

REF 201300 NeuMoDx™ HBV Quant Test Strip

R only

VORSICHT: Nur für den US-Export

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

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

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

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

VERWENDUNGSZWECK

Der NeuMoDx HBV Quant Assay ist ein automatisierter *In-vitro*-Nukleinsäureamplifikationstest für die Quantifizierung der DNA des Hepatitis-B-Virus (HBV) in Humanplasma- und -serumproben zum Nachweis der HBV-Genotypen A bis H bei HBV-infizierten Personen. Der auf dem NeuMoDx 288 Molecular System und dem NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System(s)) implementierte NeuMoDx HBV Quant Assay umfasst eine automatisierte DNA-Extraktion zur Isolation der Zielnukleinsäure aus der Probe und eine Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR), die auf die hochkonservierten Sequenzen des Hepatitis-B-Virusgenoms abzielt.

Der NeuMoDx HBV Quant Assay ist für die Verwendung als Hilfsmittel bei der Versorgung von Patienten mit HBV-Infektionen vorgesehen. Die Interpretation der Ergebnisse des NeuMoDx HBV Quant Assay muss im Zusammenhang mit allen relevanten klinischen und Laborergebnissen erfolgen. Der NeuMoDx HBV Quant Assay ist nicht als Screeningtest für Blut oder Blutprodukte oder als Diagnosetool zur Diagnose des klinischen Status einer HBV-Infektion vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Zur Plasmagewinnung kann humanes Vollblut verwendet werden, das in sterilen Blutentnahmeröhrchen mit entweder Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA,) oder ACD-Stabilisator (Acid Citrate Dextrose, ACD) als Antikoagulans oder in Plasmapräparationsröhrchen (Plasma Preparation Tubes, PPT) entnommen wurde. Serum sollte in Serumentnahmeröhrchen oder -trennröhrchen (Serum Separation Tubes, SST) entnommen werden. Zur Vorbereitung des Tests wird das Plasma oder Serum in einem sekundären Probenröhrchen oder das fraktionierte Blut in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen primären Probenröhrchen mithilfe eines speziellen Probenröhrchenträgers in das NeuMoDx System geladen. Für jede Probe wird ein Aliquot der Plasma- oder Serumprobe mit dem NeuMoDx Lysis Buffer 1 vermischt, und das NeuMoDx System führt automatisch alle Schritte durch, die erforderlich sind, um die Zielnukleinsäure zu extrahieren, die isolierte DNA für die Echtzeit-PCR-Amplifikation vorzubereiten und die Amplifikationsprodukte (Abschnitte in der hochkonservierten Zielregion des HBV-Genoms, die für das *Protein X* und das *preC*-Protein codiert), falls vorhanden, zu amplifizieren und nachzuweisen. Der NeuMoDx HBV Quant Assay umfasst eine DNA-Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1), mit der überwacht wird, ob potenziell inhibitorische Substanzen vorhanden sind oder während der Extraktions- und Amplifikationsprozesse Fehler am NeuMoDx System oder bei den Reagenzien auftreten.

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist der Erreger der Hepatitis-B-Leberinfektion und ein globales Gesundheitsproblem. Hepatitis B kann entweder eine akute Hepatitis hervorrufen oder zu einer chronischen Erkrankung voranschreiten, die schließlich zu Zirrhose oder Leberkrebs führt. Das Risiko der Entwicklung einer chronischen Erkrankung ist primär altersbedingt. Wird das Virus bei der Geburt übertragen, liegt die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine chronische Erkrankung entwickelt, bei > 90 %; bei einer Infektion im Erwachsenenalter liegt diese Wahrscheinlichkeit bei nur 2–6 %.¹ HBV wird über direkten Blutkontakt mit einer infizierten Person, auf sexuellem Wege, durch die gemeinsame Verwendung von Nadeln mit einer infizierten Person beim intravenösen Drogenkonsum oder bei der Geburt vertikal von der Mutter auf das Kind übertragen. In den Vereinigten Staaten leben ca. 850.000 Menschen mit einer HBV-Infektion, wobei die Mehrzahl der Neuinfektion auf sexuelle Übertragung oder die Injektion von Drogen zurückzuführen ist.² In Afrika und dem Westpazifik sind ganze 5 % der Bevölkerung bekanntermaßen infiziert. 2015 haben HBV-Infektionen weltweit 885.000 Todesopfer gefordert, zumeist durch Zirrhose oder Leberzellkarzinom.³ Es gibt einen Impfstoff, der mit einer Wirksamkeit von 95 % HBV-Infektionen verhindern kann, weshalb mit jedem Jahr weniger Fälle diagnostiziert werden.⁴

Der aktuelle Pflegestandard zur Behandlung einer HBV-Infektion ist die antivirale Therapie, welche eine durchgehende Überwachung erfordert, um zu gewährleisten, dass die Behandlung wie gewünscht voranschreitet. Die Therapieüberwachung mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay kann Ärzten mit den Informationen versorgen, die sie für die Versorgung von Patienten mit HBV-Infektion benötigen.

PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Der NeuMoDx HBV Quant Assay kombiniert die automatisierte DNA-Extraktion, die Amplifikation und den Nachweis mittels Echtzeit-PCR. Vollblutproben werden für die Gewinnung von Plasma in EDTA-, ACD- oder PPT-Röhrchen und/oder für die Gewinnung von Serum in SST-Röhrchen entnommen. Die primäre (fraktionierte) Blutprobe oder ein Plasma-/Serumaliquot in einem kompatiblen sekundären Probenröhrchen wird mit Barcode versehen und in das NeuMoDx System geladen. Das NeuMoDx System aspiriert automatisch ein Aliquot des Plasmas/Serums und mischt es mit NeuMoDx Lysis Buffer 1 und den Agenzien in der NeuMoDx Extraction Plate, um die Verarbeitung zu beginnen. Das NeuMoDx System automatisiert und integriert die DNA-Extraktion und -Konzentration, die Reagenz Vorbereitung und die Nukleinsäureamplifikation/den Nachweis der Zielsequenzen mittels Echtzeit-PCR. Die enthaltene Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1) unterstützt die Überwachung auf das Vorhandensein von inhibitorischen Stoffen und System-, Prozess- oder Reagenzfehlern. Es ist kein Bedieneingriff erforderlich, sobald die Probe in das NeuMoDx System geladen ist.

Das NeuMoDx System verwendet eine Kombination aus Wärme, lytischem Enzym und Extraktionsreagenzien, um automatisch Lyse, DNA-Extraktion und die Entfernung von Inhibitoren durchzuführen. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden durch paramagnetische Partikel aufgenommen. Die Partikel werden zusammen mit den gebundenen Nukleinsäuren in die NeuMoDx Cartridge geladen, wo die ungebundenen Elemente mit NeuMoDx Wash Reagent ausgewaschen werden. Die gebundene DNA wird dann mit NeuMoDx Release Reagent eluiert. Das NeuMoDx System verwendet die eluierte DNA zur Rehydrierung proprietärer NeuDry™ Amplifikationsreagenzien, die alle für die Amplifikation der HBV- und SPC1-Zielsequenzen erforderlichen Elemente enthalten. Auf diese Weise können Amplifikation und Nachweis von Ziel- und Kontroll-DNA-Sequenzen gleichzeitig erfolgen. Nach der Rekonstitution der PCR-Reagenzien dispensiert das NeuMoDx System die vorbereitete PCR-fertige Mischung in eine PCR-Kammer (pro Probe) der NeuMoDx Cartridge. Amplifikation und Nachweis der Kontroll- und Ziel-DNA-Sequenzen (falls vorhanden) erfolgen in der PCR-Kammer. Die NeuMoDx Cartridge ist dafür konzipiert, das Amplifikat nach der PCR zu enthalten, wodurch das Kontaminationsrisiko nach Amplifikation nahezu eliminiert wird.

Die amplifizierten Ziele werden in Echtzeit anhand von Hydrolyse-Sonden-Chemie (allgemein als TaqMan® Chemie bezeichnet) mit fluorogenen Oligonukleotidsondenmoleküle nachgewiesen, die spezifisch für die Amplifikate ihrer jeweiligen Ziele sind. TaqMan Sonden bestehen aus einem Fluorophor, das kovalent am 5'-Ende der Oligonukleotidsonde gebunden ist, und einem Quencher am 3'-Ende. Bei intakter Sonde führt die Nähe des Fluorophors zum Quencher dazu, dass das Quencher-Molekül die Fluoreszenz des Fluorophors durch Förster-Resonanzenergietransfer (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) unterdrückt.

TaqMan Sonden sind so entwickelt, dass sie sich an einen DNA-Bereich, der durch einen spezifischen Satz von Primern amplifiziert wurde, anlagern. Während die Taq-DNA-Polymerase den Primer verlängert und den neuen Strang synthetisiert, sorgt die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase für den Abbau der Sonde, die sich an das Template angelagert hat. Der Abbau der Sonde setzt das Fluorophor frei und der Abstand zum Quencher wird größer. Dadurch wird der Löscheffekt durch FRET aufgehoben und das Fluorophor kann nachgewiesen werden. Die Intensität des resultierenden Fluoreszenzsignals, das im quantitativen PCR-Thermocycler des NeuMoDx System nachgewiesen wird, ist direkt proportional zum freigesetzten Fluorophor und kann zur Menge der vorhandenen Zielsequenz in Beziehung gesetzt werden.

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

REAGENZIEN/VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bereitgestelltes Material

REF	Inhalt	Einheiten pro Packung	Tests pro Einheit	Tests pro Packung
201300	NeuMoDx HBV Quant Test Strip <i>PCR-Trockenreagenzien, die HBV- und SPC1-spezifische TaqMan Sonden und Primer enthalten</i>	6	16	96

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

REF	Inhalt
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Getrocknete paramagnetische Partikel und Probenprozesskontrollen sowie getrocknetes lytisches Enzym</i>
800100 oder 800102	NeuMoDx HBV Calibrators <i>Sets aus HBV-Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration für den Einmalgebrauch, zur Validierung der Kalibrationskurve</i>
900101 oder 900102	NeuMoDx HBV External Controls <i>Sets aus Positiv- und Negativkontrollen für den Einmalgebrauch</i>
400400	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hamilton® CO-RE / CO-RE II Spitzen (300 µl) mit Filtern
235905	Hamilton CO-RE/CO-RE II Spitzen (1000 µl) mit Filtern

Benötigte Instrumente

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] oder **NeuMoDx 96 Molecular System** [REF 500200]



WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Der NeuMoDx HBV Quant Test Strip ist ausschließlich zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik mit den NeuMoDx Molecular Systems bestimmt.
- Die Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn das Sicherheitssiegel aufgebrochen oder die Verpackung bei Ankunft beschädigt ist.
- Verbrauchsmaterialien oder Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbeutel bei der Ankunft geöffnet oder beschädigt ist.
- Bevor Testergebnisse für klinische Proben generiert werden können, muss eine gültige Testkalibrierung (generiert durch Verarbeitung von Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration aus den NeuMoDx HBV Calibrators) verfügbar sein.
- NeuMoDx HBV External Controls müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden, solange Tests mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay durchgeführt werden.
- Das Mindestprobenvolumen ist abhängig von der Röhrchengröße, dem Probenträger und dem verarbeiteten Probenvolumen wie nachstehend definiert. Ein Volumen unter dem angegebenen Mindestvolumen kann zu dem Fehler „Quantity Not Sufficient“ (Menge nicht ausreichend) führen.
- Die Verwendung von Proben, die bei nicht geeigneten Temperaturen oder über die angegebenen Lagerzeiten hinaus aufbewahrt wurden, kann zu ungültigen oder fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Eine Kontaminierung von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien mit Mikroorganismen und Desoxyribonuklease (DNase) ist stets zu vermeiden. Bei Verwendung von Sekundärröhrchen wird die Verwendung steriler, DNase-freier Einwegtransferpipetten empfohlen. Für jede Probe eine neue Pipette verwenden.
- Zur Vermeidung von Kontamination NeuMoDx Cartridge nach der Amplifikation weder handhaben noch beschädigen. NeuMoDx Cartridges unter keinen Umständen aus dem Behälter für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 288 Molecular System) oder dem Eimer für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 96 Molecular System) entnehmen. Die NeuMoDx Cartridge ist dafür konzipiert, Kontamination zu verhindern.
- Wenn das Labor auch PCR-Tests mit offenen Röhrchen ausführt, muss unbedingt gewährleistet werden, dass der NeuMoDx HBV Quant Test Strip, die für die Tests zusätzlich benötigten Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, persönliche Schutzausrüstung wie Handschuhe und Laborkittel sowie das NeuMoDx System nicht kontaminiert werden.
- Bei der Handhabung von NeuMoDx Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sollten puderfreie Nitrilhandschuhe getragen werden. Es ist darauf zu achten, dass die Oberseite der NeuMoDx Cartridge, die Oberfläche der Versiegelungsfolie eines NeuMoDx HBV Quant Test Strip und einer NeuMoDx Extraction Plate oder die Oberseiten von Behältern mit NeuMoDx Lysis Buffer 1 nicht berührt werden; die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien dürfen ausschließlich an den Seitenflächen angefasst werden.
- Für jedes Reagenz werden, sofern erforderlich, Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) bereitgestellt unter www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Nach der Durchführung des Tests Hände gründlich waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen Proben oder Reagenzien verarbeitet werden, nicht rauchen, trinken oder essen.
- Proben sind immer wie infektiöses Material und entsprechend den sicheren Laborverfahren (beschrieben in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁵ und im CLSI-Dokument M29-A4⁶) zu behandeln.
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfall entsprechend den nationalen, bundesstaatlichen, regionalen, kommunalen und lokalen Vorschriften entsorgen.
- Nicht zur Wiederverwendung.



LAGERUNG, HANDHABUNG UND STABILITÄT VON PRODUKTEN

- Die NeuMoDx HBV Quant Test Strips sind in der Primärverpackung bei Lagerung bei 4–28 °C bis zum auf dem Produktetikett angegebenen Ablaufdatum stabil.
- Die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwenden.
- Testprodukte nicht verwenden, wenn die Primär- oder Sekundärverpackung sichtbar beschädigt ist.
- Testprodukte, die bereits auf ein anderes NeuMoDx System geladen wurden, nicht erneut laden.
- Ein in das NeuMoDx System geladener NeuMoDx HBV Quant Test Strip kann dort bis zu 62 Tage belassen werden. Die verbleibende Haltbarkeitsdauer der im Gerät befindlichen Teststreifen wird durch die Software verfolgt und dem Benutzer in Echtzeit mitgeteilt. Das System fordert zur Entfernung von Teststreifen auf, die schon über den zulässigen Zeitraum hinaus in Verwendung sind.

PROBENNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

1. Alle Proben, Kalibratoren und Kontrollen so handhaben, als seien sie in der Lage, Infektionserreger zu übertragen.
2. Vollblut oder andere Proben, die in Primärrohrchen aufbewahrt werden, nicht einfrieren.
3. Zur Gewinnung von Plasmaproben sollte Vollblut in sterilen Röhrchen entnommen werden, die EDTA oder ACD als Antikoagulans enthalten. Zur Vorbereitung und Lagerung die Anweisungen des Herstellers der Probenentnahmeröhrchen befolgen.
4. Zur Gewinnung von Serumproben sollte Vollblut in SST-Röhrchen entnommen werden. Zur Vorbereitung und Lagerung die Anweisungen des Herstellers der Probenentnahmeröhrchen befolgen.
5. Die Proben können entweder im primären Entnahmeröhrchen oder in sekundären Probenröhrchen getestet werden. Empfehlungen für Tests im Primärrohrchen:
 - a. Plasmaproben: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD Nr. 368589) oder BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD Nr. 362799).
 - b. Serumproben: BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD Nr. 367820) oder BD Vacutainer SST™ Tube (BD Nr. 367988).
6. Die vorbereiteten Proben können bis zu 8 Stunden (Plasma) oder 24 Stunden (Serum) vor Beginn der Verarbeitung im NeuMoDx System aufbewahrt werden. Falls zusätzliche Lagerungszeit benötigt wird, empfiehlt es sich, die Proben in Form von Sekundär aliquoten entweder gekühlt zu lagern oder einzufrieren.
7. Die vorbereiteten Proben sollten vor den Tests bei 2–8 °C nicht länger als 7 Tage und bei Raumtemperatur maximal 8 Stunden (Plasma) oder 24 Stunden (Serum) lang gelagert werden.
8. Die vorbereiteten Proben können vor der Verarbeitung bei ≤ –20 °C bis zu 4 Wochen (Serum) oder 6 Monate (Plasma) lang aufbewahrt werden; gefrorene Proben sollten vor der Verwendung nicht mehr als 2 Einfrier-/Auftauzyklen (Plasma) oder 4 Einfrier-/Auftauzyklen (Serum) unterzogen werden.
 - a. Wenn die Proben gefroren sind, diese bei Raumtemperatur (15-30 °C) vollständig auftauen lassen und dann vortexen, um eine gleichmäßige Verteilung in der Probe zu erhalten.
 - b. Nach dem Auftauen gefrorener Proben sollten diese innerhalb von 24 Stunden getestet werden.
 - c. Ein Einfrieren von Plasma/Serum in den primären Entnahmeröhrchen wird nicht empfohlen.
9. Wenn die Proben verschickt werden, sind sie in Übereinstimmung mit den geltenden Vorschriften auf Landes- und/oder internationaler Ebene zu verpacken und beschriften.
10. Proben eindeutig beschriften und darauf hinweisen, dass die Proben für HBV-Tests bestimmt sind.
11. Mit dem Abschnitt *Testvorbereitung* fortfahren.

Der vollständige Prozess zur Implementierung des NeuMoDx HBV Quant Assay ist nachstehend in *Abbildung 1* zusammengefasst.

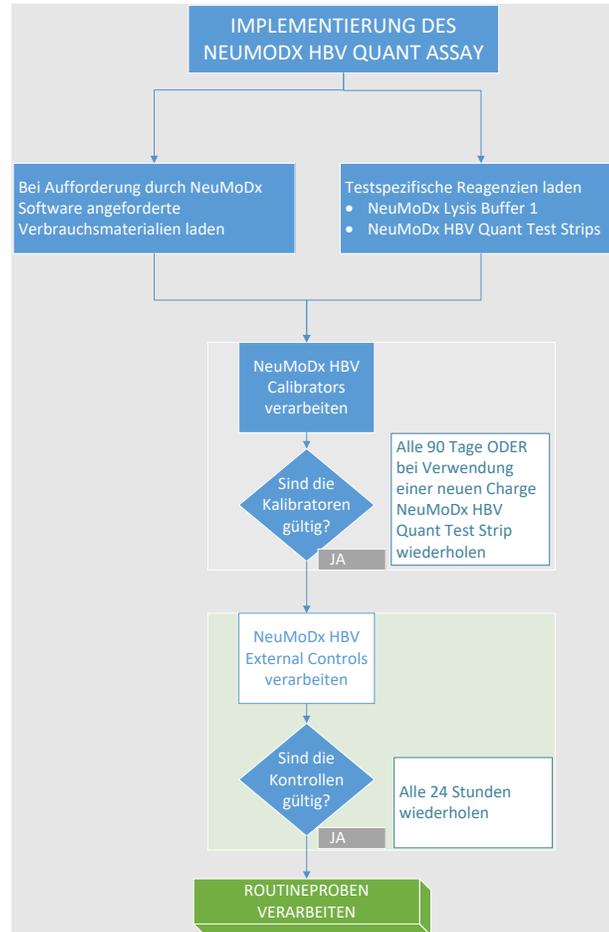


Abbildung 1: Workflow zur Implementierung des NeuMoDx HBV Quant Assay

GEBRAUCHSANWEISUNG

Testvorbereitung

Der NeuMoDx HBV Quant Assay kann direkt mit Material aus den primären Blutentnahmeröhrchen oder mit Probenaliquoten in Sekundäröhrchen durchgeführt werden. Für die Probenverarbeitung kann einer von zwei Workflows gewählt werden – Workflow mit 550 µl Probenvolumen oder Workflow mit 200 µl Probenvolumen. Proben-Barcodeetikett auf einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenöhrchen anbringen.

1. Proben-Barcodeetikett auf einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenöhrchen anbringen. Das primäre Blutentnahmeröhrchen kann beschriftet und direkt in einen 32-Röhrchen-Probenöhrchenträger eingesetzt werden, gefolgt von einer Zentrifugation gemäß den Anweisungen des Herstellers. Alternativ kann ein Aliquot des Plasmas/Serums für die Verarbeitung im NeuMoDx System in ein Sekundäröhrchen überführt werden.
2. Wenn die Probe im primären Entnahmeröhrchen getestet wird, das mit Barcode versehene Röhrchen in den Probenöhrchenträger stellen und vor dem Einsetzen in das NeuMoDx System sicherstellen, dass der Deckel entfernt wurde. Die Mindestvolumen **oberhalb** der Gel-/Pufferschicht sind nachstehend definiert und werden eingehalten, sofern die Proben gemäß den Anweisungen des Herstellers entnommen und verarbeitet werden. Für Proben, die nicht ordnungsgemäß entnommen wurden, kann die Leistung nicht garantiert werden.

Röhrchentyp	Erforderliches Mindestprobenvolumen	
	550- μ l-Workflow	200- μ l-Workflow
SST – 3,5 ml	1550 μ l	1200 μ l
PPT/SST – 5,0 ml	1800 μ l	1450 μ l
PPT/SST – 8,5 ml	2500 μ l	2200 μ l
K ₂ -EDTA/Serum – 4,0 ml	1050 μ l	700 μ l
K ₂ -EDTA/Serum – 6,0 ml	1250 μ l	900 μ l
K ₂ -EDTA/Serum – 10,0 ml	1600 μ l	1250 μ l

3. Bei Verwendung eines Sekundärrohrcchens ein Aliquot des Plasmas/Serums in ein mit dem NeuMoDx System kompatibles, mit Barcode versehenes Probenrohrcchen überführen. Dabei die unten angegebenen Volumene beachten:

Probenrohrcchenträger	Rohrcchengröße	Erforderliches Mindestprobenvolumen	
		550- μ l-Workflow	200- μ l-Workflow
32-Tube Specimen Tube Carrier (Probenrohrcchenträger für 24 Röhrchen)	11–14 mm Durchmesser und 60–120 mm Höhe	700 μ l	400 μ l
24-Tube Specimen Tube Carrier (Probenrohrcchenträger für 24 Röhrchen)	14,5-18 mm Durchmesser und 60–120 mm Höhe	1100 μ l	800 μ l
Low Volume Specimen Tube Carrier (Probenrohrcchenträger für geringes Volumen)	1,5-ml-Mikrozentrifugenrohrcchen mit Konusboden	650 μ l	300 μ l

Betrieb der NeuMoDx Systems

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

- Den Testauftrag entsprechend dem gewünschten Workflow zur Probenverarbeitung (nach Volumen) und Probenrohrcchentyp in das NeuMoDx System laden.
 - Ein Probenvolumen von 550 μ l wird durch Angabe des Probentyps als „Plasma“ oder „Serum“ getestet.
 - Ein Probenvolumen von 200 μ l wird durch Angabe des Probentyps als „Plasma2“ oder „Serum2“ getestet.
 - Wenn im Testauftrag keine Definition vorliegt, wird standardmäßig der Probentyp **Plasma** in einem **Secondary Tube** (Sekundärrohrcchen) verwendet.
- Einen oder mehrere NeuMoDx System Test Strip Carrier mit NeuMoDx HBV Quant Test Strip(s) befüllen und den/die Teststreifenräger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
- Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software die erforderlichen Verbrauchsmaterialien in die Verbrauchsmaterialräger des NeuMoDx System geben und den/die Träger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
- Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software das NeuMoDx Wash Reagent oder NeuMoDx Release Reagent ersetzen, den Priming-Abfall, den Behälter für biogefährlichen Abfall (nur NeuMoDx 288 Molecular System), den Spitzenabfallbehälter (nur NeuMoDx 96 Molecular System) oder den Eimer für biogefährlichen Abfall (nur NeuMoDx 96 Molecular System) leeren.
- Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software NeuMoDx HBV Calibrators und/oder NeuMoDx HBV External Controls verarbeiten. Weitere Informationen hinsichtlich der Kalibratoren und Kontrollen sind dem Abschnitt *Ergebnisverarbeitung* zu entnehmen.
- Das/die Proben-/Kalibrator-/Kontrollrohrcchen in einen Probenrohrcchenträger laden und darauf achten, dass die Deckel von allen Röhrchen entfernt wurden.
- Den/die Probenrohrcchenträger auf das Autolader-Regal setzen und über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden. Dadurch wird die Verarbeitung der für die identifizierten Tests geladenen Proben eingeleitet, sofern im System ein gültiger Testauftrag vorliegt.

ANWENDUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

1. Der NeuMoDx HBV Quant Test Strip kann ausschließlich auf NeuMoDx Systems verwendet werden.
2. Die Leistung des NeuMoDx HBV Quant Test Strip wurde für Plasmaproben, die mit EDTA/ACD als Antikoagulans vorbereitet wurden, oder für Serumproben, die in Serumentrennröhrchen vorbereitet wurden, ermittelt. Die Verwendung des NeuMoDx HBV Quant Test Strip mit Proben anderer Herkunft wurde nicht bewertet und die Leistungsmerkmale sind für andere Probentypen unbekannt.
3. Die Leistung des NeuMoDx HBV Quant Test Strip wurde für Tests im Primärröhrchen bei Verwendung von BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tubes, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tubes, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tubes und BD Vacutainer SST Tubes ermittelt.
4. Bei Anwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen wurden eine kleine Erhöhung der Nachweisgrenze und eine niedrigere Quantifizierungsgrenze für den NeuMoDx HBV Quant Assay beobachtet.
5. Der NeuMoDx HBV Quant Assay wird ausschließlich zu quantitativen Überwachungszwecken eingesetzt. Er ist nicht für den qualitativen Nachweis bestimmt.
6. Der NeuMoDx HBV Quant Assay darf nicht für Proben von heparinisierten Patienten verwendet werden.
7. Da der HBV-Nachweis von der Anzahl der in der Probe vorhandenen Ziel-DNA-Partikel abhängig ist, sind ordnungsgemäße Probennahme, Handhabung und Lagerung für zuverlässige Ergebnisse erforderlich.
8. Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software müssen zunächst NeuMoDx HBV Calibrators und NeuMoDx HBV External Controls entsprechend den Empfehlungen in der Packungsbeilage verarbeitet werden, bevor mit der routinemäßigen Verarbeitung klinischer Proben begonnen werden kann.
9. Eine unsachgemäße Probennahme, Handhabung, Lagerung, technische Fehler oder eine Verwechslung von Probenröhrchen könnte zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zusätzlich können negative Ergebnisse erhalten werden, wenn die Anzahl von Viruspartikeln in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des NeuMoDx HBV Quant Assay liegt.
10. Das NeuMoDx System darf ausschließlich von Personal bedient werden, das in der Anwendung des NeuMoDx System geschult ist.
11. Wenn weder das HBV-Ziel noch das SPC1-Ziel amplifiziert werden, wird ein ungültiges Ergebnis (Indeterminate (Unbestimmt), No Result (Kein Ergebnis) oder Unresolved (Offen)) ausgegeben und der Test sollte wiederholt werden.
12. Wenn das Ergebnis des NeuMoDx HBV Quant Assay Positive (Positiv) ist, der Quantifizierungswert jedoch außerhalb der Quantifizierungsgrenzen liegt, gibt das NeuMoDx System an, ob das nachgewiesene HBV *unterhalb der* unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) oder *oberhalb der* oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) lag.
13. Sollte das nachgewiesene HBV *unterhalb der* LLoQ liegen, kann der Assay (falls gewünscht) mit einem anderen Aliquot der Probe wiederholt werden.
14. Sollte das nachgewiesene HBV oberhalb der ULoQ liegen, kann der NeuMoDx HBV Quant Assay mit einem verdünnten Aliquot der Originalprobe wiederholt werden. Empfohlen wird eine Verdünnung von 1:1000 in HBV-negativem Plasma oder Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Die Konzentration der Originalprobe lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Konzentration der Originalprobe} = \log_{10} (\text{Verdünnungsfaktor}) + \text{gemeldete Konzentration der verdünnten Probe}$$
15. Das gelegentliche Vorhandensein von PCR-Inhibitoren im Plasma kann zu einem Systemquantifizierungsfehler führen. Sollte ein solcher auftreten, empfiehlt es sich, den Test mit der gleichen Probe bei einer Verdünnung von 1:10 oder 1:100 in Basematrix zu wiederholen.
16. Ein positives Ergebnis zeigt nicht unbedingt das Vorhandensein lebensfähiger Organismen an. Allerdings deutet ein positives Ergebnis auf das Vorhandensein von Hepatitis-B-Virus-DNA hin.
17. Deletionen oder Mutationen in den konservierten Regionen, auf die der NeuMoDx HBV Quant Assay abzielt, können den Nachweis beeinträchtigen oder zu einem fehlerhaften Ergebnis bei Verwendung des NeuMoDx HBV Quant Test Strip führen.
18. Die Ergebnisse des NeuMoDx HBV Quant Assay sollten zusätzlich zu klinischen Beobachtungen und sonstigen Informationen, die dem Arzt zur Verfügung stehen, herangezogen werden. Der Test ist nicht zur Diagnose einer Infektion bestimmt.
19. Um die Kontamination von Proben zu vermeiden, werden gute Laborpraktiken, einschließlich des Wechselns der Handschuhe bei Handhabung verschiedener Patientenproben, empfohlen.

ERGEBNISVERARBEITUNG

Die verfügbaren Ergebnisse können unter der Registerkarte „Results“ (Ergebnisse) im Fenster „Results“ (Ergebnisse) auf dem Touchscreen des NeuMoDx System angezeigt oder ausgedruckt werden. Die Ergebnisse des NeuMoDx HBV Quant Assay werden unter Anwendung des Entscheidungsalgorithmus und der Verarbeitungsparameter, die in der NeuMoDx HBV Quant Assay-Definitionsdatei (HBV-ADF) spezifiziert sind, automatisch durch die NeuMoDx System Software generiert. Abhängig vom Amplifikationsstatus von Zielsequenz und Probenprozesskontrolle kann das Ergebnis als Negative (Negativ), Positive (Positiv) mit Angabe der HBV-Konzentration, Positive (Positiv) oberhalb der oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), Positive (Positiv) unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), Indeterminate (IND) (Unbestimmt), Unresolved (UNR) (Offen) oder No Result (NR) (Kein Ergebnis) gemeldet werden. Die Ergebnisse werden auf Grundlage des ADF-Entscheidungsalgorithmus angegeben, wie nachstehend in *Tabelle 1* zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung des Entscheidungsalgorithmus des HBV Quant Assay

ERGEBNIS	HBV-Ziel	Probenprozesskontrolle (SPC1)	Ergebnisinterpretation
Positive (Positiv) mit Angabe der Konzentration	Amplified (Amplifiziert) $0,9 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (550- μl -Workflow) $1,4 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (200- μl -Workflow)	Amplified (Amplifiziert) oder Not Amplified (Nicht amplifiziert)	HBV-DNA innerhalb des quantitativen Bereichs nachgewiesen
Positive (Positiv), oberhalb der ULoQ	Amplified (Amplifiziert) $[\text{HBV}] > 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplifiziert) oder Not Amplified (Nicht amplifiziert)	HBV-DNA oberhalb des quantitativen Bereichs nachgewiesen
Positive (Positiv), unterhalb der LLoQ	Amplified (Amplifiziert) $[\text{HBV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (550- μl -Workflow) $[\text{HBV}] < 1,4 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (200- μl -Workflow)	Amplified (Amplifiziert) oder Not Amplified (Nicht amplifiziert)	HBV-DNA unterhalb des quantitativen Bereichs nachgewiesen
Negative (Negativ)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Amplified (Amplifiziert)	HBV-DNA nicht nachgewiesen
Indeterminate (Unbestimmt)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nicht amplifiziert, Systemfehler festgestellt, Probenverarbeitung abgeschlossen)		Die Ergebnisse für alle Ziele waren ungültig; Probe erneut testen†
No Result* (Kein Ergebnis)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nicht amplifiziert, Systemfehler festgestellt, Probenverarbeitung abgebrochen)		Probenverarbeitung wurde abgebrochen; Probe erneut testen†
Unresolved (Offen)	Not Amplified, No System Error Detected (Nicht amplifiziert, kein Systemfehler festgestellt)		Die Ergebnisse für alle Ziele waren ungültig; Probe erneut testen†

* Das Flag No Result (Kein Ergebnis) wird nur von NeuMoDx System Software der Version 1.8 und höher gemeldet.

† Das NeuMoDx System ist mit einer automatischen Funktion für Rerun/Repeat (Wiederholungsläufe) ausgestattet, die der Benutzer aktivieren kann, damit als IND/UNR/NR (Unbestimmt/Offen/Kein Ergebnis) gemeldete Proben automatisch erneut verarbeitet und Verzögerungen bei der Ergebnismeldung vermieden werden.

Testberechnung

1. Für Proben innerhalb des Quantifizierungsbereichs des NeuMoDx HBV Quant Assay wird die Konzentration der HBV-DNA in den Proben anhand der gespeicherten Standardkurven in Verbindung mit dem Kalibrationskoeffizienten und dem Probenvolumen berechnet.
 - a. Ein Kalibrationskoeffizient wird auf Grundlage der Ergebnisse für die verarbeiteten NeuMoDx HBV Calibrators berechnet und dient dazu, die Gültigkeit der Standardkurve für eine gegebene Charge des NeuMoDx HBV Quant Test Strip auf einem spezifischen NeuMoDx System nachzuweisen.
 - b. Der Kalibrationskoeffizient wird in die endgültige Bestimmung der Konzentration der HBV-DNA einbezogen.
 - c. Die NeuMoDx Software berücksichtigt das eingesetzte Probenvolumen bei der Bestimmung der Konzentration an HBV-DNA pro ml Probe.
2. Die Ergebnisse des NeuMoDx HBV Quant Assay werden in \log_{10} IU/ml angegeben.
3. Die resultierende Quantifizierung unbekannter Proben kann auf den 4. internationalen HBV-Standard der WHO zurückgeführt werden.

Testkalibrierung

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

Kalibratoren

1. Ein Set der NeuMoDx HBV Calibrators muss verarbeitet werden, wenn eine neue Charge der NeuMoDx HBV Quant Test Strip verwendet wird, eine neue HBV Quant Assay-Definitionsdatei auf das NeuMoDx System geladen wird, der Gültigkeitszeitraum des aktuellen Kalibratorsets abgelaufen ist (aktuell auf 90 Tage festgelegt) oder Veränderungen an der NeuMoDx System Software vorgenommen werden.
2. Die NeuMoDx System Software benachrichtigt den Benutzer, wenn eine Verarbeitung von Kalibratoren erforderlich ist. Bis zur erfolgreichen Verarbeitung der Kalibratoren kann keine neue Teststreifencharge für Tests verwendet werden.
3. Die Gültigkeit der Kalibrierung wird wie folgt ermittelt:
 - a) Zum Nachweis der Gültigkeit muss ein Set aus zwei Kalibratoren – einer (1) mit hoher und einer (1) mit niedriger Konzentration – verarbeitet werden.
 - b) Mindestens zwei (2) der drei (3) Replikate müssen Ergebnisse innerhalb der vordefinierten Parameter ergeben. Das Nominalziel für den Kalibrator mit niedriger Konzentration liegt bei $3,7 \log_{10}$ IU/ml und das Nominalziel für den Kalibrator mit hoher Konzentration bei $5,7 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Ein Kalibrationskoeffizient wird berechnet, um der erwarteten Variation zwischen verschiedenen Teststreifenchargen Rechnung zu tragen. Dieser Kalibrationskoeffizient wird bei der Bestimmung der HBV-Endkonzentration herangezogen.

4. Wenn ein oder beide Kalibratoren die Gültigkeitsprüfung nicht bestehen, ist die Verarbeitung für den/die fehlgeschlagenen Kalibrator(en) mit einem neuen Fläschchen zu wiederholen. Sollte einer der Kalibratoren die Gültigkeitsprüfung nicht bestehen, reicht es aus, nur die Verarbeitung des fehlgeschlagenen Kalibrators zu wiederholen; das System erfordert nicht, dass beide Kalibratoren erneut verarbeitet werden.
5. Wenn der/die Kalibrator(en) die Gültigkeitsprüfung wiederholt nicht besteht/bestehen, NeuMoDx Molecular, Inc. kontaktieren.

Qualitätskontrolle

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

Externe Kontrollen

1. Die positiven und negativen externen Kontrollen müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden, solange Tests mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay durchgeführt werden. Wenn kein Satz gültiger externer Kontrollergebnisse vorhanden ist, fordert das NeuMoDx System den Benutzer dazu auf, Kontrollen zu verarbeiten, bevor Probenergebnisse ausgegeben werden können.
2. Die Gültigkeit der externen Kontrollen wird auf Grundlage des erwarteten Ergebnisses durch das NeuMoDx System bewertet. Die Positivkontrolle sollte das Ergebnis Positive (Positiv) und die Negativkontrolle das Ergebnis Negative (Negativ) für HBV ergeben.
3. Diskrepante Ergebnisse für die externen Kontrollen sind wie folgt zu behandeln:
 - a) Ein für eine Negativkontrollprobe gemeldetes positives Testergebnis weist auf ein Probenkontaminationsproblem hin.
 - b) Ein für eine Positivkontrollprobe gemeldetes Testergebnis „Negative“ (Negativ) kann darauf hinweisen, dass ein Problem mit dem Reagenz oder dem Instrument besteht.
 - c) In jedem der oben beschriebenen Fälle, oder falls das Ergebnis Indeterminate (IND) (Unbestimmt) oder No Result (NR) (Kein Ergebnis) erhalten wird, die Verarbeitung der NeuMoDx HBV External Controls mit frischen Fläschchen der Kontrolle(n) wiederholen, die die Gültigkeitsprüfung nicht bestanden hat/haben.
 - d) Wenn die positive NeuMoDx HBV External Control weiterhin das Ergebnis Negative (Negativ) ergibt, den technischen Service von NeuMoDx kontaktieren.
 - e) Wenn die negative NeuMoDx HBV External Control weiterhin das Ergebnis Positive (Positiv) ergibt, vor dem Kontaktieren des technischen Service von NeuMoDx möglichst alle in Frage kommenden Kontaminationsquellen eliminieren, was den Austausch aller Reagenzien einschließt.

(Interne) Probenprozesskontrollen

In der NeuMoDx Extraction Plate ist eine exogene Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1) enthalten, die mit jeder Probe dem vollständigen Prozess der Nukleinsäure-Extraktion und Echtzeit-PCR-Amplifikation unterzogen wird. Zudem enthält jeder NeuMoDx HBV Quant Test Strip SPC1-spezifische Primer und Sonden, was den Nachweis von SPC1 zusammen mit der Ziel-HBV-DNA (falls vorhanden) in der Multiplex-PCR ermöglicht. Der Nachweis der SPC1-Amplifikation erlaubt der NeuMoDx System Software die Überwachung der Effizienz der DNA-Extraktion und der PCR-Amplifikation.

Ungültige Ergebnisse

Wenn ein auf dem NeuMoDx System ausgeführter NeuMoDx HBV Quant Assay nach Abschluss der Probenverarbeitung kein gültiges Ergebnis liefert, wird das Ergebnis basierend auf der aufgetretenen Fehlerart als Indeterminate (IND) (Unbestimmt), No Result (Kein Ergebnis) oder Unresolved (UNR) (Offen) gemeldet.

Das Ergebnis IND wird gemeldet, wenn während der Probenverarbeitung ein Fehler im NeuMoDx System erkannt wird. Falls das Ergebnis IND gemeldet wird, empfiehlt sich ein erneuter Test.

Das Ergebnis UNR wird gemeldet, wenn trotz der Abwesenheit von Systemfehlern keine gültige Amplifikation von HBV-DNA oder SPC1 nachweisbar ist, was auf einen möglichen Reagenzfehler oder das Vorliegen von Inhibitoren hinweist. Falls das Ergebnis UNR gemeldet wird, empfiehlt sich als erster Schritt ein erneuter Test. Wenn der Wiederholungstest fehlschlägt, kann eine Probenverdünnung verwendet werden, um die Effekte einer möglichen Probeninhibition abzumildern.

Wenn ein auf dem NeuMoDx System ausgeführter NeuMoDx HBV Quant Assay kein gültiges Ergebnis ergibt und die Probenverarbeitung vor Abschluss abgebrochen wird, wird das Ergebnis No Result (NR) (Kein Ergebnis) gemeldet. Falls das Ergebnis NR gemeldet wird, empfiehlt sich ein erneuter Test.

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität – Nachweisgrenze unter Verwendung des WHO-Standards

Die analytische Sensitivität des NeuMoDx HBV Quant Assay wurde durch Testen von Negativproben und einer Verdünnungsreihe des 4. internationalen Standards der WHO in gescreentem negativem Humanplasma und -serum charakterisiert, um die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) auf den NeuMoDx Systems zu bestimmen. Die LoD war definiert als die niedrigste Zielkonzentration, die gemäß Analyse im Probit-Stil mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen wird. Die Studien wurden über 3 Tage mit verschiedenen NeuMoDx Systems und mehreren Chargen der NeuMoDx Reagenzien durchgeführt. Eine zusätzliche Studie wurde durchgeführt, um die LoD des NeuMoDx HBV Quant Assay bei Anwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen zu bestätigen. Die Nachweisraten beider Studien sind in *Tabelle 2* aufgeführt.

Tabelle 2: Positiv-Nachweisraten für die LoD-Bestimmung des NeuMoDx HBV Quant Assay

	Zielkonzentration [IU/ml]	Zielkonzentration [\log_{10} IU/mk]	PLASMA			SERUM		
			Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate	Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate
550 μl	20	1,30	108	108	100 %	107	107	100 %
	10	1	108	107	99 %	108	104	96 %
	5	0,70	108	98	91 %	108	95	88 %
	2,5	0,40	108	97	90 %	108	72	67 %
	1,25	0,10	108	73	68 %	108	44	42 %
	NEG	n. z.	108	0	0 %	107	0	0 %
200 μl	25	1,40	43	43	100 %	44	44	100 %

Die LoD des NeuMoDx HBV Quant Assay in Plasma für den HBV-Genotyp A (4. internationaler Standard der WHO) wurde unter Anwendung des Workflows mit 550 μ l Probenvolumen als 5,2 IU/ml (95%-KI 4,1–7,6 IU/ml) [(0,72 \log_{10} IU/ml) (95%-KI 0,61–0,88 \log_{10} IU/ml)] bestimmt (Abbildung 2). Die LoD des NeuMoDx HBV Quant Assay für Serumproben wurde unter Anwendung des Workflows mit 550 μ l Probenvolumen als 8,0 IU/ml (95%-KI 6,5–10,8 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95%-KI 0,8–1,0 \log_{10} IU/ml)] bestimmt (Abbildung 2).

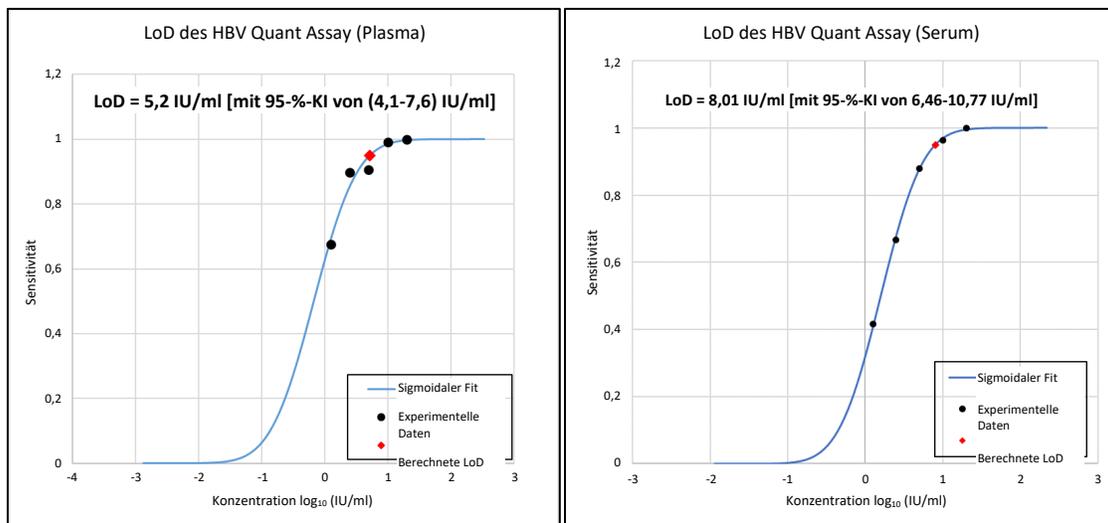


Abbildung 2: Analyse im Probit-Stil zur Bestimmung der LoD des NeuMoDx HBV Quant Assay; Plasma (links) und Serum (rechts)

Analytische Sensitivität – Quantifizierungsgrenze – untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) unter Verwendung des WHO-Standards

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

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

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

Die zusammengestellten Ergebnisse für die 5 Konzentrationen der HBV-Proben, die für die Untersuchung der LLoQ unter Anwendung des 4. internationalen Standards der WHO verwendet wurden, sind in *Tabelle 3* aufgeführt. Die LLoQ für den 4. internationalen Standard der WHO in Plasma wurde mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay (Workflow mit 550 μ l Probenvolumen) als 5,5 IU/ml (0,74 \log_{10} IU/ml) bestimmt. Eine separate Studie wurde durchgeführt, um die LLoQ bei Anwendung des Workflows mit 200 μ l Probenvolumen zu bestätigen. Diese ergab eine LLoQ von 25 IU/ml, wie in *Tabelle 3* dargestellt.

Die LLoQ des NeuMoDx HBV Quant Assay für Serumproben wurde unter Anwendung des Workflows mit 550 μ l Probenvolumen als 6,0 IU/ml und unter Anwendung des Workflows mit geringem Probenvolumen (200 μ l) als 25 IU/ml bestimmt, wie in *Tabelle 3* dargestellt.

Tabelle 3: LLoQ des NeuMoDx HBV Quant Assay mit Bias und TAE

	Zielkonz. [IU/ml]	Zielkonz. [\log_{10} IU/ml]	Plasma					Serum				
			Konz.-Durchschnitt [\log_{10} IU/ml]	Nachweis (%)	SD	Bias	TAE	Konz.-Durchschnitt [\log_{10} IU/ml]	Nachweis (%)	SD	Bias	TAE
550 μ l	20	1,30	1,29	100	0,23	0,16	0,63	1,43	100	0,20	0,13	0,52
	10	1,00	1,07	99	0,25	0,20	0,71	1,21	96	0,24	0,21	0,69
	5	0,70	0,89	91	0,35	0,34	1,04	1,00	88	0,40	0,30	1,09
	2,5	0,40	0,75	90	0,44	0,51	1,39	0,96	67	0,44	0,56	1,46
	1,25	0,10	0,73	68	0,41	0,68	1,50	0,95	42	0,38	0,85	1,61
200 μ l	25	1,40	1,61	100	0,35	0,21	0,91	1,81	100	0,18	0,41	0,78

Analytische Sensitivität – LoD und LLoQ über HBV-Genotypen hinweg

Die LoD wurde zunächst für Genotyp A (4. internationaler Standard der WHO) bestimmt. Anschließend wurden mit jedem der anderen 7 Genotypen zusätzliche Tests im Bereich um die ermittelte LoD durchgeführt. Sechsenddreißig (36) Replikate in Konzentrationen, die dem 2-, 1- und 0,5-Fachen der Obergrenze des 95%-KI der LoD (~ 7 IU/ml) entsprachen, wurden unter Anwendung des Workflows mit 550 μ l Probenvolumen mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay getestet. Der prozentuale Anteil Positiver wurde für jeden Genotyp bei jeder der getesteten Konzentrationen tabelliert und zur Berechnung der LoD anhand einer Analyse im Probit-Stil herangezogen.

Der analytische Gesamtfehler bei diesen Konzentrationen wurde ebenfalls berechnet. Die niedrigste Konzentration mit einer Positiv-Nachweisrate von 95 % und einem berechneten TAE von $\leq 1,0$ wurde entsprechend als LLoQ für den jeweiligen Genotyp festgelegt. Über die Genotypen hinweg wurde die Nachweisgrenze des NeuMoDx HBV Quant Assay für Plasmaproben unter Anwendung des Workflows mit 550 μ l Probenvolumen als 6,2 IU/ml (0,79 \log_{10} IU/ml) und die LLoQ als 7,6 IU/ml (0,88 \log_{10} IU/ml) ermittelt, wie in *Tabelle 4* dargestellt.

Tabelle 4. In Plasma unter Anwendung des Workflows mit 550 μ l Probenvolumen getestete HBV-Genotypen

GENOTYP	LoD [IU/ml]	LLoQ [IU/ml]
Genotyp A	5,2	5,2
Genotyp B	6,2	6,2
Genotyp C	3,5	6,2
Genotyp D	5,2	5,7
Genotyp E	3,5	3,5
Genotyp F	5,1	6,2
Genotyp G	3,5	3,5
Genotyp H	5,2	7,6

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studien gibt NeuMoDx für den NeuMoDx HBV Quant Assay bei Anwendung des **Workflows mit 200 μ l Probenvolumen** eine **LoD und LLoQ von 25 IU/ml (1,4 \log_{10} IU/ml)** in *Plasma und Serum an*.

Bei Anwendung des **Workflows mit 550 μ l Probenvolumen** gibt NeuMoDx für den NeuMoDx HBV Quant Assay eine **LoD und LLoQ von 8,0 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)** in *Plasma und Serum an*.

Analytische Sensitivität – Linearität und Bestimmung der oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearität und obere Bestimmungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) des NeuMoDx HBV Quant Assay wurden in Plasma anhand einer Verdünnungsreihe hoch-positiver klinischer HBV-Probe (Access Biologicals, Vista, CA) mit etablierter Rückführbarkeit auf den 4. internationalen Standard der WHO ermittelt. In gepooltem HBV-negativem Plasma wurde ein Panel mit 11 Proben vorbereitet, um ein Testpanel zu erhalten, das einen Konzentrationsbereich von 9,02–1,02 \log_{10} IU/ml abdeckt. Das Testpanel wurde in 6 Replikaten pro Konzentration auf 2 NeuMoDx Systems und mit 3 Chargen der kritischen Reagenzien verarbeitet. Der NeuMoDx HBV Quant Assay demonstrierte die Fähigkeit, HBV über den linearen Bereich von 8 \log_{10} (einschließlich kritischer medizinischer Entscheidungspunkte) mit einer Abweichung von $\pm 0,22 \log_{10}$ IU/ml zu quantifizieren. Die Anwendung von Regressionsanpassungen 2. und 3. Ordnung brachte keinen signifikanten Vorteil. Die ULoQ wurde anhand der Daten aus dieser Studie als 9,02 \log_{10} IU/ml [*Tabelle 5* und *Abbildung 3*] bestimmt.

Tabelle 5: Linearität des NeuMoDx HBV Quant Assay (evaluiert mit Genotyp A)

Zielkonz. (IU/ml)	Zielkonz. (log ₁₀ IU/ml)	Mittlere Konz. (log ₁₀ IU/ml)	Standardabweichung	Bias	Vorausgesagte lineare Anpassung	Abweichung von nicht-linearer Anpassung
1,05e+09	9,02	8,99	0,08	0,06	9,02	-0,04
1,05e+08	8,02	8,05	0,07	0,05	8,02	0,03
1,05e+07	7,02	7,05	0,07	0,06	7,02	0,04
1,05e+06*	6,02	6,05	0,05	0,05	6,02	0,03
1,05e+05	5,02	5,04	0,05	0,04	5,02	0,00
2,82e+04*	4,45	4,43	0,07	0,05	4,45	-0,01
1,05e+04	4,02	3,99	0,09	0,05	4,02	-0,02
2,82e+03*	3,45	3,41	0,07	0,06	3,45	-0,03
1,05e+03	3,02	3,00	0,04	0,04	3,02	-0,03
1,05e+02	2,02	1,99	0,11	0,09	2,02	-0,01
1,05e+01	1,02	1,09	0,29	0,23	1,02	0,06

* Nahe medizinischer Entscheidungspunkte

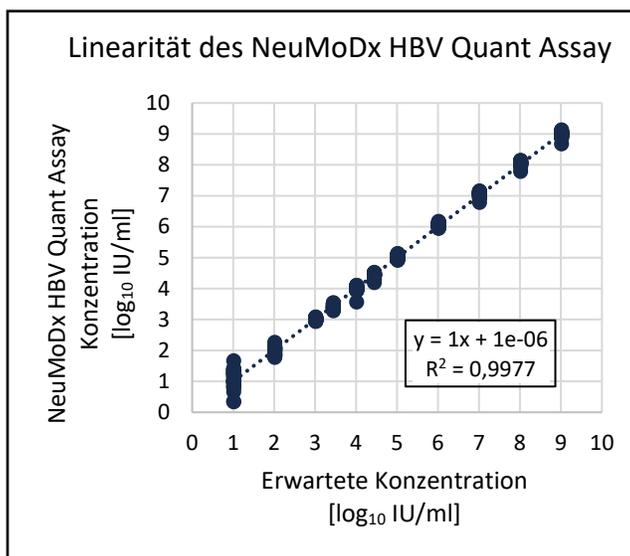


Abbildung 3: Linearer Bereich des NeuMoDx HBV Quant Assay in Plasma

Eine Folgestudie wurde durchgeführt, um die Matrixäquivalenz zu bestätigen. In dieser Analyse wurden die quantitativen Ergebnisse des NeuMoDx HBV für in Plasma und Serum vorbereitete Proben mit zwei verschiedenen Regressionsanpassungsmodellen (MS Excel-Regressionstool und Passing-Bablok) verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine starke Korrelation, repräsentiert durch Werte für Steigung und Achsenabschnitt sehr nahe an 1,00 bzw. 0,00 und einen R²-Wert von 0,99 (MS Excel-Regressionstool) oder einen p-Wert von 0,270 (Passing-Bablok). Die vom NeuMoDx System gemeldeten HBV Quant Assay-Konzentrationen für die Plasmamatrix im Vergleich mit entsprechenden Serumproben sind in *Abbildung 4* dargestellt.

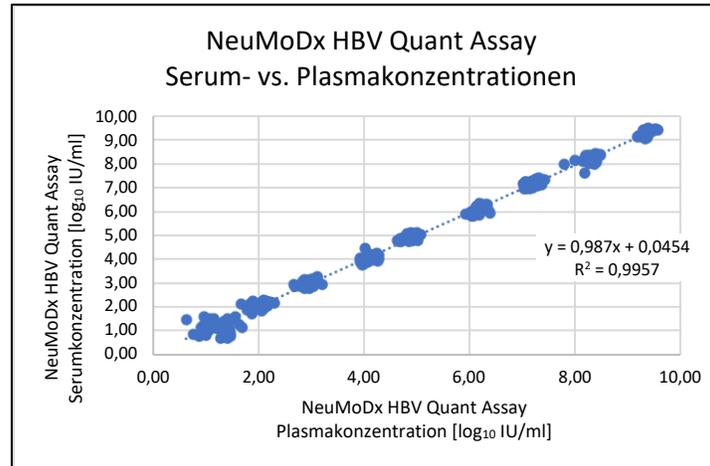


Abbildung 4: Matrixvergleich für den linearen Bereich des NeuMoDx HBV Quant Assay

Linearität und ULoQ wurden dann für den Workflow mit 200 µl Probenvolumen über einen Bereich von 9,31–1,71 log₁₀ IU/ml bestätigt. Es wurden Vergleiche der Gleichwertigkeit der von der NeuMoDx Software gemeldeten Konzentrationen für den 200-µl- und den 550-µl-Workflow durchgeführt. Regressionsanalysen nach Deming und Passing-Bablok ergaben über den gesamten linearen Bereich hinweg sowohl für Plasma- als auch für Serumproben eine ausgezeichnete Korrelation und eine Steigung nahe 1 sowie minimale Achsenabschnitte (Bias) für die gemeldeten Konzentrationen. Ein Bland-Altman-Vergleich der für den Workflow mit 200 µl Probenvolumen gemeldeten Konzentration mit der mittleren gemeldeten Konzentration für beide Workflows (200 µl und 550 µl Probenvolumen) zeigte ein minimales Bias, was die Genauigkeit des zur Generierung der Ergebnisse für den 200-µl-Workflow eingesetzten Algorithmus belegt. Zusätzlich ergab sich für eine einfache lineare Regression zum Vergleich der erwarteten mit der gemeldeten Konzentration für den 200-µl-Workflow eine Steigung nahe 1, was für eine ausgezeichnete Korrelation spricht (*Abbildung 5*). Zusammengefasst demonstrieren diese Vergleiche die genaue Quantifizierung von HBV über den linearen Bereich des NeuMoDx HBV Quant Assay bei Verwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen.

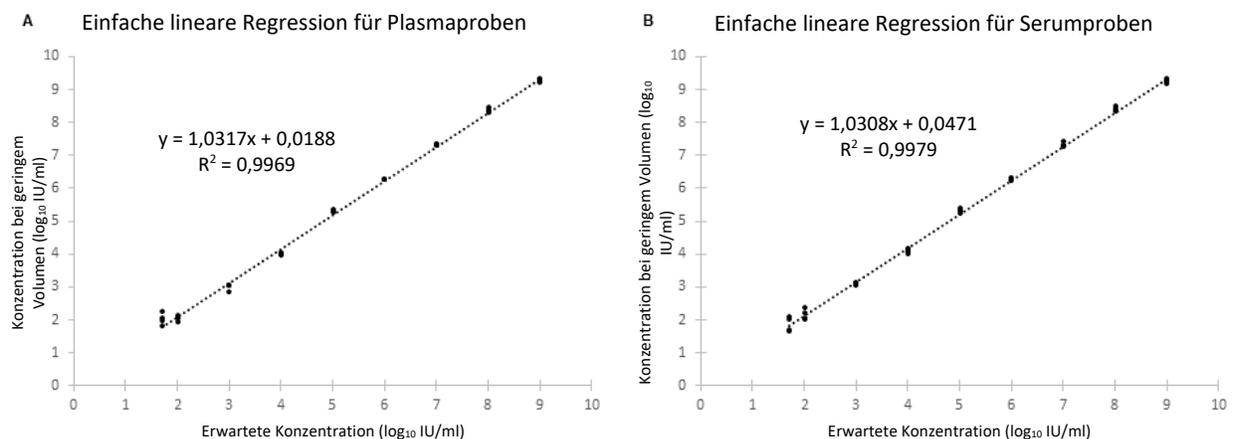


Abbildung 5: Lineare Beziehung zwischen den erwarteten und vom NeuMoDx System gemeldeten Konzentrationen für den 200-µl-Workflow in a) Plasma und b) Serum

Linearität über Genotypen hinweg

Die Linearität des NeuMoDx HBV Quant Assay in Plasmaproben für die HBV-Genotypen wurde durch Testen von mindestens vier (4) verschiedenen Konzentrationen für jeden HBV-Genotyp in gepooltem HBV-negativem Plasma charakterisiert. Die getesteten Konzentrationen der in dieser Studie verwendeten HBV-Ziele waren abhängig von der jeweiligen Konzentration der ursprünglichen Probe, weshalb sie sich für die verschiedenen Genotypen unterscheiden. Die Studie wurde mit jedem Genotyp unter Verwendung von jeweils 6 Replikaten pro Konzentration durchgeführt. Die Linearität über die HBV-Genotypen hinweg ist in *Tabelle 6* und *Abbildung 6* dargestellt.

Tabelle 6: Linearität des NeuMoDx HBV Quant Assay über Genotypen hinweg

Genotyp	Linearitätsgleichung y = NeuMoDx HBV Quant Assay Quantifizierung x = erwartete Bestimmung	R ²
A	$y = 1x + 1e-06$	0,9977
B	$y = 1,0129x - 0,0964$	0,9975
C	$y = 1,0250x - 0,0898$	0,998
D	$y = 1,0379x - 0,0896$	0,9975
E	$y = 1,0182x - 0,096$	0,9956
F	$y = 0,9736x + 0,276$	0,9906
G	$y = 1,0547x - 0,0835$	0,9813

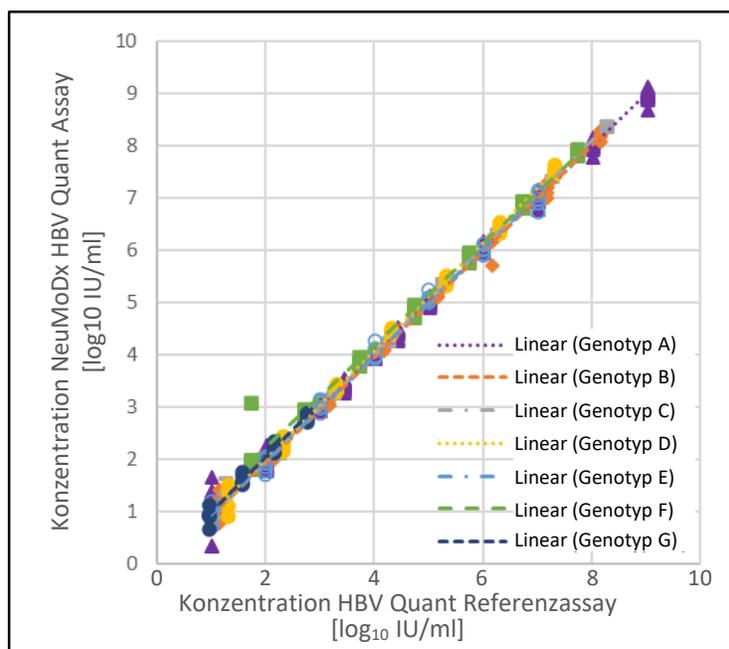


Abbildung 6: Linearität des NeuMoDx HBV Quant Assay über Genotypen hinweg

Analytische Spezifität und Kreuzreaktivität

Die analytische Spezifität wurde durch Screening von 32 häufig in Blut-/Plasmaproben vorkommenden Organismen sowie Spezies, die phylogenetisch mit HBV verwandt sind, auf Kreuzreaktivität demonstriert. Die Organismen wurden in Pools mit jeweils 4–6 Organismen vorbereitet und bei hoher Konzentration getestet. Die getesteten Organismen sind in *Tabelle 7* dargestellt. Mit keinem der getesteten Organismen wurde eine Kreuzreaktivität beobachtet, was eine analytische Spezifität von 100 % für den NeuMoDx HBV Quant Assay bestätigt.

Tabelle 7: Zur Demonstration der analytischen Spezifität verwendete Pathogene – Kreuzreaktivität

Adenovirus 2	Dengue V1	Hepatitis A	HPV 16	Ilheus (ILHV)	Gelbfieber
Adenovirus 5	Dengue V2	Hepatitis C	HPV 18	Influenza A	Zika-Virus
Banzi-Virus	Dengue V3	Humanes Herpesvirus 6a	HSV1	Parvo B19	
BK-Virus	Dengue V4	Humanes Herpesvirus 8	HSV 2	Rubella	
Zytomegalievirus	Epstein-Barr-Virus	HIV 1	HTLV 1	St.-Louis-Enzephalitis	
VZV	Vacciniavirus	HIV 2	HTLV 2	West-Nil-Virus	

Störsubstanzen – kommensale Organismen

Der NeuMoDx HBV Quant Assay wurde auf Störungen in Gegenwart von Nicht-Zielorganismen untersucht. Dazu wurden die Organismen-Pools eingesetzt, die für die Untersuchung der analytischen Spezifität vorbereitet wurden. Die Organismen wurden entweder einzeln oder gepoolt in Gruppen von je 4–6 Organismen in gescreentem HBV-negativem Plasma, versetzt mit HBV-Kontrollen in einer Konzentration von 3,7 log₁₀ IU/ml, getestet. Es wurde keine signifikante Störung in Gegenwart dieser kommensalen Organismen beobachtet, was aus der minimalen Abweichung der Quantifizierung von Kontrollproben ohne störende Agenzien hervorgeht [Tabelle 8].

Tabelle 8: Störungstests – kommensale Organismen

Nicht-Zielorganismen	Konz.-Durchschnitt (log ₁₀ IU/ml)	Bias (log ₁₀ IU/ml)
Gruppe 1 [BK-Virus, Cytomegalie-Virus, Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus 6a, Humanes Herpesvirus 8]	3,51	0,10
Gruppe 2 [Adenovirus 2, Adenovirus 5, Dengue V2, Dengue V3, Dengue V4]	3,38	0,22
Gruppe 3 [Parvo B19, HTLV 1, HTLV 2, Ilheus (ILHV), Gelbfieber, Zika-Virus]	3,62	0,06
Gruppe 4 [HPV 16, HPV 18, HSV 1, HSV 2, Dengue V1]	3,57	0,04
Gruppe 5 [St.-Louis-Enzeph., VZV, Vacciniavirus, West-Nil-Virus]	3,57	0,03
HAV	3,58	0,05
Banzi-Virus	3,41	0,19
HIV-1	3,47	0,15
HIV-2	3,56	0,05
Rubella	3,16	0,44
Influenza A	3,60	0,03
HCV	3,58	0,04

Störsubstanzen – endogene und exogene Substanzen

Die Leistung des NeuMoDx HBV Quant Test Strip wurde in Gegenwart typischer exogener und endogener Störsubstanzen, die in klinischen HBV-Plasmaproben vorkommen, bewertet. Diese umfassten ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Blutkomponenten sowie häufige antivirale Medikamente, welche in *Tabelle 9* klassifiziert sind. Jede der nachstehend in *Tabelle 10* aufgeführten endogenen und exogenen Substanzen wurde zu gescreentem, HBV-negativem Humanplasma gegeben, das mit $3,7 \log_{10}$ IU/ml HBV versetzt war, und die Daten wurden auf Störungen untersucht. Zusätzlich wurde auch für den mit einer Hepatitis-B-Infektion verbundenen Krankheitszustand repräsentatives Plasma auf potenzielle Störungen getestet.

Tabelle 9: Störungstests – exogene Agenzien (Medikamenten-Klassifizierungen)

Pool	Medikament	Einstufung
1	Zidovudin (ZDV)	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
	Saquinavir	HIV-Proteaseinhibitor
	Ritonavir	HIV-Proteaseinhibitor
	Clarithromycin	Antibiotikum
	Interferon alfa-2a	Immunmodulator
	Interferon alfa-2b	Immunmodulator
2	Abacavirsulfat	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
	Amprenavir	Proteaseinhibitor
	Ribavirin	Immunmodulator
	Entecavir	HBV-Antiviren-Medikament
	Fluoxetin	SSRI-Antidepressivum
	Valacyclovirhydrochlorid	Antiviren-Medikament
3	Tenofoviridisoproxil	HBV-/HIV-Antiviren-Medikament
	Lamivudin	HBV-/HIV-Antiviren-Medikament
	Ganciclovir	CMV-Antiviren-Medikament
	Valganciclovir	CMV-Antiviren-Medikament
	Nevirapin	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
4	Efavirenz	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
	Lopinavir	Proteaseinhibitor
	Enfuvirtid	HIV-Fusionsinhibitor
	Ciprofloxacin	Antibiotikum
	Paroxetin	SSRI-Antidepressivum
5	Adefovir(-Dipivoxil)	Antiviren-Medikament
	Azithromycin	Antibiotikum
	Indinavirsulfat	HIV-Proteaseinhibitor
	Sertralin	SSRI-Antidepressivum

Tabelle 10: Störungstests – exogene und endogene Agenzien

Endogen	Konz.- Durchschnitt (log ₁₀ IU/ml)	Bias (log ₁₀ IU/ml)
Hämoglobin	3,50	0,20
Triglyceride	3,51	0,09
Bilirubin	3,56	0,13
Albumin	3,51	0,17
Exogen (Medikamente)	Konz.- Durchschnitt (log ₁₀ IU/ml)	Bias (log ₁₀ IU/ml)
Pool 1: Zidovudin (ZDV), Saquinavir, Ritonavir, Clarithromycin, Interferon alfa-2a, Interferon alfa-2b	3,58	0,08
Pool 2: Abacavirsulfat, Amprenavir, Ribavirin, Entecavir, Fluoxetin, Valacyclovirhydrochlorid	3,56	0,04
Pool 3: Tenofovirdisoproxil, Lamivudin, Ganciclovir, Valganciclovir, Nevirapin	3,59	0,06
Pool 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtid, Ciprofloxacin, Paroxetin	3,60	0,07
Pool 5: Adefovir(-Dipivoxil), Azithromycin, Indinavirsulfat, Sertralin	3,56	0,19
Krankheitszustand	Konz.- Durchschnitt (log ₁₀ IU/ml)	Bias (log ₁₀ IU/ml)
Antinukleäre Antikörper (ANA)	3,61	0,10
Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)	3,63	0,10
Rheumatoide Arthritis (RA)	3,57	0,09
HCV-Antikörper	3,58	0,07
HBV-Antikörper	3,64	0,11
Alkoholzirrhose	3,68	0,15
Rheumafaktor (RF)	3,63	0,10
Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)	3,49	0,06

Laborinterne Präzision

Die Präzision des NeuMoDx HBV Quant Test Strip wurde durch Testen eines 8-Proben-Panels aus HBV-Proben der Genotypen A und C mit drei NeuMoDx Systems über 12 Tage bestimmt. Die Intra-Lauf-, Intra-Tag- und Intra-System-Präzision wurden charakterisiert und die Gesamt-Standardabweichung wurde als $\leq 0,22 \log_{10}$ IU/ml bestimmt. Die Präzision von Bediener zu Bediener wurde nicht charakterisiert, da der Bediener bei der Verarbeitung von Proben mit dem NeuMoDx System keine wesentliche Rolle spielt. Die Ergebnisse für die laborinterne Präzision sind in *Tabelle 11* dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Studie zur laborinternen Präzision

PANEL-TESTPROBE	ZIELKONZ. [log ₁₀ IU/ml]	MITTLERE KONZ. [log ₁₀ IU/ml]	N	Bias	Intra-Lauf-SD	Intra-Tag-SD	Intra-System-SD	Gesamt-SD
Genotyp A	7,75	7,89	36	0,14	0,06	0,07	0,07	0,07
	5,75	5,83	36	0,11	0,07	0,10	0,10	0,10
	3,75	3,70	36	0,11	0,11	0,13	0,15	0,15
	1,75	1,54	36	0,23	0,16	0,22	0,22	0,22
Genotyp C	6,27	6,23	36	0,10	0,08	0,09	0,10	0,10
	4,27	4,18	36	0,08	0,08	0,10	0,10	0,10
	3,27	3,14	36	0,09	0,08	0,12	0,12	0,12
	2,27	2,08	36	0,12	0,12	0,15	0,16	0,16

Interchargen-Reproduzierbarkeit

Die Interchargen-Reproduzierbarkeit des NeuMoDx HBV Quant Test Strip wurde unter Verwendung von je drei verschiedenen Chargen der wesentlichen Reagenzien – NeuMoDx Lysis Buffer 1, NeuMoDx Extraction Plate und NeuMoDx HBV Quant Test Strip – bestimmt. Zur Bewertung der Leistung wurde ein 8-Proben-Panel der HBV-Genotypen A und C eingesetzt. Die Tests wurden mit je drei verschiedenen Reagenzchargen auf drei NeuMoDx Systems über 6 Tage durchgeführt. Die Variation innerhalb der und zwischen den Chargen wurde analysiert. Das maximale Gesamt-Bias lag bei 0,12 log₁₀ IU/ml und die maximale Gesamt-SD bei 0,24 log₁₀ IU/ml. Es wurde kein signifikanter Leistungsunterschied zwischen den Chargen festgestellt, da die Quantifizierung aller Panel-Mitglieder innerhalb der Toleranzanforderungen lag. Die Ergebnisse für die Interchargen-Reproduzierbarkeit sind nachstehend in *Tabelle 12* dargestellt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Studie zur Interchargen-Reproduzierbarkeit

PANEL-TESTPROBE	ZIELKONZ. [log ₁₀ IU/ml]	MITTLERE KONZ. [log ₁₀ IU/ml]	N	Bias	Intrachargen-SD	Interchargen-SD	Gesamt SD
Genotyp A	8,02	7,99	36	0,03	0,15	0,09	0,17
	6,02	5,96	36	0,06	0,17	0,06	0,18
	4,02	3,90	36	0,12	0,14	0,09	0,17
	2,02	1,92	36	0,10	0,21	0,12	0,24
Genotyp C	6,27	6,32	36	0,05	0,06	0,08	0,10
	4,27	4,31	36	0,04	0,22	0,09	0,24
	3,27	3,30	36	0,03	0,20	0,07	0,21
	2,27	2,32	36	0,05	0,13	0,13	0,18

Wirksamkeit der Kontrolle

Die Wirksamkeit der im NeuMoDx HBV Quant Assay enthaltenen SPC1 in Bezug auf ihre Meldung von Prozessschrittfehlern oder Inhibitionen, welche die Leistung des NeuMoDx HBV Quant Assay beeinträchtigen, wurde anhand von zwei häufigen HBV-Genotypen (A und C) bewertet. Die getesteten Bedingungen sind repräsentativ für kritische Fehlschläge von Prozessschritten, die potenziell bei der Probenverarbeitung auftreten und von den Sensoren des NeuMoDx System zur Leistungsüberwachung *möglicherweise nicht erkannt werden*. Die Wirksamkeit der SPC1 wurde durch Simulation solcher Fehlerbedingungen ausgewertet. Prozessschwächen, die sich nachteilig auf den Nachweis/die Quantifizierung von HBV auswirkten, spiegelten sich in der Leistung des SPC1-Ziels wider (Vorhandensein von Inhibitor und Fehlen eines Waschschritts). Für Bedingungen, unter denen die Amplifikation von SPC1 nicht beeinträchtigt war, konnte auch das HBV-Ziel innerhalb einer angegebenen Quantifizierung von 0,2 log₁₀ IU/ml der Kontrollproben amplifiziert werden.

Tabelle 13: Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle

Getesteter Prozessschrittfehler	Amplifikationsstatus Probenprozesskontrolle	Amplifikationsstatus HBV-Ziel	Assayergebnis
Presence of Inhibitor (Vorhandensein von Inhibitor)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Delivered (Keine Waschlösung abgegeben)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Blowout (Kein Wasch-Blowout)	Amplified (Amplifiziert)	Amplified (Amplifiziert)	Positive (Positiv) mit Quantifizierung innerhalb von 0,2 log ₁₀ IU/ml der Kontrolle

Kreuzkontamination

Zur Bestimmung der Kreuzkontaminationsrate des NeuMoDx HBV Quant Assay wurden drei Sätze von HBV-Proben aus alternierend hoch-positiven und negativen Proben analysiert. Insgesamt wurden dabei 144 Replikate einer normalen, HBV-negativen EDTA-Plasmaprobe und 144 Replikate einer HBV-Probe mit hohem Titer von 8,0 log₁₀ IU/ml getestet. Alle 144 Replikate der negativen Probe waren negativ, was zeigt, dass während der Probenverarbeitung im NeuMoDx System keine Kreuzkontamination aufgetreten ist.

Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Tests wurden durchgeführt, um die Gleichwertigkeit der Ergebnisse für Plasmaproben zu demonstrieren, die in Entnahmeröhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Acid-Citrate-Dextrose (ACD) entnommen wurden. Zusätzlich wurden Tests durchgeführt, um die Gleichwertigkeit von frischen und gefrorenen Proben zu bestimmen. Vierzig einzelne Spenderproben, bezogen von BioIVT, wurden sowohl in EDTA- als auch in ACD-Entnahmeröhrchen entnommen. Diese frischen Proben wurden mit HBV-Genotyp A oder C in vier Konzentrationen versetzt und auf Gleichwertigkeit getestet. Die Proben wurden dann für mindestens 24 Stunden eingefroren, aufgetaut und erneut getestet. Mittels Regressionsanalyse wurde eine ausgezeichnete Gleichwertigkeit für frische und gefrorene Proben bzw. für EDTA- und ACD-Proben demonstriert.

Tabelle 14: Regressionsanalyse der Ergebnisse der Studie auf Gleichwertigkeit der Proben

Parameter [Akzeptanzkriterien]	Frisch vs. gefroren	ACD vs. K ₂ -EDTA
Steigung [0,9–1,1]	1,002	0,996
Achsenabschnitt [< 0,5]	-0,031	0,018
Bestimmtheitsmaß [R ² > 0,95]	0,995	0,993

Zusätzliche Tests wurden durchgeführt, um die Gleichwertigkeit der Leistung des NeuMoDx HBV Quant Assay bei Verwendung von Proben in primären vs. sekundären Entnahmeröhrchen zu demonstrieren. Panels aus HBV-negativen, mit HBV-Ziel (AccuPlex™ HBV Control) versetzte Spenderproben wurden zunächst ausgehend vom primären Probenröhrchen verarbeitet. Das verbleibende Plasma jeder Probe wurde in ein sekundäres Probenröhrchen aliquotiert und erneut verarbeitet. Es wurde keine signifikante Differenz zwischen den gemeldeten Ergebnissen bei Verarbeitung im primären und sekundären Probenröhrchen festgestellt.

Die Gleichwertigkeit der Leistung des NeuMoDx HBV Quant Assay bei frischen vs. gefrorenen Serumproben wurde ebenfalls evaluiert. Dazu wurde ein Panel aus einzelnen, frischen Spender-Serumproben, die mit HBV in Konzentrationen über den linearen Bereich hinweg versetzt waren, verwendet. Nach der Verarbeitung der frischen Proben wurden die Serumproben für mindestens 24 Stunden bei –20 °C eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden dann aufgetaut und erneut getestet. Die lineare Gleichwertigkeit zwischen identischen frischen und gefrorenen Proben wurde mittels Regressionsanalysen nach Passing-Bablok und Deming ausgewertet. Der p-Wert der Passing-Bablok-Regression von 0,329 (größer als 0,05) und der Korrelationskoeffizient der Deming-Regression von 0,989 demonstrieren eine ausgezeichnete Gleichwertigkeit der frisch verarbeiteten und der nach dem Auftauen verarbeiteten Proben. Das Bias zwischen frischem und gefrorenem Zustand wurde nach Bland-Altman als extrem vernachlässigbarer Wert von -0,002 log₁₀ IU/ml bestimmt, was die Gleichwertigkeit der Verarbeitung frischer vs. gefrorener Proben weiter demonstriert. Abschließend wurde durch einfache lineare Regression sowohl für frische als auch für gefrorene Proben die Korrelation zwischen den vom System gemeldeten HBV-Konzentrationen und den erwarteten Konzentrationen bestimmt. Es wurden R²-Werte von 0,991 bzw. 0,985 erhalten.

Probenstabilität

HBV-negative EDTA-Plasma- und Serumproben wurden mit HBV in einer Konzentration von 3,7 log₁₀ IU/ml versetzt, in das NeuMoDx System geladen und zu verschiedenen Zeitpunkten getestet – sofort (Zeit 0), nach 4 Stunden, nach 8 Stunden und nach 24 Stunden. Über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg wurde kein signifikanter Unterschied in der Leistung beobachtet, was darauf hindeutet, dass sich eine Probe für bis zu 24 Stunden im NeuMoDx System befinden kann, ohne dass eine Beeinträchtigung der Assayleistung zu erwarten ist.

Ein ähnlicher Test wurde mit Plasma- und Serumproben durchgeführt, die vor der Testausführung bis zu 7 Tage lang in einem Laborkühlschrank (zwischen 2 und 8 °C) aufbewahrt wurden. Es wurde kein signifikanter Leistungsunterschied beobachtet.

Zum Abschluss wurden Proben getestet, die vor der Verarbeitung bis zu 6 Monate lang (Plasma) oder bis zu 4 Monate lang (Serum) bei ≤ -20 °C gelagert worden waren. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit frischen Proben festgestellt. Der Einfrier-/Auftauzyklus wurde wiederholt und es ergab sich keine Änderung der Leistung nach 2 Einfrier-/Auftauzyklen (Plasma) oder 4 Einfrier-/Auftauzyklen (Serum).

Methodenkorrelation

Plasmaproben

Die qualitative und quantitative Leistung des NeuMoDx HBV Quant Assay wurden im Vergleich mit FDA-/CE-zugelassenen Vergleichsassays bewertet. Dazu wurden unverdünnte klinische Plasmaproben von HBV-infizierten Patienten getestet. Die Tests wurden in Form einer Einfachblindstudie intern bei NeuMoDx mit klinischen Proben, die von drei unabhängigen Referenzlabors bezogen wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse der insgesamt 308 HBV-positiven und -negativen Proben wurden in der qualitativen Analyse zur Bestimmung der klinischen Sensitivität und Spezifität des NeuMoDx HBV Quant Assay zusammengefasst. Die qualitative Analyse wurde sowohl unter Einbeziehung der als auch ohne die positiven Proben unterhalb der LLoQ durchgeführt, da die Klassifizierung solch schwach positiver Proben von Test zu Test variieren können. Die lineare Regression zur Definition der quantitativen Leistung wurde anhand von insgesamt 97 HBV-positiven klinischen Proben innerhalb des beiden Tests gemeinsamen linearen Bereichs generiert. Der NeuMoDx HBV Quant Test Strip überzeugte durch eine ausgezeichnete Sensitivität und Spezifität und zeigte darüber hinaus eine ausgezeichnete quantitative Korrelation mit dem Vergleichsassay. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Sensitivität des NeuMoDx HBV Quant Assay auf 100 % (KI 96,4–100 %) und die Spezifität auf 95,6 % (KI 91,9–97,7 %) geschätzt. Diese 95%-Konfidenzintervalle wurden unter Anwendung der 95%-Score-Konfidenzintervall-Methode gemäß EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance, Approved Guideline, Vol 28, No 3.⁵, berechnet.

Tabelle 15: Maßzahlen der klinischen Sensitivität und Spezifität des NeuMoDx HBV Quant Assay für Plasmaproben auf dem NeuMoDx 288 Molecular System

	Referenzassay (POS)	Referenzassay (NEG)	GESAMT
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	103	9	112
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
GESAMT	103	205	308
SENSITIVITÄT = 100 % 95%-KI (96,4–100 %) SPEZIFITÄT = 95,6 % 95%-KI (91,9–97,7 %)			

Tabelle 16: Maßzahlen der klinischen Sensitivität und Spezifität des NeuMoDx HBV Quant Assay auf dem NeuMoDx 288 Molecular System mit Plasmaproben, Proben < LLoQ ausgeschlossen

	Referenzassay (POS)	Referenzassay (NEG)	GESAMT
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	99	5	104
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
GESAMT	99	201	300
SENSITIVITÄT = 100 % 95%-KI (96,3–100 %) SPEZIFITÄT = 97,5 % 95%-KI (94,3–98,9 %)			

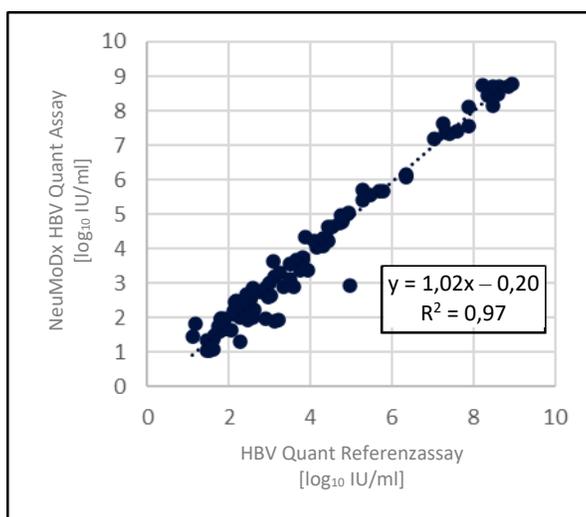


Abbildung 7: Quantitative Methodenkorrelationsstudie mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay

Zusätzliche Tests wurden unter Verwendung von 159 übrig gebliebenen klinischen Plasmaproben auf dem NeuMoDx 96 Molecular System durchgeführt. Wie bei den vorherigen Tests auf dem NeuMoDx 288 wurden die mit dem NeuMoDx 96 erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen von FDA-zugelassenen und/oder CE-gekennzeichneten Assays, welche von Labors für Tests im Rahmen der standardmäßigen Behandlung verwendet werden, verglichen. Die Ergebnisse einschließlich der Wahrheitstabelle mit klinischer Sensitivität und Spezifität sind mit 95%-KI in *Tabelle 17* aufgeführt.

Tabelle 17: Zusammenfassung der klinischen Leistung – NeuMoDx HBV Quant Assay auf dem NeuMoDx 96 Molecular System

	Referenzassay (POS)	Referenzassay (NEG)	GESAMT
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	60	2	62
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	1	95	96
GESAMT	61	97	158
SENSITIVITÄT = 98 % 95%-KI (90–100 %) SPEZIFITÄT = 98 % 95%-KI (92–100 %)			

Serumproben

Die quantitative Leistung des NeuMoDx HBV Quant Assay wurde im Vergleich mit FDA-/CE-zugelassenen Vergleichsassays durch Testen anonymisierter, übrig gebliebener HBV-positiver Serumproben von HBV-infizierten Patienten bewertet. Insgesamt 66 klinische, bekanntermaßen HBV-positive Serumproben, die von zwei unabhängigen Referenzlabors bezogen wurden, wurden intern bei NeuMoDx mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay getestet. Von den getesteten, bekanntermaßen positiven Serumproben ergaben 58 ein positives Ergebnis, während neun (9) Ergebnisse unterhalb der LLoQ und oberhalb der ULoQ des NeuMoDx HBV Quant Assay und/oder des Referenztests lagen. Insgesamt 49 HBV-positive klinische Proben innerhalb des beiden Tests gemeinsamen linearen Bereichs wurden verwendet, um die Regressionsanalysen zur Definition der quantitativen Leistung zu generieren.

Gleichwertigkeits- und Residuenplots wurden generiert, um die mittels Deming- und Passing-Bablok-Regressionsanalyse ermittelte Korrelation zwischen den Konzentrationen des NeuMoDx HBV Quant Assay und den Konzentrationswerten des Referenztests für alle getesteten Proben darzustellen. Diese sind in Abbildung 8 und 9 zu sehen. Die Qualität der Anpassung der Deming-Regression wird durch einen Steigungskoeffizienten von 0,99 mit 95%-KI (0,93, 1,07) und einen Achsenabschnitt (Bias) von -0,22 mit 95%-KI (-0,56, 0,12) illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay und Referenztests erhaltenen Konzentrationsergebnisse hochkorreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen. Die Qualität der linearen Anpassung nach Passing-Bablok wird durch einen Steigungskoeffizienten von 0,99 mit 95%-KI (0,91, 1,06) und einen Achsenabschnitt (Bias) von -0,25 mit 95%-KI (-0,48, 0,06) illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx HBV Quant Assay und Referenztests erhaltenen Konzentrationsergebnisse hochkorreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen, wie in *Tabelle 18* gezeigt.

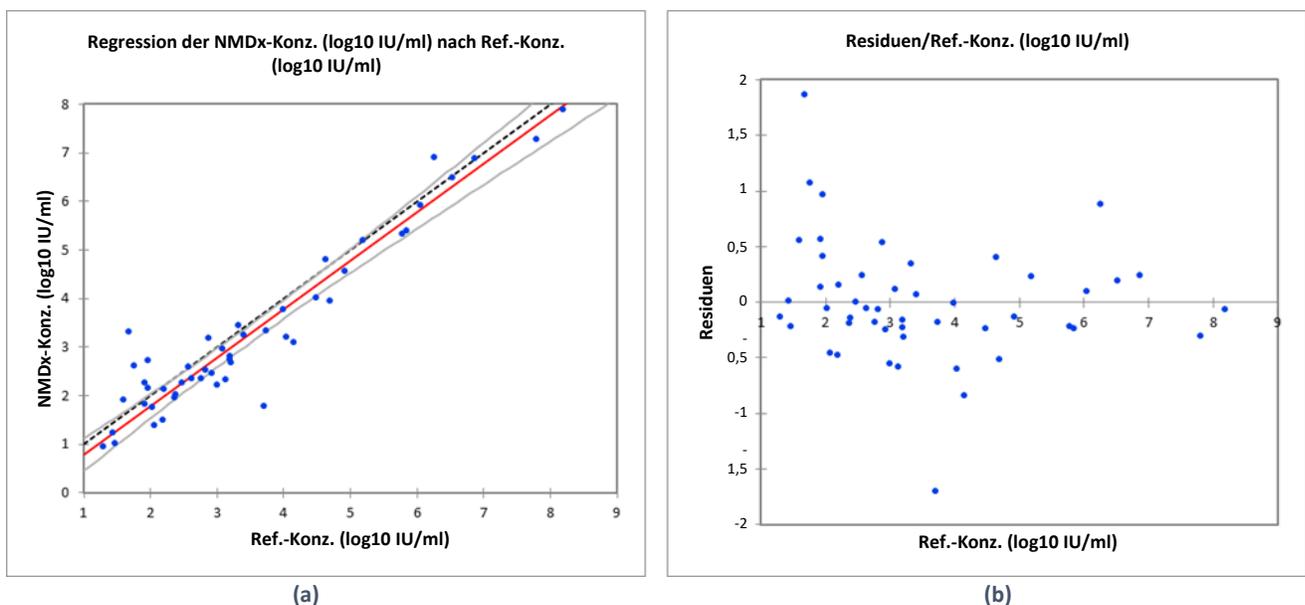


Abbildung 8: Gleichwertigkeits- (a) und Residuenplots (b) – kumulative Analyse des NeuMoDx HBV Tests vs. Referenztests – Deming-Analyse.

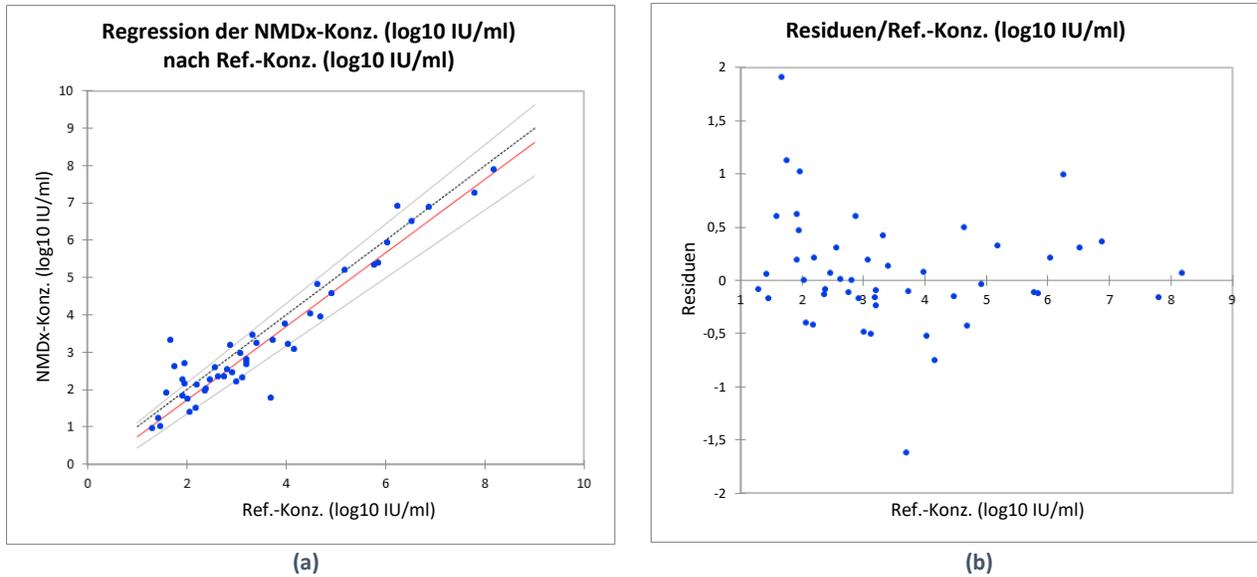


Abbildung 9: Gleichwertigkeits- (a) und Residuenplots (b) – kumulative Analyse der Ergebnisse des NeuMoDx HBV Quant Assay vs. Referenztests – Passing-Bablok-Analyse.

Tabelle 18. Zusammenfassung der linearen Regressionsanalysen nach Deming und Passing-Bablok für Serumproben

Deming-Analyse			Passing-Bablok-Analyse		
Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient	R2	Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient	p-Wert
-0,22 95%-KI (-0,56, 0,12)	0,99 95%-KI (0,93, 1,07)	0,95	-0,25 95%-KI (-0,48, 0,06)	0,99 95%-KI (0,91, 1,06)	0,89

Tests künstlicher Proben – Workflow mit 200 µl Probenvolumen

Die quantitative Korrelation zwischen den Workflows mit 200 µl und 550 µl Probenvolumen wurde anhand eines Panels aus einzelnen, HBV-negativen Plasma- und Serumproben bestätigt, die mit vier bekannten Konzentrationen von auf den 4. internationalen Standard der WHO für HBV-DNA für Nukleinsäuretests rückführbarem HBV-Kontrollmaterial versetzt wurden. Diese einzelnen Plasma- und Serumproben wurden unter Anwendung beider Workflows (550 µl und 200 µl Probenvolumen) in insgesamt 288 Tests verarbeitet. Auf Basis einzelner Proben wurden Vergleiche der Gleichwertigkeit der von der NeuMoDx Software für den 200-µl- und den 550-µl-Workflow gemeldeten Konzentrationen durchgeführt. Die Regressionsanalysen nach Deming und Passing-Bablok hatten eine Steigung von 0,985 bzw. 0,998 mit Achsenabschnitten von -0,001 bzw. 0,053 für Plasma und 1,024 bzw. 1,018 mit Achsenabschnitten von 0,095 bzw. 0,070 für Serum, was eine ausgezeichnete Übereinstimmung der HBV-Quantifizierungen zwischen den beiden Verarbeitungsvolumen demonstriert. Ein Bland-Altman-Vergleich zeigte ein minimales Bias zwischen den beiden Workflows. Zusätzlich ergaben sich für einfache lineare Regressionsanalysen mit der erwarteten und der gemeldeten Konzentration für den 200 µl-Workflow eine Steigung von 1,047 und ein Korrelationskoeffizient von 0,998 (Plasma) bzw. 1,113 und 0,992 (Serum), was die ausgezeichnete Leistung des NeuMoDx HBV Quant Assay bei Anwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen weiter untermauert. Die Ergebnisse dieser Studien sind nachstehend in *Abbildung 10* und *Abbildung 11* zusammengefasst.

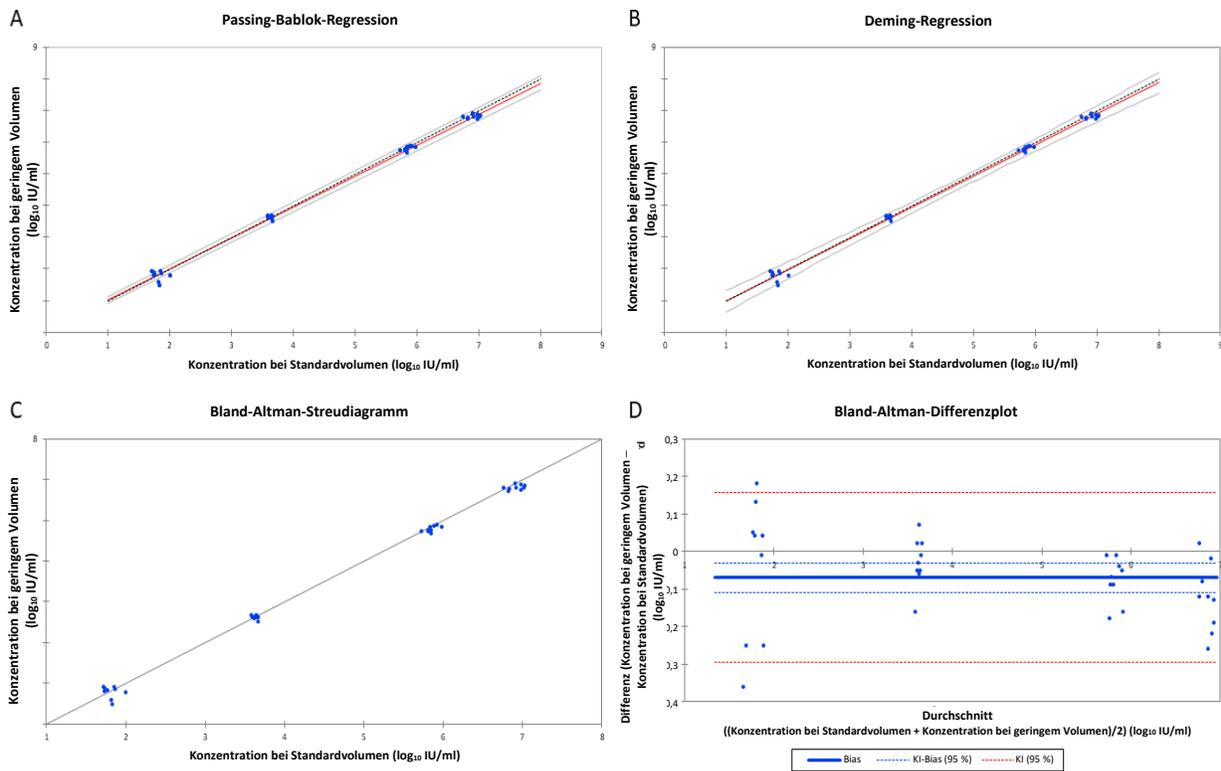


Abbildung 10: Gleichwertigkeitsplots zum Vergleich der bei geringem Volumen gemeldeten Konzentrationen mit den bei Standardprobenvolumen gemeldeten Konzentrationen. A) Passing-Bablok-Regression. B) Deming-Regression. C) Bland-Altman-Streudiagramm D) Bland-Altman-Differenzplot – Plasmaproben

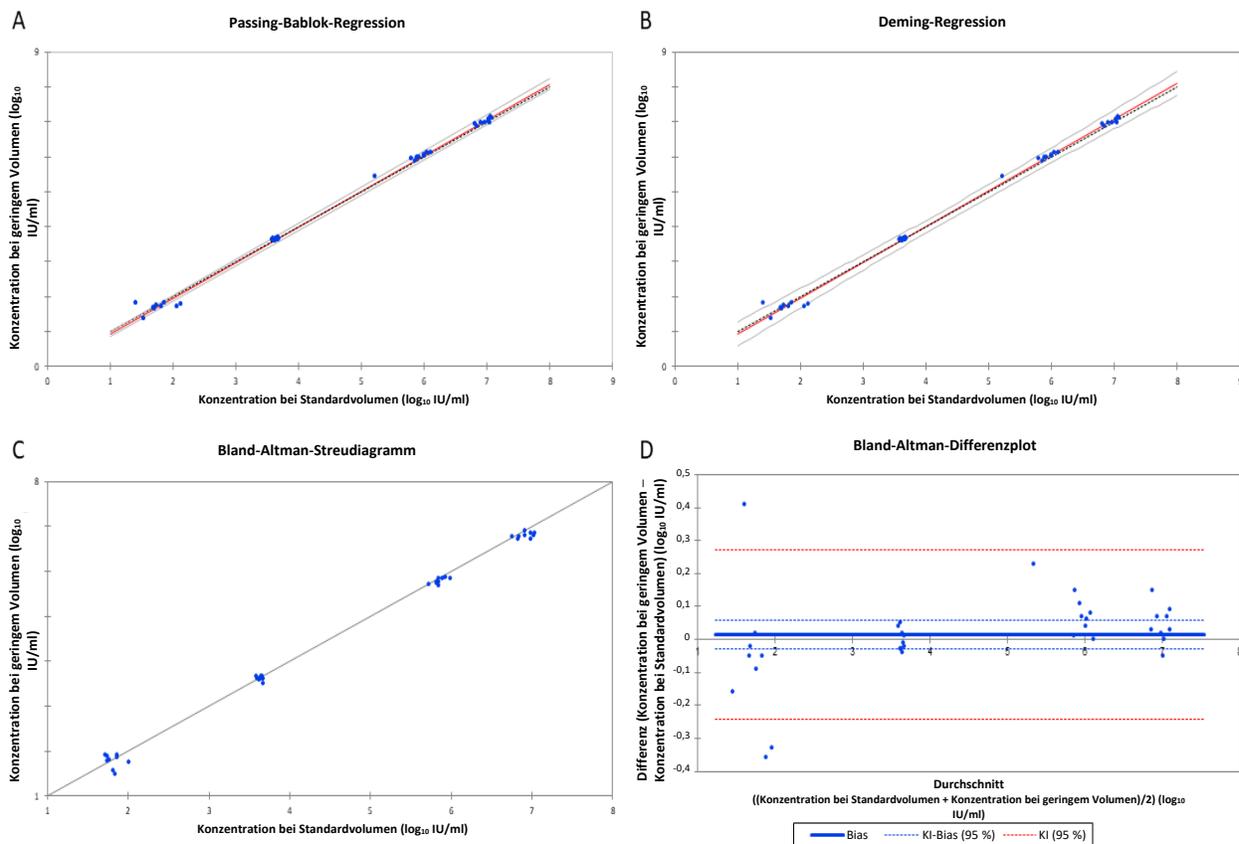


Abbildung 11: Gleichwertigkeitsplots zum Vergleich der bei geringem Volumen gemeldeten Konzentrationen mit den bei Standardprobenvolumen gemeldeten Konzentrationen. A) Passing-Bablok-Regression. B) Deming-Regression. C) Bland-Altman-Streudiagramm D) Bland-Altman-Differenzplot – Serumproben

LITERATUR

1. Mother-to-child transmission of hepatitis B virus in sub-Saharan Africa: time to act. Andersson, Monique I et al. The Lancet Global Health, Volume 3, Issue 7, e358 - e359
2. Schillie S, Vellozzi C, Reingold A, et al. Prevention of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. MMWR Recomm Rep 2018;67(No. RR-1):1–31. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6701a1>.
3. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet. April 2017. <http://www.who.int> (last accessed 20 November 2017)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARKENNAMEN

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

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

SYMBOLSCHLÜSSEL

R only Nur zur Anwendung durch Fachpersonal



Hersteller



In-vitro-Diagnostikum



Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft



Katalognummer



Chargencode



Verfallsdatum



Zulässiger Temperaturbereich



Nicht zur Wiederverwendung



Inhalt ausreichend für $<n>$ Tests



Gebrauchsanweisung beachten



Vorsicht



Biologische Risiken



CE-Kennzeichnung



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

CE 2797

Technischer Support/Vigilanzberichterstattung: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents