

**REF** 300300 NeuMoDx™ HCV Quant Test Strip**R only**

POZOR: Samo za izvoz v ZDA

**IVD** Za diagnostično uporabo *in vitro* s sistemoma NeuMoDx 288 in NeuMoDx 96 Molecular SystemsPosodobljena navodila najdete na: [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu)

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

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

### NAMEN UPORABE

NeuMoDx HCV Quant Assay je avtomatiziran, *in vitro* test amplifikacije nukleinske kisline za kvantifikacijo RNA virusa hepatitisa C (HCV) v primerkih človeške plazme in seruma za genotipe 1 do 6, pozitivne na anti-HCV protitelesa, pri posameznikih, okuženih z virusom HCV. Test NeuMoDx HCV Quant Assay, implementiran na NeuMoDx 288 Molecular System in NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System(s)) vključuje avtomatizirano ekstrakcijo RNA za izolacijo ciljne nukleinske kisline iz primerka ter verižno reakcijo polimeraze z reverzno transkripcijo v realnem času (RT-PCR) za targetiranje visoko ohranjenih zaporedij v genomu virusa hepatitisa C.

Test NeuMoDx HCV Quant Assay je namenjen kot pripomoček za obravnavo bolnikov, ki so okuženi s HCV. Rezultati testa NeuMoDx HCV Quant Assay morajo biti interpretirani v kontekstu vseh relevantnih kliničnih in laboratorijskih ugotovitev. Test NeuMoDx HCV Quant Assay ni namenjen za uporabo kot presejalni test za kri ali krvne proizvode ali za diagnosticiranje kliničnega statusa okužbe s HCV.

### POVZETEK IN RAZLAGA

Človeška polna kri, odvzeta v sterilne epruvete za odvzem krvi, ki kot antikoagulant vsebujejo etilendiamintetraacetno kislino (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) ali citratno raztopino kisle reakcije, ki vsebuje dekstrozo (acid citrate dextrose, ACD), ali v epruvete za pripravo plazme (Plasma Preparation Tubes, PPT), se lahko uporabi za pripravo plazme, medtem ko je treba serum odvzeti v epruvete za serum ali epruvete za ločevanje seruma (Serum Separator Tube, SST). Med pripravo na testiranje se plazmo ali serum v sekundarni epruveti s primerki ali frakcionirano krvjo v prvotni epruveti s primerki, ki sta združljivi s sistemom NeuMoDx System, naloži v sistem NeuMoDx System z uporabo določenega prenosnika za epruvete s primerki. Za vsak primerek se zmeša alikvot vzorca plazme/seruma s puflom NeuMoDx Lysis Buffer 3, sistem NeuMoDx System pa samodejno izvede vse korake, ki so potrebni za ekstrakcijo ciljne nukleinske kisline, pripravi izolirano RNA za amplifikacijo RT-PCR v realnem času ter amplificira in zazna produkte amplifikacije, če so prisotni. Test NeuMoDx HCV Quant Assay targetira dve visoko ohranjeni regiji genoma HCV, kar povečuje njegovo zanesljivost. Test NeuMoDx HCV Quant Assay poleg tega vključuje kontrolo obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC2) za RNA za lažje spremljanje prisotnosti morebitnih inhibitornih snovi ter napak sistema NeuMoDx System ali reagentov, do katerih lahko pride med postopkom ekstrakcije in amplifikacije.

HCV je RNA-virus s pozitivno usmerjeno enojnoverižno RNA, sposoben povzročiti tako akutne kot kronične okužbe.<sup>1</sup> Cepivo za hepatitis C trenutno ne obstaja. Akutna okužba je običajno asimptomatska in zelo redko povezana z življenjsko ogrožajočimi boleznimi, vendar lahko več kot polovica oseb, okuženih s HCV, razvije kronično okužbo. Pri tistih s kronično okužbo s HCV je tveganje za cirozo jeter med 15–30 % v roku 20 let. Po ocenah ima na svetu približno 71 milijonov ljudi kronično okužbo s HCV, pri katerih se bo po pričakovanju pri velikem deležu razvila ciroza jeter ali rak na jetrih.<sup>2–4</sup> Ker se virus HCV prenaša s krvjo, se primarno prenaša s krvjo in krvnimi proizvodi. Široka uporaba testov presejanja krvi je močno zmanjšala pojav okužb z darovano krvjo.<sup>1</sup>

Zaznava protiteles za HCV ne razlikuje med aktivnimi in minulimi okužbami. Posledično, algoritmi za testiranje HCV v laboratoriju potrebujejo diagnozo aktivne okužbe s HCV pri posameznikih, pozitivnih na protitelesa, z zaznavo RNA HCV v plazmi ali serumu pred začetkom terapije (če je potrebna). Kvantifikacija RNA HCV (virusno breme) se zdaj rutinsko uporablja pri določanju in spremljanju uspešnega zdravljenja HCV.

Trenutne smernice za obravnavo in zdravljenje okužb s HCV priporočajo kvantitativno testiranje RNA HCV pred pričetkom protivirusne terapije, da se določi izhodišče, nato pa še po 12 tednih ali pozneje, po koncu zdravljenja. Včasih so priporočene dodatne časovne točke. Trajni virološki odziv (Sustained Virological Response, SVR) je tarča zdravljenja HCV in je definiran kot nezaznavna količina RNA HCV (s testom, ki ima mejo zaznave < 25 IE/ml) po zdravljenju.<sup>5–7</sup> Trenutne smernice AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) predlagajo testiranje RNA HCV ne samo ob izhodišču, temveč tudi periodično med zdravljenjem (tj. na 4 tedne) in 12 tednov po koncu zdravljenja. Testi za zaznavanje RNA HCV v kombinaciji s serološkimi testi se uporabljajo za določanje aktivne okužbe s HCV.<sup>6</sup>

### NAČELA POSTOPKA

Test NeuMoDx HCV Quant Assay združuje avtomatizirano ekstrakcijo, amplifikacijo in zaznavanje RNA z RT-PCR v realnem času. Primerki polne krvi se za pripravo plazme zbirajo v epruvetah EDTA, ACD ali PPT in/ali v epruvetah SST za pripravo seruma. Prvotni (frakcionirani) primerki krvi ali alikvot plazme/seruma v združljivi sekundarni epruveti s primerkom je označen s črtno kodo in nameščen v sistem NeuMoDx System. Sistem NeuMoDx System samodejno aspirira alikvot plazme/seruma, da ga zmeša s puflom za lizo NeuMoDx Lysis Buffer 3 ter z agenti, ki jih za začetek obdelave vsebuje ekstrakcijska plošča NeuMoDx Extraction Plate. Sistem NeuMoDx System avtomatizira in integrira ekstrakcijo in koncentracijo RNA, pripravo reagentov ter amplifikacijo nukleinske kisline/zaznavanje ciljnih sekvenc z uporabo RT-PCR v realnem času. Vključena kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC2) pomaga nadzirati prisotnost inhibitornih snovi ter napak sistema, postopka ali reagenta. Ko je primerek enkrat naložen v NeuMoDx System, upravljavcu ni več treba posredovati.

Sistem NeuMoDx System uporablja kombinacijo toplote, litičnih encimov in ekstrakcijskih reagentov za samodejno izvedbo lize, ekstrakcije RNA in odstranitev inhibitorjev. Sproščene nukleinske kisline ujamejo paramagnetni delci. Delci z vezano nukleinsko kislino se naložijo v kartušo NeuMoDx Cartridge, kjer se nevezani elementi izperejo s pralnim reagentom NeuMoDx Wash Reagent. Vezana RNA se nato izluži z reagentom za sprostitvev NeuMoDx Release

Reagent. NeuMoDx System nato uporabi izluženo RNA za rehidracijo lastniških amplifikacijskih reagentov NeuDry™, ki vsebujejo vse potrebne elemente za amplifikacijo tarč, specifičnih za HCV in SPC2. To omogoči hkratno amplifikacijo in zaznavanje tako ciljnih kot kontrolnih sekvenc RNA. Po rekonstituciji posušenih reagentov RT-PCR sistem NeuMoDx System sprosti pripravljeno mešanico za RT-PCR v eno od komor PCR (na vsak primerek) kartuše NeuMoDx Cartridge. V komori PCR pride do reverzne transkripcije, amplifikacije ter zaznavanja kontrolnih in ciljnih (če so prisotne) sekvenc. Kartuša NeuMoDx Cartridge je zasnovana tako, da vsebuje ampikon po PCR, tako da praktično odpravlja tveganje kontaminacije po amplifikaciji.

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

Šobe TaqMan so zasnovane tako, da se prilegajo znotraj regije DNK, ki jo amplificira specifični komplet primerjev. Ko polimeraza DNK Taq razširi primer in sintetizira novo verigo, aktivnost eksonukleaze v smeri 5' proti 3' koncu polimeraze Taq DNA degradira šobo, ki se prilaga predlogi. Degradacija šobe sprosti fluorofor in zlomi bližino dušilca ter tako premaga učinek dušenja zaradi FRET ter omogoči zaznavanje fluorofora. Nastali fluorescenčni signal, zaznan v kvantitativnem RT-PCR termopomnoževalniku sistema NeuMoDx System je neposredno proporcionalen s sproščenim fluoroforom in ga je mogoče korelirati s količino prisotne tarče.

Šoba TaqMan, označena s fluoroforom (vzbujanje: 490 nm in emisija: 521 nm) na koncu 5', temni dušilec na koncu 3' pa se uporablja za zaznavanje RNA HCV. Šoba TaqMan je za zaznavo kontrole obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC2) označena z drugačnim fluorescentnim barvilom (vzbujanje: 535 nm in emisija: 556 nm) na koncu 5' in s temnim dušilecem na koncu 3'. Programska oprema sistema NeuMoDx System nadzoruje fluorescentni signal, ki ga oddajajo šobe TaqMan na koncu vsakega amplifikacijskega cikla. Ko je amplifikacija končana, programska oprema NeuMoDx System analizira podatke in sporoči končni rezultat (POSITIVE (POZITIVNO))/NEGATIVE (NEGATIVNO)/INDETERMINATE (NEDOLOČEN)/UNRESOLVED (NEREŠENO)/NO RESULT (NI REZULTATA)). Če je rezultat pozitiven in izračunana koncentracija v mejah kvantifikacije, programska oprema NeuMoDx System navede tudi kvantitativno vrednost, povezano z vzorcem.

### REAGENTI/POTROŠNI MATERIAL

#### Priloženi materiali

REF.	Vsebina	Enote na paket	Testi na enoto	Testi na paket
300300	<b>NeuMoDx HCV Quant Test Strip</b> <i>Posušeni reagenti RT-PCR, ki vsebujejo šobe in primerje TaqMan, specifične za HCV in SPC2</i>	6	16	96

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

REF.	Vsebina
100200	<b>NeuMoDx Extraction Plate</b> <i>Posušeni paramagnetni delci, litični encim in kontrole obdelave vzorca</i>
800200 ali 800202	<b>NeuMoDx HCV Calibrators</b> <i>Kompleti visokih in nizkih kalibratorjev HCV za enkratno uporabo za določanje veljavnosti krivulje kalibracije</i>
900201 ali 900202	<b>NeuMoDx HCV External Controls</b> <i>Kompleti HCV-pozitivnih in negativnih kontrol za enkratno uporabo</i>
400600	<b>NeuMoDx Lysis Buffer 3</b>
400100	<b>NeuMoDx Wash Reagent</b>
400200	<b>NeuMoDx Release Reagent</b>
100100	<b>NeuMoDx Cartridge</b>
235903	<b>Konice Hamilton CO-RE/CO-RE II (300 µl) s filtri</b>
235905	<b>Konice Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µl) s filtri</b>

#### Potrebni instrumenti

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

### OPOZORILA IN VARNOSTNI UKREPI

- NeuMoDx HCV Quant Test Strip je namenjen samo za diagnostično uporabo *in vitro* s sistemi NeuMoDx Systems.
- Ne uporabljajte reagentov ali potrošnega materiala po navedenem roku uporabe.
- Ne uporabljajte reagentov, če je varnostni pečat prelomljen oziroma če je embalaža ob prejemu poškodovana.
- Ne uporabljajte potrošnega materiala ali reagentov, če je zaščitna vrečka ob prejemu odprta ali poškodovana.

- Veljavna testna kalibracija (ustvarjena z obdelavo visokih in nizkih kalibratorjev iz opreme NeuMoDx HCV Calibrators) mora biti na voljo, preden je možno ustvariti rezultate testa za klinične vzorce.
- Kontrole NeuMoDx HCV External Controls morajo biti obdelane vsakih 24 ur med testiranjem s testom NeuMoDx HCV Quant Assay.
- Minimalni volumen primerka sekundarnih alikvotov je odvisen od velikosti epruvete, prenosnika epruvete s primerekom in obdelave volumna primerka, kot je določeno spodaj. Če je volumen manjši od navedenega minimuma, se lahko pojavi napaka »Quantity Not Sufficient« (Količina ni zadostna).
- Če so primerki shranjeni pri nepravilnih temperaturah ali dlje od navedenega obdobja shranjevanja, so rezultati lahko neveljavni ali napačni.
- Vselej preprečite kontaminacijo katerega koli reagenta in potrošnega materiala z mikrobi ali ribonukleazo (RNaza). Priporočena je uporaba sterilnih pipet za prenos brez Rnaze pri uporabi sekundarnih epruvet za primerke. Za vsak primerek uporabite novo pipeto.
- Kartušice NeuMoDx Cartridge po amplifikaciji ne prijemajte oziroma je ne odlopite, da se izognete kontaminaciji. Kartuš NeuMoDx Cartridge v nobenem primeru ne odstranjujte iz zabojskih odpadke (NeuMoDx 288 Molecular System) oziroma koša za biološke odpadke (NeuMoDx 96 Molecular System). Kartušica NeuMoDx Cartridge je zasnovana tako, da preprečuje kontaminacijo.
- V primerih, kjer teste PCR z odprtimi epruvetami izvaja tudi laboratorij, je potrebno zagotoviti, da testni trakovi NeuMoDx HCV Quant Test Strip, dodatni potrošni material in reagenti, potrebni za testiranje, osebna zaščitna oprema kot so rokavice in laboratorijskih plašči ter NeuMoDx System niso kontaminirani.
- Pri ravnanju z reagenti in potrošnim materialom NeuMoDx uporabljajte čiste nitrilne rokavice brez pudra. Bodite previdni, da se ne dotaknete zgornje površine kartušice NeuMoDx Cartridge, površine tesnilne folije traka NeuMoDx HCV Quant Test Strip ali ekstrakcijske plošče NeuMoDx Extraction Plate oziroma zgornje površine pufra NeuMoDx Lysis Buffer 3; s potrošnim materialom in reagenti ravnajte tako, da se dotikate samo stranskih površin.
- Varnostni listi (Safety Data Sheets, SDS) so za vsak reagent (kot je primerno) na voljo na spletni strani [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu)
- Po izvedbi testa si temeljito umijte roke.
- Pipete ne uporabljajte z usti. Ne kadite, pijte ali jejte v območjih, kjer ravnate s primerki ali reagenti.
- S primerki vedno ravnajte, kot da so kužni in v skladu z varnimi postopki v laboratorijih, kot so tisti, opisani v *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>8</sup> in dokumentu CLSI M29-A4.<sup>9</sup>
- Neuporabljene reagente in odpadke zavrzite v skladu z državnimi, zveznimi, okrajnimi in lokalnimi predpisi.
- Ne uporabljajte ponovno.



### SHRANJEVANJE, RAVNANJE IN STABILNOST IZDELKA

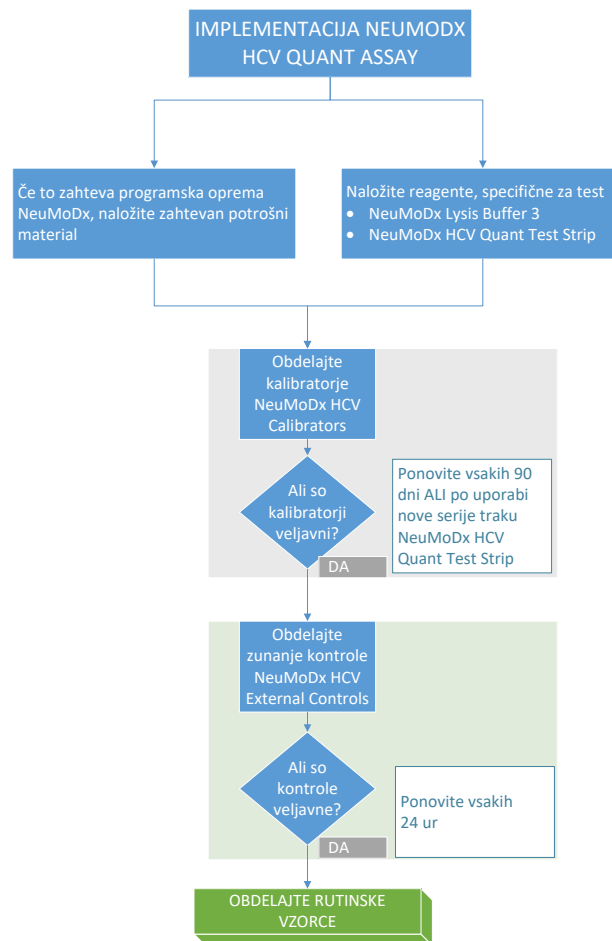
- Trakovi NeuMoDx HCV Quant Test Strip so stabilni v prvotni embalaži do navedenega roka uporabe na oznaki izdelka, če so shranjeni pri temperaturi od 4 do 28 °C.
- Ne uporabljajte potrošnega materiala in reagentov po poteku roka uporabe.
- Ne uporabljajte nobenih testnih izdelkov, če je primarna ali sekundarna embalaža vidno poškodovana.
- Ne uporabljajte nobenih testnih izdelkov, ki so bili predhodno naloženi na drug sistem NeuMoDx System.
- Ko je naložen, lahko NeuMoDx HCV Quant Test Strip ostane v sistemu NeuMoDx System do 14 dni. Programska oprema spremlja preostali rok uporabnosti naloženih testnih trakov in ga sporoča uporabniku v realnem času. Sistem bo pozval k odstranitvi testnega traku, ki je v uporabi dlje, kot je dovoljeno.

### ZBIRANJE, TRANSPORT IN SHRANJEVANJE PRIMERKOV

1. Z vsemi primerki, kalibratorji in kontrolami ravnajte, kot da lahko prenašajo povzročitelje okužb.
2. V primarnih epruvetah ne zamrzujte polne krvi ali katerihkoli primerkov.
3. Za pripravo primerkov plazme je treba odvzeti polno kri v sterilne epruvete z uporabo EDTA ali ACD za antikoagulacijo ali v epruvete za pripravo plazme (Plasma Preparation Tubes, PPT). Upoštevajte navodila proizvajalca epruvete za zbiranje primerkov za pripravo in shranjevanje.
4. Za pripravo primerkov seruma je treba polno kri odvzeti v epruvete za serum ali epruvete za ločevanje seruma (Serum Separator Tube, SST). Upoštevajte navodila proizvajalca epruvete za zbiranje primerkov za pripravo in shranjevanje.
5. Primerke je možno testirati v prvotnih epruvetah za odvzem ali sekundarnih epruvetah s primerkom. Priporočila za testiranje s prvotno epruveto:
  - a. Primerki plazme: Epruveta BD Vacutainer® Plus Plastic K<sub>2</sub>EDTA Tube (BD #368589) ali epruveta za pripravo plazme BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
  - b. Primerki seruma: Epruveta BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) ali BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
6. Pripravljeni primerki se lahko shranjujejo v sistemu NeuMoDx System do 8 ur pred pričetkom obdelave. Če je potreben dodaten čas shranjevanja, priporočamo, da so primerki shranjeni v hladilniku ali zamrznjeni v sekundarnih alikvotih.
7. Pripravljeni primerki naj bodo shranjeni pri temperaturi 2–8 °C največ 7 dni pred testiranjem ter največ 8 ur pri sobni temperaturi.
8. Pripravljeni primerki v sekundarnih epruvetah so lahko shranjeni pri temperaturi ≤ –20 °C do 24 tednov pred obdelavo; zamrznjeni primerki pred uporabo ne smejo biti izpostavljeni več kot dvema (2) cikloma zamrzovanja/odtajanja.

- a. Primerki plazme, ki so bili zamrznjeni in izpostavljeni enemu (1) ciklu zamrzovanja in odtajanja, so lahko shranjeni v sistemu še dodatnih 8 ur.
  - b. Primerki plazme, ki so bili zamrznjeni in izpostavljeni dvema (2) ciklom zamrzovanja in odtajanja, so lahko shranjeni v sistemu največ 4 ure.
  - c. Primerke seruma, ki so bili zamrznjeni in izpostavljeni enemu (1) ali dvema (2) ciklom zamrzovanja in odtajanja, je treba testirati takoj po odtajanju.
  - d. Če so vzorci zamrznjeni, se morajo najprej popolnoma odtaliti pri sobni temperaturi (15–30 °C); zavrtite, da ustvarite enakomerno porazdeljen vzorec.
  - e. Zamrzovanje plazme/seruma v primarnih epruvetah za odvzem ni priporočljivo.
9. Če bodo primerki poslani, jih je treba zapakirati in označiti v skladu z veljavnimi državnimi in/ali mednarodnimi predpisi.
  10. Primerke jasno označite in navedite, da so namenjeni za testiranje HCV.
  11. Nadaljujte na razdelek *Priprava testa*.

Celoten postopek za implementacijo testa NeuMoDx HCV Quant Assay je povzet spodaj na *sliki 1*.



**Slika 1:** Potek dela pri implementaciji testa NeuMoDx HCV Quant Assay

## NAVODILA ZA UPORABO

### Priprava testa

Test NeuMoDx HCV Quant Assay je mogoče izvesti neposredno s primarno epruveto za odvzem krvi ali na alikvotih primerka v sekundarnih epruvetah. Obdelavo je mogoče izvesti z enim od dveh potekov dela za obdelavo primerkov: potek dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l ali potek dela za primerke z volumnom 200  $\mu$ l.

1. Oznako s črtno kodo primerka namestite na epruveto s primerkom, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System. Primarno epruveto za zbiranje krvi je mogoče označiti in jo postaviti neposredno v prenosnik za 32 epruvet s primerki, po centrifugiranju v skladu z navodili proizvajalca. Poleg tega lahko prenesete alikvot plazme v sekundarno epruveto za obdelavo v sistemu NeuMoDx System.

2. Če se testiranje primerka izvaja v primarni epruveti za zbiranje, postavite epruveto, označeno s črtno kodo, v prenosnik za epruvete s primerki in poskrbite, da bo pred nalaganjem v NeuMoDx System odstranjen pokrov. Najmanjši volumni **nad** mehkim slojem so opredeljeni spodaj in bodo doseženi, če bodo primerki zbrani in obdelani v skladu z navodili proizvajalca epruvete. Učinkovitost ni zajamčena za primerke, ki niso bili odvzeti pravilno.

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

3. Pri uporabi sekundarne epruvete:
- Nežno zavrtite primerek, da dosežete enakomerno porazdelitev.
  - Za vsak primerek uporabite novo pipeto za prenos in prenesite alikvot plazme ali seruma v primerek v epruveti s črtno kodo, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System, v skladu s spodaj določenimi volumni:

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

- Potrebna je previdnost, da se strdki iz vzorca ne prenesejo v epruveto s primerkom.

### Delovanje sistema NeuMoDx System

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

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

### OMEJITVE

1. Trak NeuMoDx HCV Quant Test Strip se lahko uporablja samo v sistemih NeuMoDx Systems.
2. Delovanje traku NeuMoDx HCV Quant Test Strip je bilo potrjeno za vzorce plazme, odvzete z EDTA/ACD kot antikoagulantom, oziroma za primerke seruma, pripravljene v epruveh za ločevanje seruma. Uporaba testnega traku NeuMoDx HCV Quant Test Strip z drugimi viri ni bila ocenjena, zato karakteristike delovanja tega testa za druge tipe primerkov niso znane.
3. Delovanje traku NeuMoDx HCV Quant Test Strip je bilo potrjeno za testiranje primarnih epruveh z uporabo epruveh BD Vacutainer Plus Plastic K<sub>2</sub>EDTA Tubes, epruveh BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, epruveh BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube in epruveh BD Vacutainer SST Tube.
4. Ravnanje s primerki, ki ni v skladu pogoji shranjevanja, lahko negativno vpliva na kvantitativno točnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay, manj verjetno pa je, da bo vplivalo na kvalitativni rezultat (pozitivno/negativno).
5. Shranjevanje primerkov seruma v sistemu po daljšem shranjevanju v zamrzovalniku in po izvedbi dveh ciklov zamrzovanja in odtajanja brez takojšnje izvedbe testiranja lahko negativno vpliva na kvantitativno točnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay.
6. Pri uporabi poteka dela za primerek z volumnom 200 µl so opazili majhno povečanje meje zaznavanja in spodnje meje kvantifikacije pri testu NeuMoDx HCV Quant Assay.
7. Test NeuMoDx HCV Quant Assay se ne sme uporabljati za vzorce iz hepariniziranih oseb.
8. Ker je zaznavanje HCV odvisno od števila prisotnih ciljnih virusnih delcev RNA v vzorcu, so zanesljivi rezultati odvisni od ustreznega zbiranja, ravnanja in shranjevanja primerkov.
9. Kalibratorji NeuMoDx HCV Calibrators in zunanje kontrole NeuMoDx HCV External Controls morajo biti obdelani po priporočilih v priloženih navodilih in zahtevah programske opreme NeuMoDx System pred obdelavo rutinskih kliničnih vzorcev.
10. Do napačnih rezultatov lahko pride zaradi nepravilnega zbiranja, ravnanja, shranjevanja primerkov ali tehnične napake ali zaradi zmede pri epruveh s primerkom. Poleg tega se lahko pojavijo lažni negativni vzorci, če je število virusnih delcev v vzorcu pod mejo zaznave testa NeuMoDx HCV Quant Assay.
11. Sistem NeuMoDx System lahko uporablja izključno osebje, ki je bilo usposobljeno za uporabo sistema NeuMoDx System.
12. Če se tako tarča HCV kot tarča SPC2 ne amplificirata, bodo sporočeni neveljavni rezultati (Indeterminate (nedoločen), No Result (ni rezultata) ali Unresolved (nerešeno)), zato je test treba ponoviti.
13. Če je rezultat testa NeuMoDx HCV Quant Assay pozitiven, kvantifikacijska vrednost pa je pod mejo kvantifikacije, bo NeuMoDx System javil, ali je bil zaznani HCV *pod* spodnjo mejo kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ali *nad* zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
14. Če je bil zaznani HCV *pod* LLoQ, je možno test NeuMoDx HCV Quant Assay ponoviti (po želji) z drugim alikvotom primerka.
15. V primeru, da je zaznan HCV nad zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), je možno test NeuMoDx HCV Quant Assay ponoviti z razredčenim alikvotom prvotnega primerka. Priporočena je raztopina 1 : 100 ali 1 : 1000 v HCV-negativni plazmi ali redčilu Basematrix 53 (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Koncentracija prvotnega primerka se izračuna na naslednji način:
 
$$\text{koncentracija prvotnega primerka} = \log_{10}(\text{faktor redčenja}) + \text{dobljena koncentracija razredčenega vzorca}$$
16. Občasna prisotnost inhibitorjev PCR v plazmi in serumu lahko povzroči napako kvantifikacije sistema. Če se to zgodi, priporočamo, da se test ponovi z istim primerkom, razredčenim v Basematrix v razmerju 1 : 10 ali 1 : 100.
17. Pozitiven rezultat ne pomeni nujno prisotnosti živih organizmov. Vendar pa pozitiven rezultat kaže na prisotnost RNA virusa hepatitisa C.
18. Izbris ali mutacije v ohranjenih regijah, ki so tarča testa NeuMoDx HCV Quant Assay, lahko vplivajo na zaznavo oziroma lahko privedejo do napačnih rezultatov pri uporabi testnih trakov NeuMoDx HCV Quant Test Strip.
19. Rezultati testa NeuMoDx HCV Quant Assay se naj uporabljajo kot dodatek kliničnim opazovanjem in drugim informacijam, ki so na voljo zdravniku; test ni namenjen diagnozi okužbe.
20. Priporočene so dobre laboratorijske prakse, vključno z menjavo rokavic med ravnanjem s primerki pacientov, da preprečite kontaminacijo.

### OBDELAVA REZULTATOV

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

**Preglednica 1.** Povzetek algoritma za odločanje pri testu NeuMoDx HCV Quant Assay

REZULTAT	Tarča HCV	Kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC2)	Interpretacija rezultatov
<b>Positive (Pozitivno) s prijavljeno koncentracijo</b>	Amplified (Amplificirano) $0,9 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IE/ml}$ (potek dela za 550 $\mu\text{l}$ ) $1,5 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IE/ml}$ (potek dela za 200 $\mu\text{l}$ )	Amplified (Amplificirano) ali Not Amplified (Ni amplificirano)	RNA HCV zaznana v kvantitativnem območju
<b>Positive (Pozitivno), nad zgornjo mejo kvantifikacije</b>	Amplified (Amplificirano) $[\text{HCV}] > 8,2 \log_{10} \text{ IE/ml}$	Amplified (Amplificirano) ali Not Amplified (Ni amplificirano)	RNA HCV zaznana nad kvantitativnim območjem
<b>Positive (Pozitivno), pod spodnjo mejo kvantifikacije</b>	Amplified (Amplificirano) $[\text{HCV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IE/mL}$ (potek dela za 550 $\mu\text{l}$ ) $[\text{HCV}] < 1,5 \log_{10} \text{ IE/mL}$ (potek dela za 200 $\mu\text{l}$ )	Amplified (Amplificirano) ali Not Amplified (Ni amplificirano)	RNA HCV zaznana pod kvantitativnim območjem
<b>Negative (Negativno)</b>	Not Amplified (Ni amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	RNA HCV ni zaznana
<b>Indeterminate (Nedoločen)</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Ni amplificirano, zaznana napaka sistema, obdelava vzorca končana)		Vsi ciljni rezultati so bili neveljavni; ponovno preskusite vzorec†
<b>No Result (Ni rezultata)*</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Ni amplificirano, zaznana napaka sistema, obdelava vzorca prekinjena)		Obdelava vzorca je bila prekinjena; ponovno preskusite vzorec†
<b>Unresolved (Nerešeno)</b>	Not Amplified, No System Error Detected (Ni amplificirano, ni zaznane napake sistema)		Vsi ciljni rezultati so bili neveljavni; ponovno preskusite vzorec†

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

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

### Testna kalkucija

- Za vzorce znotraj območja kvantifikacije testa NeuMoDx HCV Quant Assay je koncentracija RNA HCV v vzorcih izračunana z uporabo shranjene standardne krivulje, skupaj s koeficientom kalibracije in volumnom primerka.
  - Koeficient kalibracije je izračunan na podlagi rezultatov kalibratorjev NeuMoDx HCV Calibrators, ki so bili obdelani za vzpostavitev veljavnosti standardne krivulje, za posebno serijo testnega traku NeuMoDx HCV Quant Test Strip, na določenem sistemu NeuMoDx System.
  - Koeficient kalibracije je vključen v končno določitev koncentracije RNA HCV.
  - Programska oprema NeuMoDx upošteva vhodni volumen primerka pri določanju koncentracije RNA HCV na ml primerka.
- Rezultati testa NeuMoDx HCV Quant Assay so izraženi v  $\log_{10}$  IE/ml.
- Dobljena kvantifikacija neznanih vzorcev je sledljiva do 5. Mednarodnega standarda WHO za HCV.

### Testna kalibracija

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

### Kalibratorji

- Z vsako novo serijo NeuMoDx HCV Quant Test Strip je treba obdelati komplet kalibratorjev NeuMoDx HCV Calibrators, če je v NeuMoDx System naložena nova definicijska datoteka testa za HCV, če je trenutnemu kompletu kalibratorjev potekel rok veljavnosti (trenutno nastavljen na 90 dni) ali če je bila programska oprema NeuMoDx System spremenjena.
- Programska oprema NeuMoDx System bo uporabnika obvestila, ko je treba obdelati kalibratorje. Nove serije testnih trakov ni možno uporabiti, dokler kalibratorji niso uspešno obdelani.

3. Veljavnost kalibracije je določena na naslednji način:
  - a) Za določanje veljavnosti mora biti obdelan komplet dveh kalibratorjev – enega (1) visokega in enega (1) nizkega.
  - b) Vsaj dva (2) od treh (3) ponovljenih vzorcev morata prikazati rezultate znotraj vnaprej določenih parametrov. Nazivna tarča nizkega kalibratorja je  $3 \log_{10}$  IE/ml in nazivna tarča visokega kalibratorja je  $5 \log_{10}$  IE/ml.
  - c) Kalibracijski koeficient se izračuna tako, da se upošteva pričakovano odstopanje med serijami testnega traku. Ta kalibracijski koeficient se uporablja pri določanju končne koncentracije HCV.
4. Če sta en ali oba kalibratorja neuspešna pri preverjanju veljavnosti, ponovite obdelavo neuspešnega kalibratorja/neuspešnih kalibratorjev z novo vialo. Če en kalibrator ne prestane veljavnosti, je možno ponoviti samo neuspešen kalibrator, saj sistem od uporabnika ne zahteva ponovne izvedbe obeh kalibratorjev.
5. Če kalibrator(-ji) večkrat zaporedoma ne prestane(jo) testa veljavnosti, se obrnite na NeuMoDx Molecular, Inc.

### Nadzor kakovosti

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

### Zunanje kontrole

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

### (Notranje) kontrole obdelave vzorca

Eksogena kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC2) je vključena v ekstrakcijsko ploščo NeuMoDx Extraction Plate in je del celotnega postopka ekstrakcije nukleinske kisline ter amplifikacije RT-PCR v realnem času z vsakim vzorcem. SPC2, specifičen za primerke in šobe, je prav tako vključen v vsak testni trak NeuMoDx HCV Quant Test Strip, ki omogoča zaznavanje prisotnosti SPC2, poleg ciljne RNA HCV (če je prisotna) preko hkratne RT-PCR v realnem času. Zaznava amplifikacije SPC2 omogoča programski opremi sistema NeuMoDx System, da nadzira učinkovitost ekstrakcije RNA in postopka amplifikacije RT-PCR.

### Neveljavni rezultati

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

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

Rezultat UNR je prikazan, če ni zaznana nobena veljavna amplifikacija RNA HCV ali SPC2, ob odsotnosti sistemske napake, kar kaže na morebitno napako reagenta ali prisotnost inhibitorjev. V primeru sporočenega rezultata UNR je kot prvi korak priporočen ponovni test. Če ponovni test ni uspešen, lahko uporabite razredčen primerek, da ublažite učinke morebitne inhibicije v vzorcu.

Če test NeuMoDx HCV Quant Assay, izveden na sistemu NeuMoDx System, ne ustvari veljavnega rezultata in se obdelava vzorca prekine pred zaključkom, bo prikazan rezultat No Result (Ni rezultata) (NR). V primeru, da je sporočen NR (Ni rezultata), je priporočen ponovni test.

### KARAKTERISTIKE DELOVANJA

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

Analitična občutljivost testa NeuMoDx HCV Quant Assay je bila določena s testiranjem negativnih primerkov in razredčene serije 5. mednarodnega standarda WHO (genotip 1) v presejani negativni človeški plazmi in serumu, za določitev meje zaznave (Limit of Detection, LoD) v sistemih NeuMoDx System. Meja zaznave (Limit of Detection, LoD) je bila definirana kot najnižja ciljna stopnja, zaznana pri stopnji 95 %, kot je bilo določeno z analizo tipa Probit. Študija je bila izvedena v obdobju 3 dni na več sistemih z več serijami reagentov NeuMoDx. Vsak sistem (N288 in N96) je obdelal 18 ponovljenih vzorcev na dan pri vsaki stopnji razredčenja. Stopnje zaznave so prikazane v *preglednici 2*. Izvedena je bila dodatna študija za določitev LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay pri uporabi poteka dela za primerek z volumnom 200 µl; rezultati študije so prikazani v *preglednici 3*.



**Preglednica 2.** Stopnje zaznavanja pozitivnih testov za določanje LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay – potek dela za 550 µl

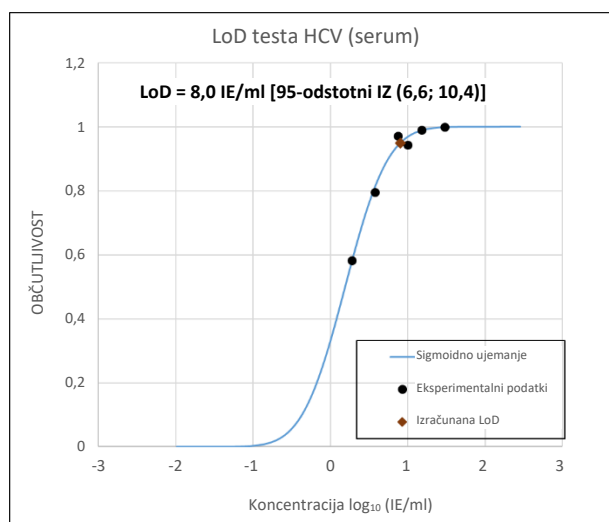
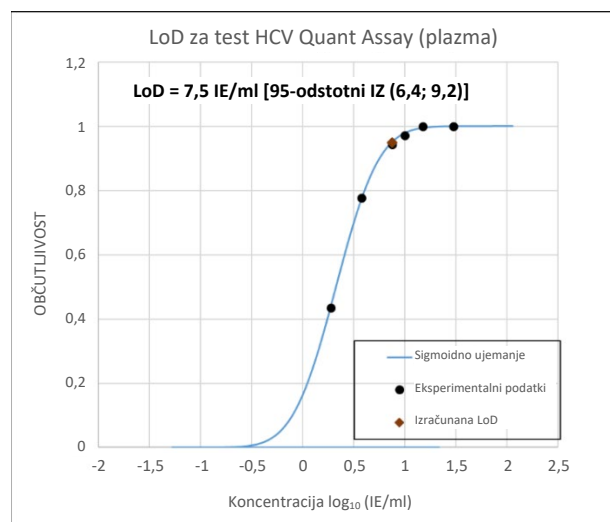
Ciljna koncentracija [IE/ml]	Ciljna koncentracija [ $\log_{10}$ IE/ml]	PLAZMA			SERUM		
		Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja	Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja
30	1,48	108	108	100 %	108	108	100 %
15	1,18	108	108	100 %	108	107	99 %
10	1,00	108	105	97 %	108	102	94 %
7,5	0,88	108	102	94 %	108	105	97 %
3,75	0,57	108	84	78 %	108	86	80 %
1,875	0,27	108	47	44 %	108	63	58 %
NEG	0	108	0	0 %	107	1	0,93 %

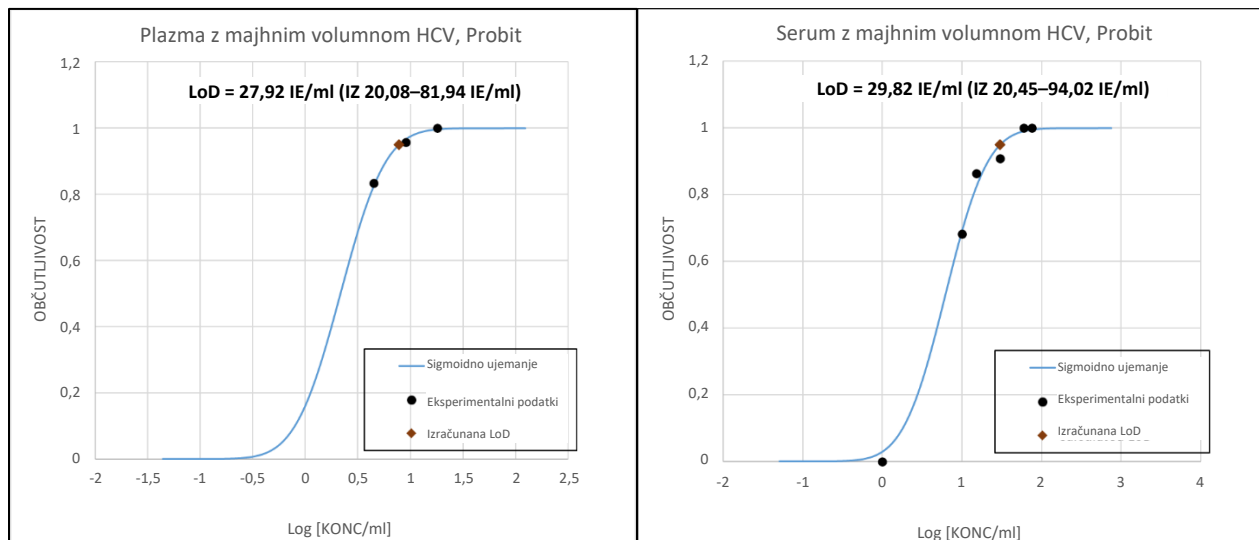
**Preglednica 3.** Stopnje zaznavanja pozitivnih testov za določanje LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay – potek dela za 200 µl

Ciljna koncentracija [IE/ml]	Ciljna koncentracija [ $\log_{10}$ IE/mL]	PLAZMA			SERUM		
		Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja	Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja
75	1,88	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	22	22	100 %
60	1,78	22	22	100 %	22	22	100 %
30	1,48	22	21	95,5 %	22	20	90,9 %
15	1,18	22	17	77,3 %	22	19	86,4 %
10	1,00	22	13	59,1 %	22	15	68,2 %
NEG	0	22	0	0 %	22	0	0 %

Na podlagi testiranja s sistemom NeuMoDx 288 Molecular System z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550 µl je bilo ugotovljeno, da je LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay v plazmi pri vseh genotipih 7,5 IE/ml (95-odstotni interval zaupanja (IZ) od 6,4 do 9,2 IE/ml) [(0,9  $\log_{10}$  IE/ml) (95-odstotni IZ od 0,8 do 1,0  $\log_{10}$  IE/ml)] (slika 2). LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay za serumske vzorce je bila določena pri 8,0 IE/ml (95-odstotni IZ od 6,6 do 10,4 IE/ml) [(0,9  $\log_{10}$  IE/ml) (95-odstotni IZ 0,8–1,0  $\log_{10}$  IE/ml)] z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550 µl (slika 2); zatrjevana LoD za obe vrsti primerkov z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550 µl je **8,0 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml)**.

LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 200 µl je bila določena pri 27,9 IE/ml (95-odstotni IZ 20,1–81,9) v vzorcih plazme in 29,8 IE/ml (95-odstotni IZ 20,5–94,0) v vzorcih seruma (slika 3); zatrjevana LoD za obe vrsti primerkov z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 200 µl je **30,0 IE/ml (1,5  $\log_{10}$  IE/ml)**.


**Slika 2:** Analiza tipa Probit, uporabljena za določanje LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (levo) in serum (desno) – potek dela za 550 µl



**Slika 3:** Analiza tipa Probit, uporabljena za določanje LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (levo) in serum (desno) – potek dela za 200 µl

**Analična občutljivost – kvantifikacijska meja – spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) z uporabo standarda WHO**

Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) je definirana kot najnižja ciljna stopnja, pri kateri je dosežena zaznava > 95 % IN kjer je TAE ≤ 1,0. Za določanje spodnje meje kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) je bila izračunana skupna analitična napaka (Total Analytical Error, TAE) za vsako od ciljnih stopenj HCV, ki so poročale zaznavo > 95 % kot del izračuna meje zaznave (Limit of Detection, LoD). TAE je opredeljena na naslednji način:

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

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

Združeni rezultati za 6 stopenj plazemskih in serumskih primerkov HCV, testiranih v študiji LLoQ z uporabo genotipa 1 in poteka dela za primerke z volumnom 550 µl, so prikazani v preglednici 4. Rezultati dodatnega testiranja z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 200 µl so prikazani v preglednici 5.

**Preglednica 4.** Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) za kvant test. NeuMoDx HCV Quant Assay z odstopanjem in TAE – potek dela za 550 µl

Ciljna konc. [IE/ml]	Ciljna konc. [log <sub>10</sub> IE/ml]	Plazma					Serum				
		Povprečna konc. [log <sub>10</sub> IE/ml]	Zaznava (%)	SD	Odstopanje	TAE	Povprečna konc. [log <sub>10</sub> IE/ml]	Zaznava (%)	SD	Odstopanje	TAE
30,00	1,48	1,41	100	0,32	0,07	0,71	1,39	100	0,30	0,08	0,69
15,00	1,18	1,24	100	0,36	0,06	0,79	1,23	99	0,32	0,06	0,70
10,00	1,00	1,07	97	0,35	0,07	0,77	1,14	94	0,36	0,14	0,85
7,50	0,88	1,01	94	0,44	0,13	1,02	1,12	97	0,25	0,25	1,09
3,75	0,57	1,08	78	0,43	0,51	1,38	1,17	80	0,58	0,59	1,76
1,88	0,27	1,11	44	0,36	0,83	1,55	1,11	58	0,69	0,84	2,22

**Preglednica 5.** Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) za kvant test. NeuMoDx HCV Quant Assay z odstopanjem in TAE – potek dela za 200 µl

Ciljna konc. [IE/ml]	Ciljna konc. [ $\log_{10}$ IE/ml]	Plazma					Serum				
		Povprečna konc. [ $\log_{10}$ IE/ml]	Zaznava (%)	SD	Odstopanje	TAE	Povprečna konc. [ $\log_{10}$ IE/ml]	Zaznava (%)	SD	Odstopanje	TAE
75	1,88	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	1,56	100	0,23	0,32	0,78
60	1,78	1,93	100	0,39	0,15	0,93	1,56	100	0,27	0,22	0,76
30	1,48	1,35	96	0,44	0,11	0,99	1,45	91	0,41	0,03	0,85
15	1,18	1,37	77	0,42	0,18	1,03	1,36	86	0,53	0,18	1,25
10	1,00	1,26	59	0,56	0,25	1,36	1,15	68	0,53	0,15	1,21

LLOQ za test NeuMoDx HCV Quant Assay je bila določena pri 7,7 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml) za plazmo in 8,4 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml) za serum z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550 µl; LLOQ tako za **plazmo kot serum** je bila določena pri **8,4 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml)** z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550 µL.

LLOQ za test NeuMoDx HCV Quant Assay z uporabo standarda WHO je bila določena pri 30,0 IE/ml (1,5  $\log_{10}$  IE/ml) za plazmo in 29,8 IE/ml (1,37  $\log_{10}$  IE/ml) za serum z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 200 µl; LLOQ tako za plazmo kot serum je bila določena pri **30,0 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml)** z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 200 µl.

#### Analitična občutljivost – LoD in LLoQ za vse genotipe HCV

LoD je bila prvotno določena za genotip 1 (5. mednarodni standard WHO), nato pa je bilo izvedeno dodatno testiranje okoli določene LoD z uporabo vsakega od drugih 5 genotipov. Z uporabo testa NeuMoDx HCV Quant Assay je bilo testiranih šestintrideset (36) replikatov na ravneh, ki ustrezajo 2x, 1x in 0,5x 95 % IZ zgornje meje LoD z uporabo plazme s potekom dela za primerke z volumnom 550 µl. Pozitivna stopnja odstotkov za vsak genotip na vsakem od teh testiranih stopenj je bila tabulirana in uporabljena pri izračunu LoD z analizo tipa Probit.

Izračunana je bila tudi skupna analitična napaka elektroforeznega tris-acetata (tris-acetate-electrophoresis, TAE) na teh stopnjah. Najnižja stopnja s 95-odstotno pozitivno zaznavo in izračunanim TAE  $\leq 1,0$  je bila ponovno upoštevana kot spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) genotipa. Ti rezultati potrjujejo, da je učinkovitost zaznave testa NeuMoDx HCV Quant Assay odlična in enakovredna pri vseh šestih genotipih z razponom 4,5–7,5 IE/ml, vključno z rezultati, dobljenimi z uporabo 5. mednarodnega standarda WHO (genotip 1). Na splošno je bila LoD testa NeuMoDx HCV Quant Assay za vse genotipe določena pri 7,5 IE/ml (0,88  $\log_{10}$  IE/ml), LLoQ pa je bila po ugotovitvah najvišja vrednost, in sicer 7,7 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml), kot je bilo sporočeno za 5. mednarodni standard WHO (genotip 1). *Preglednica 6* prikazuje rezultate LoD in LLoQ, določenih v plazmi, pri testiranju vseh genotipov HCV.

**Preglednica 6.** Genotipi HCV, testirani v plazmi z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550 µl

GENOTIP	LoD [IE/ml]	Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) [IE/ml]
1	7,5	7,7
2	4,5	5,2
3	7,5	7,5
4	6,0	6,0
5	4,8	5,5
6	4,5	6,7

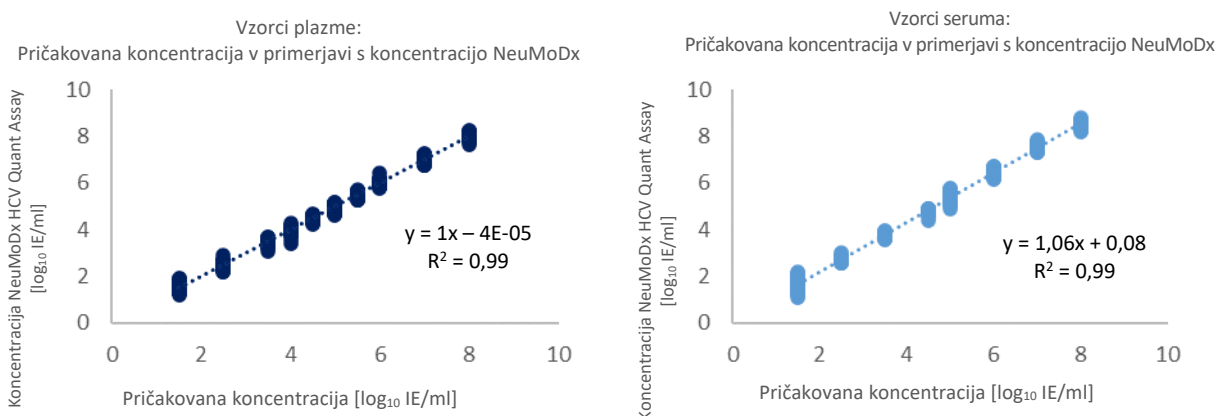
Na podlagi rezultatov zgoraj navedenih študij družba NeuMoDx trdi, da ima test NeuMoDx HCV Quant Assay **LoD 8,0 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml)** in **LLOQ 8,4 IE/ml (0,9  $\log_{10}$  IE/ml)** v **plazmi in serumu** z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 550 µl.

Zatrjevani **LoD in LLoQ** za test NeuMoDx HCV Quant Assay za **obe vrsti primerkov (plazma in serum)** z uporabo poteka dela za primerke z volumnom 200 µl je **30,0 IE/ml (1,5  $\log_{10}$  IE/ml)**.

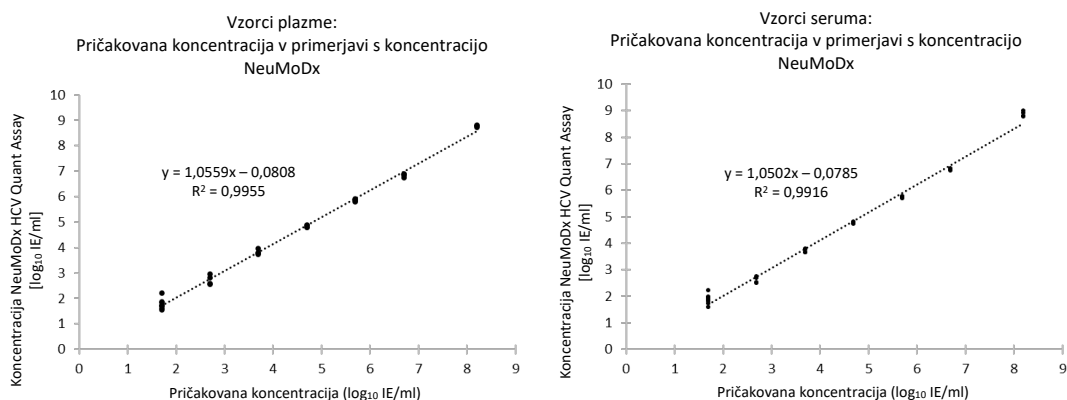
### Analična občutljivost – linearnost in določanje zgornje meje kvantifikacije (ULOQ)

Linearnost in zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULOQ) testa NeuMoDx HCV Quant Assay je bila določena v plazmi s pripravo razredčene serije in uporabo HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX) in AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) z določeno sledljivostjo do 5. mednarodnega standarda WHO. 11-članska plošča je bila pripravljena v združeni HCV-negativni plazmi, s katero je bila ustvarjena plošča, ki bi pokrivala razpon koncentracije 8,2–1,5 log<sub>10</sub> IE/ml. Test NeuMoDx HCV Quant Assay je pokazal sposobnost kvantificiranja HCV čez linearni razpon 8 log<sub>10</sub> z natančnostjo ±0,3 log<sub>10</sub> IE/ml na podlagi standardne napake, kot je bila izračunana pri 95-odstotnem intervalu zaupanja. Pri uporabi 2. in 3. regresije ni bila pridobljena nobena pomembna korist. ULOQ v plazmi je bila določena pri 8,2 log<sub>10</sub> IE/ml. Izvedena je bila dodatna študija za prikaz ekvivalence matrice in analiza, ki primerja kvantitativne rezultate NeuMoDx HCV za vzorce, pripravljene v plazmi in v serumu z uporabo dveh različnih modelov ujemanja regresije, vključno z orodji za regresijo MS Excel in Passing-Bablok. Rezultati kažejo močno korelacijo, ki jo predstavlja naklon in vrednosti prestrezanja zelo blizu 1,00 in 0,00, ter vrednost R<sup>2</sup> pri 0,99 (orodje za regresijo MS Excel) oziroma vrednost p pri 0,600 (Passing-Bablok). Koncentracije testa HCV, ki jih poroča NeuMoDx System, v primerjavi s pričakovanimi vrednostmi, so predstavljene na *sliki 4*.

Linearnost in ULOQ sta bili nato ocenjeni s potekom dela za primerke z volumnom 200 µl. Izvedene so bile primerjave ekvivalentnosti med koncentracijami, o katerih je poročala programska oprema NeuMoDx za potek dela za 200 µl in 550 µl. Analiza regresije Deming in Passing-Bablok je pokazala odlično korelacijo in naklon blizu 1 ter minimalno prestopanje (odstopanje) sporočenih koncentracij za vzorce plazme in seruma v linearnem območju. Primerjava Bland in Altman sporočene koncentracije za potek dela primerka z volumnom 200 µl in povprečne zabeležene koncentracije za potek dela za primerke z volumnom 200 µl in 550 µl je pokazala minimalno odstopanje, ki algoritmu, uporabljenemu za ustvarjanje rezultatov iz poteka dela z 200 µl pripisuje natančnost. Poleg tega je preprosta linearna regresija, ki je primerjala pričakovano koncentracijo s sporočeno koncentracijo za potek dela z 200 µl, imela naklon blizu 1, kar je pokazalo odlično korelacijo (*slika 5*). Skupaj te primerjave dokazujejo natančno kvantifikacijo HCV v linearnem območju testa NeuMoDx HCV Quant Assay z uporabo poteka dela primerka z volumnom 200 µl.



**Slika 4:** Linearni razpon testa NeuMoDx HCV Quant Assay za plazmo (levo) in serum (desno) – potek dela za 550 µl



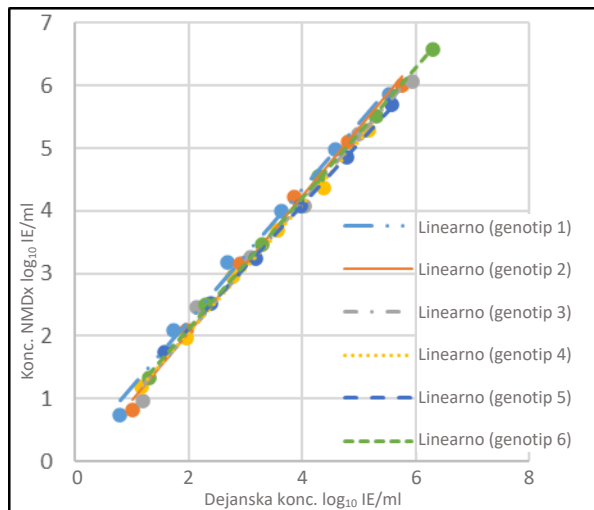
**Slika 5:** Linearni razpon testa NeuMoDx HCV Quant Assay za plazmo (levo) in serum (desno) – potek dela za 200 µl

### Analična občutljivost – linearnost po genotipih

Linearnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay v šestih genotipih HCV je bila določena s testiranjem vsaj štirih (4) različnih koncentracij vsakega genotipa HCV, pripravljenega v združeni HCV-negativni plazmi. Stopnje tarč HCV, testiranih v tej študiji, so bile odvisne od koncentracije izvornega primerka in so se zato razlikovale med genotipi. Študija je bila izvedena z vsakim genotipom, na vsaki stopnji je bilo uporabljenih 6 ponovljenih vzorcev. Linearnost za šest genotipov HCV je prikazana v *preglednici 7* in na *sliki 6*.

**Preglednica 7.** Linearnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay med genotipi

Genotip	Enačba linearnosti y = kvantifikacija NeuMoDx HCV Assay x = pričakovano količinsko določanje	R <sup>2</sup>
1	$y = 1,054x + 0,1325$	0,979
2	$y = 1,0792x - 0,0748$	0,985
3	$y = 1,0423x - 0,0439$	0,981
4	$y = 1,0158x + 0,0292$	0,973
5	$y = 0,9873x + 0,1524$	0,994
6	$y = 1,0393x + 0,0396$	0,997


**Slika 6:** Linearnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay med genotipi

**Analitična specifičnost – navzkrižna reaktivnost**

Analitična specifičnost je bila prikazana s presejanjem 33 organizmov, ki jih za navzkrižno reaktivnost običajno najdemo v primerkih krvi/plazme, kot tudi v vrstah, ki so filogenetsko podobne HCV. Organizmi so bili združeni po 4 in 6 organizmov ter testirani pri visoki koncentraciji. Testirani organizmi so prikazani v *preglednici 8*. Navzkrižna reaktivnost pri testiranih organizmih ni bila opažena, kar potrjuje 100 % analitično specifičnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay.

**Preglednica 8.** Patogeni, uporabljeni za prikaz analitične specifičnosti

Netarčni organizmi						
Adenovirus 2	Denga V1	Hepatitis A	Virus humane imunske pomanjkljivosti 2	Človeški T-limfotropni virus 1	Propionibacterium acnes	Virus zahodnega Nila
Adenovirus 5	Denga V2	Hepatitis B	Človeški papilomavirus 16	Človeški T-limfotropni virus 2	Rubella	Rumena mrzlica
Candida albicans	Denga V3	Virus herpesa simpleksa (HSV) 1	Človeški papilomavirus 18	Influenca A	St. Louis encefalitis	Virus Zika
Chlamydia trachomatis	Denga V4	Virus herpesa simpleksa (HSV) 2	Človeški herpes virus 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Citomegalovirus	Virus Epstein-Barr	Virus humane imunske pomanjkljivosti 1	Človeški herpes virus 8	Parvovirus B19	Staphylococcus epidermidis	

### Analična specifičnost – moteče snovi, komezalni organizmi

Test NeuMoDx HCV Quant Assay je bil ocenjen glede interference v prisotnosti neciljnih organizmov z uporabo istih skupin organizmov, pripravljenih za testiranje navzkrižne reaktivnosti in navedenih zgoraj v *preglednici 8*. Negativna plazma HCV je bila obogatena z organizmi, združenimi v skupine po 4–6 in prav tako obogatena s HCV-pozitivno kontrolo pri koncentraciji  $1,4 \log_{10}$  IE/ml. V prisotnosti teh komezalnih organizmov niso opazili nobenih pomembnih interferenc, kar kaže minimalni odklon kvantifikacije od kontrolnih primerkov, ki niso vsebovali motečega agenta.

### Analična specifičnost – moteče snovi, endogene in eksogene snovi

Test NeuMoDx HCV Quant Assay je bil ocenjen v prisotnosti tipičnih eksogenih in endogenih motečih snovi, s katerimi se srečujemo v primerkih klinične plazme s HCV. Vsebovale so nenavadno visoke stopnje krvnih komponent, pa tudi splošna protivirusna zdravila, ki so razvrščena v *preglednici 9*. Vsaka snov je bila dodana presejani HCV-negativni človeški plazmi, obogateni z  $1,7 \log_{10}$  IE/ml HCV, vzorci pa so bili analizirani glede motenj. Poleg tega je bila plazma v stanju splošne bolezni, povezane z okužbo s hepatitisom C, prav tako testirana glede morebitnih motenj. Povprečna koncentracija in odstopanje za vse testirane snovi sta navedena v *preglednici 10*. Nobena od eksogenih in endogenih snovi je vplivala na specifičnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay.

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

	Izdelek	Klasifikacija		Izdelek	Klasifikacija
Skupina 1	Sofosbuvir	Neposredno delujoč protivirus HCV	Skupina 2	Paritaprevir	Inhibitor proteaze HCV NS3/4A
	Ledipasvir	Inhibitor HCV		Ombitasvir	Protivirusno zdravilo za HCV
	Velpatasvir	Inhibitor HCV NS5A		Ritonavir	Inhibitor HIV proteaze
	Klaritromicin	Antibiotik		Abakavir sulfat	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Interferon alfa-2a	Modulator imunosti		Ribavirin	Modulator imunosti
Skupina 3	Grazoprevir	Inhibitor proteaze HCV NS3/4A	Skupina 4	Efavirenz	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Elbasvir	Inhibitor HCV NS5A		Lopinavir	Inhibitor proteaze
	Tenofovir dizoproksil	Protivirusno zdravilo za HBV/HIV		Azitromicin	Antibiotik
	Lamivudin	Protivirusno zdravilo za HBV/HIV		Dolutegravir	Protivirusno zdravilo za HIV
	Valganciklovir	Protivirusno zdravilo za CMV		Simeprevir	Inhibitor proteaze HCV NS3/4A
Skupina 5	Emtricitabin	Protivirusno zdravilo za HIV			
	Raltegravir	Protivirusno zdravilo za HIV			
	Amoksicilin	Antibiotik			
	Rilpivirin	Protivirusno zdravilo za HIV			
	Dasabuvir	Neposredno delujoč protivirus HCV			
	Glekaprevir	Inhibitor proteaze HCV NS3/4A			

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

Endogena	Povprečna konc. $\log_{10}$ IE/ml	Odstopanje $\log_{10}$ IE/ml
Hemoglobin	1,61	0,28
Trigliceridi	1,31	-0,02
Bilirubin	1,47	0,14
Albumin	1,47	0,14
Eksogeni (zdravila)	Povprečna konc. $\log_{10}$ IE/ml	Odstopanje $\log_{10}$ IE/ml
Skupina 1: Zidovudin (Zidovudine, ZDV), Sakvinavir, Ritonavir, Klaritromicin, Interferon alfa-2a, Interferon alfa-2b	1,48	0,15
Skupina 2: Abakavir sulfat, Amprenavir, Ribavirin, Entekavir, Fluoksetin, Valaciklovir hidroklorid	1,40	0,07
Skupina 3: Tenofovir dizoprosil, Lamivudin, Ganciklovir, Valganciklovir, Nevirapin	1,40	0,07
Skupina 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtid, Ciprofloksacin, Paroksetin,	1,51	0,18
Skupina 5: Adefovir (dipivoksil), Azitromicin, Indinavir sulfat, Sertalin	1,40	0,07
Stanje bolezni	Povprečna konc. $\log_{10}$ IE/ml	Odstopanje $\log_{10}$ IE/ml
Antinuklearno protitelo (Antinuclear Antibody, ANA)	1,53	0,18
Sistemski eritematozni lupus (SLE)	1,29	-0,06
Revmatoidni artritis	1,39	0,04
Protitelesa HBV	1,45	0,10
Alkoholna ciroza	1,43	0,08
Revmatoidni faktor	1,43	0,08
Nealkoholni steatohepatitis (NASH)	1,32	-0,03

### Natančnost znotraj laboratorija

Natančnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay je bila določena s testiranjem 7-članske plošče primerkov HCV, pripravljenih (vključujoč HCV Armored RNA in kontrolo HCV Acrometrix) z uporabo treh sistemov NeuMoDx System v obdobju 12 dni. Opredeljena je bila natančnost znotraj izvedbe, znotraj dneva in znotraj sistema, skupni standardni odklon pa je bil določen pri  $\leq 0,26 \log_{10}$  IE/ml. Pri delovanju med sistemi, dnevi ali izvedbami ni bilo pomembnih razlik, kot je prikazano v *preglednici 11*. Natančnost med upravljavci ni bila določena, saj upravlavec ne igra pomembne vloge pri obdelavi vzorcev z uporabo sistema NeuMoDx System.

**Preglednica 11.** Natančnost znotraj laboratorija – test NeuMoDx HCV Quant Assay na sistemih NeuMoDx System

	Ciljna konc. $[\log_{10}$ IE/ml]	Povpr. konc. $[\log_{10}$ IE/ml]	SD znotraj sistema	SD znotraj dneva	SD znotraj izvajanja	SD znotraj laboratorija (skupna)
<b>ARMORED</b>	6	5,95	0,17	0,13	0,10	0,17
	5	4,87	0,20	0,14	0,12	0,20
	3	2,89	0,19	0,17	0,17	0,19
<b>ACROMETRIX</b>	4,4	4,45	0,12	0,10	0,08	0,13
	3,4	3,45	0,12	0,12	0,11	0,13
	2,4	2,41	0,17	0,15	0,15	0,17
	1,4	1,40	0,26	0,25	0,25	0,24

### Ponovljivost med serijami

Ponovljivost med serijami testa NeuMoDx HCV Quant Assay je bila določena z uporabo treh različnih serij ključnih reagentov – NeuMoDx Lysis Buffer 3, ekstrakcijskih plošč NeuMoDx Extraction Plates in testnih trakov NeuMoDx CMV Quant Test Strips. Za oceno delovanja je bila uporabljena 7-članska plošča HCV (vključujoč tako HCV Armored RNA in kontrolo AcroMetrix HCV Control). Testiranje se je izvedlo s tremi serijami reagentov na treh sistemih v obdobju 6 dni. Variacija znotraj serije in med serijami je bila analizirana, rezultati pa so predstavljeni v preglednici 12. Maksimalno celotno odstopanje je znašalo 0,24 log<sub>10</sub> IE/ml in maksimalna skupna SD je bila 0,33 log<sub>10</sub> IE/ml. Pomembne razlike pri delovanju med serijami niso bile odkrite, saj je bila kvantifikacija vseh članov plošče znotraj obsega specifikacije tolerance.

**Preglednica 12.** Ponovljivost med serijami – test NeuMoDx HCV Quant Assay

	Ciljna konc. [log <sub>10</sub> IE/ml]	Srednja konc. SKUPNO [log <sub>10</sub> IE/ml]	n (Veljavni rezultati na serijo)	ODSTOPANJE ABS	SD med serijami	SD znotraj serije	Skupna SD
<b>ARMORED</b>	6	5,76	36	0,24	0,35	0,13	0,37
	5	4,84	36	0,16	0,16	0,22	0,27
	3	2,81	36	0,19	0,31	0,16	0,35
<b>ACROMETRIX</b>	4,4	4,35	36	0,05	0,21	0,11	0,24
	3,4	3,31	36	0,09	0,17	0,11	0,20
	2,4	2,33	36	0,07	0,24	0,13	0,27
	1,4	1,38	36	0,02	0,23	0,13	0,33

### Učinkovitost kontrole

SPC2 je vključen v test NeuMoDx HCV Quant Assay za poročanje o napakah v korakih postopka ali oviranja, ki bi vplivalo na izvedbo testa. Učinkovitost je bila testirana v pogojih, reprezentativnih za kritične napake v korakih postopka, ki bi se lahko pojavile med obdelavo vzorca in ki jih nadzorni senzorji sistema NeuMoDx System *morda ne bi zaznali*. Pozitivni (3 log<sub>10</sub> IE/ml) in negativni primerki so bili izzvani v prisotnosti kontrole v naslednjih pogojih: prisotnost inhibitorja, brez reagenta pranja in brez pralnega izpihanja. Neučinkovitosti v procesu, ki so negativno vplivale na zaznavo/kvantifikacijo HCV, so bile prezrčaljene z delovanjem tarče SPC2, kot je prikazano v preglednici 13. V vseh testiranih instancah je bilo ugotovljeno, da je kontrola obdelave vzorca neučinkovitosti v postopku ter prisotnost inhibitorjev nadzorovala zadovoljivo oziroma da pričakovana neučinkovitost postopka ni imela pomembnega negativnega učinka na zaznavo SPC2 niti na zaznavo in kvantifikacijo HCV. Zato se je SPC2 izkazal kot uspešen pri učinkovitem nadzoru delovanja testa na sistemu NeuMoDx System.

**Preglednica 13.** Učinkovitost kontrole obdelave vzorca

Testirana napaka koraka postopka	Status amplifikacije kontrole obdelave vzorcev	Stanje amplifikacije tarče HCV	Rezultat testa
Presence of Inhibitor (Prisotnost inhibitorja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Delivered (Brez izpiranja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Blowout (Brez izpihanja po izpiranju)	Amplified (Amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	Positive (Pozitivno) s kvantifikacijo znotraj 0,3 log <sub>10</sub> IE/ml kontrole

### Stopnja veljavnih rezultatov

Za določitev odstotka veljavnih rezultatov je bila uporabljena retrospektivna analiza podatkov, pridobljenih med oceno delovanja testa NeuMoDx HCV Quant Assay na sistemih NeuMoDx System. Veljavni testni rezultati bodo imenovani Positive (Pozitivno) ali Negative (Negativno); neveljavni testni rezultati se lahko objavijo kot Indeterminate (Nedoločeno) (IND) ali Unresolved (Nerešeno) (UNR), na podlagi statusa amplifikacije tarče in kontrole obdelave vzorca. Rezultat IND (Nedoločeno) običajno povzroči napaka instrumenta, ki privede do napake tarče in/ali nadzora notranjega postopka za amplifikacijo. Rezultat UNR (Nerešeno) je vzorcem določen, če se tako tarča kot interna kontrola ne amplificirata, pri tem pa ni zaznana napaka instrumenta. V retrospektivno analizo je bilo vključenih 1.962 posameznih rezultatov testa NeuMoDx HCV Quant Assay, ki so vključevali podatke, pridobljene tako iz primerkov seruma kot plazme na sistemih NeuMoDx 288 in NeuMoDx 96. Stopnja UNR je bila določena pri 0,61 % (12/1.962), stopnja IND pa pri 0,41 % (8/1.962); s tem so bili doseženi kriteriji za sprejemljivost analize. Zato je bila stopnja veljavnih rezultatov NeuMoDx HCV Quant Assay med kliničnimi matricami in NeuMoDx Systems določena pri 99,0 % z IZ 95 % (98,4–99,3).



### Navzkrižna kontaminacija

Stopnja navzkrižne kontaminacije za test NeuMoDx HCV Quant Assay je bila določena s testiranjem treh sklopov primerkov HCV, z izmenjujoče visoko pozitivnimi in visoko negativnimi primerki. Skupno je to vključevalo 144 ponovljenih vzorcev HCV-negativnih človeških primerkov in 144 ponovljenih vzorcev primerkov HCV z visokim titrom pri  $8,2 \log_{10}$  IE/ml. Vseh 144 ponovljenih vzorcev negativnega primerka je bilo določenih kot negativnih, kar prikazuje, da se med obdelavo vzorca na NeuMoDx System navzkrižna kontaminacija ni pojavila.

### Ekvivalenca matrice primerka

Testiranje je bilo izvedeno za dokaz ekvivalence matrice primerka med polno krvjo, zbrano v epruvetah za pripravo plazme, ki vsebujejo etilendiamin tetraacetno kislino (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA), in tistih, ki vsebujejo kislinsko citratno dekstrozo (Acid Citrate Dextrose, ACD). Dodatno testiranje je bilo izvedeno za določanje ekvivalence med svežimi in zamrznjenimi primerki plazme (zbrane v dveh tipih epruvet), kot tudi med svežimi in zamrznjenimi primerki seruma. Sveži primerki so bili shranjeni pri  $4^{\circ}\text{C}$ , dokler niso bili obogateni s štirimi stopnjami HCV in testirani za ekvivalenco. Nato so bili vzorci zamrznjeni vsaj za 24 ur pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Za tem obdobjem hranjenja v zamrznjenem stanju so bili primerki odtajani in ponovno testirani. Rezultati svežih in zamrznjenih primerkov seruma in plazme kot tudi primerkov plazme EDTA v primerjavi z ACD so bili primerjani glede ekvivalence z analizo regresije. Podatki prikazujejo odlično ekvivalenco med primerki plazme EDTA in ACD, primerki sveže in zamrznjene plazme, ter primerki svežega in zamrznjenega seruma.

Izvedeno je bilo dodatno testiranje za dokaz enakovrednosti delovanja testa NeuMoDx HCV Quant Assay na prvotnih primerkih v primerjavi s sekundarnimi primerki. Ploščice primerkov HCV-negativnih darovalcev, ki so bili obogateni s tarčo HCV (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) in primerkov HCV-pozitivnih darovalcev so bile najprej obdelane iz prvotnih epruvet s primerkom. Po obdelavi primarne epruvete s primerkom sta bila preostala plazma ali serum iz vsakega primerka razdeljena v sekundarno epruveto s primerkom in ponovno obdelana. Pri ugotovljenih rezultatih med obdelavo prvotne in sekundarne epruvete s primerkom ni bilo ugotovljene bistvene razlike.

### Primerjava klinične metode

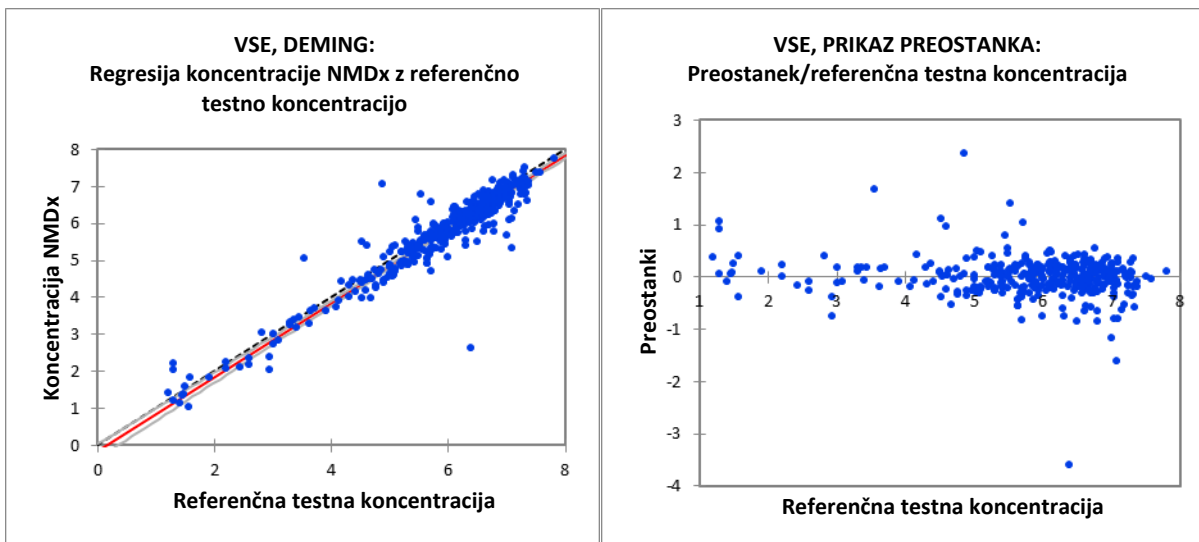
Kvalitativno in kvantitativno delovanje testa NeuMoDx HCV Quant Assay je bilo ocenjeno s primerjalnimi testi, odobrenimi s strani FDA/CE, kjer so bili testirani nerazredčeni klinični primerki pacientov, okuženih s HCV. Testiranje je bilo izvedeno interno pri NeuMoDx z enojno slepo študijo de-identificiranih, preostalih kliničnih primerkov, pridobljenih od šest zunanjih referenčnih laboratorijev. Skupaj je bilo z uporabo testa NeuMoDx HCV Quant Assay obdelanih 323 primerkov plazme in 336 primerkov seruma v (enojnem) slepem načinu na več molekularnih sistemih NeuMoDx Systems. Izmed teh vzorcev je bilo 35 vzorcev plazme in 13 vzorcev seruma testiranih TAKO na molekularnem sistemu NeuMoDx 288 Molecular System kot NeuMoDx 96 Molecular System. Nekaterih vzorcev, ki so dali NEVELJAVEN rezultat, ni bilo možno ponovno obdelati zaradi pomanjkanja razpoložljivosti zadostnega vzorca.

Napake obdelave in sistema, dobljene v molekularnih NeuMoDx Systems, so bile minimalne in so ustrezale kriterijem. Skupno so bili sprva dobljeni 4 rezultati Indeterminate (Nedoločen) (IND) rezultati za vzorce plazme in 4 rezultati IND za vzorce seruma, kar je pomenilo skupno začetno stopnjo IND 1 % (95-odstotni IZ 0,5 %–3 %) za plazmo in 1 % (95-odstotni IZ 0,4 %–3 %) za serum. Skupno so bili sprva dobljeni 3 rezultati UNRESOLVED (NEREŠENO) (UNR) za vzorce plazme in 5 rezultatov UNR za vzorce seruma, kar je pomenilo skupno stopnjo 1 % (95-odstotni IZ 0,2 %–3 %) za plazmo in 1 % (95-odstotni IZ 0,6 %–4 %) za serum.

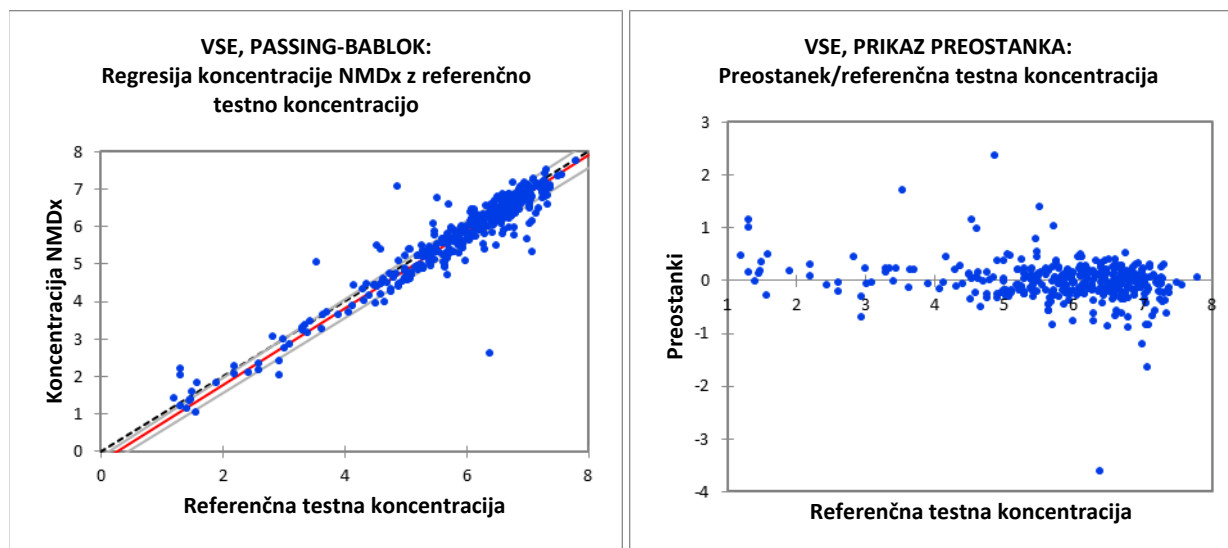
Primerki z negativnimi rezultati (IND/UNR) oziroma s »kvantifikacijsko napako« so bili ponovno testirani, ko je ostala zadostna količina; izvedel se je korak razredčenja na nekaterih vzorcih, da so bili pridobljeni veljavni rezultati. Veljaven rezultat je bil dobljen pri 13 primerkih z zadostnim volumnom za ponovitev (razredčeni ALI čisti).

Od 321 veljavnih rezultatov, dobljenih za primerke plazme, in 334 veljavnih rezultatov, dobljenih za vzorce seruma, je test NeuMoDx HCV Quant Assay sporočil, da je za 206 vzorcev plazme in 154 vzorcev seruma rezultat POZITIVNE (Pozitivno) z ustreznimi vrednostmi koncentracije, dodeljenimi z referenčnimi testi. Za korelacijo med vrednostmi koncentracije testa NeuMoDx HCV Quant Assay in vrednostmi, ki jih poročajo referenčni testi tako za vzorce plazme kot seruma, so bile uporabljene Demingove analize regresije in analize regresije Passing-Bablok.

Grafični prikazi ekvivalence so bili ustvarjeni za predstavitev korelacije med koncentracijami testa NeuMoDx HCV Quant Assay in referenčnimi testnimi vrednostmi koncentracije za vse vzorce, testirane z uporabo ujemanja z Demingovo regresijo in regresijo Passing-Bablok, ter so predstavljeni na *sliki 7* in *sliki 8*. Kakovost ujemanja regresije Deming je prikazana s koeficientom naklona 1,00, z IZ 95 % (0,97, 1,03) in prestrežanjem (odstopanje) -0,16 s 95-odstotnim IZ (-0,37, 0,06), kar prikazuje, da imajo dobljeni rezultati koncentracije med testom NeuMoDx HCV Quant Assay in referenčnimi testi visoko korelacijo ter sprejemljivo odstopanje. Kakovost linearnega ujemanja Passing-Bablok je prikazana s koeficientom naklona 1,02 s 95-odstotnim IZ (0,99, 1,05) in prestrežanjem (odstopanjem) -0,28 s 95-odstotnim IZ (-0,43, -0,14), kar prikazuje, da imajo rezultati koncentracije, pridobljene med testom NeuMoDx HCV Quant Assay in referenčnimi testi visoko korelacijo in sprejemljivo odstopanje, kot je prikazano v *preglednici 14*.



**Slika 7:** Grafični prikaz ekvivalence (levo) in preostanka (desno) – kumulativna analiza (v obeh sistemih NeuMoDx System) rezultatov testa NeuMoDx HCV Quant Assay v primerjavi z rezultati referenčnih testov za VSE vzorce na podlagi analize Demingove regresije.



**Slika 8:** Grafični prikaz ekvivalence (levo) in preostanka (desno) – kumulativna analiza (v obeh sistemih NeuMoDx System) rezultatov testa NeuMoDx HCV Quant Assay v primerjavi z rezultati referenčnih testov za VSE vzorce na podlagi analize regresije Passing-Bablok.

**Preglednica 14.** Povzetek analize linearne regresije Deming in Passing-Bablok

	Demingova analiza		Analiza Passing-Bablok	
	Prestrežanje	Koeficient naklona	Prestrežanje	Koeficient naklona
<b>KUMULATIVNO (vsa plazma + serum)</b>	-0,16 95-odstotni IZ (-0,37, 0,06)	1,00 95-odstotni IZ (0,97, 1,03)	-0,28 95-odstotni IZ (-0,43, -0,14)	1,02 95-odstotni IZ (0,99, 1,05)

Od 655 veljavnih rezultatov, dobljenih za primerke plazme in seruma z uporabo testa NeuMoDx HCV Quant Assay, so jih referenčni testi za HCV 361 potrdili kot pozitivnih in 294 jih je bilo negativnih. Občutljivost in specifičnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay sta bili izračunani z uporabo podatkov iz vseh veljavnih kliničnih vzorcev, ki so bili primerjani z referenčnim testom, ki je zbran in predstavljen v preglednici 15. Od 361 pozitivnih testiranih vzorcev jih je test NeuMoDx HCV Quant Assay 360 označil kot pozitivne, kar izkazuje 99,7-odstotno občutljivost s 95-odstotnim IZ (98,2–100 %). Od 294 negativnih testiranih vzorcev jih je test NeuMoDx HCV Quant Assay 271 prav tako označil kot negativne, kar prikazuje 92,2-odstotno specifičnost s 95-odstotnim IZ (88,3–94,9 %).

Ekvivalenca testa NeuMoDx HCV Quant Assay je bila prikazana z izjemno visoko koreliranimi rezultati delovanja testa pri molekularnem sistemu NeuMoDx 288, molekularnem sistemu NeuMoDx 96 in referenčnih testih tako za primerke plazme kot seruma.

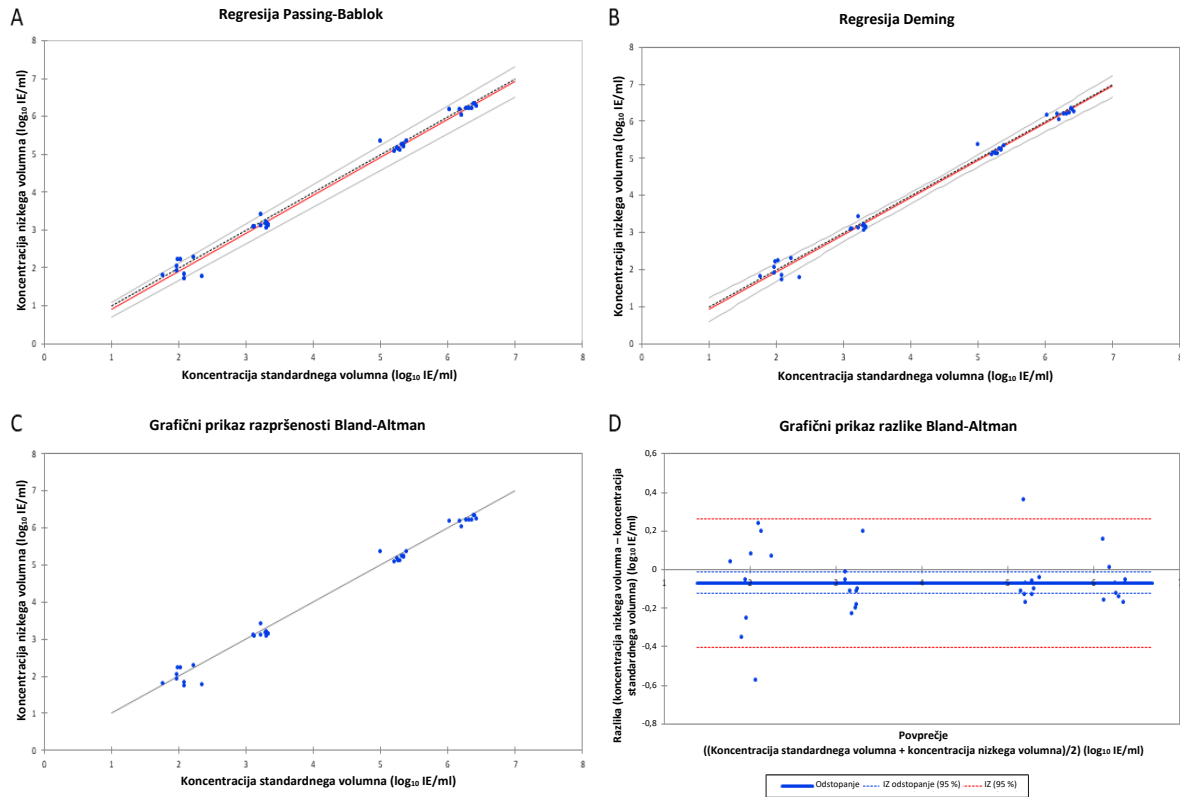
**Preglednica 15.** Rezultati primerjave kakovostne metode za test NeuMoDx HCV Quant Assay v primerjavi z referenčnimi testi – plazma in serum

	Referenčni test (POZ)	Referenčni test (NEG)	SKUPAJ
<b>NeuMoDx HCV Quant Assay (POZ)</b>	360	23	383
<b>NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)</b>	1	271	272
<b>SKUPAJ</b>	361	294	655
<b>OBČUTLJIVOST = 99,7 % IZ 95 % (98,2 %–100 %)</b>			
<b>*SPECIFIČNOST = 92,2 % IZ 95 % (88,3 %–94,9 %)</b>			

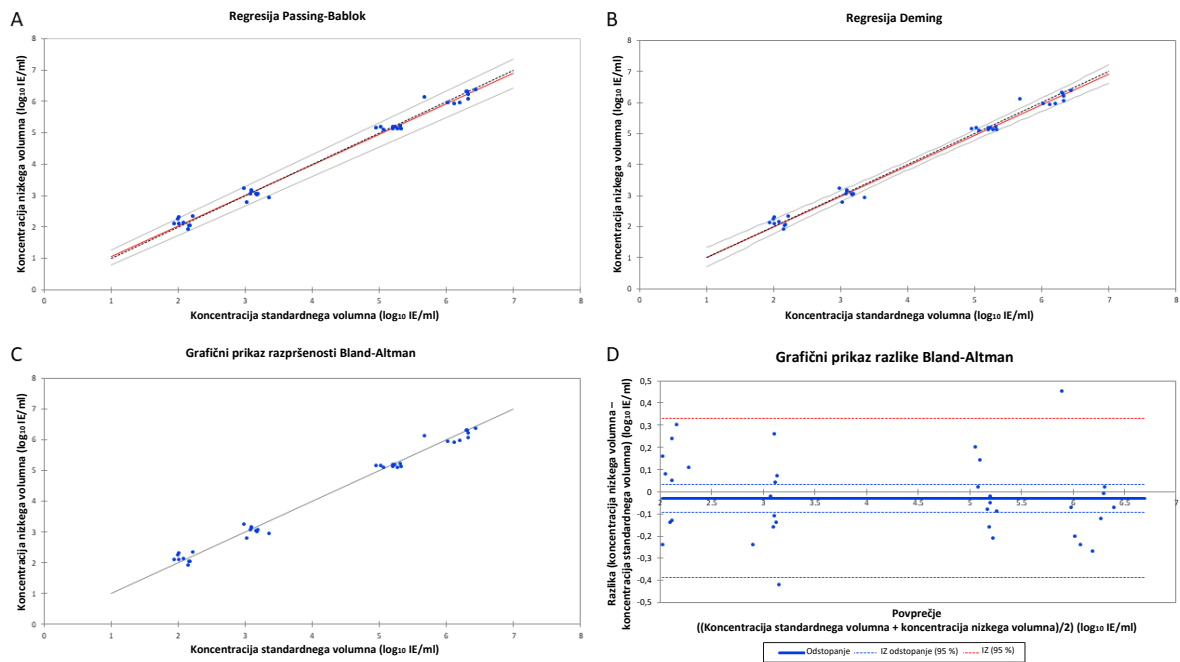
**\*OPOMBA:** Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) za test NeuMoDx HCV Quant Assay je 0,9 log<sub>10</sub> IE/ml, kar je nižje od primerjalnega testa, ki je bil uporabljen kot referenca. Posledično je bila izvedena analiza, ki je izključila 9 vzorcev, v katerih je NeuMoDx zaznal HCV, a je primerjalni test pokazal negativen rezultat. Z izključitvijo teh 9 vzorcev je bila specifičnost testa NeuMoDx HCV Quant Assay ponovno izračunana pri 95,1 % z IZ 95 % (91,7–97,2).

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

Kvantitativna korelacija med potekoma dela za primerke z volumnom 200 µl in 550 µl je bila potrjena z uporabo plošče, sestavljene iz posameznih, HCV-negativnih vzorcev plazme in seruma, ki so bili obogateni s štirimi znanimi nivoji kontrolnega materiala Accuplex HCV, in je sledljiva do 5. mednarodnega standarda WHO za RNA HCV za teste nukleinske kisline. Ti posamezni primerki plazme in seruma so bili obdelani z uporabo potekov dela za primerke z volumnom 550 µl in 200 µl za skupno 324 opravljenih testov. Primerjave ekvivalence med koncentracijami, o katerih je poročala programska oprema NeuMoDx za poteke dela za primerke z volumnom 200 µl in 550 µl z izdelano ploščo, so bile izvedene na podlagi posameznega vzorca. Analiza regresije Deming in Passing-Bablok je imela naklon 1,003 in 1,000 s prestrežanjem -0,082 in -0,085 v plazmi ter 0,974 in 0,984 s prestrežanjem 0,086 in 0,037 v serumu, kar kaže na odlično skladnost kvantifikacij HCV med obema potekoma dela obdelave glede na volumen. Primerjava Bland-Altman je pokazala minimalno odstopanje med obema potekoma dela. Poleg tega so enostavne linearne analize regresije s pričakovano koncentracijo in sporočeno koncentracijo za potek dela z 200 µl imele naklon 1,0432 in korelacijski koeficient 0,994 (plazma) ter 1,0007 in 0,993 (serum), kar še dodatno podpira odlično delovanje z uporabo poteka dela primerka z volumnom 200 µl za test NeuMoDx HCV Quant Assay. Rezultati teh študij so povzeti v nadaljevanju na sliki 9 in sliki 10.



**Slika 9:** Grafična primerjava ekvivalence koncentracij, zabeleženih med potekom dela za primerke z volumnom 200  $\mu$ l, in koncentracij, zabeleženih med potekom dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l. A) Regresija Passing-Bablok. B) Regresija Deming. C) Grafični prikaz razpršenosti Bland-Altman D) Grafični prikaz razlike Bland-Altman – primerki plazme



**Slika 10:** Grafična primerjava ekvivalence koncentracij, zabeleženih med potekom dela za primerke z volumnom 200  $\mu$ l, in koncentracij, zabeleženih med potekom dela za primerke z volumnom 550  $\mu$ l. A) Regresija Passing-Bablok. B) Regresija Deming. C) Grafični prikaz razpršenosti Bland-Altman D) Grafični prikaz razlike Bland-Altman – primerki seruma

### REFERENCE














1. Rachel H. Westbrook, Geoffrey Dusheiko. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology Update: Hepatitis C*, Volume 61, Issue 1, Supplement, November 2014, Pgs S58-S68.
2. Annual Epidemiological Report for 2016, Hepatitis C, European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis C. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018. (<https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/pdfs/2016HepSurveillanceRpt.pdf>)
3. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2: 161–76.
4. Surveillance for Viral Hepatitis – United States, 2016, CDC. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/index.htm>
5. Diagnosis and management of hepatitis C virus-infected children. Javeri R. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2011;30(11):983 – 985.
6. American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) and Infectious Disease Society of America (IDSA), HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C, Sept 21, 2017. ([www.hcvguidelines.org](http://www.hcvguidelines.org))
7. Centers for Disease Control (CDC), Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians Recommendations and Reports MMWR / Vol. 62 / May 7, 2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5<sup>th</sup> edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014

### BLAGOVNE ZNAMKE

NeuMoDx™ in NeuDry™ sta blagovni znamki podjetja NeuMoDx Molecular, Inc.  
 AcroMetrix™ je blagovna znamka podjetja Thermo Fisher Scientific.  
 Armored RNA® je registrirana blagovna znamka podjetja Asuragen, Inc.  
 BD Vacutainer® je zaščitena blagovna znamka podjetja Becton, Dickinson and Company  
 BD, PPT™, and SST™ so blagovne znamke podjetja Becton, Dickinson in Company  
 TaqMan® je registrirana blagovna znamka družbe Roche Molecular Systems, Inc.

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

### POMEN SIMBOLOV

<b>R only</b> Samo na recept	 Temperaturna meja
 Proizvajalec	 Ne uporabljajte ponovno
 Diagnostični medicinski pripomoček <i>in vitro</i>	 Vsebuje zadostno količino za <n> testov
 Pooblaščen predstavnik v Evropski skupnosti	 Glejte navodila za uporabo
 Kataloška številka	 Pozor
 Koda serije	 Biološka tveganja
 Rok uporabnosti	 Oznaka CE



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

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



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



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

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