exogenní kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC2) je zabudována do extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate a u každého vzorku prochází celým procesem extrakce nukleové kyseliny a amplifikace s real-time RT-PCR. Každá jamka testovacího proužku NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip obsahuje primery a sondy specifické pro SPC2, které umožňují detekci přítomnosti SPC2 spolu s RNA cíle (pokud je přítomna) prostřednictvím multiplexní RT-PCR. Detekce amplifikace SPC2 umožňuje soustavě NeuMoDx System sledovat účinnost extrakce RNA a procesy amplifikace pomocí RT-PCR.

Před RT-PCR soustava NeuMoDx System automaticky provede kontrolu „FILL CHECK“ (Kontrola plnění), aby se zajistilo, že je PCR komora naplněna roztokem a obsahuje dostatečné množství fluorescenční sondy.

Software soustavy NeuMoDx System nepřetržitě monitoruje snímače a regulátory v přístroji, aby byl zajištěn bezpečný a efektivní provoz soustavy.

Aktivní monitorování sacích a dávkovacích operací zavádí několik režimů zotavení z fluidikových chyb, aby se zajistilo, že soustava může bezpečným a efektivním způsobem dokončit zpracování všech vzorků, případně uvést vhodný kód chyby.

VÝKONOVÁ CHARAKTERISTIKA

Analytická citlivost

Analytická citlivost analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na molekulárních soustavách NeuMoDx Molecular System byla charakterizována ve dvou částech. Mez detekce (Limit of Detection, LoD) byla charakterizována pomocí sdružených zbytků deidentifikovaných, klinicky negativních vzorků nazofaryngeálních stěrů odebraných do matrice UVT a modelových kmenů každého cíle. Modelové kmeny použité pro jednotlivé cíle jsou uvedeny v *tabulce 3*. Nejprve byly připraveny série ředění s použitím modelových kmenů každého cíle v UVT pomocí pracovních postupů Příímý a S předúpravou a poté zpracovány soustavou NeuMoDx System za účelem stanovení předběžné hodnoty meze detekce (Limit of Detection, LoD). Ve druhé části testování byly tyto předběžné hodnoty LoD potvrzeny pomocí studie míry shody na molekulárních soustavách NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System pro oba pracovní postupy. Předběžná LoD byla přijata, pokud testování míry shody dosáhlo 95% míry pozitivivity pro oba pracovní postupy v obou soustavách. Míra detekce pro předběžnou LoD je uvedena v *tabulce 4*, zatímco v *tabulce 5* je podrobně popsáno potvrzení míry shody pro soustavu N288 a v *tabulce 6* potvrzení míry shody pro soustavu N96. Konečné hodnoty LoD v *tabulce 4* jsou vyznačeny tučným písmem.

Tabulka 3. Kmen použitý u každého cíle

Cíl/kmen	Zdroj	Kat. č.	Č. šarže	Typ materiálu
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1688	70031602	Vyčištěný supernatant z infikovaných buněk
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1690	70032253	Vyčištěný supernatant z infikovaných buněk
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	Virapur	–	B1904J	Živé, nezpracované
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	Virapur	–	C2030D	Živé, nezpracované
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	IRR	FR-1619	70015942	Vyčištěný supernatant z infikovaných buněk
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	IRR	FR-1592	70013310	Vyčištěný supernatant z infikovaných buněk
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	ATCC	VR-1931	70020870	Vyčištěná kultivační tekutina a buněčný lyzát
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	Virapur	–	B1904N	Živé, nezpracované
RSV A2	ATCC	VR-1540	60430286	Kultivační tekutina a buněčný lyzát
RSV B (WV/14617/85)	ATCC	VR-1400	70013461	Kultivační tekutina a buněčný lyzát
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	NIBSC	20/146	–	Lyofilizovaný virus inaktivovaný kyselinou a teplem
SARS-CoV-2, izolát USA-WA1/2020	BEI	NR-52285	70037779	Teplem inaktivovaný virus

Tabulka 4. Míra pozitivní detekce pro předběžné stanovení LoD analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay –
(a) pracovní postup Pretreated (S předúpravou); (b) pracovní postup Direct (Přímý)

(a) Pracovní postup S předúpravou

Cíl/kmen	Hladina	Jednotka	Poč. platných výsledků (n/N)	Počet poz.	% poz.	Ct prům.	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70 %	33,97	0,90
	0,06		10/10	10	100 %	33,36	0,96
	0,17		10/10	10	100 %	32,17	0,45
	0,5		10/10	10	100 %	31,05	0,42
	1,5		10/10	10	100 %	31,01	0,45
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	33,72	1,00
	0,5		10/10	10	100 %	32,97	0,51
	1,5		10/10	10	100 %	32,28	0,60
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	32,81	0,38
	0,5		10/10	10	100 %	31,68	0,84
	1,5		10/10	10	100 %	31,69	0,65
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	20/20	15	75 %	32,15	1,70
	0,5		10/10	9	90 %	32,37	0,50
	1,5		10/10	10	100 %	32,63	1,35
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	32,90	1,27
	0,03		10/10	10	100 %	32,26	0,48
	0,08		10/10	10	100 %	31,48	0,78
	0,25		10/10	10	100 %	30,59	0,40
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /ml	10/10	10	100 %	33,97	0,58
	0,01		10/10	10	100 %	33,90	0,39
	0,03		10/10	10	100 %	33,85	0,56
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	34,39	0,84
	0,25		10/10	10	100 %	32,53	0,21
	0,75		10/10	10	100 %	32,57	0,40
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,33	TCID ₅₀ /ml	20/20	15	75 %	33,58	1,50
	1		10/10	10	100 %	34,03	0,69
	3		10/10	10	100 %	32,30	0,66
RSV A2	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	5	50 %	32,68	0,43
	0,5		10/10	10	100 %	31,72	0,85
	1,5		10/10	10	100 %	31,71	1,35
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /ml	10/10	5	50 %	32,20	1,10
	0,05		10/10	10	100 %	31,50	0,49
	0,15		10/10	10	100 %	29,94	0,93
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	50	IU/ml	10/10	6	60 %	34,36	0,64
	150		10/10	10	100 %	34,20	0,31
	450		10/10	10	100 %	33,04	0,63
SARS-CoV-2, izolát USA-WA1/2020	50	kopie/ml	10/10	6	60 %	34,20	1,19
	150		10/10	10	100 %	33,46	0,58
	450		10/10	10	100 %	32,62	1,06

(b) Přímý pracovní postup

Cíl/kmen	Hladina	Jednotka	Poč. platných výsledků (n/N)	Počet poz.	% poz.	Ct prům.	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /ml	20/20	17	85 %	33,11	1,30
	0,06		10/10	10	100 %	33,18	0,86
	0,17		10/10	10	100 %	32,63	1,14
	0,5		10/10	10	100 %	31,33	0,74
	1,5		10/10	10	100 %	30,79	0,31
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	33,41	1,10
	0,5		10/10	9	90 %	32,54	1,03
	1,5		10/10	10	100 %	32,05	0,26
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70 %	33,39	0,16
	0,5		10/10	10	100 %	32,70	1,01
	1,5		10/10	10	100 %	31,12	1,07
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	34,11	0,69
	0,5		10/10	10	100 %	33,68	0,50
	1,5		10/10	10	100 %	32,27	1,29
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	33,31	0,95
	0,03		10/10	10	100 %	31,51	0,94
	0,08		10/10	10	100 %	31,76	0,46
	0,25		10/10	10	100 %	30,11	0,45
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /ml	10/10	9	90 %	34,82	0,39
	0,01		10/10	10	100 %	34,37	0,55
	0,03		10/10	10	100 %	33,64	0,34
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	33,78	1,11
	0,25		10/10	10	100 %	33,89	0,69
	0,75		10/10	10	100 %	32,38	0,47
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,25	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	33,23	1,17
	0,75		20/20	19	95 %	32,63	1,22
	2,25		10/10	10	100 %	31,24	1,58
RSV A2	0,42	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70 %	32,61	0,70
	1,25		10/10	10	100 %	30,99	1,55
	3,75		10/10	10	100 %	31,49	1,04
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /ml	10/10	6	60 %	33,63	1,49
	0,05		10/10	10	100 %	32,42	1,12
	0,15		10/10	10	100 %	31,81	0,81
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	50	IU/ml	10/10	7	70 %	34,80	0,56
	150		20/20	19	95 %	32,88	1,22
	450		10/10	10	100 %	33,38	0,46
SARS-CoV-2, izolát USA-WA1/2020	66,7	kopie/ml	10/10	7	70 %	33,53	0,58
	200		10/10	10	100 %	32,63	1,25
	600		10/10	10	100 %	32,69	0,86

Tabulka 5. Míra pozitivní detekce pro potvrzovací stanovení LoD analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N288
(a) pracovní postup s předúpravou; (b) přímý pracovní postup

(a) Pracovní postup s předúpravou

Cíl/kmen	Hladina	Jednotka	Počet platných výsledků (n/N)	Počet poz.	% detekce	Ct prům.	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,89	0,57
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,81	0,44
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,17	0,47
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,77	0,52
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	29/30	29	100 %	32,32	1,09
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	34,50	0,68
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,83	0,44
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /ml	29/30	29	100 %	33,04	0,69
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,17	1,23
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,39	0,41
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	150	IU/ml	30/30	30	100 %	33,63	0,61
SARS-CoV-2, izolát USA-WA1/2020	150	kopie/ml	29/30	28	96,6 %	33,59	1,01

(b) Přímý pracovní postup

Cíl/kmen	Hladina	Jednotka	Počet platných výsledků (n/N)	Počet poz.	% detekce	Ct prům.	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,92	0,69
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,75	0,57
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,96	0,48
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,67	0,48
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	29/30	28	96,6 %	31,74	1,19
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	34,88	0,95
	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	34,22	0,51
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,55	0,38
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,33	0,74
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	31,87	0,95
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,46	0,72
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	150	IU/ml	30/30	29	96,7 %	33,78	0,77
SARS-CoV-2, izolát USA-WA1/2020	200	kopie/ml	30/30	30	100 %	34,18	0,83

Tabulka 6. Míra pozitivní detekce pro potvrzení míry shody LoD u analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N96
(a) pracovní postup Pretreated (S předúpravou); (b) pracovní postup Direct (Přímý)

(a) Pracovní postup s předúpravou

Cíl/kmen	Hladina	Jednotka	Počet platných výsledků (n/N)	Počet poz.	% detekce	Ct prům.	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,05	0,81
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,53	0,75
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,33	1,11
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,98	0,96
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,75	0,69
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /ml	10/10	4	40 %	34,75	0,58
	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,91	0,75
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,25	0,97
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,21	0,96
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /ml	29/30	28	96,6 %	32,39	1,10
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,06	0,76
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	150	IU/ml	30/30	29	96,7 %	33,79	0,67
SARS-CoV-2, izolát USA-WA1/2020	150	kopie/ml	30/30	29	96,7 %	33,59	1,05

(b) Přímý pracovní postup

Cíl/kmen	Hladina	Jednotka	Poč. platných výsledků (n/N)	Počet poz.	% detekce	Ct prům.	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,42	0,54
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,35	1,10
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,17	1,24
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,22	0,50
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,78	0,56
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	34,21	0,50
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,41	0,65
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,36	1,04
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,29	0,99
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,17	0,75
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	150	IU/ml	30/30	29	96,7 %	33,50	0,78
SARS-CoV-2, izolát USA-WA1/2020	200	kopie/ml	29/30	29	100 %	34,45	0,39

Tyto úrovně jsou přijaty jako hodnoty LoD pro analýzu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na soustavách NeuMoDx System, jak je shrnuto v *tabulce 7*.

Tabulka 7. Souhrn studie mezi detekce

Cíl	Kmen	Mez detekce		
		Pracovní postup s předúpravou	Přímý pracovní postup	Jednotka
Chřipka A (Flu A) – H1N1	Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	0,06	TCID ₅₀ /ml
	Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	0,5	
Chřipka A (Flu A) – H3N2	Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	0,5	
	Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	0,5	
Chřipka B (Flu B) – linie Victoria	Hong Kong/286/2017	0,03	0,03	
	Colorado/6/2017	0,01	0,01	
	Florida/78/2015	0,25	0,25	
Chřipka B (Flu B) – linie Yamagata	Phuket/3073/2013	1	0,75	
RSV A	A2	0,5	1,25	
RSV B	(WV/14617/85)	0,05	0,05	
SARS-CoV-2	1. mezinárodní standard organizace WHO	150	150	IU/ml
	Izolát USA-WA1/2020	150	200	kopie/ml

Konkurenční interference pro cílové organismy: Flu A, Flu B, RSV a SARS-CoV-2

Konkurenční interference u analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla hodnocena pomocí panelů virových cílů, které byly přidány do klinicky negativních vzorků nasofaryngeálních stěrů, odebraných do UVT. Deset panelů obsahovalo jeden nebo dva cíle v blízkosti meze detekce (3-10X LoD) a jeden cíl v koncentraci $\geq 1E5$ kopií/ml, který představoval koinfikovaný cíl. Jedenáctý panel obsahoval po jednom ze čtyř cílů při koncentraci 2X LoD. Přítomnost dvou až tří virů v různých koncentracích v jednom vzorku a jejich vliv na analytickou citlivost uvádí *tabulka 8*.

Výsledky negativní na chřipku A a virus RSV A by měly být považovány za presumptivní u vzorků s pozitivním výsledkem na virus SARS-CoV-2 a výsledky negativní na RSV by měly být považovány za presumptivní u vzorků s pozitivním výsledkem na chřipku A. Studie kompetitivní interference ukázaly, že virus SARS-CoV-2, pokud je přítomen v koncentraci $1E5$ kopií/ml nebo vyšší, může inhibovat detekci a amplifikaci RNA viru chřipky A a viru RSV A, pokud je přítomna v koncentraci 1,5 TCID₅₀/ml, resp. 6,25 TCID₅₀/ml, a může vést k falešně negativním výsledkům. Kromě toho může virus chřipky A, je-li přítomen v koncentraci $1E5$ kopií/ml nebo vyšší, inhibovat detekci a amplifikaci RNA viru RSV A, je-li přítomna v koncentraci 3,75 TCID₅₀/ml nebo nižší, a může vést k falešně negativním výsledkům pro RSV. Pokud existuje podezření na koinfekci virem chřipky A nebo RSV u vzorků s pozitivním výsledkem na SARS-CoV-2 anebo podezření na koinfekci virem RSV u vzorků s pozitivním výsledkem na chřipku A, měl by být vzorek v případě, že by detekce viru chřipky nebo RSV změnila klinický postup, znovu otestován jiným testem na chřipku nebo RSV schváleným či autorizovaným FDA.

Tabulka 8. Shrnutí studie konkurenční interference

Panel	Cíl	Úroveň na panelu	Cílová konc.	Platné výsledky	Počet poz.	% detekce
1	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	23	96 %
	Flu B	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
2 (cyklus 1)	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	19	79 %
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	8	33 %
	SARS-CoV-2	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
2 (cyklus 2)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /ml	24	16	67 %
	SARS-CoV-2	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
2 (cyklus 3)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV A	10X	12,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
3	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100 %
	RSV B	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
4	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	Flu A	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
5	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
6	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
7	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100 %
	Flu A	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
8	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100 %
	Flu B	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
9 (cyklus 1)	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	20	83 %
	Flu A	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
9 (cyklus 2)	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /ml	24	23	96 %
	Flu A	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
10	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	23	96 %
	Flu B	Vysoká	1E5 kopií/ml	24	24	100 %
11	Flu A	2X	1 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	Flu B	2X	0,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	2X	0,1 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	2X	300 IU/ml	24	24	100 %

Analytická reaktivita a inkluзивita

Analytická reaktivita analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla hodnocena na více kmenech/izolátech virů chřipky A, chřipky B, RSV a viru SARS-CoV-2. Reaktivita každého kmene/izolátu byla charakterizována ve dvou částech. Počáteční posouzení úrovně reaktivity pro každý cíl bylo provedeno s každým jednotlivým cílovým kmenem testovaným ve 3 koncentracích v simulované matrici nasofaryngeálního stěru (připraveného s 3 000 lidských epiteliálních buněk na jeden ml UVT), *tabulka 9*. Ve druhé části byla nejnižší úroveň, která v 1. fázi dosáhla 100% pozitivitu, potvrzena jako úroveň reaktivity testováním minimálně 20 replikátů, *tabulka 10*. Celkem bylo testováno 14 kmenů viru chřipky A, 6 kmenů viru chřipky B, 1 izolát viru RSV A, 1 izolát viru RSV B a 6 izolátů viru SARS-CoV-2.

Tabulka 9. Testované kmeny virů Flu A, Flu B, RSV A, RSV B a SARS-CoV-2 – předběžná analýza úrovně reaktivity

Předběžná analýza						
Cíl	Kmen		Testované úrovně	Poč. platných výsledků	% poz.	
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	0,5 TCID ₅₀ /ml	8	75,0 %	
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			4,5 TCID ₅₀ /ml	7	100 %	
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,33 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,17 TCID ₅₀ /ml	6	50 %	
			0,5 TCID ₅₀ /ml	6	100 %	
			1,5 TCID ₅₀ /ml	6	100 %	
		A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,33 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	3,3 CEID ₅₀ /ml	8	62,5 %	
			10 CEID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			30 CEID ₅₀ /ml	8	100 %	
		H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,17 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %
				0,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
				1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
	Hong Kong/4801/2014 (H3N2)		0,15 TCID ₅₀ /ml	7	28,6 %	
			0,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
	Kansas/14/2017 (H3N2)		2,67 TCID ₅₀ /ml	8	50 %	
			8 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			24 TCID ₅₀ /ml	7	100 %	
	A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)		3,3 CEID ₅₀ /ml	6	83,3 %	
			10 CEID ₅₀ /ml	6	100 %	
			30 CEID ₅₀ /ml	6	100 %	
	A/California/02/2014 (H3N2)		0,01 TCID ₅₀ /ml	8	85,7 %	
			0,03 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,1 TCID ₅₀ /ml	7	100 %	
			0,33 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	7	100 %	
	H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	10,87 pg/ml ¹	8	100 %	
			32,6 pg/ml ¹	8	87,5 %	
			97,8 pg/ml ¹	7	100 %	
	H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	8 pg/ml ¹	8	100 %	
			25 pg/ml ¹	8	100 %	
			75 pg/ml ¹	7	100 %	
	H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1:3E5 ¹	8	50 %	
			1:1E5 ¹	7	87,5 %	
			1:3.3E4 ¹	8	100 %	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	22,67 pg/ml ¹	8	100 %		
		68 pg/ml ¹	8	100 %		
		204 pg/ml ¹	8	100 %		
Flu B	Linie Victoria	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			9 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		Washington/02/2019 (Victoria)	2,5 CEID ₅₀ /ml	8	25,0 %	
			5 CEID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			15 CEID ₅₀ /ml	8	100 %	
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	0,01 TCID ₅₀ /ml	12	91,7 %	
			0,03 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,33 TCID ₅₀ /ml	16	100 %	
1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %				

Předběžná analýza					
Cíl	Kmen		Testované úrovně	Poč. platných výsledků	% poz.
Flu B (pokračování)	Linie Yamagata	Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
			0,17 CEID ₅₀ /ml	8	75,0 %
			0,5 CEID ₅₀ /ml	8	100 %
			1,5 CEID ₅₀ /ml	8	100 %
		B/Utah/09/2014 (linie Yamagata)	0,06 CEID ₅₀ /ml	8	25,0 %
			0,19 CEID ₅₀ /ml	8	87,5 %
			0,56 CEID ₅₀ /ml	7	85,7 %
			1,7 CEID ₅₀ /ml	6	100 %
			5 CEID ₅₀ /ml	6	100 %
			15 CEID ₅₀ /ml	6	100 %
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	0,33 TCID ₅₀ /ml	8	25,0 %
			1 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %
3 TCID ₅₀ /ml	8		100 %		
RSV	RSVA	A (dlouhý)	0,67 PTJ/ml	8	37,5 %
			2 PTJ/ml	8	100 %
			6 PTJ/ml	7	100 %
	RSVB	B (9320)	0,03 PTJ/ml	8	12,5 %
			0,1 PTJ/ml	8	87,5 %
			0,3 PTJ/ml	8	100 %
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)	0,06 TCID ₅₀ /ml	8	0 %	
		0,17 TCID ₅₀ /ml	8	12,5 %	
		0,5 TCID ₅₀ /ml	8	37,5 %	
		1,5 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
		4,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		13,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		USA/CA_CDC_5574/2020 (Alfa, B.1.1.7)	0,006 TCID ₅₀ /ml	8	62,5 %
			0,02 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %
			0,06 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
			0,17 TCID ₅₀ /ml	7	100 %
	0,5 TCID ₅₀ /ml		7	100 %	
	1,5 TCID ₅₀ /ml		7	100 %	
	Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	0,002 TCID ₅₀ /ml	8	62,5 %	
		0,006 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		0,02 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		0,06 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		0,17 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		0,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)	0,001 TCID ₅₀ /ml	8	37,5 %	
		0,004 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
		0,013 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		0,04 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		0,11 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		0,33 TCID ₅₀ /ml	4	100 %	
	Italy-INMI1	7,44 kopii/ml ¹	8	37,5 %	
		22,33 kopii/ml ¹	8	87,5 %	
		67 kopii/ml ¹	8	100 %	
200 kopii/ml ¹		8	100 %		
600 kopii/ml ¹		8	100 %		
Isolate Hong Kong/VM20001061/2020	7,44 kopii/ml ¹	8	25,0 %		
	22,33 kopii/ml ¹	8	87,5 %		
	67 kopii/ml ¹	7	100 %		
	200 kopii/ml ¹	7	100 %		
	600 kopii/ml ¹	7	100 %		

¹Tyto varianty byly poskytnuty pouze s kvantifikací „celkové RNA“, která zahrnuje jak virovou RNA, tak RNA hostitelských buněk.

Tabulka 10. Testované kmeny virů Flu A, Flu B, RSV A, RSV B a SARS-CoV-2 – potvrzení úrovně reaktivity

Potvrzení					
Cíl	Kmen		Hladina	Poč. platných výsledků	% poz.
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	1,0 TCID ₅₀ /ml	23	91,3 %
			1,5 TCID ₅₀ /ml	23	100 %
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,5 TCID ₅₀ /ml	23	82,6 %
			1,0 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
			0,33 TCID ₅₀ /ml	24	85,7 %
		A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,67 TCID ₅₀ /ml	24	95,2 %
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	10 CEID ₅₀ /ml	24	100 %
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,25 TCID ₅₀ /ml	24	87,0%
			0,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,5 TCID ₅₀ /ml	23	91,3 %
			1,0 TCID ₅₀ /ml	23	95,7 %
		Kansas/14/2017 (H3N2)	12 TCID ₅₀ /ml	23	100 %
			5 CEID ₅₀ /ml	23	91,3 %
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	10 CEID ₅₀ /ml	23	100 %
		A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /ml	24	91,7 %
			0,03 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
	H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	10,87 pg/ml ¹	24	100 %
H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	2 pg/ml ¹	24	83,3 %	
		4 pg/ml ¹	23	100 %	
		8 pg/ml ¹	23	100 %	
H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1:3.3E4 ¹	24	95,7 %	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	7,6 pg/ml ¹	23	73,9 %	
		22,67 pg/ml ¹	23	100 %	
Flu B	Linie Victoria	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	1 TCID ₅₀ /ml	23	95,7 %
		Washington/02/2019 (Victoria)	5 CEID ₅₀ /ml	24	95,8 %
			10 CEID ₅₀ /ml	24	100 %
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	0,01 TCID ₅₀ /ml	23	83,3 %
		0,03 TCID ₅₀ /ml	24	100 %	
	Linie Yamagata	Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	0,05 CEID ₅₀ /ml	24	100 %
		B/Utah/09/2014 (linie Yamagata)	0,56 TCID ₅₀ /ml	24	87,0 %
			1,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
			0,75 TCID ₅₀ /ml	24	87,5 %
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	1,5 TCID ₅₀ /ml	20	95,0 %
		3,0 TCID ₅₀ /ml	24	100 %	
RSV	RSVA	A (dlouhý)	2 PTJ/ml	24	91,7 %
			4 PTJ/ml	24	95,8 %
	RSVB	B (9320)	0,15 PTJ/ml	24	100 %
			0,3 PTJ/ml	21	100 %
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)		1,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
			3 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
			4,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		USA/CA_CDC_5574/2020 (Alfa, B.1.1.7)	0,02 TCID ₅₀ /ml	24	95,8 %
			0,06 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	0,006 TCID ₅₀ /ml	24	95,8 %
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)		0,006 TCID ₅₀ /ml	24	87,5 %
			0,013 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		Italy-INMI1	22 kopii/ml ¹	24	95,8 %
			67 kopii/ml ¹	24	100 %
Isolate Hong Kong/VM20001061/2020	22 kopii/ml ¹	24	57,1 %		
	67 kopii/ml ¹	24	100 %		

¹Tyto varianty byly poskytnuty pouze s kvantifikací „celkové RNA“, která zahrnuje jak virovou RNA, tak RNA hostitelských buněk.

Reaktivita analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay při detekci různých klinických izolátů viru SARS-CoV-2 byla prokázána provedením analýzy *in silico* s primery a sondami analýzy vůči všem sekvencím dostupným v GenBank (listopad 2021) pomocí webového nástroje NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Výsledky ukazují, že primery a sonda pro virus SARS-CoV-2 vykazují 100% homologii u více než 98 % sekvencí. Celkově vykazují primery a sondy > 95% homologii se všemi analyzovanými sekvencemi.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla charakterizována testováním deseti panelů virů Flu A, Flu B, RSV A, RSV B nebo SARS-CoV-2, které byly jednotlivě přidány na 2 úrovních: [mírně pozitivní (5x LoD) a nízko pozitivní (2x LoD)], a jednoho negativního panelu. Panely byly testovány se třemi šaržemi testovacích proužků NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip, vyrobených v souladu se SVP, na dvou soustavách NeuMoDx System a v průběhu šesti po sobě nenásledujících dní. Prvky panelu byly připraveny v simulovaných vzorcích nazofaryngeálních stěrů připravených se 3 000 lidských epitelálních buněk na jeden ml univerzálního přepravního média Universal Viral Transport (UVT), do nichž byl přidán reprezentativní kmen viru Flu A, Flu B, RSV A, RSV B a SARS-CoV-2. Testovací proužky NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip a pufr NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) byly identifikovány jako klíčové reagenty specifické pro test, které dokážou ovlivnit funkci analýzy. Z tohoto důvodu byl použit pracovní postup s předúpravou, aby bylo možné do studie zahrnout VVLB. Směrodatná odchylka pro hodnoty Ct v rámci tří šarží testovacích proužků NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay Test Strip a dvou soustav NeuMoDx Molecular System a mezi nimi byla $\leq 1,2$ s variačními koeficienty (CV) $\leq 4,0\%$ pro všechny cíle, což ukazuje na vynikající reprodukovatelnost, viz *tabulka 11, 12 a 13*.

Tabulka 11. Reprodukovatelnost testovacích proužků NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip napříč všemi soustavami/šaržemi/dny

Cíl	Úroveň cíle	Poč. platných	% pozitivních	Prům. Ct	SD	% CV
Flu A	Mírně poz.	72	100 %	31,21	0,59	1,9 %
	Nízko poz.	72	100 %	32,01	0,58	1,8 %
Flu B	Mírně poz.	72	100 %	31,02	0,39	1,3 %
	Nízko poz.	72	100 %	31,88	0,56	1,7 %
RSV A	Mírně poz.	72	100 %	29,71	0,95	3,2 %
	Nízko poz.	72	100 %	30,75	1,18	3,8 %
RSV B	Mírně poz.	72	100 %	28,43	0,53	1,9 %
	Nízko poz.	72	100 %	29,45	0,56	1,9 %
SARS-CoV-2	Mírně poz.	72	100 %	32,70	0,51	1,5 %
	Nízko poz.	72	100 %	33,68	0,56	1,7 %
Skutečně negativní		72	0 %	–	–	–

Tabulka 12. Reprodukovatelnost testovacích proužků NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip podle jednotlivých soustav

Panel		N0000096					N000012				
Cíl	Úroveň cíle	Poč. platných	% pozitivních	Prům. Ct	SD	% CV	Poč. platných	% pozitivních	Prům. Ct	SD	% CV
Flu A	Mírně poz.	36	100 %	31,37	0,66	2,1 %	36	100 %	31,05	0,46	1,5 %
	Nízko poz.	36	100 %	32,07	0,65	2,0 %	36	100 %	31,95	0,51	1,6 %
Flu B	Mírně poz.	36	100 %	31,10	0,40	1,3 %	36	100 %	30,94	0,37	1,2 %
	Nízko poz.	36	100 %	31,84	0,57	1,8 %	36	100 %	31,91	0,55	1,7 %
RSV A	Mírně poz.	36	100 %	29,94	0,97	3,2 %	36	100 %	29,49	0,89	3,0 %
	Nízko poz.	36	100 %	30,93	1,19	3,8 %	36	100 %	30,57	1,16	3,8 %
RSV B	Mírně poz.	36	100 %	28,60	0,58	2,0 %	36	100 %	28,26	0,42	1,5 %
	Nízko poz.	36	100 %	29,60	0,53	1,8 %	36	100 %	29,29	0,56	1,9 %
SARS-CoV-2	Mírně poz.	36	100 %	32,80	0,56	1,7 %	36	100 %	32,61	0,43	1,3 %
	Nízko poz.	36	100 %	33,83	0,64	1,9 %	36	100 %	33,52	0,42	1,2 %
Skutečně negativní		36	0 %	–	–	–	36	0 %	–	–	–

Tabulka 13. Reprodukovatelnost testovacích proužků NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip podle jednotlivých šarží reagensů

Panel		Šarže 1				Šarže 2				Šarže 3			
Cíl	Úroveň cíle	Poč. platných	Prům. Ct	SD	% CV	Poč. platných	Prům. Ct	SD	% CV	Poč. platných	Prům. Ct	SD	% CV
Flu A	Mírně poz.	24	31,06	0,38	1,2 %	24	31,49	0,62	2,0 %	24	31,08	0,65	2,1 %
	Nízko poz.	24	32,02	0,59	1,8 %	24	32,18	0,50	1,6 %	24	31,82	0,61	1,9 %
Flu B	Mírně poz.	24	31,05	0,39	1,2 %	24	31,08	0,47	1,5 %	24	30,94	0,29	0,9 %
	Nízko poz.	24	31,93	0,36	1,1 %	24	32,01	0,77	2,4 %	24	31,69	0,42	1,3 %
RSV A	Mírně poz.	24	29,04	0,71	2,4 %	24	30,40	0,66	2,2 %	24	29,69	0,94	3,2 %
	Nízko poz.	24	31,53	0,50	1,6 %	24	29,45	0,79	2,7 %	24	31,25	0,87	2,8 %
RSV B	Mírně poz.	24	28,65	0,54	1,9 %	24	28,29	0,52	1,8 %	24	28,35	0,47	1,7 %
	Nízko poz.	24	29,31	0,48	1,6 %	24	29,46	0,64	2,2 %	24	29,57	0,55	1,8 %
SARS-CoV-2	Mírně poz.	24	32,82	0,43	1,3 %	24	32,70	0,56	1,7 %	24	32,59	0,50	1,5 %
	Nízko poz.	24	33,42	0,58	1,7 %	24	33,80	0,57	1,7 %	24	33,81	0,47	1,4 %
Skutečně negativní		24	–	–	–	24	–	–	–	24	–	–	–

Klinická účinnost

Klinická výkonová charakteristika analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla stanovena pomocí retrospektivní srovnávací studie interních metod za použití zbytkových vzorků z nazofaryngeálních stěrů pocházejících z 4 geograficky odlišných míst klinických laboratoří. Do této studie byla zahrnuta také ředění klinických vzorků pozitivních na virus SARS-CoV-2, aby se prokázala klinická citlivost v blízkosti LoD.

Zbytkové vzorky z nazofaryngeálních stěrů od symptomatických pacientů poskytující laboratoř deidentifikovala a přidělila jim jedinečné identifikační číslo, čímž byl vytvořen důvěrný seznam spojující ID pacienta s deidentifikovanými vzorky testovanými pro účely studie. Pro tuto studii bylo odebráno celkem 747 jednotlivých vzorků z nazofaryngeálních stěrů. Všechny vzorky byly zpracovány jak přímým pracovním postupem, tak pracovním postupem s předúpravou, přičemž nakonec bylo získáno 739 platných a 8 neplatných výsledků v přímém pracovním postupu a 736 platných a 11 neplatných výsledků v pracovním postupu s předúpravou. Z těchto platných vzorků bylo 121 určeno výhradně k hodnocení cílových virů chřipky A, chřipky B a RSV. Pozitivní vzorky na chřipku A představují 54 z těchto vzorků, přičemž pozitivní vzorky na chřipku B 34 a pozitivní vzorky na RSV 33. V rámci této kohorty 121 vzorků poskytly dodávající klinické laboratoře výsledky pro všechny 3 sledované cíle. Tato kohorta pozitivních vzorků tak poskytla také 67 negativních výsledků na chřipku A, 87 negativních výsledků na chřipku B a 88 negativních výsledků na RSV. Výše uvedené negativní výsledky byly dále doplněny o 59 klinických vzorků, u nichž byly výsledky srovnávacích analýz potvrzeny jako negativní pro všechny 4 cíle. Celkem bylo v obou pracovních postupech identifikováno 106 vzorků jako pozitivních na virus SARS-CoV-2. Klinické negativní výsledky pro virus SARS-CoV-2 byly potvrzeny platným výsledkem testu NeuMoDx u 512 vzorků z přímého pracovního postupu a 509 vzorků z pracovního postupu s předúpravou.

Výsledek testování těchto vzorků byl obsluhou odebrán pro provedení „slepého pokusu“. Výsledky hlášené ze specifických legálně prodávaných molekulárních zařízení schválených FDA a CE, využívaných laboratořemi pro standardní testování péče, byly použity k provedení analýzy srovnávání metod.

Výsledky analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay poskytly klinickou citlivost 98,1 % v obou pracovních postupech pro cíl chřipky A a klinickou specifičnost 100 % pro přímý pracovní postup, resp. 99,2 % pro pracovní postup s předúpravou (*tabulka 14A*). Výsledky pro cíl Flu B poskytly pro oba pracovní postupy klinickou citlivost 97,1 % a klinickou specifičnost 100 % (*tabulka 14B*). Výsledky pro cíl RSV (nediferencované) poskytly klinickou citlivost 97 % pro oba pracovní postupy a klinická specifičnost byla stanovena na 99,3 % pro přímý pracovní postup, respektive 98,6 % pro postup s předúpravou (*tabulka 14C*). Výsledky pro cíl SARS-CoV-2 poskytly klinickou citlivost 97,2 % pro oba pracovní postupy, zatímco klinická specifičnost byla stanovena na 98,4 % pro přímý pracovní postup a 98,2 % pro pracovní postup s předúpravou (*tabulka 14D*). Spodní a horní meze 95% intervalů spolehlivosti, uvedené v *tabulkách 14A, 14B, 14C a 14D* níže, byly vypočteny za použití Wilsonovy metody s korekcí kontinuity.

Tabulka 14A. Shrnutí klinické účinnosti – Testovací proužky NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detekce Flu A
a) postup přímého zpracování a b) pracovní postup s předem upraveným vzorkem

(a) Postup přímého zpracování

Flu A		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	53	0	53
	NEG	1	126	127
	Celkem	54	126	180
Klinická citlivost (Flu A) = 98,1 % (88,8 % – 99,9 %)				
Klinická specifičnost (Flu A) = 100 % (96,3 % – 100 %)				

(b) Pracovní postup u předběžně upraveného vzorku

Flu A		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ	53	1	54
	NEG	1	125	126
	Celkem	54	126	180
Klinická citlivost (Flu A) = 98,1 % (88,8 % – 99,9 %)				
Klinická specifčnost (Flu A) = 99,2 % (95,0 % – 100 %)				

Tabulka 14B. Shrnutí klinické účinnosti – Testovací proužky NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detekce Flu B

(a) Přímý pracovní postup a (b) Pracovní postup S předúpravou

(a) Postup přímého zpracování

Flu B		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ	33	0	33
	NEG	1	146	147
	Celkem	34	146	180
Klinická citlivost (Flu B) = 97,1 % (82,9 % – 99,8 %)				
Klinická specifčnost (Flu B) = 100 % (96,8 % – 100 %)				

(b) Pracovní postup u předběžně upraveného vzorku

Flu B		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ	33	0	33
	NEG	1	146	147
	Celkem	34	146	180
Klinická citlivost (Flu B) = 97,1 % (82,9 % – 99,8 %)				
Klinická specifčnost (Flu B) = 100 % (96,8 % – 100 %)				

Tabulka 14C. Shrnutí klinické účinnosti – testovací proužky NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detekce RSV pomocí

(a) přímého pracovního postupu a (b) pracovního postupu s předúpravou

(a) Přímý pracovní postup

RSV		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ	32	1	33
	NEG	1	146	147
	Celkem	33	147	180
Klinická citlivost (RSV) = 97,0 % (82,5 % – 99,8 %)				
Klinická specifčnost (RSV) = 99,3 % (95,7 % – 100 %)				

(b) Pracovní postup u předběžně upraveného vzorku

RSV		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ	32	2	34
	NEG	1	145	146
	Celkem	33	147	180
Klinická citlivost (RSV) = 97,0 % (82,5 % – 99,8 %)				
Klinická specifčnost (RSV) = 98,6 % (94,7 % – 99,8 %)				

Tabulka 14D. Shrnutí klinické účinnosti – testovací proužky NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detekce SARS-CoV-2 a) postup přímého zpracování a b) pracovní postup s předem upraveným vzorkem

(a) Postup přímého zpracování

SARS-CoV-2		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ	103	8	111
	NEG	3	504	507
	Celkem	106	512	618
Klinická citlivost (SARS-CoV-2) = 97,2 % (91,3 % – 99,3 %)				
Klinická specifická (SARS-CoV-2) = 98,4 % (96,8 % – 99,3 %)				

(b) Pracovní postup u předběžně upraveného vzorku

SARS-CoV-2		Výsledek referenčního testu schváleného FDA/CE		
		POZ	NEG	Celkem
Výsledek testu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ	103	9	112
	NEG	3	500	503
	Celkem	106	509	615
Klinická citlivost (SARS-CoV-2) = 97,2 % (91,3 % – 99,3 %)				
Klinická specifická (SARS-CoV-2) = 98,2 % (96,5 % – 99,1 %)				

Analytická specifická a zkřížená reaktivita

Analytická specifická analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla hodnocena testováním panelu 47 organismů, který se skládal z 22 virových, 24 bakteriálních a 1 kvasinkového kmene, reprezentujících běžné respirační patogeny nebo flóru běžně přítomnou v dýchacích cestách. Bakterie a kvasinky byly testovány v koncentracích ~6E6 KTJ/ml nebo IFU/ml, pokud není uvedeno jinak. Viry byly testovány v koncentracích 1E5 až 1E6 TCID₅₀/ml nebo kopií/ml, pokud není uvedeno jinak. Pro potvrzení potenciální zkřížené reaktivity mezi SARS-CoV-2 a rodinou koronavirů (229E, OC43, NL63, MERS a SARS-1) spolu s bakterií *Legionella pneumophila* byly zahrnuty další replikáty (> 20), aby byl splněn požadavek MDCG pro zdravotnické prostředky pro diagnostiku in vitro pro stanovení viru SARS-CoV-2. Analytická specifická analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla 100 % pro Flu A, Flu B, RSV A, RSV B i SARS-CoV-2.

Dalším testovaným členem rodiny koronavirů byl HKU1, avšak z důvodu nedostupnosti viru a genomové RNA byly testovány 4 repliky syntetického materiálu. Byla také provedena analýza *in-silico* mezi primery a sondami NeuMoDx SARS-CoV-2 a genomy koronaviru HKU1, publikovanými v GenBank, aby se prozkoumala potenciální zkřížená reaktivita. Celkem 57 sekvencí genomů HKU1 bylo získáno z databáze NCBI Virus NIH. Všechny sekvence HKU1 měly 3 nebo více neshod s každým primerem a sondou NeuMoDx SARS-CoV-2. Nebyla zjištěna žádná blízká homologie. Proto se neočekává žádná zkřížená reaktivita mezi koronavirem HKU1 a analýzou NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2.

Tabulka 15. Výsledky analytické specifické

Organismus	Koncentrace	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
Adenovirus typu 1	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Adenovirus typu 7	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> 1176	10 ng/ml	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	10 ng/ml	-	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
EBV	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Hemophilus influenzae</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
HHV 6A	1E6 kopií/ml	-	-	-	-
HHV 7	1E6 kopií/ml	-	-	-	-
HHV 8	1E6 kopií/ml	-	-	-	-
HSV 1	1E6 kopií/ml	-	-	-	-
HSV 2	1E6 kopií/ml	-	-	-	-
Lidský koronavirus 229E	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Lidský koronavirus HKU1	1E6 kopií/ml	-	-	-	-
Lidský koronavirus NL63	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Lidský koronavirus OC43	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Lidský enterovirus 68	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Lidský metapneumovirus	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-

Organismus	Koncentrace	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
Lidský virus parainfluenzy typ 1	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Lidský virus parainfluenzy typ 2	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Lidský virus parainfluenzy typ 3	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Lidský rhinovirus typ 1A	5E3 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus jensoni</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
Virus spalniček	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Koronavirus MERS EMC/2012	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
Virus příušnic	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero A	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero B	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero C	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero D	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
Koronavirus SARS	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	6E6 KTJ/ml	-	-	-	-
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016	3x LoD	+	-	-	-
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	3x LoD	-	+	-	-
RSV A2	3x LoD	-	-	+	-
RSV B (WV/14617/85)	3x LoD	-	-	+	-
SARS-CoV-2, 1. mezinárodní standard organizace WHO	3x LoD	-	-	-	+
Negativní kontrola (bez patogenů)	-	-	-	-	-

Tabulka 16. Analytická specifická – rodina koronaviřů spolu s bakterií *Legionella pneumophila* (testováno > 20 replikátů)

Organismus	Koncentrace	SARS-CoV-2
Lidský koronavirus NL63	1,00E+04 TCID ₅₀ /ml	-
SARS-koronavirus-1	1.00E+06 PFU/ml	-
MERS – koronavirus EMC/2012	1,00E+04 TCID ₅₀ /ml	-
Lidský koronavirus 229E	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml	-
Lidský koronavirus OC43	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6,00E+06 KTJ/ml	-
Pozitivní kontrola: SARS-CoV-2, první standard WHO	3x LoD	+
Negativní kontrola (bez patogenů)	-	-

Interferující látky – komenzální organismy

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla testována z hlediska interference v přítomnosti necílových organismů (potenciálně přítomných v horních cestách dýchacích) hodnocením charakteristik testu při nízkých koncentracích (~ 3X LoD) virů Flu A, Flu B, RSV A, RSV B a SARS-CoV-2 v přítomnosti vysokých koncentrací organismů uvedených v *tabulce 15* výše. Kromě toho byly k potvrzení potenciální interference mezi virem SARS-CoV-2 a rodinou koronaviřů (229E, OC43, NL63, MERS a SARS-1) spolu s bakterií *Legionella pneumophila* (*tabulka 16*) zahrnuty další replikáty (> 20), aby byl splněn požadavek MDCG pro zdravotnické prostředky pro diagnostiku in vitro pro stanovení viru SARS-CoV-2. Tyto vzorky byly pro část studie zabývající se interferencí obohaceny pouze o SARS-CoV-2 v koncentraci ~3x LoD. U všech cílů byla zaznamenána 100% míra detekce. Nebyla tedy pozorována žádná interference při detekci cíle s žádným z komenzálních organismů.

Interferující látky – endogenní/exogenní

Analýza NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay byla vyhodnocena z hlediska náchylnosti na interferenci způsobenou látkami potenciálně spojenými s odběrem vzorků z nazofaryngeálních stěrů. Reziduální klinicky negativní vzorky z nazofaryngeálních stěrů byly obohaceny cílovými viry Flu A, Flu B, RSV A, RSV B nebo SARS-CoV-2 při koncentraci 3x LoD a zpracovány v přítomnosti i nepřítomnosti látek uvedených v *tabulce 17*. Žádná látka zahrnutá do testování neměla u žádného cíle nepříznivý účinek na účinnost analýzy.

Tabulka 17. Látky testované kvůli interferenci

	Látka	Popis / aktivní složka	Koncentrace*
Exogenní	Neo-Syneprine	Fenylefrin	15 % obj./obj.
	Nosní gel – Ayr Saline Nasal Gel	Chlorid sodný s konzervačními látkami	15 % obj./obj.
	Homeopatická úleva od alergie – Similasan	Cardiospermum, Sabadilla, Luffa operculata, Galphimia glauca	15 % obj./obj.
	Nature's Bounty Zinc	Glukonát zinečnatý	0,1 mg/ml
	Orální anestetikum/analgetikum – Oragel	Benzokain, benzalkonium-chlorid	1 % obj./obj.
	Nosní sprej – Afrin	Oxymetazolin	15 % hm./obj.
	Nosní sprej – Zicam	Luffa operculata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum, síra	15 % obj./obj.
	Nosní kortikosteroid – Flonase	Flutikason	5 % obj./obj.
	Nosní kortikosteroid – Rhinocort	Budesonid	5 % obj./obj.
	Nosní kortikosteroid – Nasacort	Triamcinolon	5 % obj./obj.
	Nosní kortikosteroid – Dexamethasone	Dexametazon	10 mg/ml
	Nosní kortikosteroid – Mometasone	Mometazon	10 mg/ml
	Nosní kortikosteroid – Beclomethasone	Beklometazon	10 mg/ml
	Chloraseptic Throat Lozeng	Benzokain, mentol	2 mg/ml
	Antibiotická nosní mast	Mupirocin	10 mg/ml
	Endogenní	Antivirový lék Relenza	Zanamivir
Antivirový lék TamiFlu		Oseltamivir	25 mg/ml
Antibiotika, systémová		Tobramycin	15 mg/ml
Mucin		Purifikovaný mucinový protein	2,5 % hm./obj.
Lidská krev		Krev	2 % obj./obj.

*Poznámka: Uvedené koncentrace jsou ty, které se používají k nasycení tampónů před nadávkováním umělé připravených pozitivních klinických vzorků s interferující látkou. Jsou proto reprezentativní pro tolerovanou úroveň v místě odběru stěrů.

Křížová kontaminace

Míra křížové kontaminace pro analýzu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na soustavách NeuMoDx Molecular 288 a 96 byla stanovena zpracováním vysoce pozitivních a negativních vzorků střídaně v „šachovnicovém“ vzoru. Všechny vzorky se skládaly ze simulovaného materiálu NP stěrů, přičemž pozitivní vzorky byly obohaceny o $\geq 10^5$ TCID₅₀/ml (nebo $\geq 10\ 000\times$ LoD). Bylo provedeno pět sad testů dle „šachovnicového vzoru“, které nakonec vytvořily celkem 60 negativních replikátů a 60 pozitivních replikátů na obou soustavách NeuMoDx 288 Molecular System a 96 Molecular System. V obou typech soustav bylo všech 120 replikátů negativních vzorků přesně nahlášeno jako negativní, což dokazuje nepřítomnost křížové kontaminace během zpracování vzorků na soustavách NeuMoDx System.

Doba realizace

Doba realizace zpracování 8 vzorků pomocí analýzy NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je stanovena na ~85 minut u soustavy NeuMoDx N288 a ~78 minut u soustavy NeuMoDx 96 pro zpracování 4 vzorků.

Celková míra selhání systému

Celková míra selhání systému pro analýzu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 byla vyhodnocena testováním 1 úrovně cílového viru SARS-CoV-2 v koncentraci $\sim 3\times$ LoD, připravené obohacením klinicky negativních vzorků nazofaryngeálních stěrů s 1. mezinárodním standardem organizace WHO pro SARS-CoV-2. Celkem 200 replikátů bylo zpracováno pomocí pracovního postupu Direct (Přímý) na soustavách NeuMoDx 96 Molecular System a NeuMoDx 288 Molecular System (100 replikátů na jednu soustavu). Míra selhání byla vypočtena jako procento falešně negativních výsledků z celkového počtu získaných platných výsledků. Bylo zjištěno, že míra detekce cíle SARS-CoV-2 v analýze NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay je 100 % jak pro soustavu NeuMoDx 96 Molecular System, tak pro soustavu NeuMoDx 288 Molecular Systems, což ukazuje 0% míru selhání v obou systémech.

Robustnost systému – inhibice

Míra inhibice byla stanovena výpočtem míry výsledku Unresolved (nerozlišeno) (kontrola zpracování vzorku nebyla amplifikován, bez přítomnosti systémové chyby) u všech negativních vzorků provedených v průběhu verifikačních a validačních studií. Z celkového počtu 1 221 zpracovaných negativních vzorků bylo získáno celkem 11 výsledků Unresolved (nerozlišeno), což prokazuje 0,9% míru inhibice pro analýzu NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

REFERENCE

1. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

BD™ je ochranná známka společnosti Becton, Dickinson and Company

Hamilton® je registrovaná ochranná známka společnosti Hamilton Company

Minitip Nylon® Flocked Swab je registrovaná ochranná známka společnosti Copan Diagnostics, Inc.









NeuMoDx™ a NeuDry™ jsou obchodní značky společnosti NeuMoDx Molecular, Inc.


TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

UTM-RT® je registrovaná ochranná známka společnosti Copan Diagnostics, Inc.

Všechny ostatní názvy produktů, ochranné známky a registrované ochranné známky, které se mohou objevit v tomto dokumentu, jsou majetkem příslušných vlastníků.

LEGENDA K SYMBOLŮM

R only	Pouze na předpis		Nepoužívejte opakovaně
	Výrobce		Obsahuje dostatečné množství pro „n“ testů
IVD	Prostředek zdravotnické techniky pro diagnostiku <i>in vitro</i>		Přečtěte si návod k použití
EC REP	Autorizovaný zástupce pro Evropské společenství		Upozornění
REF	Katalogové číslo	CE	Značka CE
LOT	Číslo šarže	CONT	Obsahuje
	Datum spotřeby		Obsahuje biologický materiál živočišného původu
	Omezení teploty		

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

Technická podpora / vigilanční hlášení: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANY
+49 2103 290

CE