

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

**R only**

OPREZ: samo za izvoz u SAD

**IVD** Za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx 288 i NeuMoDx 96 Molecular System

 Za ažurirane upute posjetite stranicu: [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu)

Detaljnije upute potražite u korisničkom priručniku za sustav NeuMoDx 288 Molecular System; br. dijela 40600108

Detaljnije upute potražite u korisničkom priručniku za sustav NeuMoDx 96 Molecular System; br. dijela 40600317

### NAMJENA

Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay automatizirani je, *in vitro* test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za kvantifikaciju RNK virusa hepatitisa C (Hepatitis C Virus, HCV) u ispitcima humane plazme i seruma za određivanje pozitivnih genotipova HCV protutijela od 1 do 6 u osoba zaraženih HCV-om. Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay provedeno na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System i sustavu NeuMoDx 96 Molecular System (sustav(i) NeuMoDx System) uključuje automatiziranu ekstrakciju RNK radi izolacije ciljne nukleinske kiseline iz ispitka i lančanu reakciju polimerazom s reverznom transkriptazom (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) u stvarnom vremenu radi ciljanja vrlo konzerviranih sekvenci u genomu virusa hepatitisa C.

Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay namijenjeno je za pomoć u zbrinjavanju pacijenata s infekcijama HCV-om. Rezultati dobiveni s pomoću ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay moraju se tumačiti u kontekstu svih relevantnih kliničkih i laboratorijskih nalaza. Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay nije namijenjeno za uporabu kao test probira za krv ili krvne pripravke niti za dijagnosticiranje kliničkog statusa infekcije HCV-om.

### SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Za pripremu plazme može se upotrebljavati humana puna krv prikupljena u sterilne epruvete za prikupljanje krvi koje sadrže etilendiamintetraoctenu kiselinu (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) ili kiselu citratnu dekstrozu (Acid Citrate-Dextrose, ACD) kao antikoagulacijska sredstva ili u epruvete za pripremu plazme (Plasma Preparation Tube, PPT), dok bi se serum trebao prikupljati u epruvete za serum ili epruvete za odvajanje seruma (Serum Separation Tube, SST). Kako bi se pripremili za testiranje, plazma ili serum u sekundarnoj epruveti za ispitke ili frakcionirana krv u primarnoj epruveti za ispitak kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se na sustav NeuMoDx System u predviđeni nosač epruveta za ispitke. Za svaki se ispitak alikvot uzorka plazme/seruma miješa s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 3 i sustav NeuMoDx System automatski izvodi sve korake potrebne za ekstrakciju ciljne nukleinske kiseline, pripremu izolirane RNK za RT-PCR amplifikaciju i, ako su prisutni, amplifikaciju i detekciju produkata amplifikacije. Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay cilja dvije vrlo konzervirane regije genoma HCV-a kako bi povećalo otpornost ispitivanja. Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay također uključuje kontrolu obrade uzorka (Sample Process Control, SPC2) RNK za pomoć pri praćenju prisutnosti potencijalno inhibirajućih tvari kao i pogrešaka sustava NeuMoDx System ili reagensa koje se mogu dogoditi tijekom postupka ekstrakcije i amplifikacije.

HCV je jednolančani, pozitivno smisleni RNK virus koji može uzrokovati akutne i kronične infekcije.<sup>1</sup> Trenutačno ne postoje cjepiva za hepatitis C. Dok je akutna infekcija obično asimptomatska i rijetko je se veže uz bolesti opasne po život, u više od polovice osoba zaraženih HCV-om može se razviti kronična infekcija. Kod onih s kroničnom infekcijom HCV-om rizik od ciroze jetre nalazi se u rasponu od 15 – 30 % unutar 20 godina od infekcije. Procjenjuje se da 71 milijun osoba na svijetu boluje od kronične infekcije HCV-om i očekuje se da će se kod značajnog broja njih razviti ciroza ili rak jetre.<sup>2-4</sup> Budući da je riječ o virusu koji se prenosi krvlju, HCV prenosi se prvenstveno putem krvi i krvnih pripravaka. Širokom primjenom testova probira znatno se smanjila učestalost infekcija uzrokovanih doniranom krvlju.<sup>1</sup>

Detekcijom protutijela na HCV nije moguće razlikovati aktivne od preboljenih infekcija. Prema tome algoritmi za laboratorijsko testiranje HCV-a zahtijevaju dijagnozu aktivne infekcije HCV-om kod osoba pozitivnih na protutijela putem detekcije RNK HCV-a u plazmi ili serumu prije samog početka liječenja (ako je to potrebno). Kvantifikacija RNK HCV-a (virusno opterećenje) danas se upotrebljava rutinski pri određivanju i praćenju uspješnog liječenja HCV-a.

Trenutačne smjernice za zbrinjavanje i liječenje infekcija HCV-om preporučuju kvantitativno testiranje RNK HCV-a prije početka antivirusne terapije kako bi se utvrdila osnovna vrijednost te nakon 12 tjedana ili više po završetku liječenja. Ponekad se preporučuju dodatne vremenske točke. Trajni virološki odgovor (Sustained Virological Response, SVR) cilj je liječenja HCV-a i definira se kao RNK HCV-a koja se ne može detektirati (ispitivanjem koje ima granicu detekcije od < 25 IU/ml) nakon liječenja.<sup>5-7</sup> Nedavne smjernice Američke udruge za istraživanje bolesti jetre (American Association for the Study of Liver Diseases) preporučuju testiranje RNK HCV-a ne samo na početku liječenja, već i povremeno tijekom liječenja (npr. nakon 4 tjedna) te 12 tjedana nakon završetka liječenja. Testovi za detekciju RNK HCV-a, u kombinaciji sa serološkim testovima, upotrebljavaju se za utvrđivanje aktivne infekcije HCV-om.<sup>6</sup>

### NAČELA POSTUPKA

Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay kombinira automatiziranu ekstrakciju RNK, amplifikaciju i detekciju izvođenjem RT-PCR-a u stvarnom vremenu. Ispitci pune krvi prikupljaju se u epruvete s EDTA-om ili ACD-om ili PPT epruvete radi pripreme plazme i/ili u SST epruvete radi pripreme seruma. Ispitak primarne (frakcionirane) krvi ili alikvot plazme/seruma u kompatibilnoj sekundarnoj epruveti za ispitak označuje se crtičnim kodom i postavlja na sustav NeuMoDx System. Sustav NeuMoDx System automatski aspirira alikvot plazme/seruma kako bi ga pomiješao s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 3 i agensima sadržanima u pločici NeuMoDx Extraction Plate za početak obrade. Sustav NeuMoDx System automatizira i integrira ekstrakciju i koncentraciju RNK, pripremu reagensa i amplifikaciju/detekciju nukleinske kiseline ciljnih sekvenci primjenom RT-PCR-a u stvarnom vremenu. Uključena kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC2) pomaže u praćenju prisutnosti inhibirajućih tvari i grešaka sustava, postupka ili reagensa. Jednom kada je ispitak postavljen na sustav NeuMoDx System, intervencija korisnika nije potrebna.

Za automatsko provođenje lize i ekstrakcije RNK te za uklanjanje inhibitora sustav NeuMoDx System upotrebljava se kombinacijom topline, litičkog enzima i ekstrakcijskih reagensa. Paramagnetske čestice hvataju oslobođene nukleinske kiseline. Čestice s vezanom nukleinskom kiselinom postavljaju se u uložak NeuMoDx Cartridge gdje se nevezani elementi ispiru s pomoću reagensa NeuMoDx Wash Reagent. Vezana RNK zatim se eluira s pomoću reagensa NeuMoDx Release Reagent. U sustavu NeuMoDx System eluirana RNK se upotrebljava za rehidraciju patentiranih NeuDry™ reagensa za amplifikaciju koji sadrže sve elemente neophodne za amplifikaciju ciljnih sekvenci virusa HCV i SPC2. To omogućava istovremenu amplifikaciju i detekciju ciljnih sekvenci i kontrolnih RNK sekvenci. Nakon rekonstitucije suhih reagensa za RT-PCR, sustav NeuMoDx System pipetira pripremljenu mješavinu za RT-PCR u jednu PCR komoru (po ispitku) uložka NeuMoDx Cartridge. Reverzna transkripcija, amplifikacija i detekcija kontrolnih i ciljnih sekvenci (ako su prisutne) odvija se u PCR komori. Uložak NeuMoDx Cartridge osmišljen je da zadrži amplikon nakon PCR-a i na taj način gotovo ukloni rizik od kontaminacije nakon amplifikacije.

Amplificirane ciljne sekvence detektirane su u stvarnom vremenu s pomoću kemijskog protokola na temelju proba za hidrolizu (obično se naziva TaqMan® kemijski protokol) u kojem se upotrebljavaju fluorogene oligonukleotidne molekularne probe specifične za amplikone odgovarajućih ciljnih sekvenci. TaqMan probe sastoje se od fluorokroma kovalentno vezanog na 5' kraj oligonukleotidne probe i prigušivača na 3' kraju. Dok je proba netaknuta, fluorokrom i prigušivač nalaze se u blizini, zbog čega molekula prigušivača suzbija fluorescenciju koju fluorokrom emitira putem Försterova prijenosa rezonantne energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

TaqMan probe osmišljene su za sparivanje unutar regije DNK amplificirane određenim kompletom početnica. Kako DNK polimeraza Taq produžuje početnicu i sintetizira novi lanac, 5' do 3' egzokleazna aktivnost DNK polimeraze Taq degradira probu sparenu s predložkom. Degradacijom probe oslobađa se fluorokrom i prekida se njegova blizina prigušivaču, čime se zbog FRET-a prevladava učinak prigušivanja i omogućava detekcija fluorokroma. Dobiveni fluorescentni signal detektiran u kvantitativnom RT-PCR termocikleru sustava NeuMoDx System izravno je proporcionalan oslobođenom fluorokromu i može se korelirati s količinom prisutne ciljne sekvence.

TaqMan proba označena fluorokromom (pobuda: 490 nm i emisija: 521 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju upotrebljava se za detekciju RNK bakterije HCV. Za detekciju SPC2, TaqMan proba označena je drugom fluorescentnom bojom (pobuda: 535 nm i emisija: 556 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju. Softver sustava NeuMoDx System prati fluorescentni signal koji emitiraju TaqMan probe na kraju svakog ciklusa amplifikacije. Kada amplifikacija završi, softver sustava NeuMoDx System analizira podatke i izvještava konačni rezultat (POSITIVE (POZITIVNO) / NEGATIVE (NEGATIVNO) / INDETERMINATE (NEODREĐENO) / UNRESOLVED (NERAZRIJEŠENO) / NO RESULT (NEMA REZULTATA)). Ako je rezultat pozitivan i izračunata koncentracija je unutar granica kvantifikacije, softver sustava NeuMoDx System također daje kvantitativnu vrijednost koja se odnosi na uzorak.

### REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

#### Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Jedinica po pakiranju	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
300300	<b>Testna traka NeuMoDx HCV Quant Test Strip</b> <i>Suhi reagensi za RT-PCR koji sadrže probe i početnice TaqMan specifične za HCV i SPC2</i>	6	16	96

#### Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni (mogu se naručiti zasebno od tvrtke NeuMoDx)

REF.	Sadržaj
100200	<b>Pločica NeuMoDx Extraction Plate</b> <i>Suhe paramagnetske čestice, litički enzim i kontrole obrade uzorka</i>
800200 ili 800202	<b>Kalibratori NeuMoDx HCV Calibrators</b> <i>Kompleti kalibratora za HCV visoke i niske razine za jednokratnu uporabu za utvrđivanje valjanosti kalibracijske krivulje</i>
900201 ili 900202	<b>Kontrole NeuMoDx HCV External Controls</b> <i>Kompleti pozitivnih i negativnih kontrola za HCV za jednokratnu uporabu</i>
400600	<b>Pufer NeuMoDx Lysis Buffer 3</b>
400100	<b>Reagens NeuMoDx Wash Reagent</b>
400200	<b>Reagens NeuMoDx Release Reagent</b>
100100	<b>Uložak NeuMoDx Cartridge</b>
235903	<b>Vršci s filtrima (300 µl) Hamilton CO-RE / CO-RE II</b>
235905	<b>Vršci s filtrima (1000 µl) Hamilton CO-RE / CO-RE II</b>

#### Potrebni instrumenti

Sustav NeuMoDx 288 Molecular System [REF. 500100] ili sustav NeuMoDx 96 Molecular System [REF. 500200]



### UPOZORENJA I MJERE OPREZA

- Testna traka NeuMoDx HCV Quant Test Strip namijenjena je samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx System.
- Ne upotrebljavajte reagens ili potrošni materijal nakon navedenog datuma isteka roka trajanja.
- Ne upotrebljavajte reagens ako je zaštitna folija potrgana ili ako je pakiranje oštećeno po dolasku.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal ili reagens ako je zaštitna vrećica otvorena ili oštećena pri dolasku.
- Valjana kalibracija testa (dobivena obradom kalibratora visoke i niske razine iz kompleta kalibratora NeuMoDx HCV Calibrators) mora biti dostupna prije dobivanja rezultata testa za kliničke uzorke.
- Kontrole NeuMoDx HCV External Controls moraju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay.
- Minimalni volumen ispitka sekundarnih alikvota ovisi o veličini epruvete, nosaču epruveta za ispitke i volumenu ispitka koji se obrađuje kako je navedeno u nastavku. Volumen manji od navedenog minimuma može rezultirati pogreškom „Quantity Not Sufficient” (Nedovoljna količina).
- Uporaba ispitaka koji su se čuvali pri neprikladnim temperaturama ili dulje od navedenog vremena pohrane može dati nevažne ili pogrešne rezultate.
- Uvijek izbjegavajte kontaminaciju svih reagensa i potrošnih materijala mikroorganizmima i ribonukleazama (RNaza). Prilikom uporabe sekundarnih epruveta za ispitke preporučuje se uporaba sterilnih jednokratnih pipeta za prijenos bez RNaze. Za svaki ispitak upotrebljavajte novu pipetu.
- Kako biste izbjegli kontaminaciju, ne rukujte uloškom NeuMoDx Cartridge i ne rastavljajte ga nakon amplifikacije. Nemojte vaditi uloške NeuMoDx Cartridges iz spremnika za biološki opasan otpad (NeuMoDx 288 Molecular System) ili koša za biološki otpad (NeuMoDx 96 Molecular System) ni u kojem slučaju. Uložak NeuMoDx Cartridge osmišljen je za sprječavanje kontaminacije.
- U slučajevima kada se u laboratoriju provode PCR testovi na otvorenim epruvetama, potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije testne trake NeuMoDx HCV Quant Test Strip, dodatnog potrošnog materijala i reagensa potrebnih za testiranje, osobne zaštitne opreme poput rukavica i laboratorijskih kuta te sustava NeuMoDx System.
- Pri rukovanju reagensima i potrošnim materijalom NeuMoDx potrebno je nositi čiste nitrilne rukavice bez pudera. Pazite da ne dodirujete gornju površinu uloška NeuMoDx Cartridge, površinu folije testne trake NeuMoDx HCV Quant Test Strip i pločice NeuMoDx Extraction Plate te gornju površinu pufera NeuMoDx Lysis Buffer 3; pri rukovanju potrošnim materijalom i reagensima smiju se dodirivati samo bočne površine.
- Sigurnosno-tehnički listovi (Safety Data Sheets, SDS) dostupni su (prema potrebi) za svaki reagens na [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu)
- Nakon izvođenja testa temeljito operite ruke.
- Ne pipetirajte ustima. Ne pušite, ne konzumirajte hranu i piće u područjima u kojima se rukuje ispitcima ili reagensima.
- Ispitcima uvijek rukujte kao da su infektivni te u skladu sa sigurnim laboratorijskim postupcima poput onih opisanih u *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>8</sup> i dokumentu M29-A4 instituta CLSI.<sup>9</sup>
- Odložite nekorištene reagens i otpad u skladu s državnim, saveznim, pokrajinskim i lokalnim propisima.
- Nije za ponovnu uporabu.



### POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

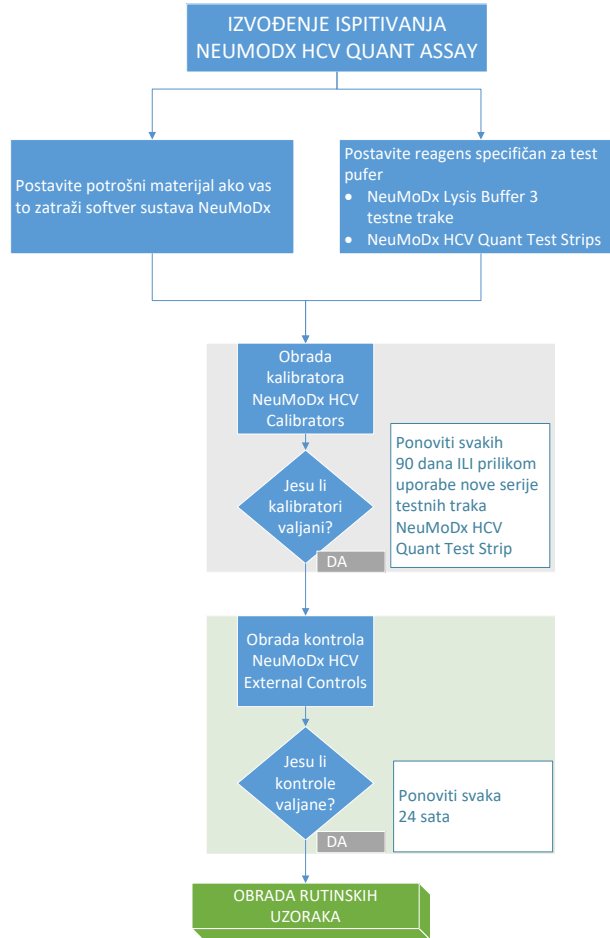
- Testne trake NeuMoDx HCV Quant Test Strips stabilne su u primarnom pakiranju do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci proizvoda kada se čuvaju na temperaturi od 4 do 28 °C.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal i reagens nakon datuma isteka roka trajanja.
- Ne upotrebljavajte bilo koji proizvod za testiranje ako je primarno ili sekundarno pakiranje vidljivo oštećeno.
- Nemojte ponovno postavljati nikakve proizvode za testiranje koji su prethodno bili postavljeni na drugi sustav NeuMoDx System.
- Nakon postavljanja testna traka NeuMoDx HCV Quant Test Strip može ostati na sustavu NeuMoDx System do 14 dana. Softver prati preostali uporabni vijek postavljenih testnih traka i obavještava korisnika u stvarnom vremenu. Sustav će zatražiti uklanjanje testne trake koja se upotrebljava dulje od dopuštenog razdoblja.

### PRIKUPLJANJE, PRIJEVOZ I POHRANA ISPITAKA

1. Rukujte svim ispitcima, kalibratorima i kontrolama kao da mogu prenijeti infektivne agense.
2. Nemojte zamrzavati punu krv ni bilo kakve ispitke pohranjene u primarnim epruvetama.
3. Za pripremu ispitaka plazme punu krv treba prikupiti u sterilne epruvete uz primjenu antikoagulansa EDTA ili ACD ili u epruvete za pripremu plazme (Plasma Preparation Tubes, PPT). Slijedite upute proizvođača epruvete za prikupljanje ispitaka o pripremi i pohrani.
4. Za pripremu ispitaka seruma punu krv treba prikupiti u epruvete za serum ili SST epruvete. Slijedite upute proizvođača epruvete za prikupljanje ispitaka o pripremi i pohrani.

5. Ispitci se mogu testirati u primarnim epruветama za prikupljanje ili sekundarnim epruветama za ispitke. Preporučeno za testiranje primarnih epruветa:
  - a. Ispitci plazme: epruвета BD Vacutainer® Plus Plastic K<sub>2</sub>EDTA Tube (BD #368589) ili epruвета BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
  - b. Ispitci seruma: epruвета BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) ili epruвета BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
6. Pripremljeni ispitci mogu biti pohranjeni na sustavu NeuMoDx System do 8 sati prije obrade. Ako je potrebno dodatno vrijeme pohrane, preporučuje se stavljanje ispitaka u hladnjak ili zamrzavanje u obliku sekundarnih alikvota.
7. Pripremljeni ispitci do testiranja moraju biti pohranjeni na temperaturi od 2 – 8 °C najviše 7 dana i na sobnoj temperaturi najviše 8 sati.
8. Pripremljeni ispitci u sekundarnim epruветama mogu se pohraniti na temperaturi ≤ -20 °C do 24 tjedna prije obrade; zamrznuti uzorci ne bi trebali proći više od dva (2) ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije uporabe.
  - a. Ispitci plazme koji su zamrznuti i podvrgnuti jednom (1) ciklusu zamrzavanja/odmrzavanja mogu se čuvati na sustavu dodatnih 8 sati.
  - b. Ispitci plazme koji su zamrznuti i podvrgnuti dvama (2) ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja ne bi se trebali čuvati na sustavu dulje od 4 sata.
  - c. Ispitci seruma koji su zamrznuti i podvrgnuti jednom (1) ili dvama (2) ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja moraju se testirati odmah nakon odmrzavanja.
  - d. Ako su uzorci zamrznuti, ostavite ih da se u potpunosti odmrznu dok ne dosegnu sobnu temperaturu (15 – 30 °C); promiješajte na vorteks miješalici za dobivanje ravnomjerno raspodijeljenog uzorka.
  - e. Zamrzavanje plazme/seruma u primarnim epruветama za prikupljanje se ne preporučuje.
9. Ako se ispitci otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.
10. Jasno označite ispitke i naznačite da su ispitci za testiranje na HCV.
11. Nastavite s odjeljkom *Priprema testa*.

Sažetak sveukupnog postupka izvođenja ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay prikazan je na *slici 1* u nastavku.



Slika 1: Tijek rada izvođenja ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay

## UPUTE ZA UPOTREBU

### Priprema za test

Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay može se izvoditi izravno iz primarnih epruveta za prikupljanje krvi ili iz alikvota ispitaka u sekundarnim epruvetama. Obrada se može vršiti primjenom jednog od dvaju tijekom rada obrade volumena ispitaka – tijekom rada za volumen ispitka od 550  $\mu$ l ili tijekom rada za volumen ispitka od 200  $\mu$ l.

1. Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom za ispitak na epruvetu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System. Primarna epruveta za prikupljanje krvi može se označiti i postaviti izravno na nosač epruveta za ispitke za 32 epruvete nakon centrifugiranja prema uputama proizvođača. Također, alikvot plazme može se prenijeti u sekundarnu epruvetu za obradu na sustavu NeuMoDx System.
2. Ako ispitak testirate u primarnoj epruveti za prikupljanje, postavite epruvetu označenu crtičnim kodom u nosač epruveta za ispitke i pobrinite se da uklonite čep prije postavljanja na sustav NeuMoDx System. Minimalni volumeni **iznad** sloja leukocita i trombocita definirani su u nastavku i bit će zadovoljeni ako se ispitci prikupe i obrade u skladu s uputama proizvođača epruveta. Radni učinak nije zajamčen za ispitke koji su prikupljeni nepravilno.

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

3. Ako se upotrebljava sekundarna epruveta:
  - a. Ispitak nježno promiješajte na vorteks miješalici za postizanje ravnomjerne raspodjele
  - b. S pomoću pipete za prijenos za svaki ispitak prenesite alikvot plazme ili seruma u epruvetu za ispitak s crtičnim kodom kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System u skladu s volumenima definiranim u nastavku:

Nosač epruvete za ispitak	Veličina epruvete	Minimalni potreban volumen ispitka	
		Tijek rada za 550 µl	Tijek rada za 200 µl
<b>32-Tube Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke za 32 epruvete)</b>	promjer 11 – 14 mm, visina 60 – 120 mm	700 µl	400 µl
<b>24-Tube Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke za 24 epruvete)</b>	promjer 14,5 – 18 mm, visina 60 – 120 mm	1100 µl	800 µl
<b>Low Volume Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke malog volumena)</b>	epruveta od 1,5 ml za mikrocentrifugu sa stožastim dnom	650 µl	300 µl

- c. Pripazite da ne prenesete nikakve ugruške iz uzorka u epruvetu za ispitke.

### Rad sustava NeuMoDx System

Detaljnije upute potražite u korisničkim priručnicima za sustave NeuMoDx 288 i 96 Molecular System (br. dijelova 40600108 i 40600317)

1. Učitajte nalog za test u sustav NeuMoDx System prema željenoj vrsti tijeka rada za određeni volumen ispitka i željenoj vrsti epruvete za ispitak.
  - volumen ispitka od 550 µl testira se definiranjem vrste ispitka kao „**Plasma**” (Plazma) ili „**Serum**”
  - volumen ispitka od 200 µl testira se definiranjem vrste ispitka kao „**Plasma2**” (Plazma2) ili „**Serum2**”
  - Ako nije definirano u nalogu za test, prema zadanim se postavkama upotrebljava vrsta ispitka **Plasma** (Plazma) u epruveti **Secondary Tube** (Sekundarna epruveta).
2. Popunite jedan ili više nosača NeuMoDx System Test Strip carrier(s) testnim trakama NeuMoDx HCV Quant Test Strip(s) i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač/e testnih traka u sustav NeuMoDx System.
3. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, u nosače potrošnog materijala sustava NeuMoDx System dodajte potreban potrošni materijal i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač/e u sustav NeuMoDx System.
4. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, zamijenite reagense NeuMoDx Wash Reagent i NeuMoDx Release Reagent te prema potrebi ispraznite otpad od ispiranja, spremnik za biološki opasan otpad (samo za sustav NeuMoDx 288 Molecular System), koš za otpad za vrške (samo za sustav NeuMoDx 96 Molecular System) ili koš za biološki otpad (samo za sustav NeuMoDx 96 Molecular System).
5. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, prema potrebi obradite kalibratore NeuMoDx HCV Calibrators i/ili kontrole NeuMoDx HCV External Controls. Dodatne informacije o kalibratorima i kontrolama možete pronaći u odjeljku *Obrada rezultata*.
6. Postavite epruvetu/e s ispitkom/kalibratorom/kontrolom u nosač epruveta za ispitke i pobrinite se da uklonite čepove sa svih epruveta.
7. Postavite nosač(e) epruveta za ispitke na policu za automatsko postavljanje i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač(e) u sustav NeuMoDx System. To će pokrenuti obradu postavljenih ispitaka za identificirane testove ako u sustavu postoji valjani nalog za test.

### OGRANIČENJA

1. Testna traka NeuMoDx HCV Quant Test Strip može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx Systems.
2. Radni učinak testne trake NeuMoDx HCV Quant Test Strip utvrđen je za ispitke plazme pripremljene s antikoagulansom EDTA/ACD ili ispitke seruma pripremljene u epruvetama za odvajanje seruma. Uporaba testne trake NeuMoDx HCV Quant Test Strip s drugim izvorima nije procijenjena i radne značajke za ostale vrste ispitaka nisu poznate.
3. Radni učinak testne trake NNeuMoDx HCV Quant Test Strip utvrđen je za testiranje primarnih epruveta s pomoću epruveta BD Vacutainer Plus Plastic K<sub>2</sub>EDTA Tubes, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tubes, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tubes i BD Vacutainer SST Tubes.
4. Rukovanje ispitcima koje nije u skladu s uvjetima pohrane može negativno utjecati na kvantitativnu točnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay, ali je mala vjerojatnost da će utjecati na kvalitativnu (pozitivnu/negativnu) stopu rezultata.
5. Pohrana ispitaka seruma na sustavu nakon dulje pohrane u zamrznutom stanju i podvrgavanja dvama ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja bez provođenja testiranja odmah nakon odmrzavanja može negativno utjecati na kvantitativnu točnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay.
6. Malo povećanje granice detekcije i niža granica kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay zabilježeni su tijekom primjene tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl.
7. Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay ne smije se upotrebljavati s uzorcima heparinizirane humane krvi.
8. Budući da detekcija HCV-a ovisi o broju ciljnih virusnih čestica RNK prisutnih u uzorku, pouzdani rezultati ovise o propisnom prikupljanju, rukovanju i pohrani ispitaka.
9. Kalibratori NeuMoDx HCV Calibrators i kontrole NeuMoDx HCV External Controls moraju se obraditi prema preporukama na uputama proizvoda kada to zatraži softver sustava NeuMoDx System prije obrade rutinskih kliničkih uzoraka.
10. Pogrešni rezultati mogu se pojaviti zbog nepropisnog prikupljanja, rukovanja i pohrane ispitaka, tehničke pogreške ili pogrešne identifikacije epruvete za ispitke. Dodatno, lažno negativni rezultati javljaju se jer je broj virusnih čestica u uzorku niži od granice detekcije ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay.
11. Rad na sustavu NeuMoDx System ograničen je na osoblje obučeno za uporabu sustava NeuMoDx System.
12. Ako ne dođe do amplifikacije ciljne sekvence HCV-a i ciljne sekvence SPC2, prijavljuje se nevažeći rezultat (Indeterminate (Neodređeno), No Result (Nema rezultata) ili Unresolved (Nerazriješeno)) te je potrebno ponoviti test.
13. Ako ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay ima rezultat Positive (Pozitivno), ali je vrijednost kvantifikacije izvan granica kvantifikacije, sustav NeuMoDx System prijavit će je li detektirani HCV *ispod* donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ili *iznad* gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
14. U slučaju da je detektirani HCV *ispod* donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay može se (po želji) ponoviti s drugim alikvotom ispitka.
15. U slučaju da je detektirani HCV *iznad* gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay može se ponoviti s razrijeđenim alikvotom originalnog ispitka. Preporučuje se razrjeđenje u omjeru 1:100 ili 1:1000 plazmom negativnom na HCV ili diluansom Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Koncentracija originalnog ispitka računa se kako slijedi:  
$$\text{koncentracija originalnog ispitka} = \log_{10}(\text{faktor razrjeđivanja}) + \text{prijavljena koncentracija razrijeđenog uzorka}$$
16. Povremena prisutnost inhibitora PCR-a u plazmi i serumu može uzrokovati kvantifikacijsku pogrešku sustava. Ako do toga dođe, preporučuje se ponoviti test s istim ispitkom razrijeđenim diluansom Basematrix u omjeru 1:10 ili 1:100.
17. Pozitivan rezultat ne naznačava nužno prisutnost vijabilnih organizama. Međutim, pozitivan rezultat upućuje na vjerojatnu prisutnost RNK virusa hepatitisa C.
18. Delecije ili mutacije u konzerviranim regijama koje su ciljane ispitivanjem NeuMoDx HCV Quant Assay mogu utjecati na detekciju ili mogu dovesti do pogrešnih rezultata kada se upotrebljava testna traka NeuMoDx HCV Quant Test Strip.
19. Rezultati ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay trebaju se upotrebljavati kao dodatak kliničkim opažanjima i drugim informacijama koje su liječniku dostupne; test nije namijenjen dijagnosticiranju infekcije.
20. Preporučuje se dobra laboratorijska praksa, uključujući mijenjanje rukavica između rukovanja ispitcima pacijenata, kako bi se izbjegla kontaminacija.

### OBRADA REZULTATA

Dostupni rezultati mogu se pregledavati ili ispisivati s kartice „Results“ (Rezultati) u prozoru Results (Rezultati) na zaslonu osjetljivom na dodir sustava NeuMoDx System. Rezultate ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay automatski generira softver sustava NeuMoDx System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx HCV (HCV Assay Definition File, HCV ADF). Rezultat se može prijaviti kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom HCV-a, Positive (Pozitivno) iznad ULoQ-a, Positive (Pozitivno) ispod LLoQ-a, Indeterminate (IND) (Neodređeno), Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ili No Result (NR) (Nema rezultata) na temelju statusa amplifikacije ciljne sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultati se prijavljuju na temelju algoritma odlučivanja u ADF-u, koji je sažet u nastavku u *tablici 1*.

**Tablica 1.** Sažetak algoritma odlučivanja ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay

REZULTAT	Ciljna sekvenca HCV-a	Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC2)	Tumačenje rezultata
<b>Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom</b>	Amplified (Amplificirano) $0,9 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 550 $\mu\text{l}$ ) $1,5 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 200 $\mu\text{l}$ )	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	RNK HCV-a detektiran unutar kvantitativnog raspona
<b>Positive (Pozitivno), iznad ULoQ-a</b>	Amplified (Amplificirano) [HCV] > 8,2 $\log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	RNK HCV-a detektiran iznad kvantitativnog raspona
<b>Positive (Pozitivno), ispod LLoQ-a</b>	Amplified (Amplificirano) [HCV] < 0,9 $\log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 550 $\mu\text{l}$ ) [HCV] < 1,5 $\log_{10} \text{ IU/ml}$ (tijek rada za 200 $\mu\text{l}$ )	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	RNK HCV-a detektiran ispod kvantitativnog raspona
<b>Negative (Negativno)</b>	Not Amplified (Nije amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	RNK HCV-a nije detektiran
<b>Indeterminate (Neodređeno)</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka završena)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeći; ponovno testirajte uzorak†
<b>No Result (Nema rezultata)*</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka prekinuta)		Obrada uzorka je prekinuta; ponovno testirajte uzorak†
<b>Unresolved (Nerazriješeno)</b>	Not Amplified (Nije amplificirano), No System Error Detected (Nema uočenih pogrešaka sustava)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeći; ponovno testirajte uzorak†

\*Oznaka No Result (Nema rezultata) prijavljuje se samo u inačicama softvera sustava NeuMoDx System 1.8 i novijima.

†Sustav NeuMoDx System opremljen je automatskom opcijom Rerun (Ponovna obrada) / Repeat (Ponavlanje testa) koju krajnji korisnik može odabrati kako bi osigurao da se rezultat IND/UNR/NR automatski ponovno obradi kako bi se minimizirala kašnjenja u izvještavanju rezultata.

### Izračun testa

- Za uzorke unutar raspona kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay koncentracija RNK HCV-a u uzorcima računa se s pomoću pohranjene standardne krivulje u kombinaciji s koeficijentom kalibracije i volumenom ispitka.
  - Koeficijent kalibracije izračunava se na temelju rezultata dobivenih kalibratorima NeuMoDx HCV Calibrators koji su obrađeni kako bi se utvrdila valjanost standardne krivulje za danu seriju testne trake NeuMoDx HCV Quant Test Strip na određenom sustavu NeuMoDx System.
  - Koeficijent kalibracije uključen je u konačno određivanje koncentracije RNK HCV-a.
  - Softver sustava NeuMoDx uzima u obzir ulazni volumen ispitka prilikom određivanja koncentracije RNK HCV-a po ml ispitka.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay izraženi su u  $\log_{10} \text{ IU/ml}$ .
- Dobivena kvantifikacija nepoznatih uzoraka sljediva je do 5. Međunarodnog standarda za HCV SZO-a.

### Kalibracija testa

Valjana kalibracija na temelju standardne krivulje neophodna je za kvantifikaciju RNK HCV-a u ispitcima. Za dobivanje valjanih rezultata kalibracija testa mora se obaviti s pomoću vanjskih kalibratora koje isporučuje tvrtka NeuMoDx Molecular, Inc.

### kalibratori

- Komplet kalibratora NeuMoDx HCV Calibrators treba se obraditi sa svakom novom serijom testnih traka NeuMoDx HCV Quant Test Strips ako se nova datoteka definicije ispitivanja za HCV učita na sustav NeuMoDx System, ako je trenutačno postavljeni komplet kalibratora premašio razdoblje valjanosti (trenutačno postavljeno na 90 dana) ili ako je softver sustava NeuMoDx System izmijenjen.
- Softver sustava NeuMoDx System obavijestit će korisnika kada treba obraditi kalibratore. Nova serija testnih traka ne može se upotrebljavati dok kalibratori nisu uspješno obrađeni.



3. Valjanost kalibracije određuje se na sljedeći način:
  - a) Komplet koji sadrži dva kalibratora – jedan (1) visoke i jedan (1) niske razine – treba obraditi kako bi se utvrdila valjanost.
  - b) Najmanje dva (2) od tri (3) ponavljanja moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara. Nominalna ciljna vrijednost kalibratora niske razine iznosi  $3 \log_{10}$  IU/ml, a nominalna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi  $5 \log_{10}$  IU/ml.
  - c) Koeficijent kalibracije izračunat je kako bi se ispravila očekivana varijacija između serija testnih traka. Taj se koeficijent kalibracije upotrebljava pri određivanju konačne koncentracije HCV-a.
4. Ako provjera valjanosti nije uspjela za jedan ili oba kalibratora, ponovite obradu neuspjelog/ih kalibratora primjenom nove bočice. U slučaju neuspjele provjere valjanosti jednog kalibratora, moguće je ponoviti obradu samo neuspjelog kalibratora jer sustav od korisnika ne zahtijeva ponovnu obradu oba kalibratora.
5. Ako provjera valjanosti kalibratora uzastopno ne uspije, obratite se tvrtki NeuMoDx Molecular, Inc.

### Kontrola kvalitete

Lokalni propisi obično navode da je laboratorij odgovoran za postupke kontrole kojima se prati točnost i preciznost cijelog analitičkog postupka te da mora utvrditi broj, vrstu i učestalost primjene materijala za kontrolu testa s pomoću provjerenih specifikacija radnog učinka za nemodificirani, odobreni sustav testa.

### Vanjske kontrole

1. Pozitivne i negativne vanjske kontrole trebaju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay. Ako nema rezultata kompleta valjanih vanjskih kontrola, softver sustava NeuMoDx System od korisnika će zatražiti da obradi kontrole prije nego što se mogu iskazati rezultati za uzorak.
2. Valjanost vanjskih kontrola procijenit će se na sustavu NeuMoDx System na temelju očekivanih rezultata. Pozitivna kontrola trebala bi dati rezultat Positive (Pozitivno) na HCV, a negativna kontrola trebala bi dati rezultat Negative (Negativno) na HCV.
3. U slučaju nepodudarnih rezultata vanjskih kontrola treba postupiti na sljedeći način:
  - a) Rezultat testiranja Positive (Pozitivno) prijavljen za negativan kontrolni uzorak ukazuje na problem kontaminacije ispitka.
  - b) Rezultat testiranja Negative (Negativno) prijavljen za pozitivan kontrolni uzorak može ukazivati na problem povezan s reagensima ili instrumentom.
  - c) U bilo kojem od gore navedenih slučajeva ili u slučaju rezultata Indeterminate (IND) (Neodređeno) ili No Result (NR) (Nema rezultata) ponovite obradu kontrola NeuMoDx HCV External Controls sa svježim bočicama kontrole/a čije testiranje valjanosti nije uspjelo.
  - d) Ako se za pozitivnu kontrolu NeuMoDx HCV External Control i dalje dobiva rezultat Negative (Negativno), obratite se tehničkoj službi tvrtke NeuMoDx.
  - e) Ako se za negativnu kontrolu NeuMoDx HCV External Control i dalje dobiva rezultat Positive (Pozitivno), pokušajte ukloniti sve izvore potencijalne kontaminacije, što uključuje zamjenu svih reagensa, prije nego što se obratite tehničkoj službi tvrtke NeuMoDx.

### Kontrole obrade uzorka (unutarnje)

Egzogena kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC2) uključena je u pločicu NeuMoDx Extraction Plate i podvrgnuta cijelom postupku ekstrakcije nukleinske kiseline i RT-PCR amplifikacije u stvarnom vremenu sa svakim uzorkom. Početnice i proba specifične za SPC2 također su uključene u svaku testnu traku NeuMoDx HCV Quant Test Strip što omogućuje detekciju prisutnosti SPC2 zajedno s ciljnom RNK HCV-a (ako je prisutna) putem multipleksnog RT-PCR-a u stvarnom vremenu. Detekcija amplifikacije SPC2 softveru sustava NeuMoDx System omogućava praćenje učinkovitosti postupaka ekstrakcije RNK i RT-PCR amplifikacije.

### Nevažeći rezultati

Ako ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat nakon završetka obrade uzorka, on se prijavljuje kao Indeterminate (IND) (Neodređeno), No Result (NR) (Nema rezultata) ili Unresolved (UNR) (Nerazriješeno), ovisno o vrsti pogreške koja se pojavila.

Rezultat IND (Neodređeno) prijavljuje se ako se tijekom obrade uzorka detektira pogreška sustava NeuMoDx System. U slučaju da je prijavljen rezultat IND (Neodređeno), preporučuje se ponovno testiranje.

Rezultat UNR (Nerazriješeno) prijavljuje se ako nije detektirana valjana amplifikacija RNK HCV-a ili SPC2 u slučaju nepostojanja pogrešaka sustava, što ukazuje na moguću pogrešku reagensa ili na prisutnost inhibitora. U slučaju da je prijavljen rezultat UNR (Nerazriješeno), kao prvi korak preporučuje se ponovno testiranje. U slučaju da ponovno testiranje ne uspije, može se upotrijebiti razrijeđeni ispitak kako bi se ublažili učinci inhibicije uzorka.

Ako ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat, a obrada uzorka se prekine prije završetka, on se prijavljuje kao No Result (NR) (Nema rezultata). U slučaju da je prijavljen rezultat NR (Nema rezultata), preporučuje se ponovno testiranje.

## RADNE ZNAČAJKE

### Analitička osjetljivost – granica detekcije primjenom standarda SZO-a

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay utvrđena je testiranjem negativnih ispitaka i serije razrjeđenja 5. međunarodnog standarda SZO-a (genotip 1) u probranoj negativnoj humanoj plazmi i serumu za određivanje granice detekcije (Limit of Detection, LoD) na sustavima NeuMoDx Systems. LoD je definirana kao najniža ciljna razina detektirana pri stopi od 95 % određena Probit analizom. Ispitivanje je provedeno tijekom 3 dana na više sustava s više serija reagensa NeuMoDx. Svaki sustav (N288 i N96) obradio je 18 ponavljanja svake razine razrjeđivanja dnevno. Stope detekcije prikazane su u *tablici 2*. Dodatno ispitivanje provedeno je radi određivanja granice detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl, a rezultati su prikazani u *tablici 3*.

**Tablica 2.** Pozitivne stope detekcije za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay – tijekom rada za volumen od 550 µl

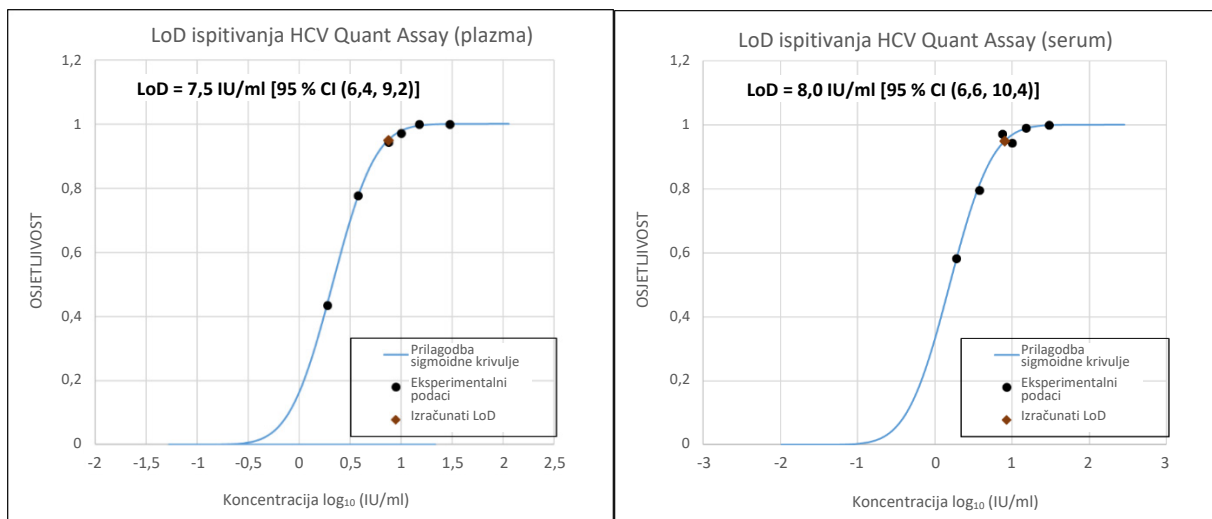
Ciljna koncentracija [IU/ml]	Ciljna koncentracija [ $\log_{10}$ IU/ml]	PLAZMA			SERUM		
		Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
30	1,48	108	108	100 %	108	108	100 %
15	1,18	108	108	100 %	108	107	99 %
10	1,00	108	105	97 %	108	102	94 %
7,5	0,88	108	102	94 %	108	105	97 %
3,75	0,57	108	84	78 %	108	86	80 %
1,875	0,27	108	47	44 %	108	63	58 %
NEG.	0	108	0	0 %	107	1	0,93 %

**Tablica 3.** Pozitivne stope detekcije za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay – tijekom rada za volumen od 200 µl

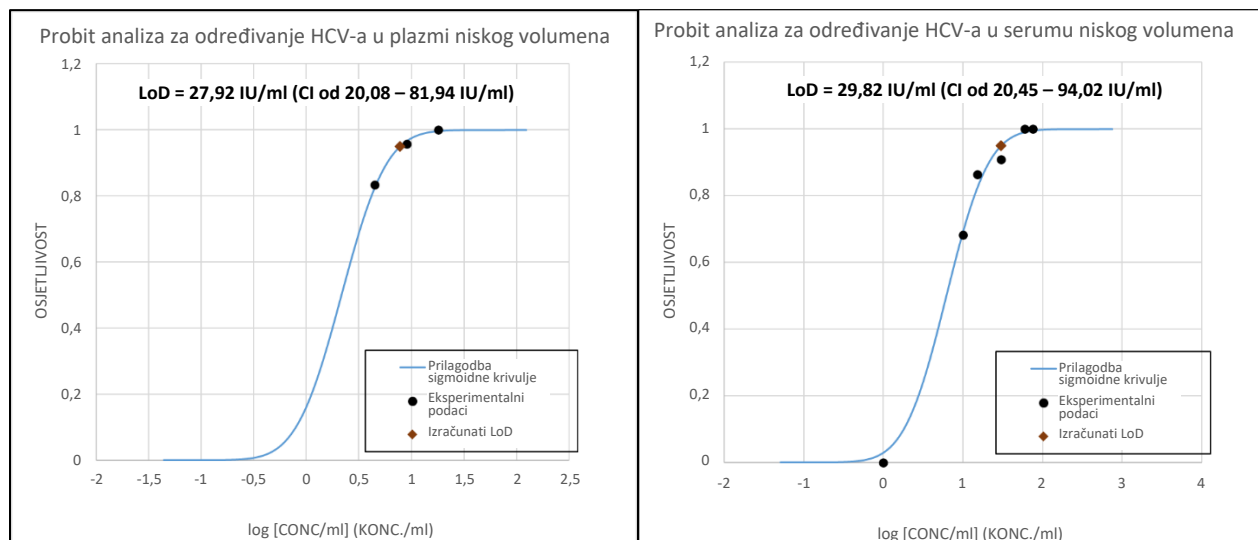
Ciljna koncentracija [IU/ml]	Ciljna koncentracija [ $\log_{10}$ IU/ml]	PLAZMA			SERUM		
		Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
75	1,88	N/P	N/P	N/P	22	22	100 %
60	1,78	22	22	100 %	22	22	100 %
30	1,48	22	21	95,5 %	22	20	90,9 %
15	1,18	22	17	77,3 %	22	19	86,4 %
10	1,00	22	13	59,1 %	22	15	68,2 %
NEG.	0	22	0	0 %	22	0	0 %

Utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay u plazmi za sve genotipove iznosi 7,5 IU/ml (95 %-tni CI od 6,4 do 9,2 IU/ml) [(0,9  $\log_{10}$  IU/ml) (95 %-tni CI od 0,8 do 1,0  $\log_{10}$  IU/ml)] prema testu provedenom na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System primjenom tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl (*slika 2*). Utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay za ispitke seruma iznosi 8,0 IU/ml (95 %-tni CI od 6,6 do 10,4 IU/ml) [(0,9  $\log_{10}$  IU/ml) (95 %-tni CI od 0,8 – 1,0  $\log_{10}$  IU/ml)] uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl (*slika 2*); utvrđeni LoD za obje vrste ispitaka uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl iznosi **8,0 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml)**.

Utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl iznosi 27,9 IU/ml (95 %-tni CI od 20,1 – 81,9) u ispitcima plazme i 29,8 IU/ml (95 %-tni CI od 20,5 – 94,0) u ispitcima seruma (*slika 3*); utvrđena granica detekcije (Limit of Detection, LoD) za obje vrste ispitaka uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl iznosi **30,0 IU/ml (1,5  $\log_{10}$  IU/ml)**.



**Slika 2:** Probit analiza primjenjuje se za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (lijevo) i serum (desno) – tijekom rada za volumen od 550  $\mu$ l



**Slika 3:** Probit analiza primjenjuje se za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (lijevo) i serum (desno) – tijekom rada za volumen od 200  $\mu$ l

### Analička osjetljivost – granica kvantifikacije – donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) primjenom standarda SZO-a

Donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) definira se kao donja ciljna razina pri kojoj se postiže stopa detekcije > 95 % i TAE  $\leq 1,0$ . Kako bi se odredio LLoQ, ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) izračunata je za svaku ciljnu razinu HCV-a za koju je dobivena detekcija > 95 % u sklopu izračuna LoD-a. TAE se definira na sljedeći način:

$$\text{TAE} = \text{odstupanje} + 2 * \text{SD} \quad [\text{Westgardova statistička pravila}]$$

Odstupanje je apsolutna vrijednost razlike između prosječne izračunate koncentracije i očekivane koncentracije. SD se odnosi na standardnu devijaciju od vrijednosti kvantificirane za uzorak.

Objedinjeni rezultati za 6 razina ispitaka plazme i seruma s virusom HCV koji su testirani u ispitivanju donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) uz primjenu genotipa 1 i tijekom rada za ispitke volumena 550  $\mu$ l prikazani su u *tablici 4*. Rezultati dodatnih testiranja uz primjenu tijekom rada za ispitke volumena 200  $\mu$ l prikazani su u *tablici 5*.

**Tablica 4.** LLoQ ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay s odstupanjem i TAE – tijek rada za volumen od 550 µl

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

**Tablica 5.** LLoQ ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay s odstupanjem i TAE – tijek rada za volumen od 200 µl

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

Utvrđeno je da LLoQ za ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay iznosi 7,7 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml) za plazmu te 8,4 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml) za serum uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl; utvrđeno je da LLoQ za plazmu i serum iznosi **8,4 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml)** uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl.

Utvrđeno je da LLoQ za NeuMoDx HCV Quant Assay u kojem se upotrebljava standard SZO-a iznosi 30,0 IU/ml (1,5  $\log_{10}$  IU/ml) za plazmu te 29,8 IU/ml, (1,37  $\log_{10}$  IU/ml) za serum uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl; utvrđeno je da LLoQ za plazmu i serum iznosi **30,0 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml)** uz primjenu tijekom rada za volumen ispitka od 200 µl.

#### Analitička osjetljivost – LoD i LLoQ za genotipove HCV-a

LoD je prvenstveno utvrđen za genotip 1 (5. međunarodni standard SZO-a), a zatim je provedeno dodatno testiranje utvrđenog LoD-a korištenjem svakog od preostalih 5 genotipova. Trideset i šest (36) ponavljanja na razinama koje odgovaraju 2 X, 1 X i 0,5 X gornje granice LoD uz 95-postotni CI testirano je s pomoću ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay korištenjem plazme i primjenom tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl. Pozitivni postotak svakog genotipa na svakoj od testiranih razina unesen je u tablicu te se upotrebljavao za izračunavanje LoD-a s pomoću probit analize.

Izračunata je i ukupna analitička pogreška pri testiranim razinama. Najniža razina s 95 %-tnom pozitivnom detekcijom i izračunatim TAE od  $\leq 1,0$  smatrala se LLoQ-om genotipa. Ti rezultati potvrđuju da ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay ima izvrsne i ekvivalentni radni učinak detekcije za svih šest genotipova s rasponom od 4,5 – 7,5 IU/ml, uključujući rezultate dobivene s 5. međunarodnim standardom SZO-a (genotip 1). Sveukupno, utvrđeno je da LoD ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay za genotipove iznosi 7,5 IU/ml (0,88  $\log_{10}$  IU/ml), a LLoQ je utvrđen kao najviša vrijednost te iznosi 7,7 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml), kako je prijavljeno za 5. međunarodni standard SZO-a (genotip 1, gore naveden). *Tablica 6* prikazuje rezultate za LoD i LLoQ za testiranja na genotipovima HCV-a u plazmi.

**Tablica 6.** Genotipovi HCV-a testirani u plazmi primjenom tijekom rada za volumen ispitka od 550 µl

GENOTIP	LoD [IU/ml]	LLoQ [IU/ml]
1	7,5	7,7
2	4,5	5,2
3	7,5	7,5
4	6,0	6,0
5	4,8	5,5
6	4,5	6,7

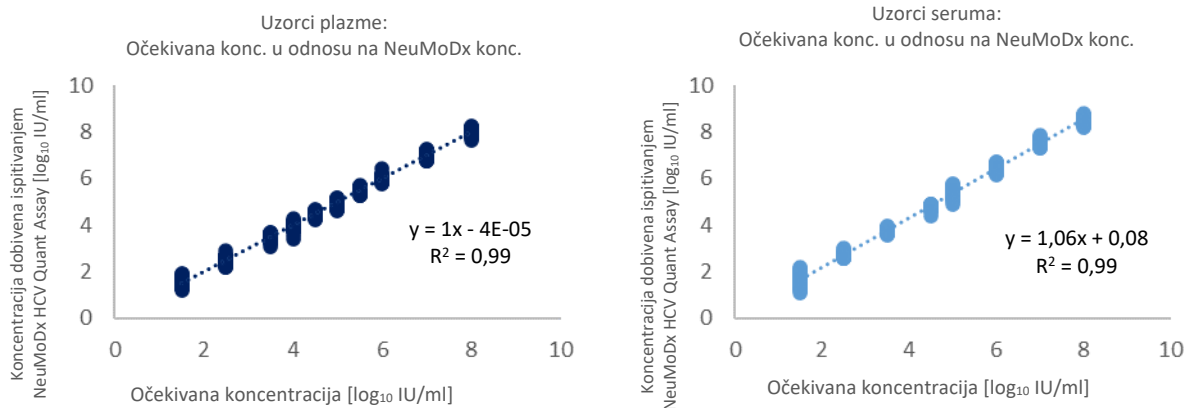
Na temelju rezultata prethodno referenciranih studija, NeuMoDx je utvrdio LoD od **8,0 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml)** i LLoQ od **8,4 IU/ml (0,9  $\log_{10}$  IU/ml)** za ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay u **plazmi i serumu** uz primjenu **tijeka rada za volumen ispitka od 550 µl**.

Utvrđeni **LoD** i **LLOQ** za ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay za **obje vrste ispitaka (plazma i serum)** uz primjenu **tijeka rada za volumen ispitka od 200 µL iznosi 30,0 IU/ml (1,5 log<sub>10</sub> IU/ml)**.

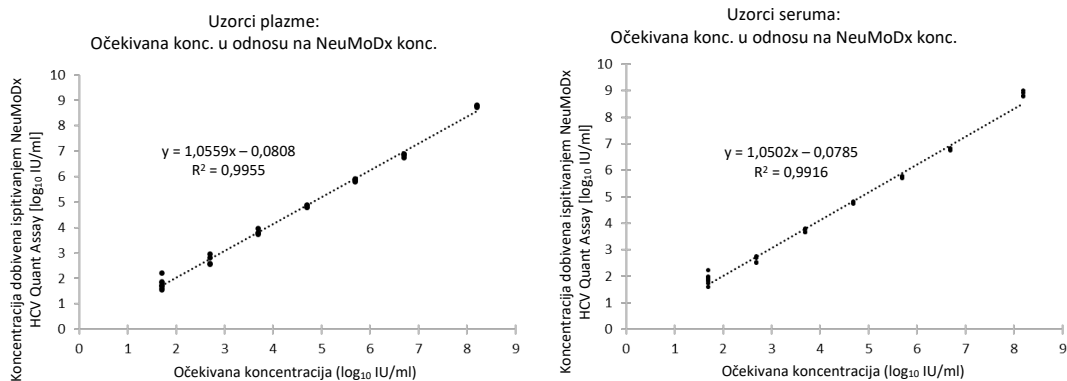
### Analička osjetljivost – linearnost i određivanje gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULOQ)

Linearnost i gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULOQ) ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay utvrđeni su iz plazme pripremom serije razrjeđenja s pomoću HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX) i kontrole AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) uz utvrđenu sljedivost do 5. međunarodnog standarda SZO-a. Panel s 11 sastavnica pripremljen je u poolu plazme negativne na HCV za izradu panela koji obuhvaća raspon koncentracije 8,2 – 1,5 log<sub>10</sub> IU/ml. Ispitivanjem NeuMoDx HCV Quant Assay dokazana je mogućnost kvantificiranja HCV-a u linearnom rasponu od 8 log<sub>10</sub> s točnosti od ±0,3 log<sub>10</sub> IU/ml na temelju standardne pogreške izračunate 95 %-tnim intervalom pouzdanosti. Nije bilo značajne koristi od uporabe regresije 2. i 3. stupnja. Utvrđeno je da ULOQ u plazmi iznosi 8,2 log<sub>10</sub> IU/ml. Sljedeće ispitivanje provedeno je kako bi se dokazala ekvivalentnost matrica, a analizom su s pomoću dva različita modela regresije, uključujući alat za regresiju programa MS Excel i Passing-Bablokovu regresiju, uspoređeni kvantitativni rezultati ispitivanja NeuMoDx HCV uzoraka pripremljenih u plazmi i serumu. Rezultati su pokazali veliku korelaciju predstavljenu vrijednostima nagiba i odsječka koje su bile vrlo blizu 1,00 odnosno 0,00, te vrijednosti R2 od 0,99 (alat za regresiju programa MS Excel) ili p-vrijednosti od 0,600 (Passing-Bablokova regresija). Koncentracije ispitivanja za HCV koje je prijavio sustav NeuMoDx System uspoređene s očekivanim vrijednostima prikazane su na *slici 4*.

Linearnost i ULOQ zatim su procijenjeni uz primjenu tijeka rada za volumen ispitka od 200 µL. Usporedbe ekvivalentnosti provedene su između koncentracija koje je prijavio softver sustava NeuMoDx za tijekove rada za volumene od 200 µL i 550 µL. Demingova i Passing-Bablokova regresijska analiza pokazale su odličnu korelaciju i nagib blizu vrijednosti 1 te minimalne odsječke (odstupanje) prijavljenih koncentracija i za uzorke plazme i za uzorke seruma unutar linearnog raspona. Bland-Altmanova usporedba prijavljene koncentracije za tijek rada za volumen 200 µL u odnosu na srednju prijavljenu koncentraciju za tijekove rada za ispitke volumena 200 µL i 550 µL pokazala je minimalno odstupanje, pripisujući točnost algoritmu koji se upotrebljava za generiranje rezultata iz tijeka rada za volumen od 200 µL. Osim toga, jednostavna linearna regresija kojom se uspoređuje očekivana koncentracija u odnosu na prijavljenu koncentraciju za tijek rada za volumen od 200 µL imala je nagib blizu vrijednosti 1, pokazujući izvrsnu korelaciju (*slika 5*). Ako ih se promatra zajedno, te usporedbe pokazuju točnu kvantifikaciju HCV-a unutar linearnog raspona ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay u slučaju primjene tijeka rada za volumen ispitka od 200 µL.



**Slika 4:** Linearni raspon ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (lijevo) i serum (desno) – tijek rada za volumen od 550 µL



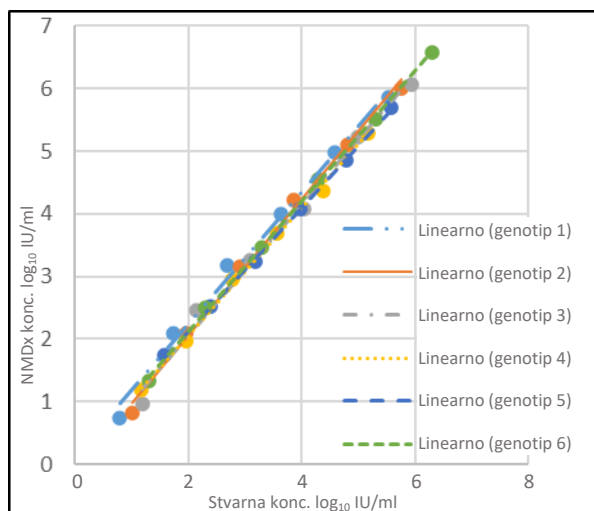
**Slika 5:** Linearni raspon ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (lijevo) i serum (desno) – tijek rada za volumen od 200 µL

### Analitička osjetljivost – linearnost za genotipove

Linearnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay za šest genotipa HCV-a određena je testiranjem najmanje četiriju (4) različitih koncentracija svakog genotipa HCV-a pripremljenog u poolu plazme negativne na HCV. Razine ciljnih sekvenci HCV-a testiranih u ovom ispitivanju ovisile su o koncentraciji izvornog ispitka i stoga su se razlikovale za razne genotipove. Ispitivanje je za svaki genotip provedeno u 6 ponavljanja za svaku razinu. Linearnost za šest genotipova HCV-a prikazana je u *tablici 7* i na *slici 6*.

**Tablica 7.** Linearnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay za genotipove

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



**Slika 6:** Linearnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay za genotipove

### Analitička specifičnost – križna reaktivnost

Analitička specifičnost dokazana je probirom na 33 organizama koji se mogu često pronaći u ispircima krvi/plazme te na vrste filogenetski slične HCV-u radi utvrđivanja križne reaktivnosti. Organizmi su pripremljeni u poolovima koji su sadržavali između 4 i 6 organizama i testirani su pri visokim koncentracijama. Testirani organizmi prikazani su u *tablici 8*. Nije uočena križna reaktivnost s bilo kojim od testiranih organizama, čime je potvrđena 100 %-tna analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay.

**Tablica 8.** Patogeni korišteni za dokazivanje analitičke specifičnosti

Organizmi koji nisu ciljani ispitivanjem						
Adenovirus 2	Denga V1	Hepatitis A	Virus humane imunodeficijencije 2	Humani T-limfotropni virus 1	Propionibacterium acnes	Virus Zapadnog Nila
Adenovirus 5	Denga V2	Hepatitis B	Humani papilomavirus tipa 16	Humani T-limfotropni virus 2	Rubeola	Žuta groznica
Candida albicans	Denga V3	Virus herpesa simplex (HSV) 1	Humani papilomavirus tipa 18	Influenca A	St. Louis encefalitis	Zika virus
Chlamydia trachomatis	Denga V4	Virus herpesa simplex (HSV) 2	Humani herpes virus 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Citomegalovirus	Epstein-Barrov virus	Virus humane imunodeficijencije-1	Humani herpes virus 8	Parvovirus B19	Staphylococcus epidermidis	

### Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, komenzalni organizmi

Interferencija ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay procijenjena je u prisutnosti organizama koji nisu ciljani ispitivanjem primjenom istih poolova organizama pripremljenih za testiranje križne reaktivnosti navedenih gore u *tablici 8*. U plazmu negativnu na HCV dodani su organizmi u poolovima od 4 – 6 organizama i pozitivna kontrola HCV-a pri koncentraciji od 1,4 log<sub>10</sub> IU/ml. Nije uočena značajna interferencija u prisutnosti tih komenzalnih organizama na što ukazuje minimalna devijacija kvantifikacije od kontrolnih ispitaka koji ne sadrže interferirajuće agense.

### Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, endogene i egzogene tvari

Ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay procijenjeno je u prisutnosti uobičajenih egzogenih i endogenih interferirajućih tvari pronađenih u kliničkim ispitcima plazme s HCV-om. To je uključivalo abnormalno visoke razine komponenti krvi te uobičajene antivirusne lijekove koji su klasificirani u *tablici 9*. Svaka tvar dodana je u probiranu humanu plazmu negativnu na HCV u koju je dodano 1,7 log<sub>10</sub> IU/ml HCV-a i uzorci su analizirani kako bi se utvrdila interferencija. Osim toga, plazme pacijenata s uobičajenim stanjima bolesti povezanim s infekcijom hepatitisom C također su testirane kako bi se utvrdila potencijalna interferencija. Prosječna koncentracija i odstupanje svih testiranih tvari navedeni su u *tablici 10*. Nijedna od egzogenih i endogenih tvari nije utjecala na specifičnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tablica 9. testiranje interferencije – egzogeni agensi (klasifikacija lijekova)

	Proizvod	Klasifikacija		Proizvod	Klasifikacija
Pool 1	Sofosbuvir	Antivirusni za HCV s izravnim djelovanjem	Pool 2	Paritaprevir	Inhibitor proteaze HCV-a NS3/4A
	Ledipasvir	Inhibitor HCV-a		Ombitasvir	Antivirusno za HCV
	Velpatasvir	Inhibitor HCV-a NS5A		Ritonavir	Inhibitor HIV-proteaze
	Klaritromicin	Antibiotik		Abakavir sulfat	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Interferon alfa-2a	Imunomodulator		Ribavirin	Imunomodulator
Pool 3	Grazoprevir	Inhibitor proteaze HCV-a NS3/4A	Pool 4	Efavirenz	Inhibitor reverzne transkriptaze
	Elbasvir	Inhibitor HCV-a NS5A		Lopinavir	Inhibitor proteaze
	Tenofovir dizoproksil	Antivirusno za HBV/HIV		Azitromicin	Antibiotik
	Lamivudin	Antivirusno za HBV/HIV		Dolutegravir	Antivirusno za HIV
	Valganciklovir	Antivirusno za CMV		Simeprevir	Inhibitor proteaze HCV-a NS3/4A
Pool 5	Emtricitabin	Antivirusno za HIV			
	Raltegravir	Antivirusno za HIV			
	Amoksicilin	Antibiotik			
	Rilpivirin	Antivirusno za HIV			
	Dasabuvir	Antivirusni za HCV s izravnim djelovanjem			
	Glecaprevir	Inhibitor proteaze HCV-a NS3/4A			

**Tablica 10.** Testiranje interferencije – egzogeni i endogeni agensi

Endogeni	Prosječna konc. log <sub>10</sub> IU/ml	Odstupanje log <sub>10</sub> IU/ml
Hemoglobin	1,61	0,28
Trigliceridi	1,31	-0,02
Bilirubin	1,47	0,14
Albumin	1,47	0,14
Egzogeno (lijekovi)	Prosječna konc. log <sub>10</sub> IU/ml	Odstupanje log <sub>10</sub> IU/ml
Pool 1: zidovudin (Zidovudine, ZDV), sakvinavir, ritonavir, klaritromicin, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b	1,48	0,15
Pool 2: abakavir sulfat, amprenavir, ribavirin, entekavir, fluoksetin, valaciklovir hidroklorid	1,40	0,07
Pool 3: tenofoviridizoproksil, lamivudin, ganciklovir, valganciklovir, nevirapin	1,40	0,07
Pool 4: efavirenz, lopinavir, enfuvirtid, ciprofloksacin, paroksetin,	1,51	0,18
Pool 5: adefovir (dipivoksil), azitromicin, indinavir sulfat, sertralin	1,40	0,07
Stanje bolesti	Prosječna konc. log <sub>10</sub> IU/ml	Odstupanje log <sub>10</sub> IU/ml
Antinuklearno protutijelo (Antinuclear Antibody, ANA)	1,53	0,18
Sistemski eritemski lupus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	1,29	-0,06
Reumatoidni artritis	1,39	0,04
HBV protutijela	1,45	0,10
Alkoholna ciroza	1,43	0,08
Reumatoidni faktor	1,43	0,08
Nealkoholni steatohepatitis (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	1,32	-0,03

### Preciznost unutar laboratorija

Preciznost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay utvrđena je testiranjem panela sa 7 sastavnica pripremljenih ispitaka HCV-a (koji uključuju HCV Armored RNA i kontrolu AcroMetrix HCV Control) na tri sustava NeuMoDx Systems u razdoblju od 12 dana. Određene su preciznosti unutar obrade, unutar dana i unutar sustava i utvrđena je sveukupna standardna devijacija od  $\leq 0,26 \log_{10}$  IU/ml. Nije uočena značajna razlika u radnom učinku na svim sustavima, tijekom svih dana ili tijekom svih obrada kao što je prikazano u *tablici 11*. Preciznost između korisnika nije određena jer korisnik ne igra značajnu ulogu u obradi uzoraka na sustavu NeuMoDx System.

**Tablica 11.** Preciznost unutar laboratorija – ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay na sustavima NeuMoDx Systems

	Ciljna konc. [log <sub>10</sub> IU/ml]	Prosječna konc. [log <sub>10</sub> IU/ml]	SD unutar sustava	SD unutar dana	SD unutar obrade	SD unutar laboratorija (sveukupno)
ARMORED	6	5,95	0,17	0,13	0,10	0,17
	5	4,87	0,20	0,14	0,12	0,20
	3	2,89	0,19	0,17	0,17	0,19
ACROMETRIX	4,4	4,45	0,12	0,10	0,08	0,13
	3,4	3,45	0,12	0,12	0,11	0,13
	2,4	2,41	0,17	0,15	0,15	0,17
	1,4	1,40	0,26	0,25	0,25	0,24



### Obnovljivost među serijama

Obnovljivost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay među serijama određena je s pomoću tri različite serije ključnih reagensa, pufera NeuMoDx Lysis Buffer 3, pločica NeuMoDx Extraction Plates i testnih traka NeuMoDx HCV Quant Test Strips. Panel sa 7 sastavnica HCV-a (koji uključuje HCV Armored RNA i kontrolu AcroMetrix HCV Control) upotrebljavao se za procjenu radnog učinka. Testiranje je provedeno s pomoću tri serije reagensa na tri sustava tijekom 6 dana. Varijacije unutar serija i među serijama analizirane su i rezultati su prikazani u *tablici 12*. Maksimalno sveukupno odstupanje iznosilo je 0,24 log<sub>10</sub> IU/ml, a maksimalna sveukupna standardna devijacija (SD) iznosila je 0,33 log<sub>10</sub> IU/ml. Nije uočena značajna razlika u radnom učinku među serijama jer je kvantifikacija svih sastavnica panela bila unutar specifikacije tolerancije.

**Tablica 12.** Obnovljivost među serijama – ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay

	Ciljna konc. [log <sub>10</sub> IU/ml]	Srednja konc. SVEUKUPNO [log <sub>10</sub> IU/ml]	n (valjani rezultati po seriji)	APSOLUTNO ODSUPANJE	SD među serijama	SD unutar serije	Sveukupni SD
ARMORED	6	5,76	36	0,24	0,35	0,13	0,37
	5	4,84	36	0,16	0,16	0,22	0,27
	3	2,81	36	0,19	0,31	0,16	0,35
ACROMETRIX	4,4	4,35	36	0,05	0,21	0,11	0,24
	3,4	3,31	36	0,09	0,17	0,11	0,20
	2,4	2,33	36	0,07	0,24	0,13	0,27
	1,4	1,38	36	0,02	0,23	0,13	0,33

### Učinkovitost kontrole

SPC2 uključen je u ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay za prijavljivanje neuspjelih koraka obrade ili inhibicija koje utječu na radni učinak ispitivanja. Učinkovitost je testirana pod uvjetima koji predstavljaju ključne neuspjele korake obrade koji bi se potencijalno mogli dogoditi tijekom obrade uzoraka i koje *možda nisu detektirali* senzori za praćenje radnog učinka sustava NeuMoDx System. Pozitivni (3 log<sub>10</sub> IU/ml) i negativni ispiti ispitani su u prisutnosti kontrole pod sljedećim uvjetima: prisutnost inhibitora, nije doveden reagens za ispiranje i nema ispuštanja reagensa za ispiranje. Neučinkovitosti obrade koje su imale negativan utjecaj na detekciju/određivanje HCV-a odražavale su učinkovitost detekcije ciljne sekvence SPC2 kao što je prikazano u *tablici 13*. U svim testiranim slučajevima, pokazalo se ili da su kontrolom obrade uzorka na odgovarajući način uočene neučinkovitosti obrade i prisutnost inhibitora ili da očekivana neučinkovitost u obradi nije imala značajan negativni učinak na detekciju SPC2 ni detekciju kvantifikaciju HCV-a. Stoga se pokazala uspješnost SPC2 u učinkovitom praćenju radnog učinka ispitivanja na sustavu NeuMoDx System.

**Tablica 13.** Učinkovitost kontrole obrade uzorka

Testiran neuspjeli korak obrade	Status amplifikacije kontrole obrade uzorka	Ciljne sekvence HCV-a Status amplifikacije	Rezultat ispitivanja
Presence of Inhibitor (Prisutnost inhibitora)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Unresolved (Nerazriješeno)
No Wash Delivered (Nije doveden reagens za ispiranje)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Unresolved (Nerazriješeno)
No Wash Blowout (Nema ispuštanja reagensa za ispiranje)	Amplified (Amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	Positive (Pozitivno) s kvantifikacijom unutar 0,3 log <sub>10</sub> IU/ml kontrole

### Stopa valjanih rezultata

Retrospektivna analiza podataka dobivenih tijekom procjene radnog učinka ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay na sustavima NeuMoDx Systems upotrebljavala se za određivanje postotka valjanih rezultata. Valjani rezultati testa prijavljuju se kao Positive (Pozitivno) ili Negative (Negativno); nevažeci rezultati mogu se prijaviti kao Indeterminate (IND) (Neodređeno) ili Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) na temelju statusa amplifikacije ciljne sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultat prijavljen kao IND (Neodređeno) obično uzrokuje pogreška instrumenta koja dovodi do neuspješne amplifikacije ciljne sekvence i/ili unutarnje kontrole obrade. Rezultat UNR (Nerazriješeno) uzorcima se dodjeljuje u slučaju neuspješne amplifikacije i ciljne sekvence i unutarnje kontrole obrade ako nema detektiranog kvara instrumenta. U retrospektivnu analizu uključena su 1962 pojedinačna rezultata ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay, što je uključivalo podatke dobivene iz ispita seruma i plazme na sustavu NeuMoDx 288 System i sustavu NeuMoDx 96 System. Utvrđena je stopa rezultata UNR (Nerazriješeno) od 0,61 % (12/1962) i stopa rezultata IND (Neodređeno) od 0,41 % (8/1962); ti rezultati ispunjavaju kriterije prihvatljivosti analize. Stoga je određeno da konačna stopa valjanih rezultata ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay na kliničkim matricama i sustavima NeuMoDx Systems iznosi 99,0 % s 95 %-tnim CI (98,4 – 99,3).

### Križna kontaminacija

Stopa križne kontaminacije ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay određena je testiranjem tri kompleta HCV ispitaka uz naizmjenično testiranje visoko pozitivnih i negativnih ispitaka. Ukupno, to je uključivalo testiranje 144 ponavljanja humanih ispitaka negativnih na HCV i 144 ponavljanja ispitaka s visokim titrom HCV-a pri koncentraciji od  $8,2 \log_{10}$  IU/ml. Svih 144 ponavljanja obrade negativnog ispitka dala su negativan rezultat, što pokazuje da nije došlo nikakve križne kontaminacije tijekom obrade uzoraka na sustavu NeuMoDx System.

### Ekvivalentnost matrice ispitka

Testiranje je provedeno kako bi se dokazala ekvivalentnost matrice ispitka između pune krvi prikupljene u epruvetama za prikupljanje s etilendiamintetraoctenom kiselinom (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) i kiselom citratnom dekstrozom (Acid Citrate Dextrose, ACD) radi pripreme plazme. Dodatno testiranje je provedeno kako bi se utvrdila ekvivalentnost između svježih i zamrznutih ispitaka plazme (prikupljenih u dvije vrste epruveta), kao i svježih i zamrznutih ispitaka seruma. Svježi ispitci čuvali su se na 4 °C sve dok u njih nisu dodane četiri razine HCV-a i dok nije provedeno testiranje ekvivalentnosti. Zatim su uzorci zamrznuti u trajanju od najmanje 24 sata na temperaturi od -20 °C. Nakon tog razdoblja pohrane u zamrznutom stanju ispitci su odmrznuti i ponovno testirani. Rezultati svježih i zamrznutih uzoraka seruma i plazme, kao i ispitaka plazme s antikoagulansima EDTA i ACD, uspoređeni su metodom regresijske analize kako bi se utvrdila ekvivalentnost. Podaci su pokazali izvrsnu ekvivalentnost između ispitaka plazme s EDTA i ACD, svježih i zamrznutih ispitaka plazme te svježih i zamrznutih ispitaka seruma.

Provedeno je dodatno testiranje u svrhu dokazivanja ekvivalencije radnog učinka ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay na primarnim ispitcima u odnosu na sekundarne ispitke. Paneli ispitaka davatelja negativnih na HCV u koje je dodana ciljna sekvenca virusa HCV (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) i ispitaka davatelja pozitivnih na HCV najprije su obrađeni iz primarnih epruveta za ispitke. Nakon obrade primarne epruvete preostala plazma ili serum iz svakog ispitka podijeljeni su u alikvote u sekundarnu epruvetu za ispitke i ponovno su obrađeni. Nije zabilježena nikakva značajna razlika u zabilježenim rezultatima između obrade u primarnim i sekundarnim epruvetama za ispitke.

### Usporedba kliničkih metoda

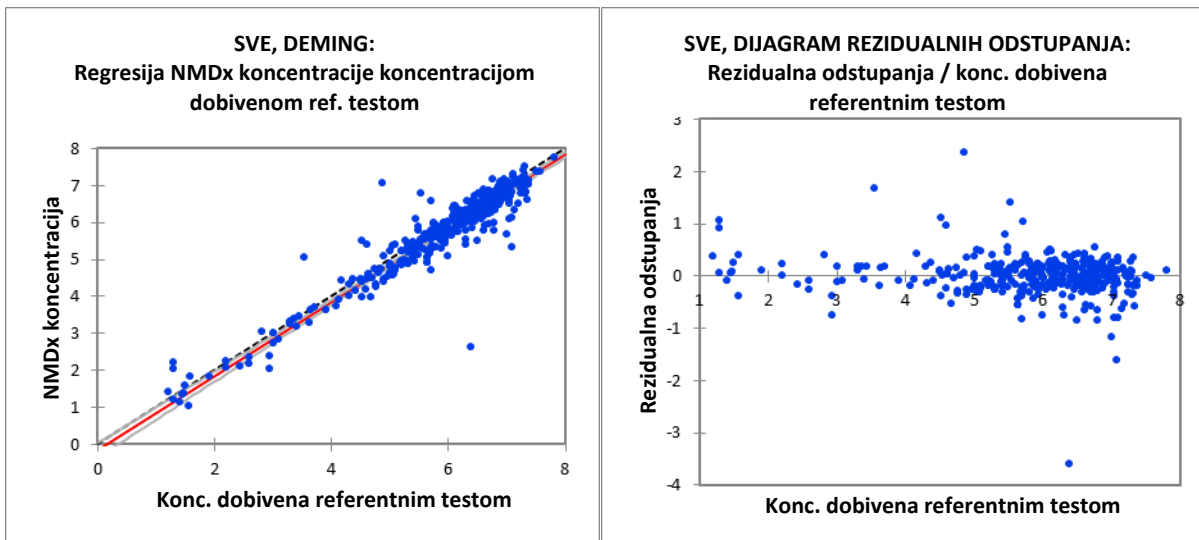
Kvalitativni i kvantitativni radni učinak ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay procijenjeni su usporedbom s komparativnim ispitivanjima koje je odobrila agencija FDA / koji nose oznaku CE testiranjem nerazrijeđenih kliničkih ispitaka pacijenata zaraženih HCV-om. Testiranje je provedeno interno u tvrtki NeuMoDx jednostruko slijepim ispitivanjem deidentificiranih preostalih kliničkih ispitaka dobivenih iz šest vanjskih referentnih laboratorija. Ukupno 323 ispitaka plazme i 336 ispitaka seruma obrađeno je s pomoću ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay (jednostrukim) slijepim ispitivanjem na više sustava NeuMoDx Molecular Systems. Od navedenih uzoraka 35 uzoraka plazme i 13 uzoraka seruma obrađeno je na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System, KAO I na sustavu NeuMoDx 96 Molecular System. Neke od uzoraka koji su dali NEVAŽEĆI rezultat nije bilo moguće ponovno obraditi jer dovoljna količina uzorka nije bila dostupna.

Pogreške obrade i sustava dobivene na sustavima NeuMoDx Molecular Systems bile su minimalne i ispunjavale su zadane kriterije. Ukupno 4 neodređena rezultata (IND (NEODREĐENO)) prvo su dobivena za uzorke plazme, a 4 rezultata IND (NEODREĐENO) dobivena su za uzorke seruma, što je rezultiralo sveukupnom početnom stopom IND (NEODREĐENO) od 1 % (95-postotni CI od 0,5 % – 3 %) za plazmu i 1 % (95-postotni CI od 0,4 % – 3 %) za serum. Ukupno 3 rezultata UNRESOLVED (UNR) (NERAZRIJEŠENO) dobivena su za uzorke plazme, a 5 rezultata UNR (NERAZRIJEŠENO) dobiveno je za uzorke seruma te su dali sveukupnu stopu od 1 % (95-postotni CI od 0,2 % – 3 %) za plazmu i 1 % (95-postotni CI od 0,6 % – 4 %) za serum.

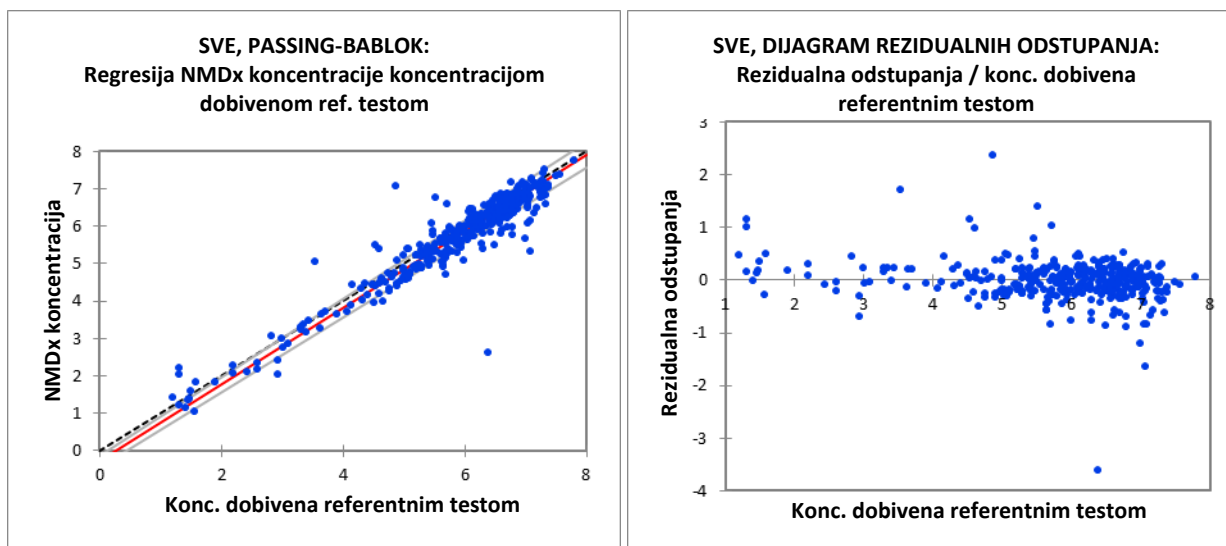
Ispitci koji su dali nevažec rezultate (IND (Neodređeno) /UNR (Nerazriješeno)) ili „Quantitation Error“ (Kvantifikacijska pogreška) testirani su ponovno ako je preostalo dovoljno volumena; na nekim je uzorcima proveden korak razrjeđenja kako bi mogli dati valjane rezultate. Za 13 ispitaka koji su imali dovoljan volumen za ponavljanje testiranja (razrijeđeni ili čisti) dobiven je valjani rezultat.

Od 321 valjanog rezultata dobivenog za ispitke plazme i 334 valjana rezultata dobivena za uzorke seruma, za 206 uzoraka plazme i 154 uzorka seruma prijavljen je rezultat POSITIVE (POZITIVNO) ispitivanjem NeuMoDx HCV Quant Assay s odgovarajućim vrijednostima koncentracije koje su dobivene referentnim testovima. Demingova regresija i Passing-Bablokova regresijska analiza upotrebljavale su se za korelaciju između vrijednosti koncentracije dobivenih ispitivanjem NeuMoDx HCV Quant Assay i vrijednosti dobivenih referentnim testovima za uzorke plazme i uzorke seruma.

Dijagrami ekvivalentnosti izrađeni su za prikaz korelacije između vrijednosti koncentracija dobivenih ispitivanjem NeuMoDx HCV Quant Assay i referentnim testovima za sve uzorke testirane s pomoću prilagodbe Demingovom regresijom i prilagodbe Passing-Bablokovom metodom i prikazuju se na *slici 7* i *slici 8*. Kvaliteta prilagodbe Demingovom regresijom ilustrirana je koeficijentom nagiba od 1,00 s 95 %-tnim CI (0,97, 1,03) i odsječka (odstupanja) od -0,16 s 95 %-tnim CI (-0,37, 0,06), što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx HCV Quant Assay i referentnim testovima imaju visoku korelaciju s prihvatljivim odstupanjem. Kvaliteta prilagodbe Passing-Bablokovom metodom linearne regresije ilustrirana je koeficijentom nagiba od 1,02 s 95 %-tnim CI (0,99, 1,05) i odsječkom (odstupanjem) od -0,28 s 95 %-tnim CI (-0,43, -0,14), što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx HCV Quant Assay i referentnim testovima imaju visoku korelaciju s prihvatljivim odstupanjem, kao što je prikazano u *tablici 14*.



Slika 7: Dijagrami ekvivalentnosti (lijevo) i rezidualnog odstupanja (desno) – kumulativna analiza (na oba sustava NeuMoDx Systems) rezultata ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay u usporedbi s rezultatima referentnog ispitivanja za SVE uzorke na temelju Demingove regresijske analize.



Slika 8: Dijagrami ekvivalentnosti (lijevo) i rezidualnog odstupanja (desno) – kumulativna analiza (na oba sustava NeuMoDx Systems) rezultata ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay u usporedbi s rezultatima referentnog ispitivanja za SVE uzorke na temelju Passing-Bablokove regresijske analize.

Tablica 14. sažetak linearne regresijske analize Demingovom i Passing-Bablokovom metodom

	Demingova analiza		Passing-Bablokova analiza	
	Odsječak	Koeficijent nagiba	Odsječak	Koeficijent nagiba
<b>KUMULATIVNO</b> <b>(svi uzorci plazme + seruma)</b>	- 0,16 95 %-tni CI (-0,37, 0,06)	1,00 95 %-tni CI (0,97, 1,03)	- 0,28 95 %-tni CI (-0,43, -0,14)	1,02 95 %-tni CI (0,99, 1,05)

Od 655 valjanih rezultata dobivenih za ispitke plazme i seruma s pomoću ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay, 361 uzorak prijavljen je kao pozitivan na referentnim testovima za HCV, a za 294 uzoraka prijavljeno je da su negativni. Osjetljivost i specifičnost ispitivanja NeuMoDx HCV

Quant Assay izračunate su s pomoću podataka svih valjanih kliničkih uzoraka uspoređenih s referentnim testom, koji su objedinjeni i prikazani u *tablici 15*. Od 361 testiranog pozitivnog uzorka, 360 je prijavljeno kao pozitivno na ispitivanju NeuMoDx HCV Quant Assay, što pokazuje 99,7 %-tnu osjetljivost s 95 %-tnim CI (98,2 % – 100 %). Od 294 testirana negativna uzorka, 271 je prijavljen kao negativan na ispitivanju NeuMoDx HCV Quant Assay, što pokazuje 92,2 %-tnu specifičnost s 95 %-tnim CI (88,3 % – 94,9 %).

Ekvivalentnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay dokazana je visoko koreliranim rezultatima radnog učinka ispitivanja na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System, sustavu NeuMoDx 96 Molecular System i referentnom testu za ispitke plazme i ispitke seruma.

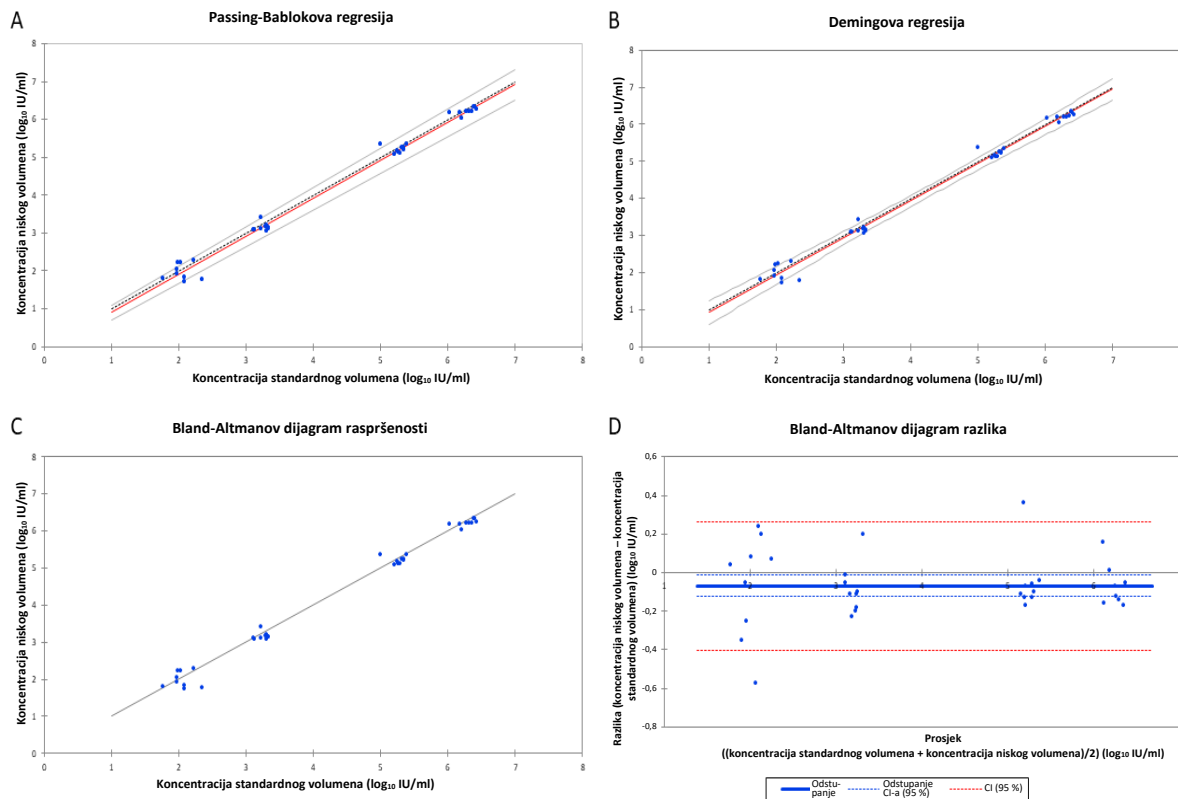
**Tablica 15.** Rezultati usporedbe kvalitativnih metoda za ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay u usporedbi s referentnim testovima – plazma i serum

	Referentno ispitivanje (POZ)	Referentno ispitivanje (NEG)	UKUPNO
NeuMoDx HCV Quant Assay (POZ)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
UKUPNO	361	294	655
<b>OSJETLIVOST = 99,7 %</b> 95 %-tni CI (98,2 % – 100 %) <b>*SPECIFIČNOST = 92,2 %</b> 95 %-tni CI (88,3 % – 94,9 %)			

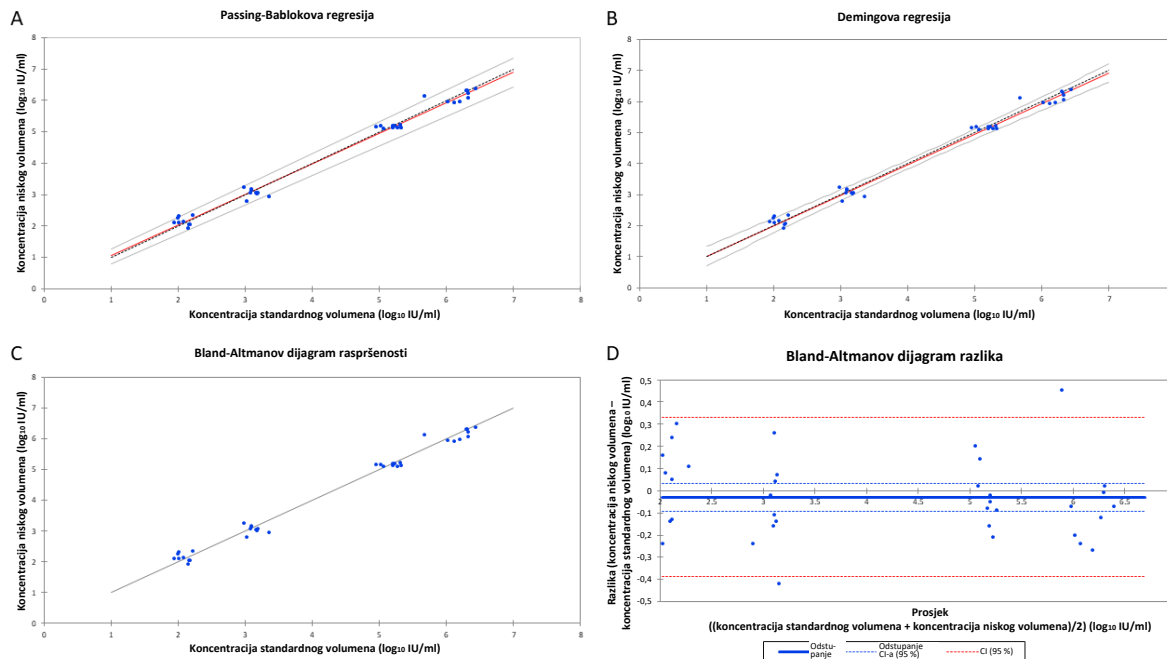
**\*NAPOMENA:** *LLoQ ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay iznosi 0,9 log<sub>10</sub> IU/ml, što je niže od komparativnog ispitivanja koji se upotrebljavao kao referentni test. Sljedeća analiza provedena je bez 9 uzoraka u kojima je sustav NeuMoDx detektirao HCV, ali koje komparativno ispitivanje prijavilo kao negativne. Bez navedenih 9 uzoraka specifičnost ispitivanja NeuMoDx HCV Quant Assay je ponovno izračunata te je iznosila 95,1 % s 95 %-tnim CI (91,7 – 97,2).*

### Testiranje surogat ispitaka – tijek rada za ispitke volumena 200 µl

Kvantitativna korelacija između tijekova rada za ispitke volumena 200 µl i 550 µl potvrđena je primjenom panela koji se sastojao od pojedinačnih ispitaka plazme i seruma negativnih na HCV kojima su dodane četiri poznate razine kontrolnog materijala Accuplex HCV Control, sljedeće do 5. međunarodnog standarda SZO-a za RNK HCV-a za testove na temelju nukleinske kiseline. Ti pojedinačni ispitci plazme i seruma obrađeni su primjenom radnih postupaka za ispitke volumena 550 µl i 200 µl te su na kraju provedena ukupno 324 testa. Usporedbe ekvivalentnosti između koncentracija koje je prijavio softver sustava NeuMoDx za tijekove rada za ispitke volumena 200 µl i 550 µl i surogat panela provedene su na bazi pojedinačnih uzoraka. Demingova i Passing-Bablokova regresijska analiza imale su nagib od 1,003 i 1,000 s odsječcima od -0,082 i -0,085 u plazmi te nagib od 0,974 i 0,984 s odsječcima od 0,086 i 0,037 u serumu, što dokazuje odlično podudaranje kvantifikacija HCV-a između dvaju tijekova rada za dva volumena obrade. Bland-Altmanova usporedba pokazala je minimalno odstupanje između dvaju radnih tijekova. Osim toga, jednostavne linearne regresijske analize s očekivanom koncentracijom i prijavljenom koncentracijom za tijek rada za volumen od 200 µl imale su nagib od 1,0432 i koeficijent korelacije od 0,994 (za plazmu) te 1,0007 i 0,993 (za serum), što dodatno potvrđuje odlični radni učinak primjene tijeka rada za ispitke volumena 200 µl za ispitivanje NeuMoDx HCV Quant Assay. Rezultati tih ispitivanja sažeti su u nastavku na *slici 9* i *slici 10*.



**Slika 9:** Usporedbe dijagrama ekvivalentnosti prijavljenih koncentracija za tijek rada za ispitke volumena 200  $\mu$ l u odnosu na prijavljene koncentracije za tijek rada za ispitke volumena 550  $\mu$ l. A) Passing-Bablokova regresija. B) Demingova regresija. C) Bland-Altmanov dijagram raspršenosti D) Bland-Altmanov dijagram razlika – ispitci plazme



**Slika 10:** Usporedbe dijagrama ekvivalentnosti prijavljenih koncentracija za tijek rada za ispitke volumena 200 µl u odnosu na prijavljene koncentracije za tijek rada za ispitke volumena 550 µl. A) Passing-Bablokova regresija. B) Demingova regresija. C) Bland-Altmanov dijagram raspršenosti D) Bland-Altmanov dijagram razlika – ispitci seruma

### REFERENCE

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

### ZAŠITNI ZNAKOVI


NeuMoDx™ i NeuDry™ su zaštitni znakovi tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc. AcroMetrix™ je zaštitni znak tvrtke Thermo Fisher Scientific. Armored RNA® je registrirani zaštitni znak tvrtke Asuragen, Inc. BD Vacutainer® je registrirani zaštitni znak tvrtke Becton, Dickinson and Company BD, PPT™ i SST™ su zaštitni znakovi tvrtke Becton, Dickinson and Company TaqMan® je registrirani zaštitni znak tvrtke Roche Molecular Systems, Inc.


Svi drugi nazivi proizvoda, zaštitni znakovi i registrirani zaštitni znakovi koji se mogu pojaviti u ovom dokumentu u vlasništvu su svojih vlasnika.


### LEGENDA SIMBOLA


**R only** Za uporabu samo uz recept


 Proizvođač

 Medicinski proizvod za *in vitro* dijagnostiku


 Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici


 Kataloški broj


 Kód šarže

 Upotrijebiti do

 Temperaturno ograničenje


 Nije za ponovnu uporabu

 Sadrži dovoljno za <n> testova

 Pročitajte upute za upotrebu

 Oprez

 Biološke opasnosti

 Oznaka CE



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

Naručitelj (Australija):  
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



Tehnička podrška / izvještaj o kontroli sigurnosti: [support@qiagen.com](mailto:support@qiagen.com)

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