

REF 201501 NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip 2.0**R only**

OPREZ: samo za izvoz u SAD

IVD Za in vitro dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx 288 i NeuMoDx 96 Molecular SystemZa ažurirane upute posjetite stranicu www.qiagen.com/neumodx-ifu

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

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

NAMJENA

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 automatizirani je *in vitro* test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za kvantifikaciju DNK humanog Epstein-Barrova virusa (Epstein-Barr Virus, EBV) u EDTA plazmi imunokompromitiranih pacijenata s transplantiranim organima.

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 provedeno na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System i sustavu NeuMoDx 96 Molecular System uključuje automatiziranu ekstrakciju DNK radi izolacije ciljnih nukleinskih kiselina iz ispitka i PCR u stvarnom vremenu radi ciljanja dviju vrlo konzerviranih regija u genomu EBV-a.

Ispitivanje je namijenjeno kao pomoć pri praćenju razina DNK EBV-a u perifernoj krvi radi procjene virusnog odgovora na liječenje. Ispitivanje je namijenjeno za uporabu u kombinaciji s kliničkom slikom i drugim laboratorijskim markerima napretka bolesti za kliničko zbrinjavanje i praćenje infekcije EBV-om.

Ispitivanje nije namijenjeno za uporabu kao test probira na prisutnost DNK EBV-a u krvi ili krvnim pripravcima. Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 namijenjeno je za uporabu od strane obučenog osoblja kliničkog laboratorija koje je posebno obučeno i osposobljeno za tehnike PCR-a u stvarnom vremenu i *in vitro* dijagnostičke postupke i/ili rad na sustavima NeuMoDx Molecular Systems. Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 nije namijenjeno za samotestiranje ili za uporabu na mjestima pružanja skrbi.

SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Za pripremu plazme može se upotrebljavati humana puna krv prikupljena u sterilnim epruvetama za prikupljanje krvi koje sadrže EDTA kao antikoagulacijsko sredstvo. Kako bi se započelo testiranje, plazma u epruveti za ispitke kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se na nosač epruveta za ispitke i na radnu površinu sustava NeuMoDx System. Za svaki se ispitak alikvot uzorka plazme volumena 550 µl miješa s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 1 i sustav NeuMoDx System automatski izvodi sve korake potrebne za ekstrakciju ciljane nukleinske kiseline, pripremu izolirane DNK za PCR amplifikaciju u stvarnom vremenu i, ako su prisutni, amplifikaciju i detekciju produkata amplifikacije (dvije vrlo konzervirane regije u genomu EBV-a). Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 uključuje kontrolu obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) DNK za pomoć s praćenjem prisutnosti potencijalno inhibirajućih tvari te pogrešaka sustava NeuMoDx System ili reagensa koje se mogu dogoditi tijekom postupka ekstrakcije i amplifikacije.

EBV je uobičajeni dvolančani DNK virus iz porodice humanih herpesvirusa kojim se mogu zaraziti osobe svih dobnih skupina. Procjenjuje se da je > 90 % osoba diljem svijeta trenutačno zaraženo EBV-om ili su bile zaražene u prošlosti.¹ EBV se širi putem tjelesnih tekućina kao što su slina, krv i sperma te putem transplantacije organa. Mnogi se zaraze EBV-om u djetinjstvu. Te osobe, iako su zaražene EBV-om, potpuno su asimptomatske. Imunokompromitirane osobe mogu razviti teže simptome i komplikacije od infekcije EBV-om. Latentna infekcija EBV-om predstavlja najveću opasnost za pacijente nakon transplantacije. Posttransplantacijski limfoproliferativni poremećaji (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLDs) uključuju stvaranje tumora uzrokovanog EBV-om u B stanicama zbog učinka imunosupresivnih sredstava na imunološku kontrolu EBV-a, jednog od najznačajnijih uzroka morbiditeta i smrtnosti kod pacijenata koji su podvrgnuti bilo kojoj vrsti transplantacije organa.²

Praćenje virusnog opterećenja EBV-a može se upotrijebiti kao pomoć pri dijagnosticiranju i zbrinjavanju PTLD-a povezanog s EBV-om. Međutim, dijagnozu treba postaviti s pomoću biopsije. Praćenje virusnog opterećenja EBV-a može se upotrijebiti i za praćenje odgovora na liječenje PTLD-a povezanog s EBV-om, obično lijekom rituksimab i smanjenjem imunosupresivne terapije.³

NAČELA POSTUPKA

Za ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 na sustavu NeuMoDx System upotrebljavaju se testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, kalibratori NeuMoDx EBV Calibrators, kontrole NeuMoDx EBV External Controls, pufer NeuMoDx Lysis Buffer 1 i reagensi NeuMoDx za opću uporabu za izvođenje analize. Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 kombinira automatiziranu ekstrakciju DNK, amplifikaciju i detekciju izvođenjem PCR-a u stvarnom vremenu. Ispitci pune krvi prikupljaju se u epruvete s EDTA radi pripreme plazme. Ispitak plazme u epruveti za uzorke kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se u nosač epruveta za ispitke i zatim postavlja na radnu površinu sustava NeuMoDx System radi obrade. Nije potrebna dodatna intervencija korisnika.

Za automatsko provođenje lize stanica i ekstrakcije DNK te za uklanjanje inhibitora sustavi NeuMoDx Systems koriste se kombinacijom topline, litičkog enzima i ekstrakcijskih reagensa. Mikrosfere s magnetskim afinitetom hvataju oslobođene nukleinske kiseline. Mikrosfere s vezanim nukleinskim kiselinama postavljaju se u uložak NeuMoDx Cartridge, gdje se nevezane komponente koje nisu dio DNK ispiru s pomoću reagensa NeuMoDx Wash Reagent, a vezana DNK se eluira s pomoću reagensa NeuMoDx Release Reagent. U sustavima NeuMoDx Systems eluirana DNK zatim se upotrebljava za rehidraciju patentiranih NeuDry™ reagensa za amplifikaciju koji sadrže sve elemente neophodne za PCR amplifikaciju ciljnih sekvenci specifičnih za EBV i kontrole SPC1. Nakon rekonstitucije NeuDry PCR reagensa sustav NeuMoDx System pipetira pripremljenu mješavinu za PCR u uložak NeuMoDx Cartridge. Amplifikacija i detekcija kontrolnih i ciljnih DNK sekvenci (ako su prisutne) odvija se u području PCR komore uložka NeuMoDx Cartridge. Uložak NeuMoDx Cartridge također je osmišljen da zadrži amplikon nakon PCR-a u stvarnom vremenu i na taj način praktički ukloni rizik od kontaminacije nakon amplifikacije.

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 cilja dvije vrlo konzervirane regije, BALF5 i BXFL1, u genomu EBV-a. Dizajn ispitivanja s dvije ciljne sekvence smanjuje rizik od lažno negativnih rezultata u slučaju mutacije u jednoj ciljnoj regiji čime se povećava otpornost ispitivanja. 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 prigušuje 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 proizvodi početnicu i sintetizira novi lanac, 5' do 3' egzonukleazna aktivnost DNK polimeraze Taq degradira probu sparenu s predložkom. Degradacijom probe oslobađa se fluorokrom i gubi se blizina prigušivaču, čime se zbog FRET-a prevladava učinak prigušivanja i omogućava fluorescentna detekcija fluorokroma. Dobiveni detektirani fluorescentni signal izravno je proporcionalan oslobođenom fluorokromu i može se korelirati s količinom prisutne ciljne DNK.

TaqMan proba označena fluorokromom (pobuda: 490 nm i emisija: 521 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju upotrebljava se za detekciju obje ciljne sekvence DNK EBV-a. Za detekciju SPC1, 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 izveštava rezultat (POSITIVE (POZITIVNO) / NEGATIVE (NEGATIVNO) / INDETERMINATE (NEODREĐENO) / NO RESULT (NEMA REZULTATA) / UNRESOLVED (NERAZRIJEŠENO)). Ako je rezultat POSITIVE (POZITIVNO), softver sustava NeuMoDx System također daje kvantitativnu vrijednost koja se odnosi na uzorak ili izvještava je li izračunata koncentracija izvan granica linearnog raspona.



REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Jedinica po pakiranju	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
201501	NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 <i>Suhi reagensi za RT-PCR koji sadrže probe i početnice TaqMan specifične za EBV i SPC1.</i>	6	16	96

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

REF.	Sadržaj
800501	NeuMoDx EBV Calibrators <i>Kompleti EBV kalibratora visoke i niske razine za jednokratnu uporabu za utvrđivanje valjanosti standardne krivulje (1 bočica svake kontrole = 1 komplet)</i>
900502	NeuMoDx EBV External Controls <i>Kompleti nisko pozitivnih, visoko pozitivnih i negativnih kontrola za EBV za jednokratnu uporabu za utvrđivanje svakodnevne valjanosti ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 (1 bočica svake kontrole = 1 komplet)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Suhe paramagnetske čestice, litički enzim i kontrole obrade uzorka</i>
400500	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Vršci s filtrima (300 µl) Hamilton® CO-RE / CO-RE II
235905	Vršci s filtrima (1000 µl) Hamilton CO-RE / CO-RE II

Potrebni instrumenti

Sustav **NeuMoDx 288 Molecular System** [REF. 500100] ili sustav **NeuMoDx 96 Molecular System** [REF. 500200]
NeuMoDx System Software 1.9.2.6 ili novija



UPOZORENJA I MJERE OPREZA

- Testna traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 namijenjena je samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx System.
- Ne upotrebljavajte reagense ili potrošni materijal nakon navedenog datuma isteka roka trajanja.
- Ne upotrebljavajte reagense ako je zaštitna folija potrgana ili ako je pakiranje oštećeno po dolasku.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal ili reagense ako je zaštitna vrećica otvorena ili oštećena pri dolasku.
- Valjana kalibracija testa (dobivena obradom kalibratora visoke i niske razine NeuMoDx EBV Calibrators [REF. 800501]) mora biti dostupna prije dobivanja rezultata testa za kliničke uzorke.
- Vanjske kontrole NeuMoDx EBV External Controls [REF 900502] moraju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

- Minimalni volumen ispitka sekundarnih alikvota plazme s EDTA-om detaljno je objašnjen u nastavku u odjeljku Priprema za test. 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.
- Izbjegavajte kontaminaciju svih reagensa i potrošnog materijala mikroorganizmima i deoksiribonukleazama (DNaza). Prilikom uporabe sekundarnih epruveta preporučuje se uporaba sterilnih jednokratnih pipeta za prijenos bez DNaze. 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 EBV Quant Test Strip 2.0, 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 EBV Quant Test Strip 2.0 i pločice NeuMoDx Extraction Plate te gornju površinu spremnika pufera NeuMoDx Lysis Buffer; 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.
- 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*⁴ te u dokumentu M29-A4 instituta CLSI.⁵
- Tijekom rada s kemikalijama uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku katu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Za više informacija pogledajte odgovarajuće sigurnosno-tehničke listove (Safety Data Sheets, SDS).
- Neiskorištene reagense i otpad odložite u skladu s državnim, saveznim, pokrajinskim i lokalnim propisima. Pridržavajte se preporuka iz sigurnosno-tehničkog lista (Safety Data Sheet, SDS).

NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0



Sadrži: borna kiselina. Opasnost! Uzrokuje jako nadraživanje oka. Može naštetiti plodnosti ili nerođenom djetetu. Prije uporabe pribaviti posebne upute. Ne rukovati prije upoznavanja i razumijevanja sigurnosnih mjera predostrožnosti. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU izloženosti ili sumnje na izloženost: zatražiti savjet/pomoć liječnika. Skladištiti pod ključem. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada.

Informacije za hitne slučajeve

CHEMTREC

Izvan SAD-a i Kanade +1 703-527-3887



POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

1. Testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 stabilne su u primarnom pakiranju do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci proizvoda kada se čuvaju na temperaturi od 15 °C do 28 °C.
2. Nakon postavljanja testna traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 može ostati na sustavu NeuMoDx System 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.
3. Iako nisu infektivni, kalibratore NeuMoDx EBV Calibrators i kontrole NeuMoDx EBV External Controls nakon uporabe treba odložiti kao laboratorijski biološki opasan otpad kako bi se smanjio rizik od kontaminacije.

PRIKUPLJANJE, PRIJEVOZ I POHRANA ISPITAKA

Rukujte svim ispitcima kao da mogu prenijeti infektivne agense.

1. Nemojte zamrzavati punu krv ni bilo kakve ispitke pohranjene u primarnim epruvetama.
2. Za pripremu ispitaka plazme punu krv treba prikupiti u sterilne epruvete uz primjenu antikoagulansa EDTA. Pridržavajte se uputa proizvođača epruvete za prikupljanje ispitka.
3. Puna krv prikupljena u gore navedenim proizvodima može se čuvati i/ili prenositi do 24 sata na temperaturi od 2 °C do 25 °C prije pripreme plazme. Priprema plazme treba se izvoditi u skladu s uputama proizvođača.
4. Pripremljeni ispitci plazme mogu ostati na sustavu NeuMoDx System do 8 sati prije obrade. Ako je potrebno dodatno vrijeme pohrane, preporučuje se stavljanje ispitaka u hladnjak ili zamrzavanje.
5. Pripremljeni ispitci plazme do testiranja moraju biti pohranjeni na temperaturi od 2 do 8 °C najviše 7 dana i na sobnoj temperaturi najviše 8 sati.
6. Pripremljeni ispitci plazme mogu se pohraniti na –20 °C do 8 tjedana; uzorci plazme ne bi trebali proći više od 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije uporabe.
 1. Ako su ispitci zamrznuti, ostavite ih da se u potpunosti odmrznu dok ne dosegnu sobnu temperaturu (od 15 °C do 30 °C); promiješajte na vorteks miješalici za dobivanje ravnomjerno raspodijeljenog uzorka. Uzorci bi trebali biti na sobnoj temperaturi prije testiranja.
 2. Nakon odmrzavanja uzoraka testiranje treba provesti u roku od 8 sati.
7. Ako se ispitci otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.

UPUTE ZA UPOTREBU

Priprema za test

1. Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom za ispitak na epruvetu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System kako je opisano u nastavku.
2. Prenesite alikvot ispitka u epruvetu za ispitak s crtičnim kodom kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System u skladu s volumenima definiranim u nastavku:
3. *Za ispitke plazme:*
 - Nosač epruveta za ispitke (32 epruvete): promjera 11 – 14 mm i visine 60 – 120 mm; minimalni volumen punjenja $\geq 750 \mu\text{l}$
 - Nosač epruveta za ispitke (24 epruvete): promjera 14,5 – 18 mm i visine 60 – 120 mm; minimalni volumen punjenja $\geq 1100 \mu\text{l}$
 - Nosač epruveta za ispitke malog volumena (32 epruvete): epruvete od 1,5 ml za mikrocentrifugu sa stožastim dnom; minimalni volumen punjenja $\geq 650 \mu\text{l}$

Rad sustava NeuMoDx System

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

1. Popunite jedan ili više nosača testnih traka sustava NeuMoDx System testnim trakama NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosače testnih traka u sustav NeuMoDx System.
2. 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.
3. 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).
4. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, prema potrebi obradite kalibratore Calibrators [REF. 800501] i/ili vanjske kontrole External Controls [REF. 900502]. Dodatne informacije o kalibratorima i kontrolama možete pronaći u odjeljku *Obrada rezultata*.
5. Postavite epruvetu/epruvete za ispitke u nosač epruveta za ispitke i pobrinite se da uklonite čepove sa svih epruveta i brisove iz svih epruveta.
6. 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 ispitaka postavljenih za identificirane testove ako u sustavu postoji valjani nalog za test.

OGRANIČENJA

1. Testna traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx Systems.
2. Radni učinak testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 utvrđen je za ispitke plazme pripremljene iz pune krvi prikupljene s antikoagulansom EDTA. Uporaba testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 drugim izvorima nije procijenjena i radne značajke za ostale vrste ispitaka nisu poznate.
3. Budući da detekcija EBV-a obično ovisi o broju virusnih čestica prisutnih u uzorku, pouzdani rezultati ovise o propisnom prikupljanju, rukovanju i pohrani ispitaka.
4. Pogrešni rezultati javljaju se zbog nepropisnog prikupljanja, rukovanja i pohrane ispitaka, tehničke pogreške ili zamjene epruveta za ispitke. Dodatno, lažno negativni rezultati javljaju se jer je broj virusnih čestica u uzorku niži od granice detekcije ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.
5. Rad na sustavu NeuMoDx System ograničen je na osoblje obučeno za uporabu sustava NeuMoDx System.
6. Ako ne dođe do amplifikacije ciljne sekvence EBV-a i ciljne sekvence SPC1, prijavljuje se nevažeci rezultat (Indeterminate (Neodređeno) ili Unresolved (Nerazriješeno)) te je potrebno ponoviti test.
7. Ako dođe do pogreške sustava prije dovršetka obrade uzorka, prijavljuje se rezultat „No Result“ (Nema rezultata) te je potrebno ponoviti test.
8. U slučaju da je detektirani DNK EBV-a iznad ULoQ-a, ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 može se ponoviti s razrijeđenim alikvotom originalnog ispitka. Preporučuje se razrjeđenje u omjeru 1:100 ili 1:1000 plazmom negativnom na EBV ili diluansom Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare®, Milford, MA). Sustav će automatski izračunati koncentraciju originalnog ispitka na sljedeći način: koncentracija originalnog ispitka = \log_{10} (faktor razrjeđivanja) + prijavljena koncentracija razrijeđenog uzorka, pod uvjetom da je faktor razrjeđivanja ispravno odabran u softveru prije ponavljanja.
9. Prisutnost inhibitora PCR-a u plazmi može uzrokovati pogrešku određivanja sustava; ako do toga dođe, preporučuje se ponoviti test s istim ispitkom razrijeđenim diluansom Basematrix u omjeru 1:10 ili 1:100.
10. Pozitivan rezultat upućuje na prisutnost DNK EBV-a.
11. Iako je mogućnost niska, delecije ili mutacije u konzerviranim regijama koje su ciljane ispitivanjem NeuMoDx EBV Quant Assay mogu utjecati na detekciju i/ili kvantifikaciju i mogu dovesti do pogrešnih rezultata.
12. Rezultati ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 trebaju se upotrebljavati kao dodatak kliničkim opažanjima i ostalim informacijama koje su liječniku dostupne; test nije namijenjen za dijagnosticiranje infekcije.
13. 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 EBV Quant Assay 2.0 automatski generira softver sustava NeuMoDx System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay (EBV Quant ADF verzija 4.0.0 ili novija). Rezultat ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 može se prijaviti kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom DNK EBV-a, Indeterminate (Neodređeno), No Result (Nema rezultata) ili Unresolved (Nerazriješeno) na temelju statusa amplifikacije ciljne sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultati se prijavljuju na temelju algoritma odlučivanja koji obrađuje rezultate u ADF-u, koji je sažet u *tablici 1* u nastavku.

Tablica 1: tumačenje rezultata ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Rezultat	EBV – ciljne sekvence	Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Pozitivno)	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [2 ≤ Ct < 28 AND (I) EPR > 1,3 AND (I) EP > 1200] OR (II) [28 < Ct < 38 AND (I) EP > 1200]	N/A (N/P)
Positive (Pozitivno), iznad gornje granice određivanja [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (log10 IU/ml)	[CONC] (KONC.) > 8,0 log10 IU/ml, NO QUANT (NEMA KVANT.)	N/A (N/P)
Positive (Pozitivno), ispod donje granice određivanja [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (log10 IU/ml)	[CONC] (KONC.) < 1,48 log10 IU/ml, NO QUANT (NEMA KVANT.)	N/A (N/P)
Negative (Negativno)	NOT AMPLIFIED (NIJE AMPLIFICIRANO) N/P OR (II) [2 ≤ Ct < 28 AND (I) EPR ≤ 1,3 AND (I) EP > 1200] OR (II) [28 ≤ Ct < 38 AND (I) EP > 1200] OR (II) Ct > 38	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [29 < Ct < 35 and (i) EP ≥ 2000]
No Result (Nema rezultata)*	Not Amplified (Nije amplificirano), System Error Detected (Otkrivena pogreška sustava), Sample Processing Aborted (Obrada uzorka prekinuta)	
Indeterminate (Neodređeno)*	Not Amplified (Nije amplificirano), System Error Detected (Otkrivena pogreška sustava), Sample Processing Completed (Obrada uzorka završena)	
Unresolved (Nerazriješeno)*	Not Amplified (Nije amplificirano), No System Error Detected (Nema uočenih pogrešaka sustava)	

EP = End Point Fluorescence (Fluorescencija krajnje točke); EPR = End Point Fluorescence Ratio (Omjer fluorescencija krajnjih točaka); Ct = Cycling threshold (Prag cikliranja);

Quant (Kvant.) = izračunata količina prisutnog EBV-a izražena u log₁₀ IU/ml. Pogledajte odjeljak Izračun testa u nastavku.

* Sustav dopušta opcionalnu mogućnost Rerun (Ponovna obrada) / Repeat (Ponovi) za omogućivanje automatske ponovne obrade u slučaju nevažnog rezultata kako bi se smanjila kašnjenja u izvještavanju rezultata.

Izračun testa: uzorci

- Za uzorke unutar linearnog raspona ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 koncentracija DNK EBV-a u uzorcima izračunata je s pomoću pohranjene standardne krivulje u kombinaciji s koeficijentom kalibracije.
 - „Koeficijent kalibracije“ izračunava se na temelju rezultata dobivenih kalibratorima NeuMoDx EBV Calibrators koji su obrađeni kako bi se utvrdila valjanost standardne krivulje za svaku seriju testnih traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, na određenom sustavu NeuMoDx System.
 - Sustav automatski uključuje koeficijent kalibracije u konačno određivanje koncentracije DNK EBV-a.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 izraženi su u IU/ml i log₁₀ IU/ml.
- Dobiveno određivanje nepoznatih uzoraka sljedivo je do 1. međunarodnog standarda za tehnike amplifikacije nukleinske kiseline Epstein-Barrova virusa SZO-a.

Izračun testa: kalibratori

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

- Kalibratori NeuMoDx EBV Calibrators isporučuju se u kompletu [REF. 800501] i sadržavaju neinfektivnu enkapsuliranu ciljnu sekvencu EBV-a pripremljenu u diluensu Basematrix.

2. Komplet kalibratora za EBV treba obraditi sa svakom novom serijom testnih traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, ako se nova datoteka definicije ispitivanja za EBV učita na sustav NeuMoDx ako je trenutno postavljeno kompletno kalibratora premašio razdoblje valjanosti (postavljeno na 90 dana) ili ako je softver sustava NeuMoDx System izmijenjen.
3. Softver sustava NeuMoDx System obavijestit će korisnika kada treba obraditi kalibratore; nova serija testnih traka ne može se upotrebljavati dok kalibratori nisu uspješno obrađeni.
4. Valjanost kalibracije određuje se na sljedeći način:
 1. Komplet koji sadrži dva kalibratora, visoke i niske razine, treba obraditi kako bi se utvrdila valjanost.
 2. Za dobivanje valjanih rezultata barem 2 od 3 ponavljanja moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara. Nazivna ciljna vrijednost kalibratora niske razine iznosi 3 log₁₀ IU/ml, a nazivna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi 5 log₁₀ IU/ml.
 3. Koeficijent kalibracije izračunat je kako bi se ispravila očekivana varijacija između serija testnih traka; taj koeficijent kalibracije upotrebljava se za određivanje konačne koncentracije DNK EBV-a.
5. 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.
6. Ako provjera valjanosti kalibratora ne uspije drugi uzastopni put, obratite se tehničkoj podršci tvrtke QIAGEN.

Nevažeci rezultati

Ako ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat, prijavljuje se kao Indeterminate (Neodređeno), No Results (Nema rezultata) ili Unresolved (Nerazriješeno) ovisno o vrsti pogreške koja se pojavila te se test mora ponoviti kako bi se dobio valjani rezultat.

Rezultat Indeterminate (Neodređeno) prijavljuje se ako se tijekom obrade uzorka detektira pogreška sustava NeuMoDx System. U slučaju rezultata Indeterminate (Neodređeno) preporučuje se ponovno testiranje.

Rezultat No Result (Nema rezultata) prijavljuje se ako se detektira pogreška sustava NeuMoDx System te se obrada uzorka prekine. U slučaju rezultata No Result (Nema rezultata) preporučuje se ponovno testiranje.

Rezultat Unresolved (Nerazriješeno) prijavljuje se ako nema detektiranih ciljnih sekvenci i ako nema amplifikacije kontrole obrade uzorka, što ukazuje na moguću grešku reagensa ili na prisutnost inhibitora. U slučaju rezultata Unresolved (Nerazriješeno), kao prvi korak preporučuje se ponovno testiranje. U slučaju da ponovno testiranje ne uspije, može se upotrijebiti razrijeđeni ispitak kako bi se ublažio učinak moguće inhibicije (pogledajte odjeljak s ograničenjima za daljnje upute).

Pogledajte korisnički priručnik za sustav NeuMoDx 288 Molecular System (br. dijela: 40600108) ili korisnički priručnik za sustav NeuMoDx 96 Molecular System (br. dijela: 40600317) za popis kodova pogrešaka koje mogu biti povezane s nevažecim rezultatima.

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. Vanjske kontrole koji sadrže neinfektivnu enkapsuliranu ciljnu sekvencu EBV-a u diluensu Basematrix za pozitivne kontrole ili Basematrix za negativne kontrole, isporučuje tvrtka QIAGEN u sklopu kompleta koji sadrži NeuMoDx EBV External Controls [REF. 900502].
2. Pozitivne i negativne vanjske kontrole trebaju se obraditi jednom svaka 24 sata. Ako nema kompleta valjanih vanjskih kontrola, softver sustava NeuMoDx System od korisnika će zatražiti da obradi te kontrole kako bi mogao prijaviti rezultate za uzorak:

Kontrole NeuMoDx EBV External Controls	Očekivana koncentracija	Shema boje oznake
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	1,5E4 IU/ml (4,18 log ₁₀ IU/ml)	Crvena
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	150 IU/ml (2,18 log ₁₀ IU/ml)	Siva
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	N/A (N/P)	Crna

3. Kada obrađujete vanjske kontrole, postavite kontrole u nosač epruveta za ispitke i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač u sustav NeuMoDx System s police za automatsko postavljanje. Sustav NeuMoDx System prepoznaje crtične kodove i započinje obradu kontrola, osim ako reagensi ili potrošni materijal nužni za testiranje nisu dostupni.
4. Valjanost tih vanjskih kontrola procijenit će se na sustavu NeuMoDx System na temelju očekivanih rezultata.

Kontrole NeuMoDx EBV External Controls	Rezultat kvantifikacije EBV-a	Rezultat za SPC1
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	EBV POSITIVE (POZITIVNO NA EBV) [Konc.] 3,68 – 4,68 log ₁₀ IU/ml	Pozitivno na SPC1
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	EBV POSITIVE (POZITIVNO NA EBV) [Konc.] 1,58 – 2,78 log ₁₀ IU/ml	Pozitivno na SPC1
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	EBV NEGATIVE (NEGATIVNO NA EBV)	Pozitivno na SPC1

5. U slučaju nepodudarnih rezultata vanjskih kontrola treba postupiti na sljedeći način:
 1. Rezultat testa Positive (Pozitivno) prijavljen za negativan kontrolni uzorak može ukazivati na kontaminaciju te treba provjeriti postupke kontrole kvalitete laboratorija kako bi se pronašao temeljni uzrok. Obvezno upotrebljavajte zasebna područja za pripremu uzorka, rukovanje kontrolom i postavljanje RT-PCR-a. Dodatne savjete za rješavanje problema potražite u *korisničkom priručniku sustava NeuMoDx 288 Molecular System ili 96 Molecular System*.
 2. Rezultat Negative (Negativno) prijavljen za pozitivan kontrolni uzorak može ukazivati na problem povezan s reagensima ili instrumentom.
 3. U bilo kojem od gore navedenih slučajeva ili u slučaju rezultata No Result (NR) (Nema rezultata), Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ili Indeterminate (IND) (Neodređeno) ponovite obradu neuspjele kontrole sa svježe odmrznutim bočicama kontrole čije testiranje valjanosti nije uspjelo.
 4. Ako se za pozitivnu vanjsku kontrolu i dalje dobiva rezultat Negative (Negativno), obratite se tehničkoj podršci tvrtke QIAGEN.
 5. Ako se za negativnu vanjsku kontrolu i dalje dobiva rezultat Positive (Pozitivno), pokušajte ukloniti sve izvore potencijalne kontaminacije, što uključuje zamjenu svih reagensa i ponavljanje obrade, prije nego što se obratite tehničkoj podršci tvrtke QIAGEN.
6. Ako vanjske kontrole ne daju očekivane rezultate, potrebno je ponoviti skup pozitivnih i negativnih kontrola. Rezultati za uzorke neće se prijaviti ako kontrole ne daju očekivane rezultate.
7. Sustav NeuMoDx System opremljen je automatskom opcijom Rerun (Ponovna obrada) / Repeat (Ponovi) koju korisnik može odabrati kako bi se pobrinuo da se rezultat INVALID (NEVAŽEĆE) automatski ponovno obradi kako bi se minimizirala kašnjenja u izvještavanju rezultata.

Kontrole obrade uzorka (interne)

Egzogena kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) uključena je u pločicu NeuMoDx Extraction Plate i podvrgnuta cijelom postupku ekstrakcije nukleinske kiseline i RT-PCR amplifikacije u stvarnom vremenu sa svakim uzorkom/kontrolom/kalibratorom. Početnice i probe specifične za SPC1 uključene su u svaku testnu traku NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0. SPC1 sustavu NeuMoDx System omogućava praćenje učinkovitosti postupaka ekstrakcije DNK i RT-PCR amplifikacije.

RADNE ZNAČAJKE

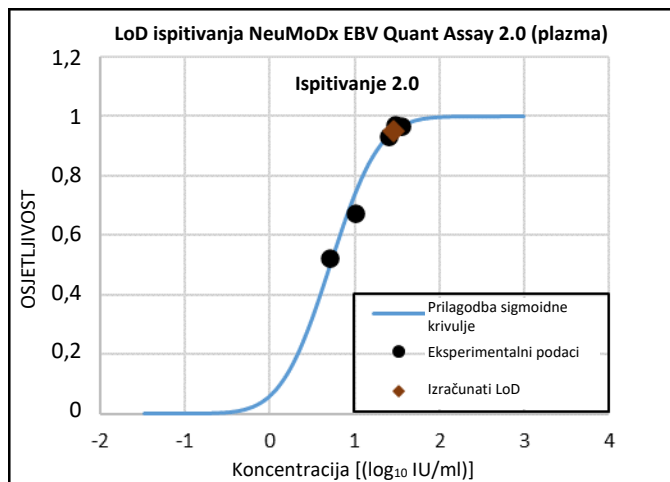
ANALITIČKA OSJETLJIVOST – granica detekcija

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 karakterizirana je u dvije uzastopne faze: 1. preliminarna procjena granice detekcije (Limit of Detection, LoD) (probit analiza) nakon koje slijedi 2. potvrda LoD-a. U 1. dijelu negativni ispitci i serijsko razrjeđivanje 1. međunarodnog standarda SZO-a u probranoj humanoj plazmi negativnoj na EBV ispitani su radi određivanja preliminarnog LoD-a na sustavu NeuMoDx System. Preliminarni LoD definiran je kao najniža ciljna razina detektirana pri stopi od 95 % određena probit analizom. U 2. dijelu preliminarni LoD potvrđen je ispitivanjem surogat panela na razini LoD-a. Obje faze ispitivanja provedene su tijekom 3 dana na više sustava s više serija reagensa NeuMoDx. U 1. dijelu obrađeno je ukupno 144 ponavljanja pri svakoj razini razrjeđivanja. Stope detekcije prikazane su u *tablici 2*.

Tablica 2: preliminarno određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Ciljna koncentracija [IU/ml]	Ciljna koncentracija [\log_{10} IU/ml]	PLAZMA		
		Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
35	1,54	144	139	96,5 %
30	1,48	144	140	97,2 %
25	1,40	143	133	93,0 %
10	1,00	144	97	67,4 %
5	0,70	143	75	52,4 %
NEG.	---	144	0	0,0 %

Utvrđeno je da LoD ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 u plazmi upotrebom 1. međunarodnog standarda SZO-a za EBV iznosi 29,3 IU/ml ($1,47 \log_{10}$ IU/ml) s 95-postotnim intervalom pouzdanosti (Confidence Interval, CI) od 24,4 do 37,1 IU/ml, ($1,39 - 1,57 \log_{10}$ IU/ml) [slika 1]. Taj je LoD zatim potvrđen analizom stope uspješnosti koja je opisana u *tablici 3*.



Slika 1: probit analiza korištena za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 u uzorcima plazme

Tablica 3: potvrđivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Sustav	Ciljna koncentracija [IU/ml]	Ciljna koncentracija [log ₁₀ IU/ml]	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
N96	29,3	1,47	96	94	97,9 %
N288			96	92	95,8 %
Svi			192	186	96,9 %

Potvrđeno je da LoD genotipa 2 (Genotype 2, GT2) EBV-a iznosi 29,3 IU/ml [1,47 log₁₀ IU/ml] kao što je određeno analizom stope uspješnosti.

Na temelju rezultata obaju ispitivanja utvrdilo se da LoD ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 iznosi 29,3 IU/ml [1,47 log₁₀ IU/ml].

ANALITIČKA OSJETLJIVOST – donja granica određivanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

LLoQ se definira se kao najniža ciljna razina pri kojoj se postiže stopa detekcije > 95 % i ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) ≤ 1,0. Kako bi se odredio LLoQ, ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) izračunata je za svaku ciljnu razinu EBV-a za koju je dobivena detekcija > 95 % u sklopu izračuna LoD-a. TAE se definira na sljedeći način:

$$\text{TAE} = \text{odstupanje} + 2 \cdot \text{SD} \text{ (Westgardova statistička pravila)}$$

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 5 razina 1. međunarodnog standarda SZO-a za EBV u ispitcima plazme koji su se upotrebljavali za ispitivanje LLoQ prikazani su u *tablici 4*. Na temelju tog skupa podataka i prethodno određenog LoD-a, utvrđeno je da LLoQ iznosi 30,0 IU/ml (1,48 log₁₀ IU/ml) i to je naknadno potvrđeno za testiranje genotipa 2 (Genotype 2, GT2) EBV-a.

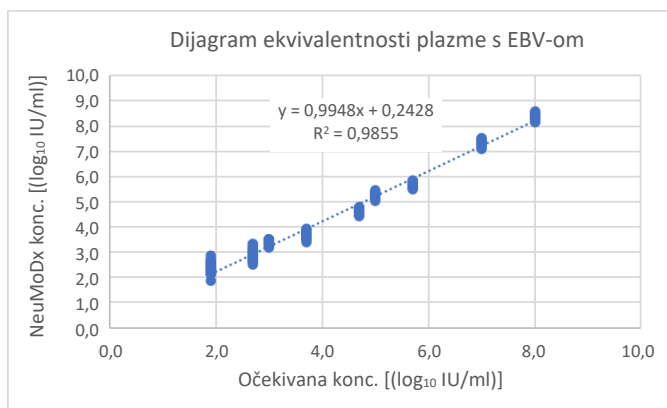
Tablica 4: LLoQ ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 s odstupanjem i TAE

Ciljna konc. [IU/ml]	Ciljna konc. [log ₁₀ IU/ml]	Plazma				
		Prosječna konc. [log ₁₀ IU/ml]	Stopa detekcije	SD	Odstupanje	TAE
35	1,54	2,05	96,5 %	0,23	0,50	0,96
30	1,48	1,97	97,2 %	0,24	0,49	0,98
25	1,40	1,93	93,0 %	0,24	0,53	1,02
10	1,00	1,96	67,4 %	0,31	0,96	1,59
5	0,70	1,83	52,4 %	0,27	1,13	1,68

Na temelju ishoda tih ispitivanja, utvrđeno je da LoD ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 iznosi 29,3 IU/ml (1,47 log₁₀ IU/ml), a LLoQ 30,0 IU/ml [1,48 log₁₀ IU/ml].

Linearnost i određivanje gornje granice određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearnost i gornja granica određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 utvrđene su u plazmi pripremom serijskih razrjeđivanja primjenom 1. međunarodnog standarda za EBV SZO-a i dva dodatna standarda: NeuMoDx enkapsulirane ciljne sekvence EBV-a i ATCC EBV kulture (ATCC, Manassas, VA). Sljedivost do 1. međunarodni standard za EBV SZO-a utvrđena je za sve sekundarne standarde prije testiranja. Panel s 10 sastavnica pripremljen je u poolu plazme negativne na EBV za izradu panela koji obuhvaća raspon koncentracije 1,48 – 8,0 log₁₀ IU/ml. Utvrđeno je da ULoQ ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 iznosi 8,0 log₁₀ IU/ml. Pripremljen je potvrdni panel za procjenu linearnosti standardne krivulje, a koncentracije ispitivanja za EBV koje je prijavio sustav NeuMoDx System uspoređene s očekivanim vrijednostima prikazane su na *sllici 2*.



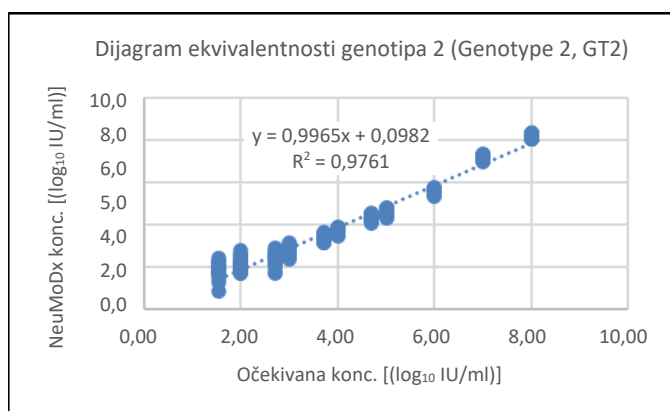
Slika 2: linearnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Linearnost genotipa 2 (Genotype 2, GT2) EBV-a

Linearnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 diljem genotipa 2 (Genotype 2, GT2) EBV-a karakterizirana je testiranjem jedanaest različitih koncentracija EBV GT2 s uspostavljenom sljedivošću do 1. međunarodnog standarda SZO-a za EBV pripremljenog u poolu plazme negativne na EBV. Ispitivanje je obavljeno testiranjem 36 ponavljanja pri 11 koncentracija na 2 sustava NeuMoDx System i 3 serije testnih traka EBV Quant Test Strips 2.0. Linearnost za genotip 2 (Genotype 2, GT2) EBV-a prikazana je u *tablici 5* i na *slici 3*.

Tablica 5: linearnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 za genotip 2 EBV-a

Genotip	Jednadžba linearnosti y = određivanje ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 x = očekivano određivanje	R ²
GT2	$y = 0,9965x - 0,0982$	0,9761



Slika 3: linearnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 za genotip 2 EBV-a

Analitička specifičnost – križna reaktivnost

Analitička specifičnost dokazana je probirom na 36 organizama koji se mogu pronaći u ispocima krvi/plazme te na vrste filogenetski slične EBV-u radi utvrđivanja križne reaktivnosti. Organizmi pri visokim koncentracijama pripremljeni su u poolovima koji su sadržavali 5 – 6 organizama. Testirani organizmi prikazani su u *tablici 6*. Nije uočena križna reaktivnost s bilo kojim od testiranih organizama, čime je potvrđena 100-postotna analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Tablica 6: patogeni korišteni za dokazivanje analitičke specifičnosti

Organizmi koji nisu ciljani ispitivanjem					
BK poliomavirus	Adenovirus tipa 5	Virus herpesa simplexa tipa 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Citomegalovirus	Virus hepatitisa C	Virus herpesa simplexa tipa 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Humani herpes virus tipa 6	Parvovirus B19	Virus varicella-zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Humani herpes virus tipa 7	JC virus	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Humani herpes virus tipa 8	Humani papiloma virus tipa 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus hepatitisa B	Humani papiloma virus tipa 18	SV 40	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>

Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, komenzalni organizmi

Interferencija ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 procijenjena je u prisutnosti organizama koji nisu ciljani ispitivanjem primjenom poolova organizama koji su jednaki onima pripremljenima za testiranje križne reaktivnosti, a koji su prethodno navedeni u *tablici 6*. U plazmu negativnu na EBV dodani su poolovi organizama u skupinama od 4 do 7; u te je poolove plazme zatim dodana ciljna sekvenca EBV-a pri koncentraciji od 90 IU/ml [$1,95 \log_{10}$ IU/ml]. Nije uočena značajna interferencija u prisutnosti tih organizama na što ukazuje minimalna devijacija određivanja od kontrolnih ispitaka koji ne sadrže interferirajuće agense.

Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, endogene i egzogene tvari

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 procijenjeno je u prisutnosti uobičajenih egzogenih i endogenih interferirajućih tvari pronađenih u kliničkim ispitcima plazme s EBV-om. To je uključivalo abnormalno visoke razine komponenti krvi te uobičajene antivirusne i imunosupresivne lijekove, klasificirane u *tablici 7*. Svaka tvar dodana je u probranu humanu plazmu negativnu na EBV u koju je dodano 90 IU/ml EBV-a [$1,95 \log_{10}$ IU/ml] i uzorci su analizirani kako bi se utvrdila interferencija usporedbom prijavljenih koncentracija u usporedbi s pozitivnom kontrolom. Osim toga, plazme pacijenata s uobičajenim stanjima bolesti povezanim s infekcijom EBV-om također su testirane kako bi se utvrdila potencijalna interferencija. Prosječna koncentracija i odstupanje svih tvari ispitanih u usporedbi s kontrolnim uzorcima u koje je dodana jednaka razina EBV-a navedeni su u *tablici 8*. Nijedna od egzogenih i endogenih tvari nije utjecala na specifičnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Tablica 7: testiranje interferencije – egzogeni agensi (klasifikacija lijekova)

Pool	Naziv lijeka	Klasifikacija	Pool	Naziv lijeka	Klasifikacija
Pool 1	Azatioprin	Imunosupresiv	Pool 4	Trimetoprim	Antibiotik
	Ciklosporin	Imunosupresiv		Vankomicin	Antibiotik
	Foskarnet	Antivirusni (Herpesviridae)		Takrolimus	Imunosupresiv
	Ganciklovir	Antivirusni (EBV)		Everolimus	Imunosupresiv
	Valganciklovir hidroklorid	Antivirusni (EBV)		Kalijev klavulanat	Antibiotik
Pool 2	Prednizon	Kortikosteroid/ imunosupresiv	Pool 5	Famotidin	Antagonist receptora histamina
	Cidofovir	Antivirusni (EBV)		Sulfametoksazol	Antibiotik
	Cefotetan	Antibiotik (širokog spektra)		Valaciklovir	Antivirusni (Herpesviridae)
	Cefotaksim	Antibiotik (širokog spektra)		Letermovir	Antivirusni (EBV)
	Flukonazol	Antifungalni		Dinatrijev tikarcilin	Antibiotik
Pool 3	Mikofenolat mofetil	Imunosupresiv		Leflunomid	Imunosupresiv
	Mikofenolat-natrij	Imunosupresiv			
	Piperacilin	Antibiotik			
	Sirolimus/rapamicin	Imunosupresiv			
	Tazobaktam	Modificirani antibiotik			

Tablica 8: testiranje interferencije – endogeni i egzogeni agensi

Endogeno + stanje bolesti	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Hemoglobin	2,19	0,32
Trigliceridi	1,90	0,02
Bilirubin	2,12	0,24
Albumin	1,95	0,07
Sistemiški eritemski lupus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	2,08	0,20
Antinuklearno protutijelo (Antinuclear Antibody, ANA)	2,36	0,48
Reumatoidni artritis (Rheumatoid Arthritis, RA)	1,89	0,01
Pozitivna kontrola	1,88	N/P
Egzogeno (lijekovi)	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Pool 1: azatioprin, ciklosporin, foskarnet, ganciklovir, valganciklovir hidroklorid	2,19	0,09
Pool 2: prednizon, cidofovir, cefotetan, cefotaksim, flukonazol	2,11	0,01
Pool 3: mikofenolat mofetil, mikofenolat-natrij, piperacilin, sirolimus/rapamicin, tazobaktam	2,16	0,06
Pool 4: trimetoprim, vankomicin, takrolimus, everolimus, kalijev klavulanat	2,24	0,14
Pool 5: famotidin, sulfametoksazol, letermovir, valaciklovir, dinatrijev tikarcilin, leflunomid	2,26	0,16
Pozitivna kontrola	2,10	N/P

Preciznost unutar laboratorija

Preciznost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 određena je testiranjem 3 ponavljanja panela ispitaka EBV-a sa 6 sastavnica pripremljenih s kontrolom NeuMoDx EBV Positive Control i EBV kulturom (ATCC, Manassas, VA) dvaput dnevno na dva sustava NeuMoDx 288 System i dva sustava NeuMoDx 96 System tijekom 12 dana. Određene su preciznosti unutar obrade, unutar dana i unutar sustava i utvrđena je ukupna standardna devijacija od $\leq 0,18 \log_{10}$ IU/ml. Dokazana je izvrsna preciznost među sustavima, danima i obradama kao što je prikazano u *tablici 9*. Preciznost između korisnika nije određena jer korisnik ne igra značajnu ulogu u obradi uzoraka na sustavu NeuMoDx System.

Tablica 9: preciznost unutar laboratorija – ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 na sustavima NeuMoDx Systems

Ciljna konc. EBV-a [log ₁₀ IU/ml]	Prosječna konc. EBV-a [log ₁₀ IU/ml]	SD unutar sustava	SD unutar dana	SD unutar obrade	Ukupni SD (unutar laboratorija)
7,70	7,82	0,10	0,08	0,08	0,11
6,00	6,07	0,12	0,11	0,11	0,13
5,00	4,75	0,13	0,12	0,11	0,13
4,00	3,78	0,13	0,11	0,11	0,14
3,00	2,93	0,15	0,14	0,13	0,16
1,95	2,19	0,17	0,16	0,16	0,18

Obnovljivost među serijama

Obnovljivost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 među serijama određena je s pomoću 3 serije testnih traka NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 u sklopu ispitivanja preciznosti unutar laboratorija. Panel plazme pozitivne na EBV sa 6 sastavnica upotrijebljen je za procjenu radnog učinka (*tablica 10*). Rezultati dobiveni među serijama analizirani su i prikazani u *tablici 10*. Maksimalno odstupanje bilo je $0,29 \log_{10}$ IU/ml, a maksimalna standardna devijacija (Standard Deviation, SD) bila je $0,18 \log_{10}$ IU/ml za testne trake NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strips 2.0. Ekvivalentan radni učinak dokazan je među serijama jer je određivanje svih sastavnica panela bilo unutar specifikacije tolerancije.

Tablica 10: obnovljivost među serijama – testna traka NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strip 2.0

Očekivana konc. (log ₁₀ IU/ml)	Serija 1			Serija 2			Serija 3		
	Prosječna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Konc. u log SD	Aps. odst.	Prosječna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Konc. u log SD	Aps. odst.	Prosječna konc. (log ₁₀ IU/ml)	Konc. u log SD	Aps. odst.
7,70	7,82	0,11	0,12	7,84	0,10	0,14	7,79	0,09	0,09
6,00	6,08	0,12	0,08	6,10	0,10	0,10	6,04	0,10	0,04
5,00	4,77	0,13	0,23	4,78	0,13	0,22	4,71	0,10	0,29
4,00	3,80	0,15	0,20	3,81	0,13	0,19	3,74	0,11	0,26
3,00	2,96	0,16	0,04	2,96	0,15	0,04	2,87	0,16	0,13
1,95	2,20	0,18	0,25	2,22	0,18	0,27	2,16	0,16	0,21

Učinkovitost kontrole obrade uzorka

Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) uključena je u ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 za prijavljivanje neuspjelih koraka obrade ili inhibicija koje utječu na radni učinak ispitivanja. Primjenom ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay kao modela, učinkovitost SPC1 testirana je za ispitke plazme 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. Ispitci pozitivni na citomegalovirus (od 3 log₁₀ IU/ml) i negativni ispitci ispitani su pod sljedećim uvjetima: prisutnost inhibitora, nije dovedena otopina za ispiranje i nema ispuštanja reagensa za ispiranje. Neučinkovitosti obrade koje su imale negativan utjecaj na detekciju/određivanje ciljne sekvence virusa odražavale su učinkovitost detekcije ciljne sekvence SPC1 kao što je prikazano u *tablici 11*. 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 SPC1 ni detekciju ili određivanje ciljne sekvence virusa. Stoga se pokazala uspješnost SPC1 u učinkovitom praćenju radnog učinka ispitivanja na sustavu NeuMoDx System.

Tablica 11: učinkovitost kontrole obrade uzorka na virusnu DNK u plazmi*

Testiran neuspjeli korak obrade	Status amplifikacije kontrole obrade uzorka 1	Status amplifikacije ciljne sekvence CMV-a	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 određivanjem unutar 0,3 log ₁₀ IU/ml kontrole

*Citomegalovirus (Cytomegalovirus, CMV) u ispitcima plazme upotrebljavao se kao model za procjenu učinkovitosti kontrole obrade uzorka.

Križna kontaminacija

Stopa križne kontaminacije za ispitke plazme utvrđena je naizmjeničnom obradom uzoraka visoko pozitivnih i negativnih na EBV. Pet skupova takvih naizmjeničnih testiranja provedena su s ukupno 60 ponavljanja plazme negativne na EBV i 60 ponavljanja plazme u koju je dodan EBV pri koncentraciji od 6,0 log₁₀ IU/ml na sustavima NeuMoDx 288 i 96 Molecular System. U obje vrste sustava, svih 120 ponavljanja obrade negativnog ispitka dala su negativan rezultat, što pokazuje da ne dolazi do nikakve križne kontaminacije tijekom obrade uzoraka plazme na sustavu NeuMoDx System.

Ekvivalentnost matrice ispitka

Testiranje je provedeno kako bi se dokazala ekvivalentnost između svježih i zamrznutih ispitaka plazme primjenom sličnog virusa koji se prenosi krvlju, CMV, kao modela. Svježi ispitci čuvali su se na 4 °C sve dok u njih nisu dodane tri razine CMV-a i dok nije provedeno testiranje ekvivalentnosti. Uzorci su zamrznuti u trajanju od najmanje 24 sata pri –20 °C. Nakon tog razdoblja pohrane u zamrznutom stanju ispitci su odmrznuti i ponovno testirani. Rezultati svježih i zamrznutih ispitaka plazme uspoređeni su metodom regresijske analize kako bi se utvrdila ekvivalentnost. Podaci su pokazali izvrsnu ekvivalentnost između svježih i zamrznutih ispitaka plazme s nagibom od 1,0 i vrlo niskim odstupanjem (odsječak), kao što je prikazano u *tablici 12* u nastavku.

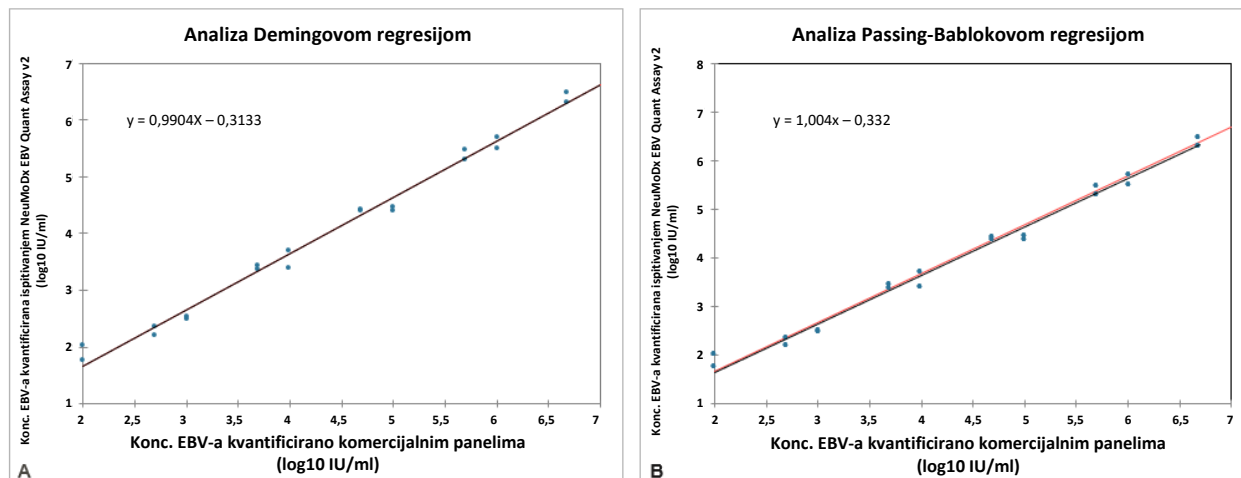
Tablica 12: ekvivalentnost matrice ispitka

Zahtjevi u pogledu parametara	Svježi u odnosu na zamrznute ispitke s EDTA
Nagib [0,9 – 1,1]	1,000
Odsječak < 0,5 log ₁₀ IU/ml	0,020
p-vrijednost > 0,05	0,631

Određivanje kvantitativnog radnog učinka

Kvantitativni radni učinak ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 određen je obradom dvaju komercijalno dostupnih panela za provjeru EBV-a proizvođača AcroMetrix i Exact Diagnostics (sljedivo do 1. međunarodnog standarda za EBV SZO-a) na sustavima NeuMoDx Molecular Systems.

Pokazana je izvrsna korelacija između ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 i dvaju komercijalno dostupnih panela za provjeru EBV-a (*slika 4*) analizom Demingovom regresijom (*slika 4A*) ili Passing-Bablokovom metodom (*slika 4B*).



Slika 4. Dijagram ekvivalentnosti između panela za provjeru proizvođača AcroMetrix i Exact Diagnostics te ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay. A. Linearna regresijska analiza Demingovom metodom. B. Linearna regresijska analiza Passing-Bablokovom metodom.

Kvaliteta prilagodbe Demingovom regresijom ilustrirana je ukupnim koeficijentom nagiba od 0,990 i odsječka (odstupanja) od $-0,313$, što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 i panelima za provjeru EBV-a imaju korelaciju s prihvatljivim odstupanjem. Prilagodba Passing-Bablokovom metodom linearne regresije također pokazuje značajnu korelaciju između rezultata dobivenih ispitivanjem NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 i panelima za provjeru EBV-a s ukupnim koeficijentom nagiba od 1,004 i odsječkom (odstupanjem) od $-0,332$. Izračunato je da je p -vrijednost Passing-Bablokove analize 0,988.

Tablica 13: sažetak linearne regresijske analize Demingovom i Passing-Bablokovom metodom

Demingova analiza		Passing-Bablokova analiza	
Odsječak	Koeficijent nagiba	Odsječak	Koeficijent nagiba
$-0,313$	0,990	$-0,332$	1,004
95-postotni CI ($-0,620, -0,007$)	95-postotni CI (0,928, 1,053)	95-postotni CI ($-0,548, -0,116$)	95-postotni CI (0,950, 1,047)

REFERENCE

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

ZAŠTITNI ZNAKOVI

NeuMoDx™ je zaštitni znak tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.










NeuDry™ je zaštitni znak tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.

Seracare® je registrirani zaštitni znak tvrtke Seracare Life Sciences, Inc.

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 ovome dokumentu u vlasništvu su svojih vlasnika.

LEGENDA SIMBOLA

R only	Za uporabu samo uz recept		Sadrži dovoljno za <n> testova
	Proizvođač		Pročitajte upute za upotrebu
IVD	Medicinski proizvod za <i>in vitro</i> dijagnostiku		Oprez
EC REP	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici		Opasnost za zdravlje
REF	Kataloški broj	CE	Oznaka CE
LOT	Kód šarže	CONT	Sadrži
	Upotrijebiti do		Sadrži biološki materijal životinjskog porijekla
	Temperaturno ograničenje	Boric Acid	Borna kiselina
	Nije za ponovnu upotrebu		



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



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

Tehnička podrška / Izvještaj o kontroli sigurnosti: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents

