

REF 201400 NeuMoDx™ CMV Quant Test Strip

R only

ATTENZIONE: solo per l'esportazione negli Stati Uniti

IVD Per uso diagnostico *in vitro* con NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular System

 Per gli aggiornamenti dei fogli illustrativi, andare su: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Per istruzioni dettagliate, fare riferimento al Manuale dell'operatore del NeuMoDx 288 Molecular System; P/N 40600108

Per istruzioni dettagliate fare riferimento al Manuale dell'operatore del NeuMoDx 96 Molecular System; P/N 40600317

USO PREVISTO

Il NeuMoDx CMV Quant Assay è un test *in vitro* automatizzato di amplificazione dell'acido nucleico per la quantificazione del DNA del citomegalovirus (CMV) nei campioni di plasma umano per i genotipi CMV da gB1 a gB4 degli individui con infezione da CMV. Il NeuMoDx CMV Quant Assay implementato nel NeuMoDx 288 Molecular System e nel NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System) comprende l'estrazione automatizzata del DNA per isolare l'acido nucleico target dal campione e dalla reazione a catena della polimerasi real-time (PCR) per stabilire le sequenze ad elevata conservazione nel genoma del citomegalovirus.

Il NeuMoDx CMV Quant Assay è destinato al rilevamento e alla quantificazione *in vitro* del DNA del citomegalovirus (CMV) in campioni di plasma umano freschi e congelati tramite i sistemi NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular System. Questo esame è destinato a essere usato in abbinamento al quadro clinico e ad altri indicatori di laboratorio di progresso della malattia per la gestione clinica e il monitoraggio dell'infezione da CMV. L'esame non deve essere usato come test di screening per la presenza di CMV nel sangue o nei suoi derivati.

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Per la preparazione del plasma, può essere usato sangue umano intero raccolto in apposite provette sterili contenenti EDTA o ACD come agente anticoagulante. Per la preparazione del test, il plasma in una provetta per campioni compatibile con il NeuMoDx System viene caricato sul NeuMoDx System utilizzando un portaprovette per campioni per avviare l'elaborazione. Per ciascun campione, viene miscelata un'aliquota di 550 µL di campione di plasma con il tampone di lisi NeuMoDx Lysis Buffer 1 e il NeuMoDx System esegue automaticamente tutti i passaggi necessari per estrarre l'acido nucleico target, preparare il DNA isolato per l'amplificazione mediante PCR real-time e, se presenti, amplificare e rilevare i prodotti di amplificazione (sezioni del target del genoma CMV in regioni altamente conservate). Il NeuMoDx CMV Quant Assay include un controllo di elaborazione dei campioni del DNA (Sample Process Control, SPC1) per aiutare a monitorare la presenza di potenziali sostanze inibitorie, nonché gli errori relativi al NeuMoDx System o ai reagenti, che si possono verificare durante il processo di estrazione e di amplificazione.

Il CMV è un comune virus a DNA a doppio filamento della famiglia dell'herpesvirus umano, che infetta persone di tutte le età. Si stima che, entro i 40 anni di età, oltre la metà della popolazione sia stata infettata con CMV.¹ CMV si diffonde tramite fluidi corporei come la saliva, le urine, il sangue, le lacrime, lo sperma e il latte materno. Gli individui immunocompetenti infettati con CMV sono in genere asintomatici, ma l'infezione da virus può essere grave nei neonati e nelle persone con un sistema immunitario indebolito. Le donne incinte possono trasmettere il CMV ai loro figli non ancora nati e causare un CMV congenito che può provocare la perdita dell'udito e altri ritardi motori e nello sviluppo. Il CMV è un importante agente patogeno per i pazienti immunodepressi, compresi i riceventi di trapianti di organi solidi, di cellule emopoietiche, i pazienti con infezione da HIV e i pazienti trattati con farmaci immunomodulanti.² Il monitoraggio della carica virale del CMV è utilizzato principalmente in queste popolazioni immunodepresse, dove provoca molte morbidità, tra cui polmonite, malattie gastrointestinali, epatite ed encefalite, oltre ad aumentare le probabilità di rigetto dell'organo e altre infezioni opportunistiche.

La diagnosi di infezione da CMV non si basa solo sul test degli acidi nucleici (Nucleic Acid Testing, NAT); il test NAT viene utilizzato in aggiunta al test dell'antigene, che prevede la colorazione dei leucociti polimorfonucleati (PMN) per le prime proteine strutturali della matrice inferiore del CMV e per altri sintomi che il paziente può manifestare. Il test della carica virale del CMV viene utilizzato di routine per determinare quando è necessaria una terapia antivirale e per monitorare l'efficacia di tali terapie.³ Mentre le linee guida attuali per la gestione e il trattamento delle infezioni da CMV nei soggetti immunodepressi sono ambigue in termini di *quando* cominciare la terapia antivirale, tutte prevedono il monitoraggio costante del carico virale dopo l'inizio della terapia antivirale, per contribuire a mitigare i gravi effetti collaterali dei farmaci in tali soggetti.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il NeuMoDx CMV Quant Assay sul NeuMoDx System utilizza la NeuMoDx CMV Quant Test Strip, i NeuMoDx CMV Calibrator, i NeuMoDx CMV External Control, il NeuMoDx Lysis Buffer 1 e i reagenti NeuMoDx di uso generale per eseguire l'analisi. Il NeuMoDx CMV Quant Assay combina l'estrazione automatizzata, l'amplificazione e la rilevazione del DNA tramite PCR real-time. I campioni di sangue intero vengono raccolti in provette con EDTA o ACD per la preparazione del plasma. Il campione di plasma in una provetta per campioni compatibile con il NeuMoDx System viene posizionato in un apposito portaprovette che viene poi caricato sul NeuMoDx System per l'elaborazione. Non sono necessari ulteriori interventi da parte dell'operatore.

I NeuMoDx System utilizzano una combinazione di calore, enzima litico e reagenti di estrazione per eseguire automaticamente la lisi cellulare, l'estrazione del DNA e la rimozione degli inibitori. Gli acidi nucleici rilasciati vengono catturati da microsfele paramagnetiche. Le particelle, con gli acidi nucleici legati, vengono caricate nella NeuMoDx Cartridge, dove i componenti non legati e diversi dal DNA vengono ulteriormente rimossi con il NeuMoDx Wash Reagent e il DNA legato viene eluito utilizzando il NeuMoDx Release Reagent. I NeuMoDx System utilizzano quindi il DNA eluito per reidratare i reagenti di amplificazione di proprietà esclusiva NeuDry™ contenenti tutti gli elementi necessari per l'amplificazione PCR dei target specifici di CMV e SPC1. Alla ricostituzione dei reagenti PCR NeuDry, il NeuMoDx System eroga la miscela pronta per la PCR presente nella NeuMoDx Cartridge. L'amplificazione e il rilevamento del controllo e delle sequenze di DNA target (se presenti) si svolgono nell'area della camera PCR della NeuMoDx Cartridge. La NeuMoDx Cartridge è studiata anche per contenere l'amplicone dopo la PCR real-time ed eliminare fondamentalmente il rischio di contaminazione post-amplificazione.

I target amplificati vengono rilevati in tempo reale utilizzando la chimica delle sonde a idrolisi (comunemente nota come chimica TaqMan®) che si avvale di molecole di sonde oligonucleotidiche fluorogeniche specifiche per gli ampliconi per i rispettivi target.

Le sonde TaqMan sono costituite da un fluoroforo legato covalentemente all'estremità 5' della sonda oligonucleotidica e da un quencher all'estremità 3'. Mentre la sonda è intatta, il fluoroforo e il quencher sono in prossimità, di conseguenza la molecola quencher estingue la fluorescenza emessa dal fluoroforo tramite il trasferimento di energia per risonanza descritto da Theodor Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Le sonde TaqMan sono progettate in modo tale da eseguire l'annealing all'interno di una regione del DNA amplificata da un set specifico di primer. Quando la Taq DNA polimerasi estende il primer e sintetizza il nuovo filamento, l'attività di esonucleasi 5' - 3' della Taq DNA polimerasi degrada la sonda che ha eseguito l'annealing allo stampo. La degradazione della sonda rilascia il fluoroforo e spezza la stretta prossimità con il quencher, superando quindi l'effetto di smorzamento dovuto al FRET e consentendo il rilevamento della fluorescenza del fluoroforo. Il segnale di fluorescenza risultante rilevato nel termociclatore per PCR quantitativa del NeuMoDx System è direttamente proporzionale al fluoroforo rilasciato e può essere correlato alla quantità di DNA target presente.

Una sonda TaqMan contrassegnata da un fluoroforo (Eccitazione: 490 nm ed Emissione: 521 nm) all'estremità 5' e un quencher scuro all'estremità 3' vengono utilizzati per rilevare il DNA del CMV. Per il rilevamento dell'SPC1, la sonda TaqMan è contrassegnata con un colorante fluorescente alternativo (Eccitazione: 535 nm ed Emissione: 556 nm) all'estremità 5' e un quencher scuro all'estremità 3'. Il software del NeuMoDx System monitora il segnale fluorescente emesso dalle sonde TaqMan alla fine di ogni ciclo di amplificazione. Quando l'amplificazione è completa, il software del NeuMoDx System analizza i dati e riporta un risultato finale [POSITIVE (POSITIVO) / NEGATIVE (NEGATIVO) / INDETERMINATE (INDETERMINATO) / UNRESOLVED (IRRISOLTO)]. Se il risultato è POSITIVE (POSITIVO), il software del NeuMoDx System fornisce anche un valore quantitativo associato al campione oppure indica se la concentrazione calcolata rientra nei limiti della quantificazione.

REAGENTI/MATERIALI DI CONSUMO

Materiali in dotazione

REF	Contenuto	Test per unità	Test per confezione
201400	NeuMoDx CMV Quant Test Strip <i>Reagenti PCR essiccati contenenti sonde TaqMan e primer specifici per CMV insieme a sonda TaqMan e primer specifici per SPC1.</i>	16	96

Reagenti e materiali di consumo necessari ma non in dotazione (disponibili separatamente da NeuMoDx)

REF	Contenuto
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Particelle paramagnetiche, enzima litico e controlli di elaborazione dei campioni essiccati</i>
800400	NeuMoDx CMV Calibrator <i>Set monouso di calibratori CMV alto e basso per stabilire la validità della curva di standard</i>
900401	NeuMoDx CMV External Control <i>Set monouso di controlli CMV positivi e negativi per stabilire la validità giornaliera di NeuMoDx CMV Quant Assay</i>
400400	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Puntali Hamilton CO-RE / CO-RE II (300 µL) con filtri
235905	Puntali Hamilton CO-RE / CO-RE II (1000 µL) con filtri

Strumentazione richiesta

NeuMoDx 288 Molecular System [RIF 500100] o NeuMoDx 96 Molecular System [RIF 500200]

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- La NeuMoDx CMV Quant Test Strip è per uso diagnostico *in vitro* solo con i NeuMoDx System.
- Non utilizzare i reagenti o i materiali di consumo dopo la data di scadenza indicata.
- Non utilizzare alcun reagente se il sigillo di sicurezza è rotto o se la confezione risulta danneggiata all'arrivo.
- Non utilizzare i materiali di consumo o i reagenti se il sacchetto di protezione appare aperto o rotto all'arrivo.

- Prima di poter generare i risultati dei test per i campioni clinici, è necessario avere a disposizione una calibrazione di test valida (generata elaborando i calibratori alto e basso dai NeuMoDx CMV Calibrator [RIF 800400]).
- È necessario elaborare i NeuMoDx CMV External Control [RIF 900401] ogni 24 ore per tutta la fase di test con il NeuMoDx CMV Quant Assay.
- Il volume minimo del campione è pari a 1 mL di plasma trattato con EDTA/ACD quando si usa il portaprovette da 32 provette; un volume inferiore a 1 mL può generare un errore del NeuMoDx System.
- L'esecuzione di un esame CMV su campioni conservati a temperature non corrette oppure oltre i tempi di conservazione specificati può produrre risultati non validi o errati quando si usa la NeuMoDx CMV Quant Test Strip.
- Evitare la contaminazione microbica e da desossiribonucleasi (DNasi) di tutti i reagenti e i materiali di consumo in ogni momento. Si raccomanda l'uso di pipette di trasferimento monouso sterili prive di DNasi. Utilizzare una nuova pipetta per ciascun campione.
- Per evitare la contaminazione, non manipolare o spezzare nessuna NeuMoDx Cartridge dopo l'amplificazione. In nessun caso recuperare le NeuMoDx Cartridge dal contenitore dei materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 288 Molecular System) o dal recipiente materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 96 Molecular System). La cartuccia NeuMoDx Cartridge è stata progettata in modo da prevenire la contaminazione.
- Nei casi in cui dal laboratorio siano condotti anche test per PCR in provetta aperta, è necessario assicurarsi che NeuMoDx CMV Quant Test Strip, i materiali di consumo e i reagenti aggiuntivi necessari per i test, i dispositivi di protezione individuale come guanti e camici da laboratorio e il NeuMoDx System non siano contaminati.
- Durante la manipolazione dei reagenti e dei materiali di consumo NeuMoDx, è necessario indossare guanti in nitrile, puliti e privi di polvere. Prestare attenzione a non toccare la superficie superiore della NeuMoDx Cartridge, la superficie della pellicola sigillante della NeuMoDx CMV Quant Test Strip e della NeuMoDx Extraction Plate o la superficie superiore del NeuMoDx Lysis Buffer 1; i materiali di consumo e i reagenti devono essere maneggiati toccando solo le superfici laterali.
- Le schede di sicurezza sono disponibili su richiesta.
- Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.
- Non pipettare con la bocca. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti.
- Maneggiare sempre i campioni come se fossero infettivi e in conformità con procedure di laboratorio sicure, come quelle descritte in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ e nel Documento M29-A4⁵ del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto in conformità alle normative nazionali, federali, provinciali, regionali e locali.

STOCCAGGIO, MANIPOLAZIONE E STABILITÀ DEL PRODOTTO

- Tutti i reagenti e i materiali di consumo NeuMoDx (ad eccezione dei controlli esterni e dei calibratori) sono stabili nell'imballaggio primario a temperature comprese tra 18 e 23 °C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del prodotto.
- Una NeuMoDx CMV Quant Test Strip caricata nel NeuMoDx System è stabile per 14 giorni; il software del NeuMoDx System richiederà la rimozione delle strisce reattive che sono state utilizzate a bordo del NeuMoDx System per più di 14 giorni e nuove strisce NeuMoDx CMV Quant Test Strip dovranno essere caricate sul NeuMoDx System.
- I NeuMoDx Calibrator ed External Control sono non infettivi ma dopo l'uso devono essere smaltiti con i materiali di scarto a rischio biologico del laboratorio, poiché dopo l'elaborazione sul sistema contengono materiali target che, se non gestiti correttamente, potrebbero causare contaminazione.

PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

1. Trattare tutti i campioni come se fossero potenziali mezzi di trasmissione di agenti infettivi.
2. Non congelare sangue intero né altri campioni conservati in provette primarie.
3. Per preparare di campioni di plasma, è necessario raccogliere il sangue intero in provette sterili utilizzando EDTA o ACD come anticoagulante. Seguire le istruzioni fornite dal produttore delle provette per il prelievo dei campioni.
4. Il sangue intero raccolto nei dispositivi sopra elencati può essere conservato e/o trasportato per un massimo di 24 ore a una temperatura compresa fra 2 e 25°C prima della preparazione del plasma. La preparazione del plasma deve essere eseguita attenendosi alle istruzioni del produttore.
5. I campioni di plasma preparati possono restare sul NeuMoDx System per un massimo di 8 ore prima dell'elaborazione. Se è necessario un tempo di conservazione maggiore, si raccomanda di mettere i campioni in frigorifero o di congelarli.
6. I campioni di plasma preparato devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C per non più di 7 giorni prima dell'analisi e per un massimo di 8 ore a temperatura ambiente.
7. I campioni preparati possono essere conservati a ≤ -20 °C per un massimo di 26 settimane prima dell'elaborazione; i campioni di plasma non devono essere sottoposti a più di 2 cicli di congelamento/scongelo prima dell'uso.
 - a. Se i campioni vengono congelati, farli scongelare completamente a temperatura ambiente (15 - 30 °C); agitare con movimenti rotatori per ottenere un campione distribuito uniformemente.
 - b. Una volta scongelati i campioni congelati, l'analisi deve essere eseguita entro 8 ore.

8. Se i campioni vengono spediti, devono essere imballati ed etichettati in conformità alle normative locali e/o internazionali applicabili.
9. Etichettare i campioni in modo chiaro e indicare che i campioni sono per analisi del CMV.
10. Procedere con la sezione *Preparazione del test*.

Il processo complessivo per l'implementazione del NeuMoDx CMV Quant Assay è riepilogato nella *Figura 1* seguente.

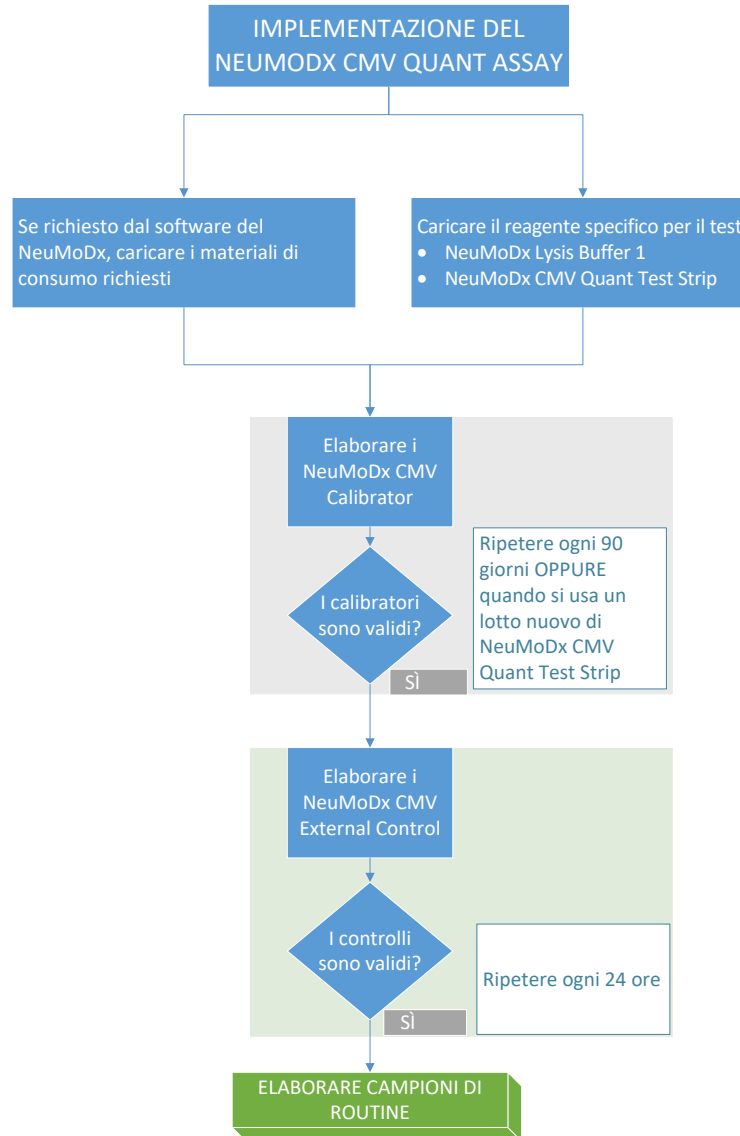


Figura 1: Flusso di lavoro di implementazione del NeuMoDx CMV Quant Assay

ISTRUZIONI PER L'USO

Preparazione del test

1. Applicare l'etichetta con codice a barre del campione su una provetta per campioni compatibile con NeuMoDx System.
2. Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire ≥ 1 mL di plasma nella provetta per campioni (secondaria) dotata di codice a barre tramite il portaprovette da 32 provette, oppure trasferire > 2 mL tramite il portaprovette da 24 provette. Occorre fare attenzione a non trasferire coaguli dal campione di plasma alla provetta per campioni. Utilizzare una pipetta di trasferimento diversa per ciascun campione.

3. La provetta secondaria deve soddisfare le seguenti specifiche delle provette compatibili con il NeuMoDx System in base al portaprovette per campioni utilizzato per l'elaborazione.
 - Portaprovette da 32 provette: diametro compreso tra 11 mm e 14 mm e altezza compresa tra 60 mm e 120 mm
 - Portaprovette da 24 provette: diametro compreso tra 14,5 mm e 18 mm e altezza compresa tra 60 mm e 120 mm

Funzionamento del NeuMoDx™ System

Per istruzioni dettagliate, fare riferimento ai Manuali dell'operatore del NeuMoDx 288 e del 96 Molecular System (p/n 40600108 e 40600317)

1. Inserire una o più NeuMoDx CMV Quant Test Strip in uno o più supporti per NeuMoDx System Test Strip e usare il touchscreen per caricare tali supporti nel NeuMoDx System.
2. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, aggiungere i materiali di consumo necessari ai supporti dei materiali di consumo del NeuMoDx System e utilizzare il touchscreen per caricare i supporti nel NeuMoDx System.
3. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, sostituire NeuMoDx Wash Reagent e NeuMoDx Release Reagent e svuotare il contenitore dei rifiuti di adescamento o il contenitore dei materiali di scarto a rischio biologico, a seconda dei casi.
4. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, elaborare i Calibrator [RIF 800400] e/o gli External Control [RIF 900401]. È possibile trovare ulteriori informazioni sui calibratori e sui controlli nella sezione *Elaborazione dei risultati*.
5. Caricare la provetta o le provette per campioni/calibratori/controlli in un portaprovette standard da 32 provette e assicurarsi che da tutte le provette siano stati rimossi i tappi.
6. Posizionare il portaprovette per campioni in qualunque posizione aperta sul ripiano del caricatore automatico e utilizzare il touchscreen per caricare il portaprovette nel NeuMoDx System. In questo modo si avvierà l'elaborazione dei campioni caricati per il/i test identificato/i.

LIMITAZIONI

- La NeuMoDx CMV Quant Test Strip può essere utilizzata solo sui NeuMoDx System.
- Le prestazioni della NeuMoDx CMV Quant Test Strip sono state definite per i campioni di plasma preparati da sangue intero raccolto con EDTA/ACD come anticoagulante; l'uso della NeuMoDx CMV Quant Test Strip con altri tipi di campioni clinici non è stato valutato e le caratteristiche prestazionali del test non sono note per altri tipi di campioni.
- Poiché il rilevamento del CMV dipende dal numero di organismi presenti nel campione, l'affidabilità dei risultati dipende dal fatto che i campioni vengano prelevati, trattati e conservati correttamente.
- I calibratori e i controlli esterni devono essere elaborati secondo le indicazioni contenute nei foglietti illustrativi presenti nella confezione e richiesti dal software del NeuMoDx System prima di elaborare i campioni clinici di routine.
- Eventuali risultati errati potrebbero essere dovuti a operazioni di prelievo, manipolazione o conservazione dei campioni non corrette, a errori tecnici o a scambi di provette per campioni. Inoltre potrebbero verificarsi falsi negativi se il numero di particelle virali nel campione è al di sotto del limite di rilevazione del NeuMoDx CMV Quant Assay.
- Il NeuMoDx System è destinato a essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato all'uso del sistema.
- Se non si amplificano sia il target CMV che il target SPC1, si otterrà un risultato non valido (Indeterminate (Indeterminato) o Unresolved (Irrisolto)) e si dovrà ripetere il test.
- Se il risultato del NeuMoDx CMV Quant Assay è Positive (Positivo), ma il valore di quantificazione è oltre i limiti di quantificazione, il NeuMoDx System indicherà se l'CMV rilevato era *al di sotto* del limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) o *al di sopra* del limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- Nel caso in cui l'CMV rilevato fosse al di sotto del limite di quantificazione inferiore, è possibile ripetere il NeuMoDx CMV Quant Assay (se si desidera) con un'altra aliquota del campione.
- Nel caso in cui l'CMV rilevato fosse al di sopra del limite di quantificazione superiore, è possibile ripetere il NeuMoDx CMV Quant Assay con un'aliquota diluita del campione originale. Si consiglia una diluizione nel rapporto 1:100 o 1:1000 nel plasma CMV-negativo o nel diluente Basematrix 53 (Basematrix, SeraCare, Milford, MA). La concentrazione di campione originale può essere calcolata come indicato di seguito:

$$\text{Concentrazione del campione originale} = \log_{10}(\text{fattore di diluizione}) + \text{concentrazione segnalata del campione diluito}.$$
- L'occasionale presenza di inibitori della PCR nel plasma può causare un errore di quantificazione del sistema; in tal caso si consiglia di ripetere il test con lo stesso campione diluito in Basematrix a 1:10 o 1:100.
- Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Piuttosto, un risultato positivo è indice di possibile presenza di DNA di citomegalovirus.
- Cancellazioni o mutazioni in entrambe le regioni conservate prese come target dal NeuMoDx CMV Quant Assay possono influenzare il rilevamento o potrebbero portare a un risultato errato quando si utilizza la NeuMoDx CMV Quant Test Strip.

- I risultati del NeuMoDx CMV Quant Assay dovranno essere impiegati in aggiunta alle osservazioni cliniche e alle altre informazioni a disposizione del medico; il test non è destinato a diagnosticare l'infezione.
- Si raccomandano buone pratiche di laboratorio, compreso il cambio di guanti tra una manipolazione dei campioni dei pazienti e quella successiva, per evitare la contaminazione.

ELABORAZIONE DEI RISULTATI

I risultati disponibili possono essere visualizzati o stampati dalla scheda "Results" (Risultati) nella finestra Results (Risultati) sul touchscreen del NeuMoDx System.

I risultati del NeuMoDx CMV Quant Assay vengono generati automaticamente dal software del NeuMoDx System utilizzando l'algoritmo decisionale e i parametri di elaborazione dei risultati sono specificati nel file di definizione esame NeuMoDx CMV (CMV Assay Definition File, EBV ADF). Il risultato del NeuMoDx CMV Quant Assay può essere: Negative (Negativo), Positive (Positivo) con indicazione di una concentrazione di CMV, Positive (Positivo) al di sopra del limite di quantificazione superiore, Positive (Positivo) al di sotto del limite di quantificazione inferiore, Indeterminate (Indeterminato) o Unresolved (Irrisolto), a seconda dello stato di amplificazione del controllo target e del controllo di elaborazione dei campioni. I risultati sono riportati nella *Tabella 1* in base all'algoritmo decisionale.

Tabella 1: Algoritmo decisionale del NeuMoDx CMV Quant Assay

Result (Risultato)	CMV	Controllo elaborazione campioni (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Positivo)	$[2 \leq Ct \leq 9 \text{ AND (ED) } EPR > 2 \text{ AND (ED) } EP \geq 1500]$ OR (OPPURE) $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (ED) } EP \geq 1500]$	N/A
Positive (Positivo), al di sopra del limite di quantificazione superiore [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (\log_{10} IU/mL)	[CONC] > 8,0 \log_{10} IU/mL, NO QUANT	N/A
Positive (Positivo), al di sotto del limite di quantificazione inferiore [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (\log_{10} IU/mL)	[CONC] < 1,3 \log_{10} IU/mL, NO QUANT	N/A
Negative (Negativo)	N/A OR (OPPURE) $[2 \leq Ct < 9 \text{ AND (ED) } EPR \leq 2]$ OR (OPPURE) $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (ED) } EP < 1500]$ OR (OPPURE) Ct > 41	AMPLIFIED (AMPLIFICATO) ($28 \leq Ct \leq 34$) and (e) EP ≥ 2000
Indeterminate (Indeterminato)	NOT AMPLIFIED / System Errors Noted (NON AMPLIFICATO / Notati errori di sistema)	
Unresolved (Irrisolto)	NOT AMPLIFIED / No System Errors Noted (NON AMPLIFICATO / Nessun errore di sistema notato)	

EP = End Point Fluorescence (fluorescenza dell'endpoint) (dopo la correzione della linea basale); EPR = End Point Fluorescence Ratio (rapporto fluorescenza dell'endpoint); Ct = Cycling Threshold (soglia del ciclo);
Quant = quantità calcolata di CMV presente espressa in \log_{10} IU/mL. Vedi sotto Calcolo del test.

Calcolo del test

- Per i campioni che rientrano nel range di quantificazione del NeuMoDx CMV Quant Assay, la concentrazione di DNA dell'CMV presente nei campioni viene calcolata tramite la curva standard memorizzata in combinazione con il coefficiente di calibrazione.
 - In base ai risultati dei NeuMoDx CMV Calibrator elaborati per stabilire la validità della curva di standard, si calcola anche un "coefficiente di calibrazione" per un particolare lotto di NeuMoDx CMV Quant Test Strip, su uno specifico NeuMoDx System.
 - Il coefficiente di calibrazione viene inserito automaticamente nella determinazione finale della concentrazione di DNA del CMV.
- I risultati del NeuMoDx CMV Quant Assay sono espressi in \log_{10} IU/mL.
- La quantificazione dei campioni sconosciuti che ne risulta è tracciabile secondo il 1° Standard Internazionale dell'OMS sul CMV.

Calibrazione del test

Per quantificare il DNA del CMV presente nei campioni, è necessaria una calibrazione valida, basata sulla curva standard. Per generare risultati validi, è necessario completare la calibrazione del test tramite i calibratori forniti da NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibratori esterni

- I NeuMoDx CMV Calibrator sono forniti in kit [RIF 800400] e contengono target di CMV incapsulato non infettivo preparato in Basematrix.
- Occorre elaborare un set di calibratori CMV con ogni nuovo lotto di NeuMoDx CMV Quant Test Strip, quando si carica un nuovo file di definizione esame CMV nel NeuMoDx System, oppure quando il set attuale di calibratori ha superato il periodo di validità (attualmente impostato a 90 giorni), o quando viene modificato il software del NeuMoDx System.

3. Il software del NeuMoDx System notificherà all'utente quando i calibratori devono essere elaborati; non è possibile usare un nuovo lotto di strisce reattive per l'analisi finché i calibratori non sono stati elaborati correttamente.
4. La validità della calibrazione viene stabilita come segue:
 - a) Per stabilire la validità occorre elaborare un set di due calibratori (alto e basso).
 - b) Per ottenere risultati validi, almeno 2 replicati su 3 devono dare risultati che rientrino nei parametri predefiniti. Il target nominale del calibratore basso è di $3 \log_{10}$ IU/mL e il target nominale del calibratore alto è di $5 \log_{10}$ IU/mL.
 - c) Viene calcolato un coefficiente di calibrazione in modo da giustificare la variazione attesa fra i lotti di strisce reattive; tale coefficiente di calibrazione viene utilizzato nella determinazione della concentrazione finale di CMV.
5. Se uno o entrambi i calibratori non superano il controllo di validità, ripetere l'elaborazione dei calibratori che non hanno superato il controllo utilizzando una fiala nuova. Nel caso in cui un calibratore non superi il controllo di validità, è possibile ripetere l'elaborazione solo di quel calibratore, dato che il sistema non richiede all'utente di elaborare nuovamente entrambi i calibratori.
6. Se il/i calibratore/i non supera/superano il controllo di validità due volte consecutive, contattare NeuMoDx Molecular, Inc.

Controllo qualità

Le normative locali in genere specificano che il laboratorio è responsabile delle procedure di controllo che monitorano l'accuratezza e la precisione dell'intero processo analitico e devono stabilire il numero, il tipo e la frequenza di test dei materiali di controllo utilizzando specifiche di prestazione verificate per un sistema di test approvato e non modificato.

Controlli esterni

1. I materiali dei controlli esterni, che contengono il virus CMV target non infettivo incapsulato in Basematrix per i controlli positivi, sono forniti da NeuMoDx Molecular, Inc. in un kit contenente i NeuMoDx CMV External Control [RIF 900401].
2. I controlli esterni positivi e negativi devono essere elaborati una volta ogni 24 ore. Se non esiste un set di controlli esterni validi, il software del NeuMoDx System richiederà all'utente di elaborare questi controlli prima di poter riportare i risultati del campione.
3. Se sono richiesti i controlli esterni, estrarre il set di controlli esterni dal congelatore e far scongelare completamente le fiale a temperatura ambiente (15-30 °C). Miscelare con vortex per garantire l'omogeneità.
4. Utilizzando il touchscreen e un portaprovette per campioni posizionato sul ripiano del caricatore automatico, caricare le fiale del controllo positivo e del controllo negativo nel NeuMoDx System. Il NeuMoDx System riconoscerà il codice a barre e inizierà l'elaborazione delle provette per campioni, a meno che i reagenti o i materiali di consumo adeguati necessari per i test siano non disponibili.
5. La validità dei controlli esterni sarà valutata dal NeuMoDx System in base al risultato atteso. Il controllo positivo deve fornire un risultato Positive (Positivo) al CMV e il controllo negativo deve fornire un risultato Negative (Negativo) al CMV.
6. Risultati discrepanti per i controlli esterni devono essere gestiti come segue:
 - a) Un risultato del test Positive (Positivo) riportato per un campione di controllo negativo indica un problema di contaminazione del campione.
 - b) Un risultato del test Negative (Negativo) riportato per un campione di controllo positivo potrebbe indicare l'esistenza di un problema riguardante un reagente o uno strumento.
 - c) In ciascuno degli esempi di cui sopra, ripetere i NeuMoDx CMV External Control(s) falliti con una fiala appena scongelata del controllo o dei controlli che non hanno superato il test di validità.
 - d) Se il NeuMoDx CMV External Control positivo continua a dare un risultato Negative (Negativo), contattare l'assistenza clienti NeuMoDx.
 - e) Se il NeuMoDx CMV External Control negativo continua a dare un risultato Positive (Positivo), cercare di eliminare tutte le fonti di potenziale contaminazione, anche sostituendo TUTTI i reagenti prima di contattare l'assistenza clienti di NeuMoDx.

Controlli (interni) di elaborazione dei campioni

Nella NeuMoDx Extraction Plate è incorporato un Controllo di elaborazione dei campioni esogeno (Sample Process Control, SPC1), che si sottopone all'intero processo di estrazione dell'acido nucleico e amplificazione mediante PCR real-time con ogni campione. In ogni NeuMoDx CMV Quant Test Strip sono inclusi anche primer e sonda specifici per SPC1, consentendo il rilevamento della presenza dell'SPC1 insieme al DNA dell'CMV target (se presente) tramite PCR multiplex real-time. Il rilevamento dell'amplificazione di SPC1 consente al software del NeuMoDx System di monitorare l'efficacia dei processi di estrazione e di amplificazione del DNA tramite PCR.

Risultati non validi

Se un NeuMoDx CMV Quant Assay eseguito sul NeuMoDx System non è in grado di produrre un risultato valido, sarà riportato come Indeterminate (IND, Indeterminato) o Unresolved (UNR, Irrisolto) in base al tipo di errore che si è verificato.

Il risultato sarà IND se viene rilevato un errore del NeuMoDx System durante l'elaborazione del campione. Se viene riportato un risultato IND, si consiglia di ripetere il test.

Il risultato sarà UNR quando non viene rilevata alcuna amplificazione valida del DNA del CMV o dell'SPC1, cosa che indica un possibile errore dovuto al reagente o la presenza di inibitori. Se viene riportato un risultato UNR, si consiglia in primo luogo di ripetere il test. Se ancora non si ottiene un risultato valido, è possibile usare un campione diluito per mitigare gli effetti di un'eventuale inibizione del campione.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica – Limite di rilevazione con lo Standard OMS

La sensibilità analitica del NeuMoDx CMV Quant Assay è stata caratterizzata testando campioni negativi e una serie di diluizioni tracciabili secondo il 1° Standard Internazionale dell'OMS nel plasma negativo umano sottoposti a screening per determinare il limite di rilevazione (Limit of Detection, LoD) sui NeuMoDx System. Il LoD è stato definito come il livello target più basso rilevato a una percentuale del 95% in base a un'analisi con modello Probit. Lo studio è stato realizzato nel corso di 3 giorni su vari sistemi con più lotti qualificati di reagenti NeuMoDx. Ogni sistema ha elaborato 18 replicati in ciascun livello di diluizione al giorno. I tassi di rilevazione sono illustrati nella *Tabella 2*.

Tabella 2: Tassi di rilevazione positivi per la determinazione del LoD del NeuMoDx CMV Quant Assay

Concentrazione target [IU/mL]	Concentrazione target [log ₁₀ IU/mL]	PLASMA		
		Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione
50	1,70	108	108	100,0%
30	1,48	108	107	99,1%
25	1,40	108	106	98,1%
20	1,30	108	105	97,2%
15	1,18	108	99	91,7%
NEG	---	108	0	0,0%

Il LoD del NeuMoDx CMV Quant Assay in plasma per la variante gB1 è stato determinato nella quantità di 17,7 IU/mL (1,25 log₁₀ IU/mL) con un intervallo di confidenza (IC) al 95% di 13,8 - 21,0 IU/mL, (1,14 - 1,32 log₁₀ IU/mL) [Figura 2]. Il LoD per tutti i genotipi è di 20,0 IU/mL (1,30 log₁₀ IU/mL) come determinato dall'analisi hit rate.

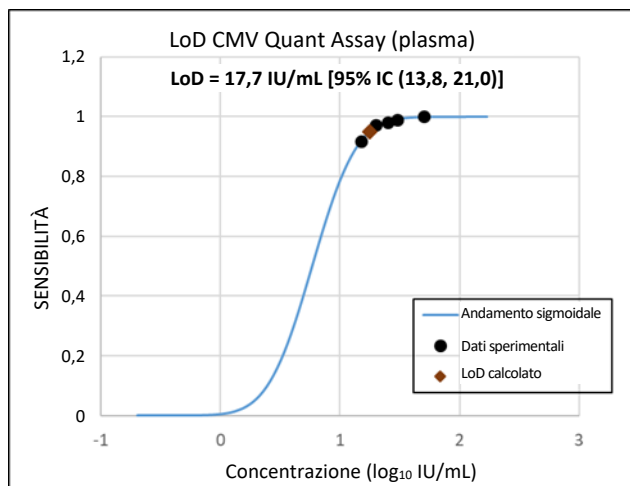


Figura 2: Analisi con modello Probit usata per determinare il LoD del NeuMoDx CMV Quant Assay in campioni di plasma

Sensibilità analitica – Limite di quantificazione – Limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

Il limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) si definisce come il livello target più basso a cui si ottiene un rilevamento >95% e un TAE ≤1,0. Per determinare il valore LLoQ, l'errore analitico totale (Total Analytical Error, TAE) è stato calcolato per ciascuno dei livelli target CMV riportati con un rilevamento > 95% come parte del calcolo del valore di LoD. Il TAE è definito come segue:

$$\text{TAE} = \text{deviazione} + 2 \cdot \text{DS} \quad (\text{Statistica Westgard})$$

La deviazione è il valore assoluto della differenza tra la media della concentrazione calcolata e la concentrazione attesa. DS si riferisce alla deviazione standard del valore quantificato del campione.

I risultati compilati per i 5 livelli di campioni di plasma di CMV (variante gB1) usati nello studio del LLoQ sono mostrati nella *Tabella 3*. Sulla base di questo set di dati e del LoD precedentemente determinato, il LLoQ è stato stabilito a 20,0 IU/mL (1,30 log₁₀ IU/mL) e confermato per tutti i genotipi.

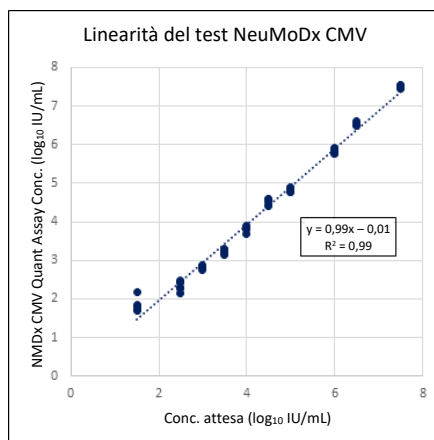
Tabella 3: LLoQ di NeuMoDx CMV Quant Assay, con deviazione e TAE

Conc. target [IU/mL]	Conc. target [\log_{10} IU/mL]	Plasma				
		Conc. media [\log_{10} IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE
50	1,70	1,75	100,0	0,16	0,05	0,37
30	1,48	1,62	99,1	0,24	0,14	0,62
25	1,40	1,56	98,1	0,19	0,17	0,55
20	1,30	1,57	97,2	0,22	0,27	0,72
15	1,18	1,52	91,7	0,21	0,35	0,78

In base ai risultati di questi studi, è stato determinato che il LoD e il LLoQ del NeuMoDx CMV Quant Assay sono entrambi a 20,0 IU/mL [$1.30 \log_{10}$ IU/mL].

Linearità e determinazione del limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

La linearità e il limite superiore di quantificazione (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) del NeuMoDx CMV Quant Assay sono stati stabiliti nel plasma preparando una serie di diluizioni utilizzando il target CMV incapsulato NeuMoDx ed Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) con tracciabilità stabilita secondo il 1° standard internazionale dell'OMS. È stato preparato un pannello di 9 componenti in pool di plasma CMV-negativo per creare un pannello che coprisse un range di concentrazione di $8 - 1,7 \log_{10}$ IU/mL. È stato determinato che l'ULoQ del NeuMoDx CMV Quant Assay era pari a $8,0 \log_{10}$ IU/mL. Le concentrazioni dell'esame CMV riportate dal NeuMoDx System rispetto ai valori attesi sono presentate nella *Figura 3*.


Figura 3: Linearità del NeuMoDx CMV Quant Assay

Linearità tra genotipi

La linearità del NeuMoDx CMV Quant Assay tra i quattro genotipi CMV (gB1, gB2, gB3 and gB4) è stata caratterizzata analizzando cinque concentrazioni diverse di ciascun genotipo di CMV preparato in un pool di plasma CMV-negativo. I livelli dei target CMV testati in questo studio sono dipesi dalla concentrazione del campione di origine, pertanto sono stati diversi tra tutti i genotipi. Lo studio è stato condotto testando 6 replicati di ciascuno dei 4 genotipi a 5 concentrazioni. La linearità tra i quattro genotipi CMV viene presentata nella *Tabella 4* e nella *Figura 4*.

Tabella 4: Linearità del NeuMoDx CMV Quant Assay tra genotipi

Genotipo	Equazione della linearità $y =$ quantificazione del NeuMoDx CMV Assay $x =$ quantificazione attesa	R ²
gB1	$y = 0,960x + 0,103$	0,994
gB2	$y = 0,989x + 0,009$	0,996
gB3	$y = 1,023x + 0,099$	0,967
gB4	$y = 0,968x + 0,004$	0,992

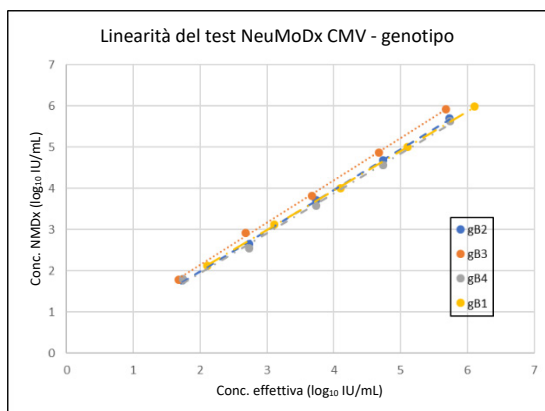


Figura 4: Linearità del NeuMoDx CMV Quant Assay tra genotipi

Specificità analitica – Reattività crociata

La specificità analitica è stata dimostrata sottoponendo a screening 35 organismi che si possono trovare in campioni di sangue/plasma, nonché in specie fitogeneticamente simili al CMV per reattività crociata. Gli organismi sono stati preparati in gruppi di 5 – 6 organismi e analizzati ad alta concentrazione. Gli organismi analizzati sono mostrati nella *Tabella 5*. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con nessuno degli organismi analizzati, confermando la specificità analitica del 100% del NeuMoDx CMV Quant Assay.

Tabella 5: Patogeni utilizzati per dimostrare la specificità analitica

Organismi non target					
Polyomavirus BK	Adenovirus tipo 5	Virus dell'herpes simplex tipo 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Virus di Epstein-Barr	Virus dell'epatite C	Virus dell'herpes simplex tipo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Virus dell'herpes umano tipo 6	Parvovirus B19	Virus varicella-zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Virus dell'herpes umano tipo 7	Virus JC	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Virus dell'herpes umano tipo 8	Papillomavirus umano 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus dell'epatite B	Papillomavirus umano 18	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Specificità analitica – Sostanze interferenti, organismi commensali

Il NeuMoDx CMV Quant Assay è stato valutato per verificare l'interferenza nella presenza di organismi non target tramite gli stessi pool di organismi preparati per testare la reattività crociata elencati sopra nella *Tabella 5*. Il plasma CMV-negativo è stato arricchito con gli organismi raccolti in gruppi di 4-7 e arricchiti anche con un target CMV a una concentrazione di 3 log₁₀ IU/mL. Non sono state osservate interferenze significative nella presenza di questi organismi commensali, come indicato dalla deviazione minima della quantificazione dai campioni di controllo che non contenevano alcun agente interferente.

Specificità analitica – Sostanze interferenti, sostanze endogene ed esogene

Il NeuMoDx CMV Quant Assay è stato valutato in presenza di sostanze interferenti esogene ed endogene tipiche, trovate in campioni clinici di plasma con CMV. Questi includevano livelli insolitamente alti di componenti del sangue, nonché comuni farmaci antivirali, che sono stati classificati nella *Tabella 6*. Ciascuna sostanza è stata aggiunta al plasma umano CMV-negativo sottoposto a screening, arricchito con 3 log₁₀ IU/mL CMV, e i campioni sono stati analizzati per valutare l'interferenza. Inoltre, è stato testato anche il plasma proveniente da stati patologici comunemente associati all'infezione da CMV per valutare la potenziale interferenza. La concentrazione e la deviazione medie di tutte le sostanze testate in confronto ai campioni di controllo arricchiti con lo stesso livello di CMV sono illustrate nella *Tabella 7*. Nessuna delle sostanze esogene ed endogene ha avuto ripercussioni sulla specificità del NeuMoDx CMV Quant Assay.

Tabella 6: Test di interferenza – Agenti esogeni (classificazioni dei farmaci)

Pool	Nome farmaco	Classificazione	Pool	Nome farmaco	Classificazione
Pool 1	Azatioprina	Immunosoppressore	Pool 4	Trimetoprim	Antibiotico
	Ciclosporina	Immunosoppressore		Vancomicina	Antibiotico
	Foscarnet	Antivirale (Herpesviridae)		Tacrolimus	Immunosoppressore
	Ganciclovir	Antivirale (CMV)		Everolimus	Immunosoppressore
	Valganciclovir cloridrato	Antivirale (CMV)		Clavulanato di potassio	Antibiotico
Pool 2	Prednisone	Corticosteroide/ Immunosoppressore	Pool 5	Famotidina	Antagonista dei recettori dell'istamina
	Cidofovir	Antivirale (CMV)		Sulfametossazolo	Antibiotico
	Cefotetan	Antibiotico (ad ampio spettro)		Valaciclovir	Antivirale (Herpesviridae)
	Cefotaxima	Antibiotico (ad ampio spettro)		Letermovir	Antivirale (CMV)
	Fluconazolo	Antifungino		Ticarillina disodica	Antibiotico
Pool 3	Micofenolato mofetile	Immunosoppressore	Leflunomide	Immunosoppressore	
	Micofenolato sodico	Immunosoppressore			
	Piperacillina	Antibiotico			
	Sirolimus/ Rapamicina	Immunosoppressore			
	Tazobactam	Antibiotico modificato			

Tabella 7: Test di interferenza – Agenti esogeni ed endogeni

Endogena	Conc. media	Deviazione
	log ₁₀ IU/mL	log ₁₀ IU/mL
Emoglobina	2,97	0,07
Trigliceridi	3,03	0,13
Bilirubina	3,01	0,11
Albumina	2,88	-0,02
Esogeno (farmaci)	Conc. media	Deviazione
	log ₁₀ IU/mL	log ₁₀ IU/mL
Pool 1: Azatioprina, Ciclosporina, Foscarnet, Ganciclovir, Valganciclovir cloridrato	2,88	-0,02
Pool 2: Prednisone, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxima, Fluconazolo	2,91	0,01
Pool 3: Micofenolato mofetile, Micofenolato sodico, Piperacillina, Sirolimus/Rapamicina, Tazobactam	2,98	0,08
Pool 4: Trimetoprim, Vancomicina, Tacrolimus, Everolimus, Clavulanato di potassio	3,05	0,15
Pool 5: Famotidina, Sulfametossazolo, Letermovir, Valaciclovir, Ticarcillina disodica, Leflunomide	2,87	-0,03
Stato della malattia	Conc. media	Deviazione
	log ₁₀ IU/mL	log ₁₀ IU/mL
Anticorpo anti-nucleo (Antinuclear Antibody, ANA)	2,90	0,00
Lupus eritematoso sistemico (LES)	3,04	0,14
Artrite reumatoide (AR)	2,99	0,09

Precisione intra-laboratorio

La precisione del NeuMoDx CMV Quant Assay è stata determinata testando 3 replicati di un pannello di 4 componenti di campioni di CMV preparati con Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) due volte al giorno, utilizzando due NeuMoDx 288 System e un NeuMoDx 96 System nell'arco di 12 giorni. Sono state caratterizzate le precisioni intra-sessione, intra-giornata e intra-sistema ed è stata determinata la deviazione complessiva standard come $\leq 0,15 \log_{10}$ IU/mL. È stata dimostrata una precisione eccellente in sistemi, giorni o processi, come illustrato nella *Tabella 8*. La precisione fra operatori non è stata caratterizzata, in quanto l'operatore non riveste un ruolo significativo nell'elaborazione dei campioni con l'uso del NeuMoDx System.

Tabella 8: Precisione intra-laboratorio – NeuMoDx CMV Quant Assay su NeuMoDx System

Conc. CMV target [log ₁₀ IU/mL]	Conc. CMV media [log ₁₀ IU/mL]	DS intra- sistema	DS intra- giornata	DS intra- sessione	DS complessiva (intra- laboratorio)
5,7	5,64	0,09	0,09	0,07	0,13
4,7	4,58	0,10	0,10	0,08	0,14
3,7	3,60	0,09	0,09	0,07	0,12
2,7	2,62	0,13	0,13	0,10	0,15

Riproducibilità lotto a lotto

La riproducibilità lotto a lotto del NeuMoDx CMV Quant Assay è stata determinata utilizzando tre lotti diversi di reagenti chiave: NeuMoDx Lysis Buffer 1, NeuMoDx Extraction Plates e NeuMoDx CMV Quant Test Strip. Per valutare le prestazioni è stato usato un pannello di 4 componenti di CMV preparati con Exact CMV Control. L'analisi è stata eseguita utilizzando tre lotti di reagenti su tre sistemi in 6 giorni. È stata analizzata la variazione all'interno dei lotti e fra i lotti e i risultati sono presentati nelle *Tabella 9*. La deviazione complessiva massima è stata di $0,12 \log_{10}$ IU/mL e la DS complessiva massima di $0,39 \log_{10}$ IU/mL. Sono state dimostrate prestazioni equivalenti fra i lotti, poiché la quantificazione di tutti i componenti del pannello rientrava della specifica di tolleranza.

Tabella 9: Riproducibilità lotto a lotto: NeuMoDx CMV Quant Assay

Conc. CMV target [log ₁₀ IU/mL]	Conc. CMV media [log ₁₀ IU/mL]	N (Risultati validi per lotto)	Deviazione	DS fra lotti	DS intra- lotto	DS complessiva
5,7	5,65	36	0,05	0,27	0,15	0,31
4,7	4,63	36	0,07	0,22	0,13	0,26
3,7	3,58	36	0,12	0,34	0,18	0,39
2,7	2,64	36	0,06	0,12	0,14	0,18

Efficacia del controllo

L'SPC1 è incluso nel NeuMoDx CMV Quant Assay per segnalare errori o inibizioni nelle fasi di processo che si ripercuotono sulle prestazioni dell'esame. L'efficacia è stata testata nelle condizioni rappresentative di errori critici della fase di elaborazione che potrebbero verificarsi durante l'elaborazione dei campioni, che *possono non essere* rilevati dai sensori di monitoraggio delle prestazioni del NeuMoDx System. Campioni positivi ($3 \log_{10}$ IU/mL) e campioni negativi sono stati messi alla prova in presenza di un controllo nelle seguenti condizioni: presenza di inibitore, nessuna soluzione di lavaggio fornita e nessun blow-out di lavaggio. Le lacune di elaborazione che hanno prodotto un effetto avverso sulla rilevazione/quantificazione del CMV sono state rispecchiate dalle prestazioni dell'SPC1 target, come da *Tabella 10*. In tutti gli esempi testati è stato dimostrato che: il controllo di elaborazione dei campioni monitorava adeguatamente le lacune di elaborazione e la presenza di inibitori, oppure la lacuna di elaborazione prevista non produceva un effetto avverso significativo sulla rilevazione dell'SPC1 o sulla rilevazione e quantificazione dell'CMV. Perciò l'SPC1 si è dimostrato efficace nel monitoraggio delle prestazioni dell'esame sul NeuMoDx System.

Tabella 10: Efficacia del Controllo di elaborazione dei campioni

Errore della fase di processo testata	Stato di amplificazione del Controllo di elaborazione dei campioni 1	Stato di amplificazione del CMV Target	Risultato dell'esame
Presence of Inhibitor (Presenza di inibitore)	Not Amplified (Non amplificato)	Not Amplified (Non amplificato)	Unresolved (Irrisolto)
No Wash Delivered (Lavaggio non effettuato)	Not Amplified (Non amplificato)	Not Amplified (Non amplificato)	Unresolved (Irrisolto)
No Wash Blowout (Nessun blow-out di lavaggio)	Amplified (Amplificato)	Amplified (Amplificato)	Positive (Positivo) con quantificazione entro $0,3 \log_{10}$ IU/mL di Controllo

Tasso di risultati validi

Per determinare la percentuale di risultati validi, è stata utilizzata un'analisi retrospettiva dei dati ottenuti durante la valutazione delle prestazioni del NeuMoDx CMV Assay sui NeuMoDx System. I risultati dei test sono riportati come Positive (Positivo) o Negative (Negativo); i risultati dei test non validi potranno essere riferiti come Indeterminate (Indeterminato, IND) o Unresolved (Irrisolto, UNR) in base allo stato di amplificazione del target e al controllo di elaborazione dei campioni. Un'indicazione IND in genere è causata da un errore dello strumento che genera un errore nel target e/o nel controllo interno di elaborazione dei campioni per l'amplificazione. Un'indicazione UNR viene attribuita ai campioni, quando sia il target sia il controllo interno di elaborazione dei campioni non riescono a portare a termine l'amplificazione, anche se non sono rilevati errori nello strumento. Nell'analisi retrospettiva sono stati inclusi i risultati del NeuMoDx CMV Quant Assay su 1.100 individui; i risultati comprendevano i dati ottenuti su entrambi i sistemi NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 System. È stato determinato che il tasso di risultati UNR era pari allo 0,91% (10/1100) e quello dei risultati IND era pari allo 0,36% (4/1100); questa determinazione soddisfa i criteri di accettazione dell'analisi. Pertanto, il tasso di risultati validi del NeuMoDx CMV Assay tra i NeuMoDx System è stato in definitiva pari al 98,7% con IC 95% (97,9-99,2).

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata per il NeuMoDx CMV Quant Assay è stato determinato testando tre set di campioni CMV composti da campioni altamente positivi e altamente negativi alternati. In totale, l'operazione ha coinvolto l'analisi di 108 replicati di plasma CMV-negativo e di 108 replicati di plasma CMV arricchito a 6,0 log₁₀ IU/mL. Tutti i 108 i replicati del campione negativo sono stati riportati come negativi, dimostrando che non si è verificata contaminazione crociata durante l'elaborazione del campione sul NeuMoDx System.

Equivalenza delle matrici di campioni

I test sono stati eseguiti per dimostrare l'equivalenza delle matrici di campioni tra il sangue intero raccolto nelle provette di raccolta contenenti acido etilendiamminicotetrate (EDTA) e acido citrico destrorico (ACD) per la preparazione del plasma. Sono stati eseguiti ulteriori test per determinare l'equivalenza tra campioni di plasma fresco e congelato (raccolti nei due tipi di provette). I campioni freschi sono stati conservati a 4°C finché non sono stati arricchiti con tre livelli di CMV e testati per valutare l'equivalenza. Successivamente i campioni sono stati congelati per un minimo di 24 ore a -20 °C. Dopo questo periodo di conservazione in condizioni di congelamento, i campioni sono stati scongelati e nuovamente analizzati. Sono stati confrontati i risultati dei campioni di plasma freschi rispetto a quelli congelati, nonché tra campioni di plasma con EDTA rispetto a quelli di plasma con ACD, per valutare l'equivalenza tramite l'analisi della regressione. I dati hanno dimostrato un'equivalenza eccellente fra campioni di plasma EDTA e ACD e tra i campioni di plasma freschi e congelati con pendenze nell'intervallo 0,02 - 1,0 e una deviazione (intercettazione) estremamente bassa, come da *Tabella 11* sottostante.

Tabella 11: Equivalenza delle matrici di campioni

Requisito parametro	ACD e K2EDTA		Fresco e congelato	
	Fresco	Congelato	ACD	EDTA
Pendenza [0,9-1,1]	1,000	0,982	1,014	1,000
Intercettazione [$<0,5 \log_{10}$ IU/mL]	-0,050	0,018	-0,061	0,020
valore-p > 0,05	0,848	0,644	0,895	0,631

Confronto tra metodi clinici

Le prestazioni quantitative del NeuMoDx CMV Quant Assay sono state valutate rispetto agli esami di confronto approvati da FDA/CE analizzando campioni clinici non diluiti di pazienti infettati da CMV. L'analisi è stata eseguita internamente sul NeuMoDx tramite uno studio in singolo cieco, utilizzando i campioni clinici residui de-identificati ottenuti da quattro laboratori di riferimento esterni. Sono stati trattati complessivamente 284 campioni di plasma utilizzando il NeuMoDx CMV Quant Assay in modalità (singolo) cieco su più NeuMoDx Molecular System.

Gli errori di elaborazione e sistema ottenuti sui NeuMoDx Molecular System sono stati minimi e i criteri sono stati soddisfatti. In totale sono stati ottenuti 3 risultati indeterminati (IND) per i campioni, pertanto il tasso IND iniziale è stato dell'1% con un IC del 95% (0,27 - 3,32%). Il volume non era sufficiente per rielaborare questi 3 campioni secondo il normale flusso di lavoro. Inizialmente sono stati ottenuti 10 risultati irrisolti (Unresolved, UNR) ma seguendo la procedura raccomandata dal CMV Quant Assay per una diluizione 1:10 in Basematrix per i risultati UNR, sono stati ottenuti risultati validi dopo aver ripetuto l'analisi di tutti e 10 i campioni UNR diluiti in modo appropriato. Pertanto, il tasso di errore di elaborazione totale è stato dell'1,06% con un IC del 95% (0,27% - 3,3%) dovuti ai risultati indeterminati che non hanno potuto essere ripetuti a causa del volume insufficiente.

Ci sono stati 4 campioni che hanno generato un flag Quantitation Error (Errore di quantificazione) e 3 di questi 4 hanno potuto essere ripetuti secondo la procedura raccomandata utilizzando una diluizione 1:10 del campione in Basematrix per ottenere un risultato quantitativo valido. Dei 283 risultati validi ottenuti nello studio, 129 campioni sono stati refertati come Positive (Positivo) dal NeuMoDx CMV Assay con i valori di concentrazione corrispondenti assegnati mediante test di riferimento. Per sei di questi campioni, cinque sono stati riportati al di sotto del LLoQ e uno è stato riportato al di sopra dell'ULOQ dal test di riferimento; pertanto, sono stati assegnati valori di concentrazione corrispondenti sia dal NeuMoDx CMV Quant Assay che dai test CE-IVD di riferimento a un totale di 123 campioni, che sono stati utilizzati per l'analisi di correlazione quantitativa. Per effettuare la correlazione tra i valori di concentrazione del NeuMoDx CMV Assay e i valori refertati dai test di riferimento sono state utilizzate le analisi della regressione di Deming e di Passing-Bablok.

Sono stati generati i grafici di equivalenza per rappresentare la correlazione tra le concentrazioni di NeuMoDx CMV Quant Assay e i valori di concentrazione dei test di riferimento per tutti i campioni testati utilizzando l'analisi della regressione di Deming e Passing-Bablok, come illustrato nella *Figura 5*.

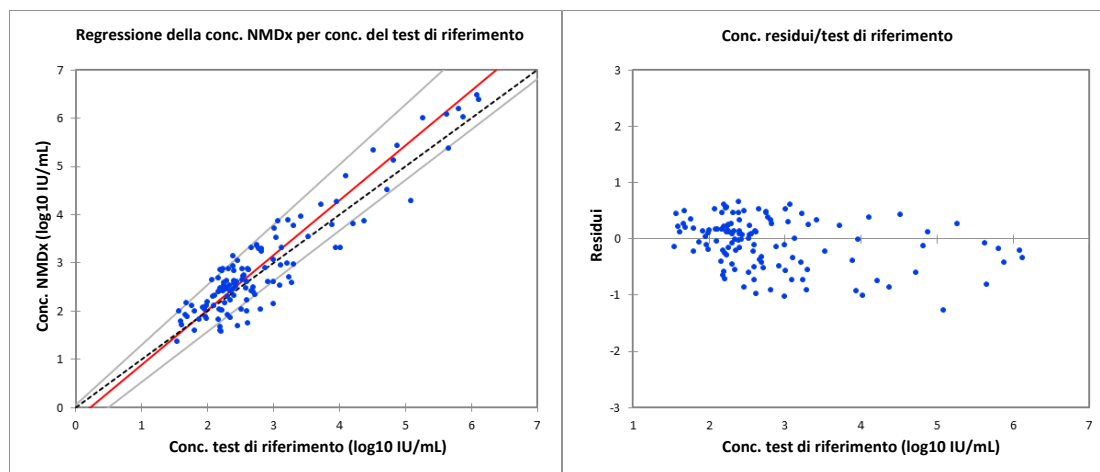


Figura 5: Grafici Equivalenza (*a sinistra*) e Residui (*a destra*): analisi cumulativa (su entrambi i NeuMoDx System) dei risultati con NeuMoDx CMV Quant Assay confrontati con i risultati del test di riferimento per TUTTI i campioni in base all'analisi della regressione di Passing-Bablok.

La qualità del modello di regressione di Deming è illustrata da un coefficiente di pendenza di 1,1, con un IC del 95% (1,0; 1,2) e da un'intercetta (deviazione) di -0,18 con un IC del 95% (-0,39; 0,03), dimostrando che i risultati di concentrazione ottenuti fra il NeuMoDx CMV Quant Assay e i test di riferimento sono altamente correlati e presentano una deviazione accettabile. La qualità del modello lineare di Passing-Bablok è illustrata da un coefficiente di pendenza di 1,1 con un IC del 95% (1,0; 1,2) e un'intercetta (deviazione) di -0,24 con un IC del 95% (-0,51; 0,06), dimostrando che i risultati di concentrazione ottenuti tra il NeuMoDx CMV Quant Assay e i test di riferimento sono altamente correlati e presentano una deviazione accettabile, come mostrato nella *Tabella 12*.

Tabella 12: Riepilogo dell'analisi di regressione lineare con metodo di Deming e di Passing-Bablok

Analisi di Deming		Analisi di Passing-Bablok	
Intercetta	Coefficiente di pendenza	Intercetta	Coefficiente di pendenza
-0,18 IC 95% (-0,39/0,03)	1,1 IC 95% (1,0/1,2)	-0,24 IC 95% (-0,51/0,06)	1,1 IC 95% (1,0/1,2)

BIBLIOGRAFIA

- Centers for Disease Control (CDC). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. (2018). Retrieved from <https://www.cdc.gov/cm/clinical/features.html>
- Kraft, C. S., Armstrong, W. S., & Caliendo, A. M. (2012). Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clinical infectious diseases*, 54(12), 1793-1797.
- A Ross, S., Novak, Z., Pati, S., & B Boppana, S. (2011). Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 11(5), 466-474.
- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARCHI COMMERCIALI










NeuMoDx™ è un marchio commerciale di NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry™ è un marchio commerciale di NeuMoDx Molecular, Inc.

TaqMan® è un marchio commerciale registrato di Roche Molecular Systems, Inc.

Tutti gli altri nomi di prodotto, i marchi commerciali e i marchi commerciali registrati che possono apparire in questo documento sono di proprietà dei rispettivi proprietari.

SIMBOLI

SIMBOLO	SIGNIFICATO
R only	Solo su prescrizione medica
	Produttore
IVD	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
EC REP	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
REF	Numero di catalogo
LOT	Codice lotto
	Data di scadenza
	Limite di temperatura
	Limiti di umidità
	Non riutilizzare
	Contenuto sufficiente per <n> test
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Rischio biologico
CE	Marchio CE

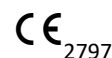


NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, USA

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



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



Assistenza tecnica/Rapporti di vigilanza: support@qiagen.com

Brevetto: www.neumodx.com/patents