

REF 201501 NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip 2.0

R only

VORSICHT: Nur für den US-Export

IVD Nur zur Verwendung mit dem NeuMoDx 288 Molecular System und dem NeuMoDx 96 Molecular System in der *In-vitro*-Diagnostik vorgesehen.

 Für Aktualisierungen dieser Beilage siehe: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Detaillierte Anleitungen sind dem Benutzerhandbuch für das NeuMoDx 288 Molecular System, Teile-Nr. 40600108, zu entnehmen.

Detaillierte Anleitungen sind dem Benutzerhandbuch für das NeuMoDx 96 Molecular System, Teile-Nr. 40600317, zu entnehmen.

VERWENDUNGSZWECK

Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ist ein automatisierter *In-vitro*-Nukleinsäureamplifikationstest zur Quantifizierung der DNA des humanen Epstein-Barr-Virus (EBV) in EDTA-Plasma immungeschwächter Transplantationspatienten.

Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, durchgeführt auf dem NeuMoDx 288 Molecular System und dem NeuMoDx 96 Molecular System, umfasst eine automatisierte DNA-Extraktion zur Isolation der Zielnukleinsäuren aus der Probe und eine Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), die auf zwei hochkonservierte Regionen im EBV-Genom abzielt.

Der Assay ist für die Verwendung als Hilfsmittel bei der Überwachung der EBV-DNA-Konzentration im peripheren Blut vorgesehen, um das Ansprechen auf eine antivirale Behandlung zu bewerten. Dieser Assay ist für die Verwendung im Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild und anderen Labormarkern für die Krankheitsprognose vorgesehen und soll das klinische Management und die Überwachung von EBV-Infektionen unterstützen.

Der Assay ist nicht für die Verwendung als Screeningtest auf das Vorhandensein von EBV-DNA in Blut oder Blutprodukten vorgesehen. Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ist für die Verwendung durch ausgebildetes Kliniklabpersonal vorgesehen, das speziell in den Techniken der Echtzeit-PCR und für *in-vitro*-diagnostische Methoden und/oder die NeuMoDx Molecular Systeme geschult wurde. Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ist nicht als Schnelltest für die Verwendung zu Hause oder am Point of Care vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Zur Plasmagewinnung kann humanes Vollblut verwendet werden, das in sterilen Blutentnahmeröhrchen mit EDTA als Antikoagulans entnommen wurde. Um einen Test zu beginnen, wird Plasma in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen in einen Probenröhrchenträger gesetzt und auf die NeuMoDx Systemarbeitsplattform geladen. Für jede Probe wird ein 550- μ l-Aliquot der Plasmaprobe mit NeuMoDx Lysis Buffer 1 vermischt, und das NeuMoDx System führt automatisch alle Schritte durch, die erforderlich sind, um die Zielnukleinsäure zu extrahieren, die isolierte DNA für die Echtzeit-PCR-Amplifikation vorzubereiten, eine Amplifikation zu erreichen und die Amplifikationsprodukte (zwei hochkonservierte Regionen im EBV-Genom), falls vorhanden, nachzuweisen. Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 enthält eine DNA-Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1). Diese Kontrolle erlaubt es, möglicherweise in der Probe vorhandene inhibitorische Substanzen sowie Fehler des NeuMoDx Systems oder von Reagenzien während des Extraktions- und Amplifikationsprozesses zu erkennen.

EBV ist ein verbreitetes doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der humanen Herpesviren, das Menschen aller Altersgruppen infiziert. Schätzungen zufolge sind oder waren > 90 % aller Personen weltweit mit EBV infiziert.¹ EBV wird über Körperflüssigkeiten wie Speichel, Blut oder Samen und bei Organtransplantationen übertragen. Viele Personen infizieren sich bereits in der Kindheit mit EBV. Diese Personen sind in der Regel zwar mit EBV infiziert, aber asymptomatisch. Bei immungeschwächten Personen kann eine EBV-Infektion mit schwereren Symptomen und Komplikationen verbunden sein. Latente EBV-Infektionen stellen besonders für Patienten nach der Transplantation ein großes Risiko dar. Zu den lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLD) zählt die EBV-induzierte Tumorbildung in B-Zellen, die durch die Auswirkungen von Immunsuppressiva auf die Immunkontrolle von EBV bedingt ist. Diese stellt eine der bedeutendsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen bei Patienten nach Organtransplantation jeglicher Art dar.²

Die Überwachung der EBV-Viruslast kann als Hilfsmittel bei der Diagnose und dem Management EBV-assoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen nach Transplantation (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLD) eingesetzt werden. Die Diagnose muss jedoch anhand einer Biopsie erfolgen. Des Weiteren kann die Überwachung der EBV-Viruslast zur Überwachung des Ansprechens auf EBV-assoziierte Behandlung lymphoproliferativer Erkrankungen nach Transplantation (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLD), gewöhnlich mit Rituximab, und einer Reduktion der Behandlung mit Immunsuppressiva herangezogen werden.³

PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 verwendet zur Durchführung der Analyse auf dem NeuMoDx System den NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, NeuMoDx EBV Calibrators, NeuMoDx EBV External Controls, NeuMoDx Lysis Buffer 1 sowie allgemeine Reagenzien von NeuMoDx. Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 kombiniert die automatisierte DNA-Extraktion, die Amplifikation und den Nachweis mittels Echtzeit-PCR. Vollblutproben werden für die Gewinnung von Plasma in EDTA-Röhrchen entnommen. Die Plasmaprobe wird in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen in einen Probenröhrchenträger gesetzt und zur Verarbeitung auf die NeuMoDx Systemarbeitsplattform geladen. Es sind keine weiteren Bedieneingriffe erforderlich.

Die NeuMoDx Systeme verwenden eine Kombination aus Wärme, lytischem Enzym und Extraktionsreagenzien, um automatisch Zelllyse, DNA-Extraktion und die Entfernung von Inhibitoren durchzuführen. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden von magnetischen Affinitätsmikrosphären erfasst. Die Mikrosphären werden dann zusammen mit den gebundenen Nukleinsäuren in die NeuMoDx Cartridge geladen, wo die ungebundenen/nicht spezifisch gebundenen DNA-Komponenten mithilfe des NeuMoDx Wash Reagent ausgewaschen werden. Zuletzt wird die gebundene DNA mit NeuMoDx Release Reagent eluiert. Die NeuMoDx Systeme verwenden die eluierte DNA anschließend zur Rehydrierung der proprietären NeuDry™ Amplifikationsreagenzien, die alle für die PCR-Amplifikation der EBV-spezifischen Zielsequenzen sowie der SPC1 erforderlichen Elemente enthalten.

Nach der Rekonstitution der NeuDry PCR-Reagenzien dispensiert das NeuMoDx System die vorbereitete PCR-fertige Mischung in die NeuMoDx Cartridge. Amplifikation und Nachweis der Kontroll- und Ziel-DNA-Sequenzen (falls vorhanden) erfolgen im PCR-Kammerbereich der NeuMoDx Cartridge. Die NeuMoDx Cartridge ist so konzipiert, dass sie nach dem Echtzeit-PCR das Amplifikat enthält, wodurch im Wesentlichen das Kontaminationsrisiko nach der Amplifikation beseitigt wird.

Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 zielt auf zwei hochkonservierte Regionen des EBV-Genoms ab, BALF5 und BXFL1. Das duale Zieldesign reduziert das Risiko falsch negativer Ergebnisse im Fall einer Mutation in einer Zielregion und steigert so die Robustheit des Assays. Die amplifizierten Ziele werden in Echtzeit anhand von Hydrolyse-Sonden-Chemie (allgemein als TaqMan® Chemie bezeichnet) nachgewiesen, wobei fluorogene Oligonukleotidsondenmoleküle angewendet werden, die spezifisch für die Amplifikate ihrer jeweiligen Ziele sind.

TaqMan Sonden bestehen aus einem Fluorophor, das kovalent am 5'-Ende der Oligonukleotidsonde gebunden ist, und einem Quencher am 3'-Ende. Bei intakter Sonde führt die Nähe des Fluorophors zum Quencher dazu, dass das Quencher-Molekül die Fluoreszenz des Fluorophors durch Förster-Resonanzenergietransfer (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) unterdrückt.

TaqMan Sonden sind so entwickelt, dass sie sich an einen DNA-Bereich, der durch einen spezifischen Satz von Primern amplifiziert wurde, anlagern. Während die Taq-DNA-Polymerase den Primer verlängert und den neuen Strang synthetisiert, sorgt die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase für den Abbau der Sonde, die sich an das Template angelagert hat. Der Abbau der Sonde setzt das Fluorophor frei, wodurch sich der Abstand zum Quencher vergrößert. Dadurch wird der Löscheffekt durch FRET aufgehoben und die Fluoreszenz des Fluorophors kann nachgewiesen werden. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zum freigesetzten Fluorophor und kann zur Menge der vorliegenden Ziel-DNA korreliert werden.

Eine TaqMan-Sonde, die mit einem Fluorophor (Anregung: 490 nm und Emission: 521 nm) am 5'-Ende und einem dunklen Quencher am 3'-Ende markiert ist, wird zum Nachweis beider EBV-DNA-Ziele verwendet. Für den Nachweis der SPC1 wird die TaqMan-Sonde mit einem alternativen Fluoreszenzfarbstoff (Anregung: 535 nm und Emission: 556 nm) am 5'-Ende und einem dunklen Quencher am 3'-Ende markiert. Die NeuMoDx System Software überwacht das von den TaqMan Sonden am Ende jedes Amplifikationszyklus abgegebene Fluoreszenzsignal. Nach Abschluss der Amplifikation analysiert die NeuMoDx System Software die Daten und gibt ein Ergebnis aus (POSITIVE (Positiv)/NEGATIVE (Negativ)/INDETERMINATE (Unbestimmt)/NO RESULT (Kein Ergebnis)/UNRESOLVED (Offen)). Lautet das Ergebnis POSITIVE (positiv), gibt die NeuMoDx System Software auch einen quantitative Wert für die Probe aus oder meldet, ob die berechnete Konzentration außerhalb des linearen Bereichs liegt.



REAGENZIEN/VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bereitgestelltes Material

REF	Inhalt	Einheiten pro Packung	Tests pro Einheit	Tests pro Packung
201501	NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 <i>RT-PCR-Trockenreagenzien, welche EBV- und SPC1-spezifische TaqMan Sonden und Primer enthalten.</i>	6	16	96

Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien (separat bei QIAGEN erhältlich)

REF	Inhalt
800501	NeuMoDx EBV Calibrators <i>Sets aus EBV-Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration für den Einmalgebrauch, zur Validierung der Standardkurve (1 Fläschchen pro Kontrolle = 1 Set)</i>
900502	NeuMoDx EBV External Controls <i>Sets aus schwach positiven, stark positiven und negativen EBV-Kontrollen zum Einmalgebrauch, zum täglichen Nachweis der Gültigkeit des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 (1 Fläschchen pro Kontrolle = 1 Set)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Getrocknete paramagnetische Partikel und Probenprozesskontrollen sowie getrocknetes lytisches Enzym</i>
400500	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hamilton® CO-RE/CO-RE II Spitzen (300 µl) mit Filtern
235905	Hamilton CO-RE/CO-RE II Spitzen (1000 µl) mit Filtern

Benötigte Instrumente

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] oder NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]
NeuMoDx System Software Version 1.9.2.6 oder höher



WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Der NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 ist ausschließlich zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik mit den NeuMoDx Systems vorgesehen.
- Die Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn das Sicherheitssiegel aufgebrochen oder die Verpackung bei Ankunft beschädigt ist.
- Verbrauchsmaterialien oder Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbeutel bei der Ankunft geöffnet oder beschädigt ist.
- Bevor Testergebnisse für klinische Proben generiert werden können, muss eine gültige Testkalibrierung (generiert durch Verarbeitung von NeuMoDx EBV Calibrators [REF 800501] mit hoher und niedriger Konzentration) verfügbar sein.
- NeuMoDx EBV External Controls [REF 900502] müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden, solange Tests mit dem NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 durchgeführt werden.
- Das Mindestprobenvolumen der sekundären Aliquote des EDTA-Plasmas ist im Abschnitt „Testvorbereitung“ unten angegeben. Ein Volumen unter dem angegebenen Mindestvolumen kann zu dem Fehler „Quantity Not Sufficient“ (Menge nicht ausreichend) führen.
- Die Verwendung von Proben, die bei nicht geeigneten Temperaturen oder über die angegebenen Lagerzeiten hinaus aufbewahrt wurden, kann zu ungültigen oder fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Eine Kontamination von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien mit Mikroben und Desoxyribonuklease (DNase) ist zu vermeiden. Bei Verwendung von Sekundärröhrchen wird die Verwendung steriler, DNase-freier Einwegtransferpipetten empfohlen. Für jede Probe eine neue Pipette verwenden.
- Zur Vermeidung von Kontamination NeuMoDx Cartridge nach der Amplifikation weder handhaben noch beschädigen. NeuMoDx Cartridges unter keinen Umständen aus dem Behälter für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 288 Molecular System) oder dem Eimer für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 96 Molecular System) entnehmen. Die NeuMoDx Cartridge ist dafür konzipiert, Kontamination zu verhindern.
- Wenn das Labor auch PCR-Tests mit offenen Röhrchen ausführt, muss unbedingt gewährleistet werden, dass der NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, die für die Tests zusätzlich benötigten Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, persönliche Schutzausrüstung wie Handschuhe und Laborkittel sowie das NeuMoDx System nicht kontaminiert werden.
- Bei der Handhabung von NeuMoDx Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sollten puderfreie Nitrilhandschuhe getragen werden. Es ist darauf zu achten, dass die Oberseite der NeuMoDx Cartridge, die Oberfläche der Versiegelungsfolie eines NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 und einer NeuMoDx Extraction Plate oder die Oberseiten von Behältern mit NeuMoDx Lysis Buffer nicht berührt werden; die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien dürfen ausschließlich an den Seitenflächen angefasst werden.
- Für jedes Reagenz werden, sofern erforderlich, Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) bereitgestellt unter www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Nach der Durchführung des Tests Hände gründlich waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen Proben oder Reagenzien verarbeitet werden, nicht rauchen, trinken oder essen.
- Proben sind immer wie infektiöses Material und entsprechend den sicheren Laborverfahren (beschrieben in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ und im CLSI-Dokument M29-A4) zu behandeln.⁵
- Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen entnehmen Sie bitte den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS).
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfall entsprechend den nationalen, bundesstaatlichen, regionalen, kommunalen und lokalen Vorschriften entsorgen. Befolgen Sie die Empfehlungen im Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheet, SDS).

NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0



Enthält: Borsäure. Gefahr! Verursacht schwere Augenreizung. Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen. Unter Verschluss aufbewahren. Inhalt/ Behälter einer anerkannten Abfallentsorgungsanlage zuführen.

Notfallinformationen

CHEMTREC

Außerhalb der USA und Kanada +1 703-527-3887



LAGERUNG, HANDHABUNG UND STABILITÄT VON PRODUKTEN

1. Die NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 sind in der Primärverpackung bei Lagerung bei 15–28 °C bis zum angegebenen Ablaufdatum stabil.
2. Ein einmal in das NeuMoDx System geladener NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 kann dort bis zu 14 Tage belassen werden. Die verbleibende Haltbarkeitsdauer der im Gerät befindlichen Teststreifen wird durch die Software verfolgt und dem Benutzer in Echtzeit mitgeteilt. Das System fordert zur Entfernung von Teststreifen auf, die schon über den zulässigen Zeitraum hinaus in Verwendung sind.

- Obwohl die NeuMoDx EBV Calibrators und NeuMoDx EBV External Controls nicht infektiös sind, sollten sie nach Verwendung als biogefährlicher Laborabfall entsorgt werden, um das Risiko einer Kontamination zu verringern.

PROBENNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

Alle Proben so handhaben, als seien sie in der Lage, Infektionserreger zu übertragen.

- Vollblut oder andere Proben, die in Primärröhrchen aufbewahrt werden, nicht einfrieren.
- Zur Gewinnung von Plasmaproben sollte Vollblut in sterilen Röhrchen entnommen werden, die EDTA als Antikoagulans enthalten. Die Anweisungen des Herstellers der Probenentnahmeröhrchen befolgen.
- Vollblut, das in den oben aufgeführten Produkten entnommen wurde, kann vor der Plasmagewinnung bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 25 °C gelagert und/oder transportiert werden. Die Plasmagewinnung ist gemäß den Anweisungen des Herstellers durchzuführen.
- Die vorbereiteten Plasmaproben können bis zu 8 Stunden vor Beginn der Verarbeitung im NeuMoDx System aufbewahrt werden. Falls zusätzliche Lagerungszeit benötigt wird, empfiehlt es sich, die Proben in entweder gekühlt zu lagern oder einzufrieren.
- Die vorbereiteten Plasmaproben sollten vor den Tests zwischen 2 und 8 °C nicht länger als 7 Tage und bei Raumtemperatur maximal 8 Stunden lang gelagert werden.
- Die vorbereiteten Plasmaproben können vor der Verarbeitung bei -20 °C bis zu 8 Wochen lang gelagert werden. Plasmaproben sollten vor der Verwendung nicht mehr als 2 Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.
 - Wenn die Proben gefroren sind, diese bei Raumtemperatur (15–30 °C) vollständig auftauen lassen und dann vortexen, um eine gleichmäßige Verteilung in der Probe zu erhalten. Proben sollten vor dem Test auf Raumtemperatur gebracht werden.
 - Nach dem Auftauen gefrorener Proben sollten diese innerhalb von 8 Stunden getestet werden.
- Wenn die Proben verschickt werden, sind sie in Übereinstimmung mit den geltenden Vorschriften auf Landes- und/oder internationaler Ebene zu verpacken und beschriften.

GEBRAUCHSANWEISUNG

Testvorbereitung

- Proben-Barcodeetikett auf einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen anbringen, wie nachstehend beschrieben.
- Ein Aliquot der Probe in ein mit dem NeuMoDx System kompatibles, mit Barcode versehenes Probenröhrchen überführen. Dabei die unten angegebenen Volumina beachten:
- Für Plasmaproben:*
 - Probenröhrchenträger (32 Röhrchen): 11–14 mm Durchmesser und 60–120 mm Höhe; Mindestfüllvolumen ≥ 750 µl
 - Probenröhrchenträger (24 Röhrchen): 14,5–18 mm Durchmesser und 60–120 mm Höhe; Mindestfüllvolumen ≥ 1100 µl
 - Probenröhrchenträger für geringes Volumen (32 Röhrchen): 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit Konusboden; Mindestfüllvolumen ≥ 650 µl

Betrieb des NeuMoDx System

Detaillierte Anleitungen sind den Benutzerhandbüchern für das NeuMoDx 288 Molecular System und das NeuMoDx 96 Molecular System (Teile-Nr. 40600108 und 40600317) zu entnehmen.

- Einen oder mehrere NeuMoDx System Teststreifenträger mit NeuMoDx EBV Quant Test Strip(s) 2.0 befüllen und den/die Teststreifenträger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
- Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software die erforderlichen Verbrauchsmaterialien in die Verbrauchsmaterialträger des NeuMoDx System geben und den/die Träger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
- Bei entsprechender Aufforderung durch die NeuMoDx System Software das NeuMoDx Wash Reagent und das NeuMoDx Release Reagent ersetzen, den Priming-Abfall, den Behälter für biogefährlichen Abfall (nur NeuMoDx 288 Molecular System), den Spitzenabfallbehälter (nur NeuMoDx 96 Molecular System) oder den Eimer für biogefährlichen Abfall (nur NeuMoDx 96 Molecular System) leeren.
- Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software die Calibrators [REF 800501] und/oder External Controls [REF 900502] wie erforderlich verarbeiten. Weitere Informationen hinsichtlich der Kalibratoren und Kontrollen sind dem Abschnitt *Ergebnisverarbeitung* zu entnehmen.
- Das/die Probenröhrchen in einen Probenröhrchenträger laden und darauf achten, dass die Deckel und etwaige Wattestäbchen von allen Röhrchen entfernt wurden.
- Den/die Probenröhrchenträger auf das Autolader-Regal setzen und über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden. Dadurch wird die Verarbeitung der für die identifizierten Tests geladenen Proben eingeleitet, sofern im System ein gültiger Testauftrag vorliegt.

ANWENDUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Der NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 kann ausschließlich auf NeuMoDx Systems verwendet werden.
- Die Leistung des NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 wurde für Plasmaproben ermittelt, die unter Verwendung von EDTA als Antikoagulans aus Vollblut gewonnen wurden. Die Verwendung des NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 mit Proben anderer Herkunft wurde nicht bewertet und die Leistungsmerkmale sind für andere Probentypen unbekannt.
- Da der Nachweis von EBV generell von der Anzahl der in der Probe vorhandenen Viruspartikel abhängig ist, sind ordnungsgemäße Probenahme, Handhabung und Lagerung für zuverlässige Ergebnisse erforderlich.

4. Eine unsachgemäße Probenahme, Handhabung, Lagerung, technische Fehler oder eine Verwechslung von Probenröhrchen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zusätzlich können falsch negative Ergebnisse erhalten werden, wenn die Anzahl von Viruspartikeln in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 liegt.
5. Das NeuMoDx System darf ausschließlich von Personal bedient werden, das in der Anwendung des NeuMoDx System geschult ist.
6. Wenn weder die EBV-Zielsequenzen noch das SPC1-Ziel amplifiziert werden, wird ein ungültiges Ergebnis („Indeterminate“ (Unbestimmt) oder „Unresolved“ (Offen)) ausgegeben und der Test sollte wiederholt werden.
7. Wenn vor Abschluss der Probenverarbeitung ein Systemfehler auftritt, wird „No Result“ (Kein Ergebnis) ausgegeben und der Test sollte wiederholt werden.
8. Sollte die nachgewiesene EBV-DNA-Konzentration oberhalb der ULoQ liegen, kann der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 mit einem verdünnten Aliquot der Originalprobe wiederholt werden. Empfohlen wird eine Verdünnung von 1:100 oder 1:1000 in EBV-negativem Plasma oder Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare®, Milford, MA). Das System berechnet anhand folgender Gleichung automatisch die Konzentration der Originalprobe: Konzentration der Originalprobe = \log_{10} (Verdünnungsfaktor) + gemeldete Konzentration der verdünnten Probe, sofern der Verdünnungsfaktor vor der Wiederholung korrekt in der Software ausgewählt wurde.
9. Das Vorliegen von PCR-Inhibitoren in Plasma kann zu einem Bestimmungsfehler im System führen. Tritt ein solcher auf, empfiehlt sich eine Testwiederholung mit der gleichen Probe nach 1:10- oder 1:100-Verdünnung in Basematrix.
10. Ein positives Ergebnis zeigt das Vorhandensein von EBV-DNA an.
11. Wenngleich die Möglichkeit gering ist, können Deletionen oder Mutationen in den konservierten Regionen, auf die der NeuMoDx EBV Quant Assay abzielt, den Nachweis und/oder die Quantifizierung beeinträchtigen und zu einem fehlerhaften Ergebnis führen.
12. Die Ergebnisse des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 sollten zusätzlich zu klinischen Beobachtungen und sonstigen Informationen, die dem Arzt zur Verfügung stehen, herangezogen werden. Der Test ist nicht zur Diagnose einer Infektion bestimmt.
13. Um Kontaminationen zu vermeiden, wird eine gute Laborpraxis, wie etwa das Wechseln der Handschuhe beim Umgang mit Proben verschiedener Patienten, empfohlen.

ERGEBNISVERARBEITUNG

Die verfügbaren Ergebnisse können in der Registerkarte „Results“ (Ergebnisse) im Fenster „Results“ (Ergebnisse) auf dem Touchscreen des NeuMoDx System angezeigt oder ausgedruckt werden. Die Ergebnisse des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 werden unter Anwendung des Entscheidungsalgorithmus und der Verarbeitungsparameter, die in der NeuMoDx EBV Quant Assay-Definitionsdatei (EBV Quant ADF Version 4.0.0 oder höher) spezifiziert sind, automatisch durch die NeuMoDx System Software generiert. Abhängig vom Amplifikationsstatus für Zielsequenz und Probenprozesskontrolle kann das Ergebnis des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 „Negative“ (Negativ), „Positive“ (Positiv) mit Angabe der EBV-DNA-Konzentration, „Indeterminate“ (Unbestimmt), „No Result“ (Kein Ergebnis) oder „Unresolved“ (Offen) sein. Die Ergebnisse werden auf Grundlage des ADF-Entscheidungsalgorithmus für die Ergebnisverarbeitung angegeben, wie nachstehend in *Tabelle 1 zusammengefasst*.

Tabelle 1: Ergebnisinterpretation für den NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Ergebnis	EBV-Zielsequenzen	Probenprozesskontrolle (SPC1)
Positive (Positiv)	AMPLIFIED (AMPLIFIZIERT) [2 ≤ Ct < 28 AND (UND) EPR > 1,3 AND (UND) EP > 1200] OR (ODER) [28 < Ct < 38 AND (UND) EP > 1200]	k. A.
Positive (Positiv), oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (Log10 IU/ml)	[CONC] (KONZ) > 8,0 log10 IU/ml, NO QUANT (KEINE QUANT)	k. A.
Positive (Positiv), unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (log10 IU/ml)	[CONC] (KONZ) < 1,48 log10 IU/ml, NO QUANT (KEINE QUANT)	k. A.
Negative (Negativ)	NOT AMPLIFIED (NICHT AMPLIFIZIERT) k. A. OR (ODER) [2 ≤ Ct < 28 AND (UND) EPR ≤ 1,3 AND (UND) EP > 1200] OR (ODER) [28 ≤ Ct < 38 AND (UND) EP > 1200] OR (ODER) Ct > 38	AMPLIFIED (AMPLIFIZIERT) [29 < Ct < 35 and (und) EP ≥ 2000]
No Result* (Kein Ergebnis)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nicht amplifiziert, Systemfehler festgestellt, Probenverarbeitung abgebrochen)	
Indeterminate* (Unbestimmt)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nicht amplifiziert, Systemfehler festgestellt, Probenverarbeitung abgeschlossen)	
Unresolved* (Offen)	Not Amplified, No System Error Detected (Nicht amplifiziert, kein Systemfehler festgestellt)	

EP = End Point Fluorescence (Endpunktfluoreszenz); EPR = End Point Fluorescence Ratio (Endpunktfluoreszenzverhältnis);

Ct = Cycling Threshold (Zyklusschwellenwert);

Quant = berechnete Menge an vorliegendem EBV, angegeben in \log_{10} IU/ml. Siehe Abschnitt „Testberechnung“ unten.

* Das System erlaubt eine optionale (Lauf-)Wiederholung, um die automatische erneute Verarbeitung im Falle eines ungültigen Ergebnisses zu ermöglichen und so Verzögerungen bei der Ergebnismeldung möglichst zu minimieren.

Testberechnung: Proben

1. Für Proben innerhalb des linearen Bereichs des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wird die Konzentration der EBV-DNA in den Proben anhand der gespeicherten Standardkurven in Verbindung mit dem Kalibrationskoeffizienten berechnet.
 1. Ein „Kalibrationskoeffizient“ wird auf Grundlage der Ergebnisse für die verarbeiteten NeuMoDx EBV Calibrators berechnet und dient dazu, die Gültigkeit der Standardkurve für jede Charge des NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 auf einem spezifischen NeuMoDx System nachzuweisen.
 2. Der Kalibrationskoeffizient wird vom System automatisch in die endgültige Bestimmung der Konzentration der EBV-DNA einbezogen.
2. Die Ergebnisse des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 werden in IU/ml und \log_{10} IU/ml angegeben.
3. Die resultierende Bestimmung der unbekanntenen Proben ist rückführbar auf den 1. internationalen Standard der WHO für das Epstein-Barr-Virus für Nukleinsäureamplifikationstechniken.

Testberechnung: Kalibratoren

Für die Quantifizierung von EBV-DNA in den Proben ist eine gültige Kalibrierung auf Grundlage der Standardkurve erforderlich. Um gültige Ergebnisse zu generieren, muss eine Testkalibrierung mit den von NeuMoDx Molecular, Inc. bereitgestellten Kalibratoren erfolgen.

1. Die NeuMoDx EBV Calibrators sind in einem Kit [REF 800501] verfügbar und enthalten in Basematrix vorbereitete, nicht infektiöse verkapselte EBV-Ziele.
2. Ein Set der EBV-Kalibratoren muss verarbeitet werden, wenn eine neue Charge des NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 verwendet wird, eine neue EBV-Assay-Definitionsdatei auf das NeuMoDx System geladen wird, der Gültigkeitszeitraum des aktuellen Kalibratorsets abgelaufen ist (auf 90 Tage festgelegt) oder Veränderungen an der NeuMoDx System Software vorgenommen werden.
3. Die NeuMoDx System Software benachrichtigt den Benutzer, wenn die Kalibratoren verarbeitet werden müssen. Bis zur erfolgreichen Verarbeitung der Kalibratoren kann keine neue Teststreifencharge für Tests verwendet werden.
4. Die Gültigkeit der Kalibrierung wird wie folgt ermittelt:
 1. Zum Nachweis der Gültigkeit muss ein Set aus zwei Kalibratoren – hohe und niedrige Konzentration – verarbeitet werden.
 2. Um gültige Ergebnisse zu erhalten, müssen mindestens 2 der 3 Replikate Ergebnisse innerhalb vordefinierter Parameter ergeben. Das Nominalziel für den Kalibrator mit niedriger Konzentration liegt bei $3 \log_{10}$ IU/ml und das Nominalziel für den Kalibrator mit hoher Konzentration bei $5 \log_{10}$ IU/ml.
 3. Ein Kalibrationskoeffizient wird berechnet, um der erwarteten Variation zwischen verschiedenen Teststreifenchargen Rechnung zu tragen. Dieser Kalibrationskoeffizient kommt bei der Bestimmung der endgültigen EBV-DNA-Konzentration zum Einsatz.
5. Wenn ein oder beide Kalibrator(en) die Gültigkeitsprüfung nicht besteht/bestehen, ist die Verarbeitung für den/die fehlgeschlagenen Kalibrator(en) mit einem neuen Fläschchen zu wiederholen. Sollte einer der Kalibratoren die Gültigkeitsprüfung nicht bestehen, reicht es aus, nur die Verarbeitung des fehlgeschlagenen Kalibrators zu wiederholen; das System erfordert nicht, dass beide Kalibratoren erneut verarbeitet werden.
6. Wenn der/die Kalibrator(en) die Gültigkeitsprüfung zweimal in Folge nicht besteht/bestehen, den technischen Support von QIAGEN kontaktieren.

Ungültige Ergebnisse

Wenn ein im NeuMoDx System durchgeführter NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 kein gültiges Ergebnis erzeugt, wird dies auf Grundlage der Art des aufgetretenen Fehlers entweder als „Indeterminate“ (Unbestimmt), „No Result“ (Kein Ergebnis) oder „Unresolved“ (Offen) gemeldet; der Test sollte wiederholt werden, um ein gültiges Ergebnis zu erzielen.

Das Ergebnis „Indeterminate“ (Unbestimmt) wird gemeldet, wenn während der Probenverarbeitung ein Fehler im NeuMoDx System erkannt wird. Falls das Ergebnis „Indeterminate“ (Unbestimmt) gemeldet wird, wird ein erneuter Test empfohlen.

Das Ergebnis „No Result“ (Kein Ergebnis) wird gemeldet, wenn ein Fehler im NeuMoDx System erkannt und die Probenverarbeitung abgebrochen wird. Falls das Ergebnis „No Result“ (Kein Ergebnis) gemeldet wird, wird ein erneuter Test empfohlen.

Das Ergebnis „Unresolved“ (Offen) wird gemeldet, wenn kein Ziel nachgewiesen wird und keine Amplifikation der Probenprozesskontrolle erfolgt, was auf einen möglichen Reagenzfehler oder das Vorhandensein von Inhibitoren hinweist. Falls das Ergebnis „Unresolved“ (Offen) gemeldet wird, wird als erster Schritt ein erneuter Test empfohlen. Wenn der Wiederholungstest fehlschlägt, kann eine verdünnte Probe verwendet werden, um den Effekt einer etwaigen Inhibition abzumildern (weitere Anweisungen siehe Abschnitt „Anwendungseinschränkungen“).

Die Fehlercodes für ungültige Ergebnisse finden Sie im Benutzerhandbuch zum NeuMoDx 288 Molecular System (Teile-Nr. 40600108) bzw. im Benutzerhandbuch zum NeuMoDx 96 Molecular System (Teile-Nr. 40600317).

Qualitätskontrolle

Die lokalen Vorschriften legen in der Regel fest, dass das Labor für die Kontrollverfahren verantwortlich ist, die die Richtigkeit und Präzision des kompletten Analyseprozesses überwachen, und unter Verwendung bestätigter Leistungsspezifikationen für ein unverändertes, zugelassenes Testsystem Anzahl, Typ und Häufigkeit der Testkontrollmaterialien feststellen muss.

Externe Kontrollen

1. Externe Kontrollen, die nicht infektiöse verkapselte EBV-Ziele in Basematrix als Positivkontrollen oder Basematrix als Negativkontrollen enthalten, werden von QIAGEN in einem Kit angeboten, das die NeuMoDx EBV External Controls [REF 900502] enthält.
2. Externe Positiv- und Negativkontrollen müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden. Wenn kein Set gültiger externer Kontrollen vorhanden ist, fordert die NeuMoDx System Software den Benutzer dazu auf, diese Kontrollen zu verarbeiten, bevor Probenergebnisse ausgegeben werden können:

NeuMoDx EBV External Controls	Erwartete Konzentration	Etiketten-Farbschema
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	1,5E4 IU/ml (4,18 log ₁₀ IU/ml)	Rot
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	150 IU/ml (2,18 log ₁₀ IU/ml)	Grau
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	k. A.	Schwarz

3. Bei der Verarbeitung von External Controls (Externe Kontrollen) die Kontrollen in einen Probenröhrchenträger setzen und den Träger über den Touchscreen aus dem Autolader-Regal in das NeuMoDx System laden. Das NeuMoDx System erkennt die Barcodes und startet die Verarbeitung der Kontrollen, sofern die für die Tests erforderlichen Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien verfügbar sind.
4. Die Gültigkeit dieser externen Kontrollen wird vom NeuMoDx System auf Grundlage der erwarteten Ergebnisse bewertet.

NeuMoDx EBV External Controls	EBV Quant.-Ergebnis	SPC1-Ergebnis
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	EBV POSITIVE (Positiv) [Conc] (Konz) 3,68–4,68 log ₁₀ IU/ml	SPC1-positiv
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	EBV POSITIVE (Positiv) [Conc] (Konz) 1,58–2,78 log ₁₀ IU/ml	SPC1-positiv
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	EBV NEGATIVE (Negativ)	SPC1-positiv

5. Diskrepanze Ergebnisse für die externen Kontrollen sind wie folgt zu behandeln:
 1. Das Testergebnis Positive (Positiv) für eine Probe einer Negativkontrolle kann auf eine Kontamination hinweisen. Um die Ursache dafür zu ermitteln, müssen die Qualitätskontrollverfahren des Labors untersucht werden. Stellen Sie sicher, dass für Probenvorbereitung, Handhabung von Kontrollen und Einrichtung der RT-PCR jeweils separate Bereiche verwendet werden. Weitere Tipps zur Fehlerbehebung siehe *Benutzerhandbuch zum NeuMoDx 288 Molecular System bzw. NeuMoDx 96 Molecular System*.
 2. Wenn das Ergebnis Negative (Negativ) für eine Probe einer Positivkontrolle berichtet wird, kann dies ein Hinweis auf ein reagenz- oder instrumentbedingtes Problem sein.
 3. In jedem der oben beschriebenen Fälle oder falls das Ergebnis No Result (NR) (Kein Ergebnis), Unresolved (UNR) (Offen) oder Indeterminate (IND) (Unbestimmt) erhalten wird, die fehlgeschlagene Kontrolle mit frisch aufgetauten Fläschchen derjenigen Kontrolle(n) wiederholen, die die Gültigkeitsprüfung nicht bestanden hat/haben.
 4. Wenn die positive externe Kontrolle weiterhin das Ergebnis Negative (Negativ) ergibt, den technischen Support von QIAGEN kontaktieren.
 5. Wenn die externe Negativkontrolle weiterhin das Ergebnis Positive (Positiv) ergibt, vor dem Kontaktieren des technischen Supports von QIAGEN möglichst alle in Frage kommenden Kontaminationsquellen eliminieren, was den Austausch aller Reagenzien und die Wiederholung des Laufs einschließt.
6. Wenn die externen Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse liefern, muss ein Set Positiv- und Negativkontrollen wiederholt werden. Es werden keine Probenergebnisse berichtet, wenn die Kontrollen nicht das erwartete Ergebnis liefern.
7. Das NeuMoDx System ist mit einer automatischen Funktion für Rerun/Repeat (Wiederholungsläufe) ausgestattet, die der Benutzer aktivieren kann, damit als INVALID (Ungültig) gemeldete Proben automatisch erneut verarbeitet und Verzögerungen bei der Ergebnismeldung vermieden werden.

(Interne) Probenprozesskontrollen

In der NeuMoDx Extraction Plate ist eine exogene Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1) enthalten, die mit jeder Probe oder Kontrolle bzw. jedem Kalibrator dem vollständigen Prozess der Nukleinsäure-Extraktion und Echtzeit-RT-PCR-Amplifikation unterzogen wird. Die für die SPC1 spezifischen Primer und Sonden sind in jedem NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 enthalten. Mit dieser SPC1 kann das NeuMoDx System die Effizienz der DNA-Extraktion und der RT-PCR-Amplifikation überwachen.

LEISTUNGSMERKMALE

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT – Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurde in zwei sequentiellen Phasen charakterisiert: 1. Vorläufige Beurteilung der Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) (Probit-Analyse), gefolgt von 2. LoD-Bestätigung. In Phase 1 wurden negative Proben und eine Verdünnungsreihe des 1. internationalen Standards der WHO in gescreentem EBV-negativem Humanplasma getestet, um die vorläufige LoD auf den NeuMoDx Systems zu bestimmen. Die vorläufige LoD wurde definiert als die niedrigste Zielkonzentration, die gemäß Probit-Analyse mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen wird. In Phase 2 wurde die vorläufige LoD durch Testen eines künstlichen Panels in LoD-Konzentration bestätigt. Beide Phasen der Studie wurden über 3 Tage mit verschiedenen Systemen und mehreren Chargen der NeuMoDx Reagenzien durchgeführt. In Phase 1 wurden insgesamt 144 Replikate der einzelnen Verdünnungsstufen verarbeitet. Die Nachweisraten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Vorläufige LoD-Bestimmung für den NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Zielkonzentration [IU/ml]	Zielkonzentration [log ₁₀ IU/ml]	PLASMA		
		Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate
35	1,54	144	139	96,5%
30	1,48	144	140	97,2%
25	1,40	143	133	93,0%
10	1,00	144	97	67,4%
5	0,70	143	75	52,4%
NEG	---	144	0	0,0%

Die LoD des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 in Plasma wurde unter Verwendung des 1. internationalen Standards der WHO für EBV als 29,3 IU/ml (1,47 log₁₀ IU/ml) mit einem 95%-Konfidenzintervall (CI) von 24,4–37,1 IU/ml, (1,39–1,57 log₁₀ IU/ml) bestimmt [Abbildung 1]. Diese LoD wurde anschließend durch die in Tabelle 3 dargestellte Trefferquotenanalyse bestätigt.

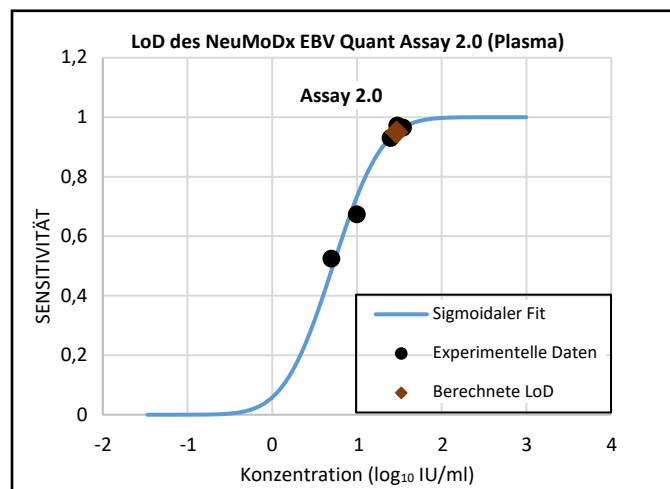

Abbildung 1: Probit-Analyse zur Bestimmung der LoD von NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 in Plasmaproben

Tabelle 3: LoD-Bestätigung des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

System	Zielkonzentration [IU/ml]	Zielkonzentration [log ₁₀ IU/ml]	Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate
N96	29,3	1,47	96	94	97,9%
N288			96	92	95,8%
Alle			192	186	96,9%

Die LoD für EBV-Genotyp 2 (GT2) wurde mittels Trefferquotenanalyse als 29,3 IU/ml [1,47 log₁₀ IU/ml] bestätigt.

Basierend auf dem Ergebnis beider Studien wurde die LoD des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 als 29,3 IU/ml [1,47 log₁₀ IU/ml] bestimmt.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT – untere Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

Die LLoQ ist definiert als die niedrigste Zielkonzentration, bei der ein Nachweis von > 95 % erreicht wird UND der analytische Gesamtfehler (Total Analytical Error, TAE) ≤ 1,0 ist. Zur Bestimmung der LLoQ wurde im Rahmen der LoD-Berechnung für jede der EBV-Zielkonzentrationen, für die ein Nachweis von > 95 % belegt werden konnte, der TAE berechnet. Der TAE ist wie folgt definiert:

$$\text{TAE} = \text{Bias} + 2 \cdot \text{SD} \text{ (Westgard Statistic)}$$

Das Bias ist der absolute Wert der Differenz zwischen dem Durchschnitt der berechneten Konzentration und der erwarteten Konzentration. SD ist die Standardabweichung (Standard Deviation) des quantifizierten Werts der Probe.

Die zusammengestellten Ergebnisse für die 5 Konzentrationen der EBV-Plasmaproben, die unter Anwendung des 1. internationalen Standards der WHO in der LLoQ-Studie verwendet wurden, sind in *Tabelle 4* dargestellt. Anhand dieser Daten und der zuvor bestimmten LoD wurde die LLoQ als 30,0 IU/ml (1,48 log₁₀ IU/ml) ermittelt und anschließend für den EBV-Genotyp 2 (GT2) bestätigt.

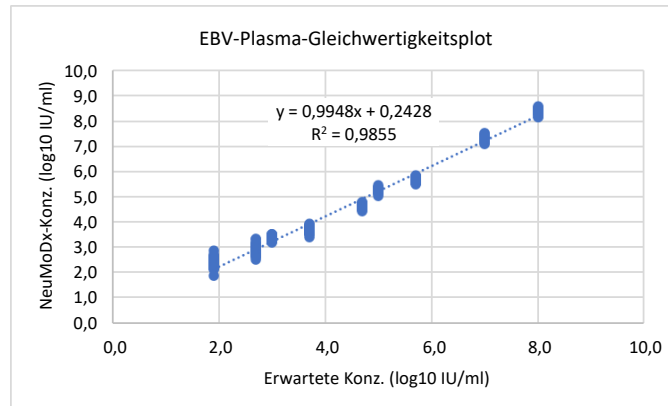
Tabelle 4: LLoQ des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 mit Bias und TAE

Zielkonz. [IU/ml]	Zielkonz. [log ₁₀ IU/ml]	Plasma				
		Konz.-Durchschnitt [log ₁₀ IU/ml]	Nachweisrate	SD	Bias	TAE
35	1,54	2,05	96,5%	0,23	0,50	0,96
30	1,48	1,97	97,2%	0,24	0,49	0,98
25	1,40	1,93	93,0%	0,24	0,53	1,02
10	1,00	1,96	67,4%	0,31	0,96	1,59
5	0,70	1,83	52,4%	0,27	1,13	1,68

Basierend auf dem Ergebnis dieser Studien wurde die LoD des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 als 29,3 IU/ml (1,47 log₁₀ IU/ml) und die LLoQ als 30,0 IU/ml [1,48 log₁₀ IU/ml] bestimmt.

Linearität und Bestimmung der oberen Bestimmungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearität und obere Bestimmungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurden in Plasma anhand einer Verdünnungsreihe mit dem 1. internationalen Standard der WHO für EBV zusätzlich zu den zwei sekundären Standards des verkapselten EBV-Ziels von NeuMoDx und der ATCC EBV Culture (ATCC, Manassas, VA) ermittelt. Die Rückverfolgbarkeit auf den 1. internationalen Standard der WHO für EBV wurde für alle sekundären Standards vor dem Test etabliert. In gepooltem EBV-negativem Plasma wurde ein Panel mit 10 Proben vorbereitet, das einen Konzentrationsbereich von 1,48–8,0 log₁₀ IU/ml abdeckte. Die ULoQ des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurde als 8,0 log₁₀ IU/ml bestimmt. Es wurde ein Bestätigungspanel zur Bewertung der Linearität der Standardkurve vorbereitet. Die vom NeuMoDx System ausgegebenen EBV-Assaykonzentrationen im Vergleich mit den Erwartungswerten sind in *Abbildung 2* dargestellt.


Abbildung 2: Linearität des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Linearität des EBV-Genotyps 2 (GT2)

Die Linearität des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 über EBV-Genotyp 2 (GT2) hinweg wurde durch Testen von elf (11) verschiedenen Konzentrationen von EBV GT2 mit etablierter Rückführbarkeit auf den 1. internationalen WHO-Standard für EBV, hergestellt in gepoolten EBV-negativen Plasmaproben, charakterisiert. Im Rahmen der Studie wurden 36 Replikate in 11 Konzentrationen auf 2 NeuMoDx Systems und mit 3 Chargen der EBV Quant Test Strips 2.0 getestet. Die Linearität für EBV-Genotyp 2 (GT2) ist in *Tabelle 5* und *Abbildung 3* dargestellt.

Tabelle 5: Linearität des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 für EBV Genotyp 2

Genotyp	Linearitätsgleichung y = NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 Bestimmung x = erwartete Bestimmung	R ²
GT2	y = 0,9965x – 0,0982	0,9761

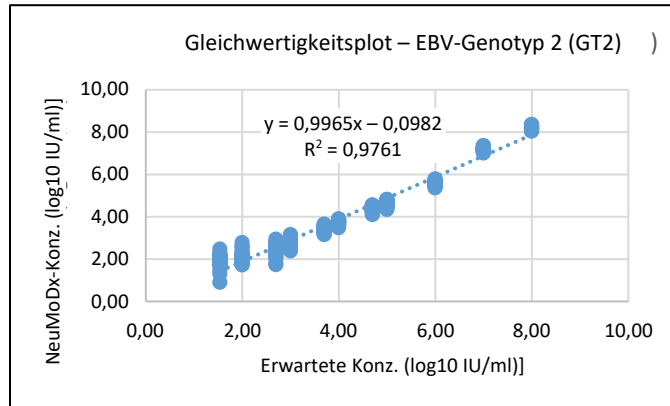


Abbildung 3: Linearität des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 für EBV Genotyp 2

Analytische Spezifität – Kreuzreaktivität

Die analytische Spezifität wurde demonstriert, indem 36 in Blut-/Plasmaproben vorkommende Organismen sowie Spezies, die phylogenetisch mit EBV verwandt sind, auf Kreuzreaktivität gescreent wurden. Die Organismen wurden in hohen Konzentrationen in Pools zu jeweils 5–6 Organismen angesetzt. Die getesteten Organismen sind in *Tabelle 6* aufgeführt. Mit keinem der getesteten Organismen wurde eine Kreuzreaktivität beobachtet, was eine analytische Spezifität von 100 % für den NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 bestätigt.

Tabelle 6: Zur Demonstration der analytischen Spezifität verwendete Pathogene

Nicht-Zielorganismen					
BK-Polyomavirus	Adenovirus Typ 5	Herpes-simplex-Virus Typ 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Cytomegalie-Virus	Hepatitis-C-Virus	Herpes-simplex-Virus Typ 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Humanes Herpesvirus Typ 6	Parvovirus B19	Varicella-Zoster-Virus	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Humanes Herpesvirus Typ 7	JC-Virus	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Humanes Herpesvirus Typ 8	Humanes Papillomvirus 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Hepatitis-B-Virus	Humanes Papillomvirus 18	SV 40	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>

Analytische Spezifität – Störstoffe, kommensale Organismen

Der NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurde auf Störungen in Gegenwart von Nicht-Zielorganismen untersucht. Dafür wurden dieselben Organismen eingesetzt wie für die Tests auf Kreuzreaktivität, die oben in *Tabelle 6* aufgeführt sind. EBV-negatives Plasma wurde mit den in Gruppen zu 4–7 gepoolten Organismen versetzt. Diese Pools wurden dann mit EBV-Ziel in einer Konzentration von 90 IU/ml [$1,95 \log_{10}$ IU/ml] versetzt. Es wurde keine signifikante Störung in Gegenwart dieser Organismen beobachtet, was aus der minimalen Abweichung der Bestimmung von Kontrollproben ohne störende Agenzien hervorgeht.

Analytische Spezifität – Störstoffe, endogene und exogene Stoffe

Die Leistung des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurde in Gegenwart typischer exogener und endogener Störstoffe, die in klinischen EBV-Plasmaproben vorkommen, bewertet. Diese umfassten ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Blutkomponenten sowie häufige antivirale Medikamente und Immunsuppressiva, welche in *Tabelle 7* aufgelistet sind. Jeder Stoff wurde gescreentem, EBV-negativem Humanplasma zugegeben, das mit 90 IU/ml [$1,95 \log_{10}$ IU/ml] EBV versetzt war, und die Proben wurden auf Störungen analysiert, indem die gemeldete Konzentration mit der Positivkontrolle verglichen wurde. Zusätzlich wurde auch für den mit einer EBV-Infektion verbundenen Krankheitszustand repräsentatives Plasma auf potenzielle Störungen getestet. Die durchschnittlichen Konzentrationen sowie das Bias aller getesteten Stoffe verglichen mit den mit der gleichen EBV-Konzentration versetzten Kontrollproben sind in *Tabelle 8* angegeben. Keine der exogenen und endogenen Stoffe beeinflusste die Spezifität des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Tabelle 7: Störungstests – exogene Agenzien (Medikamenten-Klassifizierungen)

Pool	Name des Medikaments	Einstufung	Pool	Name des Medikaments	Einstufung
Pool 1	Azathioprin	Immunsuppressivum	Pool 4	Trimethoprim	Antibiotikum
	Cyclosporin	Immunsuppressivum		Vancomycin	Antibiotikum
	Foscarnet	Antiviren-Medikament (Herpesviridae)		Tacrolimus	Immunsuppressivum
	Ganciclovir	Antiviren-Medikament (EBV)		Everolimus	Immunsuppressivum
	Valganciclovirhydrochlorid	Antiviren-Medikament (EBV)		Clavulanat-Kalium	Antibiotikum
Pool 2	Prednison	Corticosteroid/ Immunsuppressivum	Pool 5	Famotidin	Antihistaminikum
	Cidofovir	Antiviren-Medikament (EBV)		Sulfamethoxazol	Antibiotikum
	Cefotetan	Antibiotikum (Breitspektrum)		Valacyclovir	Antiviren-Medikament (Herpesviridae)
	Cefotaxim	Antibiotikum (Breitspektrum)		Letermovir	Antiviren-Medikament (EBV)
	Fluconazol	Antimykotikum		Ticarcillin-Dinatrium	Antibiotikum
Pool 3	Mycophenolat-Mofetil	Immunsuppressivum	Leflunomid	Immunsuppressivum	
	Mycophenolat-Natrium	Immunsuppressivum			
	Piperacillin	Antibiotikum			
	Sirolimus/Rapamycin	Immunsuppressivum			
	Tazobactam	Modifiziertes Antibiotikum			

Tabelle 8: Störungstests – endogene und exogene Agenzien

Endogen + Krankheitszustand	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Hämoglobin	2,19	0,32
Triglyceride	1,90	0,02
Bilirubin	2,12	0,24
Albumin	1,95	0,07
Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)	2,08	0,20
Antinukleäre Antikörper (ANA)	2,36	0,48
Rheumatoide Arthritis (RA)	1,89	0,01
Positivkontrolle	1,88	k. A.
Exogen (Medikamente)	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Pool 1: Azathioprin, Cyclosporin, Foscarnet, Ganciclovir, Valganciclovirhydrochlorid	2,19	0,09
Pool 2: Prednison, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxim, Fluconazol	2,11	0,01
Pool 3: Mycophenolat-Mofetil, Mycophenolat-Natrium, Piperacillin, Sirolimus/Rapamycin, Tazobactam	2,16	0,06
Pool 4: Trimethoprim, Vancomycin, Tacrolimus, Everolimus, Clavulanat-Kalium	2,24	0,14
Pool 5: Famotidin, Sulfamethoxazol, Letermovir, Valacyclovir, Ticarcillin-Dinatrium, Leflunomid	2,26	0,16
Positivkontrolle	2,10	k. A.

Laborinterne Präzision

Die Präzision des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurde durch Testen von 3 Replikaten eines 6-teiligen Panels aus EBV-Proben bestimmt, die mit NeuMoDx EBV Positive Control and EBV culture (ATCC, Manassas, VA) hergestellt wurden. Die Tests wurden zweimal pro Tag und unter Einsatz von zwei NeuMoDx 288 Systems und zwei NeuMoDx 96 Systems über zwölf Tage durchgeführt. Die Intra-Lauf-, Intra-Tag- und Intra-System-Präzision wurden charakterisiert und die Gesamt-Standardabweichung wurde als $\leq 0,18 \log_{10}$ IU/ml bestimmt. Über alle Systeme, Tage und Läufe hinweg wurde eine ausgezeichnete Präzision demonstriert, wie in *Tabelle 9* zu sehen ist. Die Präzision von Bediener zu Bediener wurde nicht charakterisiert, da der Bediener bei der Verarbeitung von Proben mit dem NeuMoDx System keine wesentliche Rolle spielt.

Tabelle 9: Laborinterne Präzision – NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 auf NeuMoDx Systems

EBV-Zielkonz. [\log_{10} IU/ml]	EBV-Durchschnittskonz. [\log_{10} IU/ml]	Intra-System-SD	Intra-Tag-SD	Intra-Lauf-SD	Gesamt-SD (laborintern)
7,70	7,82	0,10	0,08	0,08	0,11
6,00	6,07	0,12	0,11	0,11	0,13
5,00	4,75	0,13	0,12	0,11	0,13
4,00	3,78	0,13	0,11	0,11	0,14
3,00	2,93	0,15	0,14	0,13	0,16
1,95	2,19	0,17	0,16	0,16	0,18

Interchargen-Reproduzierbarkeit

Die Interchargen-Reproduzierbarkeit des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurde durch Bewertung von drei Chargen der NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 im Rahmen der Studie zur laborinternen Präzision ermittelt. Zur Bewertung der Leistung wurde ein 6-teiliges Panel aus EBV-positivem Plasma verwendet (*Tabelle 10*). Die Interchargen-Ergebnisse wurde analysiert und sind in *Tabelle 10* aufgeführt. Für die NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strips 2.0 betrug das maximale Bias $0,29 \log_{10}$ IU/ml und die maximale SD $0,18 \log_{10}$ IU/ml. Es wurde eine über alle Chargen hinweg gleichbleibende Leistung demonstriert, da die Bestimmung aller Panel-Mitglieder innerhalb der Toleranzanforderungen lag.

Tabelle 10: Interchargen-Reproduzierbarkeit – NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, Test Strip

Erwartete Konz. (\log_{10} IU/ml)	Charge 1			Charge 2			Charge 3		
	Konz.-Durchschn. (\log_{10} IU/ml)	log Konz. SD	Abs. Bias	Konz.-Durchschn. (\log_{10} IU/ml)	log Konz. SD	Abs. Bias	Konz.-Durchschn. (\log_{10} IU/ml)	log Konz. SD	Abs. Bias
7,70	7,82	0,11	0,12	7,84	0,10	0,14	7,79	0,09	0,09
6,00	6,08	0,12	0,08	6,10	0,10	0,10	6,04	0,10	0,04
5,00	4,77	0,13	0,23	4,78	0,13	0,22	4,71	0,10	0,29
4,00	3,80	0,15	0,20	3,81	0,13	0,19	3,74	0,11	0,26
3,00	2,96	0,16	0,04	2,96	0,15	0,04	2,87	0,16	0,13
1,95	2,20	0,18	0,25	2,22	0,18	0,27	2,16	0,16	0,21

Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle

Die Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1) ist im NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 enthalten, um Prozessschrittfehler oder Inhibition nachzuweisen, die die Leistung des Assays beeinträchtigen könnten. Die Effizienz der SPC1 wurde für Plasmaproben unter Anwendung des NeuMoDx CMV Quant Assay als Modell unter Bedingungen getestet, die repräsentativ für kritische Fehlschläge von Verarbeitungsschritten sind, welche potenziell bei der Probenverarbeitung auftreten und von den Sensoren des NeuMoDx System zur Leistungsüberwachung *möglicherweise nicht erkannt* werden. Cytomegalie-Virus-positive (bei $3 \log_{10}$ IU/ml) und -negative Proben wurden unter folgenden Bedingungen getestet: Vorliegen eines Inhibitors, keine Waschlösung abgegeben, kein Wasch-Blowout. Prozessschwächen, die sich nachteilig auf den Nachweis/die Bestimmung des viralen Ziels auswirkten, spiegelten sich in der Leistung des SPC1-Ziels wider, wie in *Tabelle 11* dargestellt. In allen getesteten Fällen zeigte sich, dass entweder die Probenprozesskontrolle Prozessschwächen und das Vorliegen von Inhibitoren korrekt überwachte oder dass die erwarteten Prozessschwächen keine signifikanten negativen Auswirkungen auf Detektion und Bestimmung von SPC1 und viralem Ziel hatten. Daher erwies sich die SPC1 als erfolgreich bei der Überwachung der Assayleistung auf dem NeuMoDx System.

Tabelle 11: Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle für virale DNA in Plasma*

Getesteter Prozessschrittfehler	Amplifikationsstatus Probenprozesskontrolle 1	Status der CMV-Zielamplifikation	Assayergebnis
Presence of Inhibitor (Vorhandensein von Inhibitor)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Delivered (Keine Waschlösung abgegeben)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Blowout (Kein Wasch-Blowout)	Amplified (Amplifiziert)	Amplified (Amplifiziert)	Positive (Positiv) mit Bestimmung innerhalb von $0,3 \log_{10}$ IU/ml der Kontrolle

*Als Modellsystem zur Bewertung der Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle wurde Cytomegalie-Virus (CMV) in Plasmaproben verwendet.

Kreuzkontamination

Die Kreuzkontaminationsrate für Plasmaproben wurde durch die abwechselnde Verarbeitung stark positiver und negativer EBV-Proben bestimmt. Es wurden fünf Sets dieser schachbrettartigen Tests mit insgesamt 60 Replikaten von EBV-negativem Plasma und 60 Replikaten von mit $6,0 \log_{10}$ IU/ml EBV versetztem Plasma sowohl auf dem NeuMoDx 288 Molecular System als auch auf dem NeuMoDx 96 Molecular System durchgeführt. Auf beiden Systemen wurden alle 120 Replikate der negativen Proben als negativ gemeldet, was zeigt, dass während der Verarbeitung der Plasmaproben auf den NeuMoDx Systems keine Kreuzkontamination aufgetreten ist.

Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Unter Anwendung eines ähnlichen über das Blut übertragenen Virus, des Cytomegalie-Virus (CMV), wurden Tests durchgeführt, um die Gleichwertigkeit von frischen und gefrorenen Plasmaproben zu demonstrieren. Die frischen Proben wurden bei 4°C aufbewahrt, bis sie mit drei Konzentrationen von CMV versetzt und auf Gleichwertigkeit getestet wurden. Die Proben wurden für mindestens 24 Stunden bei -20°C eingefroren. Im Anschluss an diesen Zeitraum der Lagerung im gefrorenen Zustand wurden die Proben aufgetaut und erneut getestet. Die Ergebnisse für frische vs. gefrorene Plasmaproben wurden mittels Regressionsanalyse auf ihre Gleichwertigkeit untersucht. Die Daten ergaben eine ausgezeichnete Gleichwertigkeit zwischen frischen und gefrorenen Plasmaproben, mit einer Steigung von 1,0 und einem sehr geringen Bias (Achsenabschnitt), wie in *Tabelle 12* unten dargestellt.

Tabelle 12: Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Parameteranforderung	Frisch vs. gefroren, EDTA
Steigung [0,9–1,1]	1,000
Achsenabschnitt < $0,5 \log_{10}$ IU/ml	0,020
p-Wert > 0,05	0,631

Charakterisierung der Bestimmungsleistung

Die Bestimmungsleistung des NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 wurde charakterisiert, indem zwei im Handel erhältliche EBV-Verifizierungspanels von AcroMetrix und Exact Diagnostics (rückführbar auf den 1. internationalen Standard der WHO für EBV) auf den NeuMoDx Molecular Systems verarbeitet wurden.

Es wurde eine ausgezeichnete Korrelation zwischen dem NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 und den zwei im Handel erhältlichen EBV-Verifizierungspanels erhalten (*Abbildung 4*), sowohl mit der Deming-Regression (*Abbildung 4A*) als auch mit der Passing-Bablok-Methode (*Abbildung 4B*).

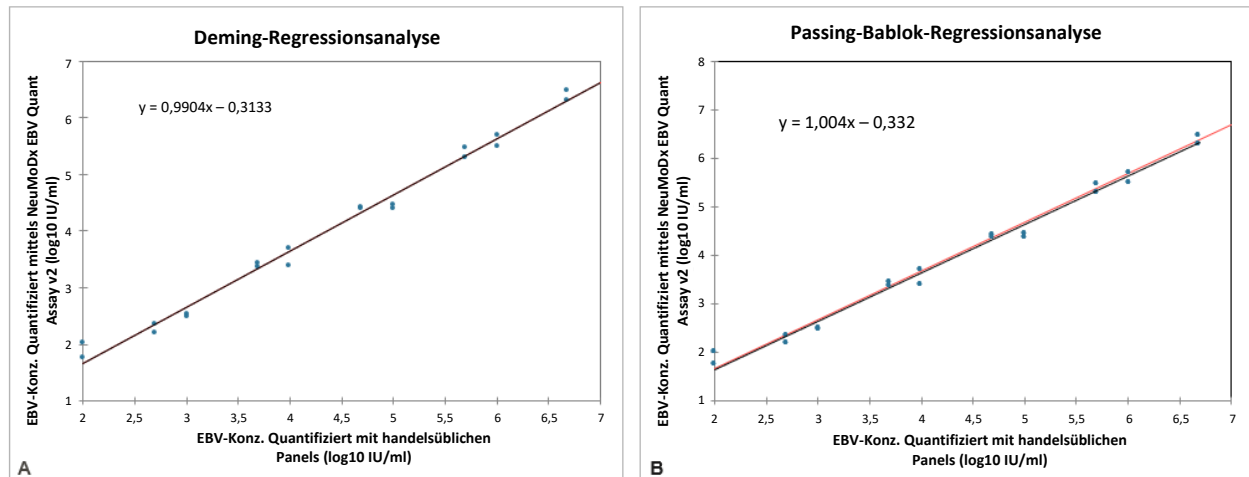


Abbildung 4. Gleichwertigkeitsplot zwischen AcroMetrix und Exact Diagnostics Verifizierungspanels und NeuMoDx EBV Quant Assay.

A. Lineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Deming-Methode. B. Lineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Passing-Bablok-Methode.

Die Qualität der Anpassung der Deming-Regression wird durch einen Gesamt-Steigungskoeffizienten von 0,990 und einen Achsenabschnitt (Bias) von -0,313 illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 und den EBV-Verifizierungspanels erhaltenen Konzentrationsergebnisse korreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen. Die lineare Passing-Bablok-Anpassung unterstützt mit einem Gesamt-Steigungskoeffizienten von 1,004 und einem Achsenabschnitt (Bias) von -0,332 ebenfalls die Signifikanz der Korrelation zwischen den mit dem NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 und den EBV-Verifizierungspanels erhaltenen Ergebnissen. Der p-Wert der Passing-Bablok-Analyse wurde als 0,988 berechnet.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Deming- und der linearen Passing-Bablok-Regressionsanalyse

Deming-Analyse		Passing-Bablok-Analyse	
Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient	Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient
-0,313	0,990	-0,332	1,004
95%-KI (-0,620, -0,007)	95%-KI (0,928, 1,053)	95%-KI (-0,548, -0,116)	95%-KI (0,950, 1,047)

LITERATUR

1. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
2. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant Direct*. 2016 Jan; 2(1): e48.
3. About Epstein-Barr Virus (EBV).” Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, 28 Sept. 2020, www.cdc.gov/epstein-barr/about-ebv.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
5. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARKENNAMEN

NeuMoDx™ ist eine Marke von NeuMoDx Molecular, Inc.










NeuDry™ ist eine Marke von NeuMoDx Molecular, Inc.

Seracare® ist eine Marke von Seracare Life Sciences, Inc.

TaqMan® ist eine eingetragene Marke von Roche Molecular Systems, Inc.

Alle anderen Produktbezeichnungen, Marken und eingetragenen Marken, die in diesem Dokument ggf. auftreten, sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

SYMBOLSCHLÜSSEL

R only	Nur zur Anwendung durch Fachpersonal		Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Hersteller		Gebrauchsanweisung beachten
IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum		Vorsicht
EC REP	Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft		Gesundheitsgefahr
REF	Katalognummer	CE	CE-Kennzeichnung
LOT	Chargencode	CONT	Enthält
	Verfallsdatum		Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs
	Zulässiger Temperaturbereich	Boric Acid	Borsäure
	Nicht zur Wiederverwendung		



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



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

Technischer Support/Vigilanzberichterstattung: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents

