

REF 300901 NeuMoDx™ FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 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



Elektronička inačica dostupna je na 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 FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay multipleksni je, *in vitro* RT-PCR dijagnostički test u stvarnom vremenu namijenjen za istovremenu kvalitativnu detekciju i diferencijaciju RNK virusa influence A (Flu A), virusa influence B (Flu B), respiratornog sincicijskog virusa (Respiratory Syncytial Virus, RSV) i virusa SARS-CoV-2 iz ispitaka nazofaringealnih (Nasopharyngeal, NP) brisova prikupljenih u transportni medij od osoba sa znakovima i simptomima bolesti slične influenci (Influenza Like Illness, ILI).

Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay koje se izvodi na sustavima NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System obuhvaća automatiziranu ekstrakciju RNK radi izolacije ciljnih nukleinskih kiselina iz ispitka te RT-PCR u stvarnom vremenu koji cilja jednu konzerviranu regiju za Flu A i RSV i dvije konzervirane regije za SARS-CoV-2 i Flu B.

Rezultati ovog testa ne smiju se upotrebljavati kao jedina osnova za dijagnozu, liječenje ili druge odluke o zbrinjavanju pacijenta. Pozitivni rezultati ukazuju na prisutnost RNK virusa SARS-CoV-2 i/ili Flu A i/ili Flu B i/ili RSV, ali ne isključuju bakterijsku infekciju niti koinfekciju drugim virusima. Klinička korelacija s anamnezom pacijenta i drugim dijagnostičkim informacijama nužna je za određivanje statusa infekcije pacijenta.

Negativni rezultati ne isključuju infekciju virusom Flu A, Flu B, RSV ili SARS-CoV-2 i ne smije ih se upotrebljavati kao jedinu osnovu za dijagnozu, liječenje ili druge odluke o zbrinjavanju pacijenta. Negativni rezultati moraju se kombinirati s kliničkim opažanjima, anamnezom pacijenta i/ili epidemiološkim informacijama.

Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay namijenjeno je za upotrebu od strane obučenog osoblja kliničkog laboratorija koje je posebno obučeno i osposobljeno za tehnike RT-PCR-a u stvarnom vremenu i *in vitro* dijagnostičke postupke i/ili rad na sustavima NeuMoDx Molecular System. Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay nije namijenjeno za samotestiranje ni za upotrebu na mjestima pružanja zdravstvene skrbi.

SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay kvalitativno je ispitivanje za upotrebu na sustavima instrumenata NeuMoDx 96 i NeuMoDx 288 u svrhu detekcije RNK virusa SARS-CoV-2, influence A, influence B i/ili RSV u uzorcima nazofaringealnih brisova. Ispitivanje ne razlikuje RNK virusa RSV A i RSV B. Ispitci nazofaringealnih brisova prikupljaju se u Copan Universal Transport Medium (UTM-RT®) (Copan UTM-RT, Copan, CA, USA) ili BD™ Universal Viral Transport System (UVT) (BD™ UVT, BD, NJ, USA). U testu se upotrebljava interna kontrola obrade uzoraka (Sample Process Control, SPC2) RNK uključena tijekom pripreme uzorka, koja služi za praćenje cjelokupnog postupka pripreme uzorka, reverzne transkripcije i PCR amplifikacije. Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay omogućava do dva tjeka rada obrade ispitaka, ovisno o potrebama laboratorija: izravni tijek rada i tijek rada s prethodnom obradom. Sustav NeuMoDx Molecular System automatski izvodi sve korake potrebne za ekstrakciju ciljnih nukleinskih kiselina; priprema izolirane RNK za lančanu reakciju polimerazom s reverznom transkriptazom u stvarnom vremenu (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) i, ako su prisutni, reverzno transkribira, amplificira i detektira produkte amplifikacije. Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay cilja konzervirane regije gena SARS-CoV-2 Nsp2 i O-riboze metiltransferaze, regije proteina matriksa virusa influence A i respiratornog sincicijskog virusa te protein matriksa i gene nestrukturalnog proteina NS1 virusa influence B.

NAČELA POSTUPKA

Najsuvremeniji standard za detekciju akutne infekcije virusom FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 amplifikacija je nukleinske kiseline konzerviranih regija genoma ciljne sekvence, koja odgovara PCR-u s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay koji se izvodi na sustavima NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System.

Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay kombinira automatiziranu ekstrakciju RNK i amplifikaciju/detekciju RNK virusa SARS-CoV-2, Flu A, Flu B i/ili RSV RT-PCR-om u stvarnom vremenu. Uzorci nazofaringealnih brisova prikupljaju se u Copan UTM-RT System ili BD™ UVT System. Izravni tijek rada omogućava označavanje primarne epruvete za prikupljanje brisa ili alikvota transportnog medija u sekundarnoj epruveti crtičnim kodom i postavljanje na sustav NeuMoDx System radi obrade. Alternativno, ispitak brisa u transportnom mediju može se prvo obraditi primjenom jednakog volumena pufera NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) prije postavljanja na sustav bez daljnje intervencije korisnika. Sustav NeuMoDx System automatski aspirira alikvot ispitka kako bi ga pomiješao s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 3 za izravni tijek rada ili alikvot prethodno obrađenog ispitka kako bi ga pomiješao s puferom Lysis Buffer 2 i reagensima sadržanima u pločici NeuMoDx Extraction Plate za početak obrade. Konkretno, pri izravnom tijeku rada, primarna epruveta za prikupljanje (bez brisa i čepa) ili alikvot uzorka u mediju u sekundarnoj epruveti označavaju se crtičnim kodom i postavljaju na sustav NeuMoDx System u predviđeni nosač epruveta za ispitke. Pri tijeku rada s prethodnom obradom ispitak u transportnom mediju prvo se obrađuje primjenom jednakog volumena pufera NeuMoDx VVLB prije postavljanja na sustav. Za izravan tijek rada sustav NeuMoDx System aspirira 400 µl alikvota uzorka i miješa ga s jednakim volumenom pufera NeuMoDx Lysis Buffer 3, dok se za tijek rada s prethodnom obradom 550 µl prethodno obrađenog uzorka kombinira s jednakim volumenom pufera Lysis Buffer 2. 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. Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC2) pomaže u praćenju prisutnosti inhibirajućih tvari i pogrešaka 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 koristi 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 upotrebljava se za rehidraciju patentiranih NeuDry™ reagensa za amplifikaciju koji sadržavaju sve elemente neophodne za amplifikaciju ciljnih sekvenci virusa Flu A, Flu B, RSV, SARS-CoV-2 i SPC2. To omogućuje istodobnu amplifikaciju i detekciju svih ciljnih sekvenci i kontrolnih RNK sekvenci za obradu uzorka. 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 generirani ampikon nakon RT-PCR-a i na taj način praktički 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 ampikone odgovarajućih ciljnih sekvenci. TaqMan probe sastoj 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, što omogućava molekuli prigušivača da suzbija fluorescenciju koju fluorokrom emitira putem Försterov prijenos rezonantne energije Försterova prijenosa rezonantne energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

TaqMan probe osmišljene su za sparivanje unutar regije cDNK amplificirane određenim kompletom početnica. Kako DNK polimeraza Taq produžuje početnicu i sintetizira novi lanac, 5' do 3' egzozukleazna 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 RT-PCR termocikleru sustava NeuMoDx System izravno je proporcionalan oslobođenom fluorokromu i može se dovesti u korelaciju s količinom prisutne ciljne sekvence.

Kanal za detekciju fluorescencijom za svaku ciljnu sekvencu ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay prikazan je u tablici u nastavku. Softver sustava NeuMoDx System prati fluorescentni signal koji emitiraju TaqMan probe na kraju svakog ciklusa amplifikacije. Nakon završetka termalnog cikliranja softver sustava NeuMoDx System analizira podatke i izvještava rezultat (POSITIVE (POZITIVNO) / NEGATIVE (NEGATIVNO) / INDETERMINATE (NEODREĐENO) / NO RESULT (NEMA REZULTATA) / UNRESOLVED (NERAZRIJEŠENO)).

Tablica 1. Kanali za detekciju

Ciljna sekvenca	Regija ciljne sekvence	Fluorokrom probe	Pobuda/emisija	Kanal za detekciju
Influenca A	Protein matriksa	FAM	530/555 nm	Green
Influenca B	Protein matriksa	HEX	470/510 nm	Yellow
	Nestrukturalni protein NS1			
SARS-CoV-2	Nsp2 gen	Texas crvena	585/610 nm	Orange
	O-riboza metiltransferaza			
Respiratorni sincijski virus	Protein matriksa	Q705	680/715 nm	Far Red
SPC2	Protein sklopa (MS2)	Q670	625/660 nm	Red

REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Jedinica po pakiranju	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
300901	Testna traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip <i>Suhi reagensi za RT-PCR koji sadržavaju TaqMan probe i početnice specifične za FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 i TaqMan probu i početnice specifične za SPC2. Sadržava 21,1 % Tris-HCl-a, 8,4 % dNTP-a i druge neaktivne sastojke</i>	6	16	96

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

REF.	Sadržaj
901200	NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls <i>Kompleti pozitivnih i negativnih kontrola za FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 za jednokratnu upotrebu za utvrđivanje svakodnevnog valjanosti ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (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 2
400600*	NeuMoDx Lysis Buffer 3
401500**	NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer
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 samo za obradu uzoraka s pomoću izravnog tijeka rada, bez koraka prethodne obrade. Pogledajte odjeljak „Upute za upotrebu“ u nastavku.

** Potrebni samo u slučaju obrade uzoraka s pomoću tijeka rada s prethodnom obradom, uz korak prethodne obrade. Pogledajte odjeljak „Upute za upotrebu“ u nastavku.

Brisovi i transportni mediji (nisu isporučeni)

Vrsta uzorka	Preporučeni proizvod za uzimanje brisa	Preporučeni bris
Nazofaringealni bris	3 mL Universal Transport Medium (Copan UTM-RT, Copan, CA, USA, 305C) ili 3 mL Universal Viral Transport System (BD UVT, BD, NJ, USA, BD 220531)	Flexible Minitip Nylon® Flocked Swab (Copan, CA, USA) ili Flexible Minitip Flocked Swab (BD, NJ, USA)

Potrebni instrumenti

NeuMoDx 288 Molecular System [REF. 500100] ili NeuMoDx 96 Molecular System [REF. 500200]
Inačica softvera NeuMoDx System Software 1.9.2.6 ili novija



UPOZORENJA I MJERE OPREZA

- Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay namijenjeno 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.
- Minimalni volumen ispitka sekundarnih alikvota ovisi o veličini epruvete / nosaču epruveta za ispitke kako je navedeno u nastavku. Volumen ispitaka manji od navedenog minimuma može rezultirati pogreškom „Quantity Not Sufficient“ (Nedovoljna količina).
- Upotreba 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 ribonukleazama (RNaza). Pri upotrebi sekundarnih epruveta preporučuje se upotreba sterilnih jednokratnih pipeta za prijenos bez RNaze. Za svaki ispitak upotrijebite 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 i PCR testovi na otvorenim epruvetama, potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije testne trake NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 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 FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip 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.
- Vanjske kontrole NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control [REF. 901200] moraju se obrađivati svaka 24 sata pri testiranju s pomoću ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
- Sigurnosno-tehnički listovi (Safety Data Sheet, SDS) dostupni su (prema potrebi) za svaki reagens na www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Nakon izvođenja testa temeljito operite ruke.
- Ne pipetirajte ustima. Nemojte pušiti, piti ni jesti 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*¹ i dokumentu M29-A4 instituta CLSI.²
- Pri radu s kemikalijama uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Dodatne informacije potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS).
- Odložite nekorištene reagens i otpad u skladu s državnim, saveznim, pokrajinskim i lokalnim propisima.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip



Sadrži: boric acid; Ethoxylated nonylphenol. Opasnost! Nadražuje kožu. Uzrokuje jako nadraživanje oka. Može štetno djelovati na plodnost ili naškoditi nerođenom djetetu. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. 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

Odlaganje

Proizvod sadržava etoksilirani nonilfenol, tvar koja uzrokuje poremećaje endokrinog sustava i koja može štetno djelovati na okoliš.

Odložite opasan otpad u skladu s lokalnim i nacionalnim propisima. To se odnosi i na nekorištene proizvode.

Tekući otpad nemojte odlagati u kanalizaciju.

Pridržavajte se preporuka navedenih u sigurnosno-tehničkom listu (Safety Data Sheet, SDS).



POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

- Testne trake NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip 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.
- Nemojte ponovno postavljati nikakve proizvode za testiranje koji su prethodno bili postavljeni na drugi sustav NeuMoDx System.
- Nakon postavljanja testna traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip može ostati na sustavu NeuMoDx System 14 dana. Softver prati preostali uporabni vijek postavljenih testnih traka i obavještava korisnika u stvarnom vremenu. Sustav NeuMoDx System zatražit će uklanjanje testne trake koja se upotrebljava dulje od dopuštenog razdoblja.

PRIKUPLJANJE, PRIJEVOZ I POHRANA ISPITAKA

Rukujte svim ispitcima kao da mogu prenijeti infektivne agense.

1. Ispitci se trebaju prikupiti s pomoću sustava Copan UTM-RT® System ili BD™ UVT System primjenom odobrenih brisova od najlona s pahuljastim vrhom (pogledajte odjeljak Brisovi i transportni medij). Osim toga, prihvatljive vrste brisova su brisovi s pahuljastim vrhom, poliesterski brisovi i brisovi od najlona. Za prikupljanje, prijevoz i pohranu ispitaka slijedite upute proizvođača.
2. Ispitci se mogu testirati u kompatibilnim primarnim epruветama za prikupljanje ili sekundarnim epruветama za ispitke.
3. 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.
4. Pripremljeni ispitci do testiranja moraju biti pohranjeni na temperaturi od 2 do 8 °C najviše 7 dana.
5. Ako se ispitci otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.
6. Nastavite s odjeljkom *Priprema testa*.

PRIPREMA TESTA

Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay omogućava dva različita tijeka rada, ovisno o željama korisnika/laboratorija:

Tijek rada 1: **IZRAVNI** – ispitak brisa u transportnom mediju postavlja se izravno na sustav NeuMoDx System u primarnu epruветu za prikupljanje ili u sekundarnu epruветu za ispitke

-ili-

Tijek rada 2: **S PRETHODNOM OBRADOM** – ispitak brisa u transportnom mediju prethodno se obrađuje puferom NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer, a zatim ga se postavlja na sustav NeuMoDx System u primarnu epruветu za prikupljanje ili u sekundarnu epruветu za ispitke

Priprema testa – IZRAVNI tijek rada za izravne ispitke brisova

1. Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom za ispitak na epruветu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System kako je opisano u koraku 3 u nastavku.
2. Ako ispitak testirate u primarnoj epruветi za prikupljanje, postavite epruветu označenu crtičnim kodom u nosač epruвета za ispitke i pobrinite se da uklonite čep i štapić za bris prije postavljanja na sustav NeuMoDx System.
3. Alternativno, alikvot transportnog medija može se prenijeti u sekundarnu epruветu označenu crtičnim kodom i postaviti u nosač epruвета za ispitke. Ako upotrebljavate sekundarnu epruветu, prenesite alikvot transportnog medija u epruветu za ispitak s crtičnim kodom kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System u skladu s volumenima definiranim u nastavku:
 - nosač epruвета za ispitke (32 epruвете): promjera 11 – 14 mm i visine 60 – 120 mm; minimalni volumen punjenja ≥ 600 µl
 - nosač epruвета za ispitke (24 epruвете): promjera 14,5 – 18 mm i visine 60 – 120 mm; minimalni volumen punjenja ≥ 1000 µl
 - nosač epruвета za ispitke malog volumena (32 epruвете): epruвета od 1,5 ml za mikrocentrifugu sa stožastim dnom, minimalni volumen punjenja ≥ 500 µl.

Priprema testa – tijek rada S PRETHODNOM OBRADOM za prethodno obrađene ispitke brisa

Napomena: Ostavite pufer Vantage Viral Lysis Buffer da dosegne sobnu temperaturu (15 do 30 °C) prije uporabe.

UPOZORENJE: Prethodna obrada uzoraka brisa puferom NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer ne jamči deaktivaciju bilo kojeg prisutnog virusa. Svim je uzorcima potrebno rukovati kao da mogu prenijeti infektivne agense.

1. Prethodno obradite transportni medij za ispitak primjenom volumena pufera NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer u omjeru 1:1. To možete učiniti u primarnoj epruветi za prikupljanje brisa ako vam je volumen transportnog medija poznat. Alternativno, prethodnu obradu možete izvršiti u sekundarnoj epruветi kombiniranjem alikvota transportnog medija s jednakim volumenom pufera NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. Dobivena bi smjesa trebala zadovoljavati zahtjeve za minimalni volumen navedene u koraku 4 u nastavku.
2. Nježno promiješajte pipetom kako biste osigurali ravnomjernu raspodjelu pufera NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer.
3. Ako prethodno obrađeni ispitak testirate u primarnoj epruветi za prikupljanje, postavite epruветu označenu crtičnim kodom u nosač epruвета za ispitke i pobrinite se da uklonite čep i štapić za bris prije postavljanja na sustav NeuMoDx System.
4. Ako upotrebljavate sekundarnu epruветu, prenesite alikvot prethodno obrađenog uzorka u epruветu za ispitak s crtičnim kodom kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System i postavite je u nosač epruвета za ispitke u skladu s volumenima definiranim u nastavku:

- 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): epruveta 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. Učitajte nalog za test u sustav NeuMoDx System u skladu s tijekom rada koji se upotrebljava za pripremu testa:
 - Neobrađeni, čisti ispitci brisova pripremljeni IZRAVNIM tijekom rada testiraju se definiranjem ispitka kao „**Transport Medium**” (Transportni medij)
 - Ispitci brisova koji su prethodno obrađeni puferom NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer primjenom tjeka rada S PRETHODNOM OBRADOM testiraju se definiranjem ispitka kao „**UserSpecified1**” (Korisnički specificiran 1)Ako nije definirano u nalogu za test, prema zadanim se postavkama upotrebljava vrsta ispitka Transport Medium (Transportni medij) u epruveti **Secondary Tube** (Sekundarna epruveta).
2. Popunite jedan ili više nosača testnih traka sustava NeuMoDx System testnim trakama NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosače 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 nosače u sustav NeuMoDx System.
4. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, zamijenite reagens NeuMoDx Wash Reagent i/ili reagens 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) i/ili koš za biološki otpad (samo za sustav NeuMoDx 96 Molecular System).
5. Postavite epruvete za ispitke u nosač epruveta za ispitke i pobrinite se da sa svih epruveta uklonite čepove i štapiće za brisove.
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 postavljenih ispitaka za identificirane testove ako u sustavu postoji valjani nalog za test.

OGRANIČENJA

1. Testna traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx System.
2. Radne značajke testne trake NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip utvrđene su za ispitke nazofaringealnih brisova u transportnom mediju koje je prikupio liječnik. Upotreba testne trake NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip s drugim vrstama ispitaka i medija za prikupljanje nije procijenjena i radne značajke nisu poznate.
3. Budući da detekcija ciljnih sekvenci virusa obično ovisi o broju virusnih čestica prisutnih u uzorku, pouzdani rezultati ovise o pravilnom prikupljanju ispitaka, rukovanju njima te njihovoj pohrani.
4. Pogrešni rezultati mogu se javiti zbog nepropisnog prikupljanja, rukovanja i pohrane ispitaka, tehničke pogreške ili zamjene epruveta za ispitke. Osim toga, lažno negativni rezultati mogu se pojaviti jer je broj virusnih čestica u uzorku niži od granice detekcije ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
5. Rad na sustavu NeuMoDx System ograničen je na osoblje obučeno za upotrebu sustava NeuMoDx System.
6. Ako ne dođe do amplifikacije ciljnih sekvenci virusa Flu A, Flu B, RSV i SARS-CoV-2 i ciljne sekvence SPC2, iskazuje 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. Pozitivan rezultat ne ukazuje nužno na prisutnost vijabilnog virusa influence A, influence B, SARS-CoV-2 i/ili RSV. Međutim, pozitivan rezultat upućuje na vjerojatnu prisutnost RNK virusa influence A, influence B, SARS-CoV-2 i/ili RSV.
9. Delecije ili mutacije u konzerviranim regijama koje cilja ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay mogu utjecati na detekciju i mogu dovesti do pogrešnog rezultata.
10. Rezultati ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay trebaju se upotrebljavati kao dodatak kliničkim opažanjima i ostalim informacijama koje su liječniku dostupne.
11. Preporučuje se dobra laboratorijska praksa, uključujući mijenjanje rukavica između rukovanja ispitcima pacijenata, kako bi se izbjegla kontaminacija.

REZULTATI

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 FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay automatski generira softver sustava NeuMoDx System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 (FluA-B-RSV-CoV-2 ADF inačica 4.0.0 ili novija). Rezultat ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay može se iskazati kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno), Indeterminate (Neodređeno), No Result (Nema rezultata) ili Unresolved (Nerazriješeno) na temelju statusa amplifikacije ciljnih sekvenci i SPC2. Rezultati se iskazuju na temelju algoritma odlučivanja koji obrađuje rezultate u ADF-u, koji je sažet u *tablici 2* u nastavku.

NeuMoDx Molecular, Inc.

40600555-HR_C
2023-08

Tablica 2. Tumačenje rezultata ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay

UKUPNI REZULTAT	CILJNA SEKVENCA 1 (Flu A) FAM	CILJNA SEKVENCA 2 (Flu B) HEX	CILJNA SEKVENCA 3 (SARS-CoV-2) TX RED	CILJNA SEKVENCA 4 (RSV) Tamnocrvena	KONTROLA OBRADJE (Sample Process Control, SPC2) Crvena	TUMAČENJE
POSITIVE (POZITIVNO) (Detektirana ciljna RNK)	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [5 ≤ Ct < 25 AND (I) EPR > 2,0 AND (I) EP ≥ 750] OR (ILI) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP ≥ 750)	N/P	N/P	N/P	N/P	Detektiran RNK za Flu A
	N/P	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [5 ≤ Ct < 28 AND (I) EPR > 1,5 AND (I) EP ≥ 600] OR (ILI) [28 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP ≥ 600]	N/P	N/P	N/P	Detektiran RNK za Flu B
	N/P	N/P	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [5 ≤ Ct < 25 AND (I) EPR > 1,5 AND (I) EP ≥ 1200] OR (ILI) [25 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP ≥ 1200]	N/P	N/P	Detektiran RNK za SARS-CoV-2
	N/P	N/P	N/P	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [5 ≤ Ct < 30 AND (I) EPR > 1,15 AND (I) EP ≥ 1200] OR (ILI) [30 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP ≥ 1200]	N/P	Detektiran RNK za RSV
NEGATIVE (NEGATIVNO) (Ciljna RNK nije detektirana)	NOT AMPLIFIED (NIJE AMPLIFICIRANO) N/P OR (ILI) (5 ≤ Ct < 25 AND (I) EPR ≤ 2,0) OR (ILI) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP < 750) OR (ILI) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NIJE AMPLIFICIRANO) N/P OR (ILI) (5 ≤ Ct < 28 AND (I) EPR ≤ 1,5) OR (ILI) (28 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP < 600) OR (ILI) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NIJE AMPLIFICIRANO) N/P OR (ILI) (5 ≤ Ct < 25 AND (I) EPR ≤ 1,5) OR (ILI) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP < 1200) OR (ILI) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NIJE AMPLIFICIRANO) N/P OR (ILI) (5 ≤ Ct < 30 AND (I) EPR ≤ 1,15) OR (ILI) (30 ≤ Ct ≤ 37 AND (I) EP < 1200) OR (ILI) (Ct > 37)	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) (24 ≤ Ct ≤ 31 AND (I) EP ≥ 1800)	Nije detektirana RNK za Flu A, Flu B, RSV i SARS-CoV-2

UKUPNI REZULTAT	CILJNA SEKVENCA 1 (Flu A) FAM	CILJNA SEKVENCA 2 (Flu B) HEX	CILJNA SEKVENCA 3 (SARS-CoV-2) TX RED	CILJNA SEKVENCA 4 (RSV) Tamnocrvena	KONTROLA OBRADE (Sample Process Control, SPC2) Crvena	TUMAČENJE
NR*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka prekinuta)					Obrada uzorka je prekinuta; ponovno testirajte uzorak
IND* (NEODREĐENO)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka završena)					Svi rezultati ciljnih sekvenci bili su nevažeci; ponovno testirajte uzorak
UNR* (NERAZRIJEŠENO)	Not Amplified, No System Error Detected (Nije amplificirano, Nema uočenih pogrešaka sustava)					Svi rezultati ciljnih sekvenci bili su nevažeci; ponovno testirajte uzorak

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

Nevažeci rezultati

Ako ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat, on se iskazuje kao Indeterminate (Neodređeno), No Result (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) iskazuje 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 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.

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

Kontrola kvalitete

U lokalnim propisima obično se navodi 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) Korisnici moraju obraditi jedan komplet vanjskih kontrola NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control [REF. 901200] svaka 24 sata i prije obrade uzorka pacijenata. 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) Ako su potrebne vanjske kontrole, obradite te kontrole (1 pozitivna kontrola i 1 negativna kontrola):

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Shema boje oznake
Pozitivne kontrole NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control	Crvena
Negativne kontrole NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control	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.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Rezultat za FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	Rezultat za SPC2
Pozitivne kontrole NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control	FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 RNA Detected (Detektirana RNK virusa FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2)	N/P
Negativne kontrole NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control	FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 RNA Not Detected (Nije detektirana RNK virusa FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2)	SPC2 Positive (Pozitivno na SPC2)

- 5) U slučaju nepodudarnih rezultata vanjskih kontrola treba postupiti na sljedeći način:
 - a) Rezultat Positive (Pozitivno) testa iskazan za negativan kontrolni uzorak može ukazivati na kontaminaciju te je potrebno provjeriti postupke kontrole kvalitete laboratorija kako bi se utvrdio temeljni uzrok. Pripremu uzoraka, rukovanje kontrolama i postavljanje RT-PCR-a obavezno obavljajte u odvojenim područjima. Dodatne savjete za rješavanje problema potražite u korisničkom priručniku za sustav *NeuMoDx 288 ili 96 Molecular System*.
 - b) Rezultat Negative (Negativno) testa iskazan za pozitivan kontrolni uzorak može ukazivati na problem povezan s reagensom ili sustavom NeuMoDx System. Savjete za rješavanje problema potražite u *korisničkom priručniku za sustav NeuMoDx 288 ili 96 Molecular System*.
 - c) U bilo kojem od gore navedenih slučajeva ili u slučaju rezultata No Result (Nema rezultata) (NR), Unresolved (Nerazriješeno) (UNR) ili Indeterminate (Neodređeno) (IND), ponovite obradu neuspjele kontrole sa svježe odmrznutim bočicama kontrola čije testiranje valjanosti nije uspjelo.
 - d) Ako se za pozitivnu kontrolu i dalje dobiva rezultat testa Negative (Negativno), obratite se tehničkoj podršci tvrtke QIAGEN.
 - e) Ako se za negativnu kontrolu i dalje dobiva rezultat testa 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.
 - f) Ako se za vanjske kontrole ne dobiju očekivani rezultati, potrebno je ponoviti komplet pozitivnih i negativnih kontrola. Rezultati pacijenta neće biti iskazani ako kontrole ne daju očekivane rezultate.

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 probe specifične za SPC2 također su uključene u svaku jačicu testne trake NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip, što omogućava detekciju SPC2 s ciljnom RNK (ako je prisutna) putem multipleksnog PCR-a. Detekcija amplifikacije SPC2 softveru sustava NeuMoDx System omogućava praćenje učinkovitosti postupaka ekstrakcije RNK i RT-PCR amplifikacije.

Prije RT-PCR-a sustav NeuMoDx System automatski provodi „FILL CHECK“ (PROVJERA NAPUNJENOSTI) kako bi osigurao da je PCR komora napunjena otopinom te da sadržava odgovarajuću količinu fluorescentne probe.

Softver sustava NeuMoDx System kontinuirano prati senzore i aktuatora na sustavu kako bi osigurao siguran i učinkovit rad sustava.

Više načina uklanjanja pogrešaka tekućina provodi se aktivnim nadzorom postupaka aspiracije i pipetiranja kako bi se osiguralo da sustav može sigurno i učinkovito završiti obradu svih uzoraka ili pružiti odgovarajući kôd pogreške.

RADNE ZNAČAJKE

Analitička osjetljivost

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na sustavima NeuMoDx Molecular System opisana je u dva dijela. Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) opisana je s pomoću puliranih preostalih anonimiziranih kliničkih negativnih ispitaka nazofaringealnih brisova prikupljenih u UVT matricu i modela sojeva za svaku ciljnu sekvencu. Modeli sojeva upotrijebljeni za svaku ciljnu sekvencu prikazani su u *tablici 3*. Prvo je pripremljena serija razrjeđivanja korištenjem modela sojeva za svaku ciljnu sekvencu u UVT-u primjenom izravnog i tijekom rada s prethodnom obradom, a zatim je obrađena na sustavu NeuMoDx System kako bi se utvrdila preliminarna vrijednost granice detekcije (Limit of Detection, LoD). U drugom dijelu testiranja te su preliminarne vrijednosti LoD potvrđene primjenom ispitivanja stope uspješnosti na sustavima NeuMoDx 288 i NeuMoDx 96 Molecular System za oba tijeka rada. Preliminarna vrijednost LoD prihvaćena je ako je ispitivanje stope uspješnosti postiglo 95-postotnu stopu pozitivnosti za oba tijeka rada na obama sustavima. Stope detekcije za preliminarnu vrijednost LoD prikazane su u *tablici 4*, dok *tablica 5* prikazuje pojedinosti o potvrđivanju stope uspješnosti za sustav N288 System, a *tablica 6* prikazuje pojedinosti o potvrđivanju stope uspješnosti za sustav N96 System. Konačne vrijednosti LoD u *tablici 4* **podebljane** su.

Tablica 3. Soj korišten za svaku ciljnu sekvencu

Ciljna sekvenca / soj	Izvor	Kat. br.	Br. serije	Vrsta materijala
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1688	70031602	Razbistren supernatant inficiranih stanica
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1690	70032253	Razbistren supernatant inficiranih stanica
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	Virapur	N/P	B1904J	Live Crude
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	Virapur	N/P	C2030D	Live Crude
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	IRR	FR-1619	70015942	Razbistren supernatant inficiranih stanica
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	IRR	FR-1592	70013310	Razbistren supernatant inficiranih stanica
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	ATCC	VR-1931	70020870	Razbistrena tekućina za kulturu i lizat stanica
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	Virapur	N/P	B1904N	Live Crude
RSV A2	ATCC	VR-1540	60430286	Tekućina za kulturu i lizat stanica
RSV B (WV/14617/85)	ATCC	VR-1400	70013461	Tekućina za kulturu i lizat stanica
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	NIBSC	20/146	N/P	Liofilizirana kiselina i toplinom deaktiviran virus
SARS-CoV-2, izolat USA-WA1/2020	BEI	NR-52285	70037779	Toplinom deaktiviran virus

Tablica 4. Pozitivne stope detekcije za određivanje preliminarni vrijednosti LoD za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – (a) tijek rada s prethodnom obradom; (b) izravni tijek rada

(a) Tijek rada s prethodnom obradom

Ciljna sekvenca / soj	Razina	Jedinica	Br. valjanih rezultata (n/N)	Br. poz.	% poz.	Prosječni Ct	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70 %	33,97	0,90
	0,06		10/10	10	100 %	33,36	0,96
	0,17		10/10	10	100 %	32,17	0,45
	0,5		10/10	10	100 %	31,05	0,42
	1,5		10/10	10	100 %	31,01	0,45
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	33,72	1,00
	0,5		10/10	10	100 %	32,97	0,51
	1,5		10/10	10	100 %	32,28	0,60
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	32,81	0,38
	0,5		10/10	10	100 %	31,68	0,84
	1,5		10/10	10	100 %	31,69	0,65
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	20/20	15	75 %	32,15	1,70
	0,5		10/10	9	90 %	32,37	0,50
	1,5		10/10	10	100 %	32,63	1,35
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	32,90	1,27
	0,03		10/10	10	100 %	32,26	0,48
	0,08		10/10	10	100 %	31,48	0,78
	0,25		10/10	10	100 %	30,59	0,40
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /ml	10/10	10	100 %	33,97	0,58
	0,01		10/10	10	100 %	33,90	0,39
	0,03		10/10	10	100 %	33,85	0,56
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	34,39	0,84
	0,25		10/10	10	100 %	32,53	0,21
	0,75		10/10	10	100 %	32,57	0,40
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,33	TCID ₅₀ /ml	20/20	15	75 %	33,58	1,50
	1		10/10	10	100 %	34,03	0,69
	3		10/10	10	100 %	32,30	0,66
RSV A2	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	5	50 %	32,68	0,43
	0,5		10/10	10	100 %	31,72	0,85
	1,5		10/10	10	100 %	31,71	1,35
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /ml	10/10	5	50 %	32,20	1,10
	0,05		10/10	10	100 %	31,50	0,49
	0,15		10/10	10	100 %	29,94	0,93
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	50	IU/ml	10/10	6	60 %	34,36	0,64
	150		10/10	10	100 %	34,20	0,31
	450		10/10	10	100 %	33,04	0,63
SARS-CoV-2, izolat USA-WA1/2020	50	kopija/ml	10/10	6	60 %	34,20	1,19
	150		10/10	10	100 %	33,46	0,58
	450		10/10	10	100 %	32,62	1,06

(b) Izravni tijek rada

Ciljna sekvenca / soj	Razina	Jedinica	Br. valjanih rezultata (n/N)	Br. poz.	% poz.	Prosječni Ct	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /ml	20/20	17	85 %	33,11	1,30
	0,06		10/10	10	100 %	33,18	0,86
	0,17		10/10	10	100 %	32,63	1,14
	0,5		10/10	10	100 %	31,33	0,74
	1,5		10/10	10	100 %	30,79	0,31
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	33,41	1,10
	0,5		10/10	9	90 %	32,54	1,03
	1,5		10/10	10	100 %	32,05	0,26
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70 %	33,39	0,16
	0,5		10/10	10	100 %	32,70	1,01
	1,5		10/10	10	100 %	31,12	1,07
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	34,11	0,69
	0,5		10/10	10	100 %	33,68	0,50
	1,5		10/10	10	100 %	32,27	1,29
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	33,31	0,95
	0,03		10/10	10	100 %	31,51	0,94
	0,08		10/10	10	100 %	31,76	0,46
	0,25		10/10	10	100 %	30,11	0,45
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /ml	10/10	9	90 %	34,82	0,39
	0,01		10/10	10	100 %	34,37	0,55
	0,03		10/10	10	100 %	33,64	0,34
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /ml	20/20	18	90 %	33,78	1,11
	0,25		10/10	10	100 %	33,89	0,69
	0,75		10/10	10	100 %	32,38	0,47
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,25	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	33,23	1,17
	0,75		20/20	19	95 %	32,63	1,22
	2,25		10/10	10	100 %	31,24	1,58
RSV A2	0,42	TCID ₅₀ /ml	10/10	7	70 %	32,61	0,70
	1,25		10/10	10	100 %	30,99	1,55
	3,75		10/10	10	100 %	31,49	1,04
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /ml	10/10	6	60 %	33,63	1,49
	0,05		10/10	10	100 %	32,42	1,12
	0,15		10/10	10	100 %	31,81	0,81
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	50	IU/ml	10/10	7	70 %	34,80	0,56
	150		20/20	19	95 %	32,88	1,22
	450		10/10	10	100 %	33,38	0,46
SARS-CoV-2, izolat USA-WA1/2020	66,7	kopija/ml	10/10	7	70 %	33,53	0,58
	200		10/10	10	100 %	32,63	1,25
	600		10/10	10	100 %	32,69	0,86

Tablica 5. Pozitivne stope detekcije za potvrdno određivanje vrijednosti LoD za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N288, (a) tijek rada s prethodnom obradom; (b) izravni tijek rada

(a) Tijek rada s prethodnom obradom

Ciljna sekvenca / soj	Razina	Jedinica	Br. valjanih rezultata (n/N)	Br. poz.	% detekcije	Prosječni Ct	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,89	0,57
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,81	0,44
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,17	0,47
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,77	0,52
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	29/30	29	100 %	32,32	1,09
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	34,50	0,68
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,83	0,44
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /ml	29/30	29	100 %	33,04	0,69
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,17	1,23
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,39	0,41
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	150	IU/ml	30/30	30	100 %	33,63	0,61
SARS-CoV-2, izolat USA-WA1/2020	150	kopija/ml	29/30	28	96,6 %	33,59	1,01

(b) Izravni tijek rada

Ciljna sekvenca / soj	Razina	Jedinica	Br. valjanih rezultata (n/N)	Br. poz.	% detekcije	Prosječni Ct	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,92	0,69
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,75	0,57
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,96	0,48
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,67	0,48
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	29/30	28	96,6 %	31,74	1,19
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /ml	10/10	8	80 %	34,88	0,95
	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	34,22	0,51
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,55	0,38
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,33	0,74
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	31,87	0,95
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,46	0,72
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	150	IU/ml	30/30	29	96,7 %	33,78	0,77
SARS-CoV-2, izolat USA-WA1/2020	200	kopija/ml	30/30	30	100 %	34,18	0,83

Tablica 6. Pozitivne stope detekcije za potvrđivanje stope uspješnosti vrijednosti LoD za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N96, (a) tijek rada s prethodnom obradom; (b) izravni tijek rada

(a) Tijek rada s prethodnom obradom

Ciljna sekvenca / soj	Razina	Jedinica	Br. valjanih rezultata (n/N)	Br. poz.	% detekcije	Prosječni Ct	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,05	0,81
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,53	0,75
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,33	1,11
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,98	0,96
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,75	0,69
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /ml	10/10	4	40 %	34,75	0,58
	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,91	0,75
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,25	0,97
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,21	0,96
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /ml	29/30	28	96,6 %	32,39	1,10
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,06	0,76
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	150	IU/ml	30/30	29	96,7 %	33,79	0,67
SARS-CoV-2, izolat USA-WA1/2020	150	kopija/ml	30/30	29	96,7 %	33,59	1,05

(b) Izravni tijek rada

Ciljna sekvenca / soj	Razina	Jedinica	Br. valjanih rezultata (n/N)	Br. poz.	% detekcije	Prosječni Ct	Ct SD
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,42	0,54
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,35	1,10
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,17	1,24
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,22	0,50
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,78	0,56
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	34,21	0,50
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	33,41	0,65
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	33,36	1,04
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /ml	30/30	29	96,7 %	32,29	0,99
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /ml	30/30	30	100 %	32,17	0,75
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	150	IU/ml	30/30	29	96,7 %	33,50	0,78
SARS-CoV-2, izolat USA-WA1/2020	200	kopija/ml	29/30	29	100 %	34,45	0,39

Razine prihvaćene kao vrijednosti LoD za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na sustavima NeuMoDx System sažete su prikazane u *tablici 7.*

Tablica 7. Sažetak ispitivanja granice detekcije

Ciljna sekvenca	Soj	Granica detekcije		
		Tijek rada s prethodnom obradom	Izravni tijek rada	Jedinica
Influenca A (Flu A) – H1N1	Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	0,06	TCID ₅₀ /ml
	Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	0,5	
Influenca A (Flu A) – H3N2	Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	0,5	
	Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	0,5	
Influenca B (Flu B) – loza Victoria	Hong Kong/286/2017	0,03	0,03	
	Colorado/6/2017	0,01	0,01	
	Florida/78/2015	0,25	0,25	
Influenca B (Flu B) – loza Yamagata	Phuket/3073/2013	1	0,75	
RSV A	A2	0,5	1,25	
RSV B	(WV/14617/85)	0,05	0,05	
SARS-CoV-2	1. međunarodni standard SZO-a	150	150	IU/ml
	Izolot USA-WA1/2020	150	200	kopija/ml

Kompetitivna interferencija za ciljne organizme: Flu A, Flu B, RSV i SARS-CoV-2

Kompetitivna interferencija ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay procijenjena je s pomoću panela ciljnih sekvenci virusa dodanih kliničkim negativnim ispitcima nazofaringealnih brisova prikupljenima u UVT. Deset panela sadržavalo je jednu ili dvije ciljne sekvence blizu njihove granice detekcije (3-10X LoD) i jednu ciljnu sekvencu na $\geq 1E5$ kopija/ml, koja predstavlja koinficiranu ciljnu sekvencu. Jedanaesti panel sadržavao je jednu od svake od četiriju ciljnih sekvenci na 2X LoD. Prisutnost dvaju do triju virusa pri različitim koncentracijama u jednom ispitku i njihovi učinci na analitičku osjetljivost prikazani su u *tablici 8.*

Treba pretpostaviti da su rezultati za influencu A i RSV A negativni u slučaju uzoraka s pozitivnim rezultatom na SARS-CoV-2, a u slučaju uzoraka s pozitivnim rezultatom na influencu A treba pretpostaviti da su rezultati za RSV negativni. Studije kompetitivne interferencije pokazale su da virus SARS-CoV-2, kada je njegova koncentracija 1E5 kopija/ml ili veća, može inhibirati detekciju i amplifikaciju RNK virusa influence A i RSV A ako je njihova koncentracija 1,5 TCID₅₀/ml odnosno 6,25 TCID₅₀/ml ili manja te da može uzrokovati lažno negativne rezultate. Osim toga, virus influence A, kada je prisutan u koncentracijama od 1E5 kopija/ml ili većima, može inhibirati detekciju i amplifikaciju RNK virusa RSV A ako je njegova koncentracija 3,75 TCID₅₀/ml ili manja te može uzrokovati lažno negativne rezultate za RSV. Ako se u uzorcima s pozitivnim rezultatom na SARS-CoV-2 sumnja na koinfekciju virusom influence A ili RSV, ili se u uzorcima s pozitivnim rezultatom na virus influence A sumnja na koinfekciju virusom RSV, treba ponovno testirati uzorak s pomoću dodatnog testa na virus influence ili RSV koji je dopustila, odobrila ili ovlasila Američka agencija za hranu i lijekove (Food And Drug Administration, FDA) ako bi detekcija virusa influence ili RSV utjecala na kliničko postupanje.

Tablica 8. Sažetak studije kompetitivne interferencije

Panel	Ciljna sekvenca	Razina panela	Ciljna konc.	Valjani rezultati	Br. poz.	% detekcije
1	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	23	96 %
	Flu B	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
2 (obrada 1)	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	19	79 %
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	8	33 %
	SARS-CoV-2	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
2 (obrada 2)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /ml	24	16	67 %
	SARS-CoV-2	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
2 (obrada 3)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV A	10X	12,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
3	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100 %
	RSV B	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
4	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	Flu A	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
5	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
6	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
7	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100 %
	Flu A	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
8	SARS-CoV-2	3X	450 IU/ml	24	24	100 %
	Flu B	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
9 (obrada 1)	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /ml	24	20	83 %
	Flu A	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
9 (obrada 2)	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /ml	24	23	96 %
	Flu A	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
10	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /ml	24	23	96 %
	Flu B	Visoka	1E5 kopija/ml	24	24	100 %
11	Flu A	2X	1 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	Flu B	2X	0,5 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	RSV B	2X	0,1 TCID ₅₀ /ml	24	24	100 %
	SARS-CoV-2	2X	300 IU/ml	24	24	100 %

Analitička reaktivnost i uključivost

Analitička reaktivnost ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay procijenjena je s pomoću više sojeva/izolata virusa influence A, influence B, RSV i SARS-CoV-2. Reaktivnost svakog soja/izolata opisana je u dva dijela. Početna procjena razina reaktivnosti za svaku ciljnu sekvenču izvedena je s pomoću soja svake pojedinačne ciljne sekvence testiranog pri 3 koncentracije u simuliranoj matrici nazofaringealnog brisa (pripremljenoj s pomoću 3000 humanih epitelnih stanica po ml UVT-a), *tablica 9*. U drugom dijelu, najniža razina na kojoj je dobivena 100-postotna pozitivna stopa u fazi 1 potvrđena je kao razina reaktivnosti testiranjem najmanje 20 ponavljanja, *tablica 10*. Testirano je ukupno 14 sojeva virusa Flu A, 6 sojeva virusa Flu B, 1 izolat virusa RSV A, 1 izolat virusa RSV B i 6 izolata virusa SARS-CoV-2.

Tablica 9. Sojevi virusa Flu A, Flu B, RSV A, RSV B i SARS-CoV-2 – preliminarna analiza razine reaktivnosti

Preliminarna analiza						
Ciljna sekvenca	Soj		Testirane razine	Br. valjanih rezultata	% poz.	
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	0,5 TCID ₅₀ /ml	8	75,0 %	
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			4,5 TCID ₅₀ /ml	7	100 %	
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,33 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,17 TCID ₅₀ /ml	6	50 %	
			0,5 TCID ₅₀ /ml	6	100 %	
			1,5 TCID ₅₀ /ml	6	100 %	
		A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,33 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	3,3 CEID ₅₀ /ml	8	62,5 %	
			10 CEID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			30 CEID ₅₀ /ml	8	100 %	
			Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,17 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %
				0,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
				1,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
	Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,15 TCID ₅₀ /ml		7	28,6 %	
		0,5 TCID ₅₀ /ml		8	100 %	
		1,5 TCID ₅₀ /ml		8	100 %	
	Kansas/14/2017 (H3N2)	2,67 TCID ₅₀ /ml		8	50 %	
		8 TCID ₅₀ /ml		8	87,5 %	
		24 TCID ₅₀ /ml		7	100 %	
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	3,3 CEID ₅₀ /ml	6	83,3 %	
			10 CEID ₅₀ /ml	6	100 %	
			30 CEID ₅₀ /ml	6	100 %	
	A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /ml	8	85,7 %		
		0,03 TCID ₅₀ /ml	8	100 %		
		0,1 TCID ₅₀ /ml	7	100 %		
		0,33 TCID ₅₀ /ml	8	100 %		
		1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %		
		3 TCID ₅₀ /ml	7	100 %		
		H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	10,87 pg/ml ¹	8	100 %
	32,6 pg/ml ¹			8	87,5 %	
	97,8 pg/ml ¹			7	100 %	
	H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	8 pg/ml ¹	8	100 %	
			25 pg/ml ¹	8	100 %	
	H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	75 pg/ml ¹	7	100 %	
			1:3E5 ¹	8	50 %	
			1:1E5 ¹	7	87,5 %	
	H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	1:3.3E4 ¹	8	100 %	
22,67 pg/ml ¹			8	100 %		
68 pg/ml ¹			8	100 %		
Flu B	Loza Victoria	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	204 pg/ml ¹	8	100 %	
			1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
		Washington/02/2019 (Victoria)	9 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			2,5 CEID ₅₀ /ml	8	25,0 %	
			5 CEID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	15 CEID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,01 TCID ₅₀ /ml	12	91,7 %	
			0,03 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
0,33 TCID ₅₀ /ml	16	100 %				
1 TCID ₅₀ /ml	8	100 %				

Preliminarna analiza						
Ciljna sekvenca	Soj		Testirane razine	Br. valjanih rezultata	% poz.	
Flu B (nastavak)	Loza Yamagata	Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,17 CEID ₅₀ /ml	8	75,0 %	
			0,5 CEID ₅₀ /ml	8	100 %	
		B/Utah/09/2014 (loza Yamagata)	1,5 CEID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,06 CEID ₅₀ /ml	8	25,0 %	
			0,19 CEID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			0,56 CEID ₅₀ /ml	7	85,7 %	
			1,7 CEID ₅₀ /ml	6	100 %	
			5 CEID ₅₀ /ml	6	100 %	
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	15 CEID ₅₀ /ml	6	100 %	
			0,33 TCID ₅₀ /ml	8	25,0 %	
			1 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
RSV	RSVA	A (dugi)	3 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			0,67 pfu/ml	8	37,5 %	
			2 pfu/ml	8	100 %	
	RSVB	B (9320)	6 pfu/ml	7	100 %	
			0,03 pfu/ml	8	12,5 %	
			0,1 pfu/ml	8	87,5 %	
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)		0,3 pfu/ml	8	100 %	
			0,06 TCID ₅₀ /ml	8	0 %	
			0,17 TCID ₅₀ /ml	8	12,5 %	
			0,5 TCID ₅₀ /ml	8	37,5 %	
			1,5 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %	
			4,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			13,5 TCID ₅₀ /ml	8	100 %	
			USA/CA_CDC_5574/2020 (Alpha, B.1.1.7)	0,006 TCID ₅₀ /ml	8	62,5 %
				0,02 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %
				0,06 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
				0,17 TCID ₅₀ /ml	7	100 %
				0,5 TCID ₅₀ /ml	7	100 %
				1,5 TCID ₅₀ /ml	7	100 %
			Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	0,002 TCID ₅₀ /ml	8	62,5 %
				0,006 TCID ₅₀ /ml	8	100 %
	0,02 TCID ₅₀ /ml	8		100 %		
	0,06 TCID ₅₀ /ml	8		100 %		
	0,17 TCID ₅₀ /ml	8		100 %		
	0,5 TCID ₅₀ /ml	8		100 %		
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)	0,001 TCID ₅₀ /ml	8	37,5 %		
		0,004 TCID ₅₀ /ml	8	87,5 %		
		0,013 TCID ₅₀ /ml	8	100 %		
		0,04 TCID ₅₀ /ml	8	100 %		
		0,11 TCID ₅₀ /ml	8	100 %		
Italy-INMI1	0,33 TCID ₅₀ /ml	4	100 %			
	7,44 kopije/ml ¹	8	37,5 %			
	22,33 kopije/ml ¹	8	87,5 %			
	67 kopija/ml ¹	8	100 %			
	200 kopija/ml ¹	8	100 %			
Izolot Hong Kong/VM20001061/2020	600 kopija/ml ¹	8	100 %			
	7,44 kopije/ml ¹	8	25,0 %			
	22,33 kopije/ml ¹	8	87,5 %			
	67 kopija/ml ¹	7	100 %			
	200 kopija/ml ¹	7	100 %			
		600 kopija/ml ¹	7	100 %		

¹Ove varijante isporučene su samo s određivanjem „ukupne RNK“, što uključuje RNK virusa i RNK stanice domaćina.

Tablica 10. Sojevi virusa Flu A, Flu B, RSV A, RSV B i SARS-CoV-2 – potvrđivanje razine reaktivnosti

Potvrđivanje					
Ciljna sekvenca	Soj		Razina	Br. valjanih rezultata	% poz.
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	1,0 TCID ₅₀ /ml	23	91,3 %
			1,5 TCID ₅₀ /ml	23	100 %
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,5 TCID ₅₀ /ml	23	82,6 %
			1,0 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
			0,33 TCID ₅₀ /ml	24	85,7 %
		A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,67 TCID ₅₀ /ml	24	95,2 %
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	10 CEID ₅₀ /ml	24	100 %
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,25 TCID ₅₀ /ml	24	87,0 %
			0,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,5 TCID ₅₀ /ml	23	91,3 %
			1,0 TCID ₅₀ /ml	23	95,7 %
		Kansas/14/2017 (H3N2)	12 TCID ₅₀ /ml	23	100 %
			5 CEID ₅₀ /ml	23	91,3 %
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	10 CEID ₅₀ /ml	23	100 %
		A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /ml	24	91,7 %
			0,03 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
	H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	10,87 pg/ml ¹	24	100 %
H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	2 pg/ml ¹	24	83,3 %	
		4 pg/ml ¹	23	100 %	
		8 pg/ml ¹	23	100 %	
H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1:3.3E4 ¹	24	95,7 %	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	7,6 pg/ml ¹	23	73,9 %	
		22,67 pg/ml ¹	23	100 %	
Flu B	Loza Victoria	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	1 TCID ₅₀ /ml	23	95,7 %
			5 CEID ₅₀ /ml	24	95,8 %
		Washington/02/2019 (Victoria)	10 CEID ₅₀ /ml	24	100 %
			0,01 TCID ₅₀ /ml	23	83,3 %
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	0,03 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
	Loza Yamagata	Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	0,05 CEID ₅₀ /ml	24	100 %
			0,56 TCID ₅₀ /ml	24	87,0 %
		B/Utah/09/2014 (loza Yamagata)	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		0,75 TCID ₅₀ /ml	24	87,5 %	
	B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	1,5 TCID ₅₀ /ml	20	95,0 %	
		3,0 TCID ₅₀ /ml	24	100 %	
RSV	RSVA	A (dugi)	2 pfu/ml	24	91,7 %
			4 pfu/ml	24	95,8 %
	RSVB	B (9320)	0,15 pfu/ml	24	100 %
			0,3 pfu/ml	21	100 %
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)	1,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %	
			3 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
			4,5 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
	USA/CA_CDC_5574/2020 (Alpha, B.1.1.7)	0,02 TCID ₅₀ /ml	24	95,8 %	
			0,06 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
		Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	0,006 TCID ₅₀ /ml	24	95,8 %
SARS-CoV-2 (nastavak)	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)	0,006 TCID ₅₀ /ml	24	87,5 %	
			0,013 TCID ₅₀ /ml	24	100 %
	Italy-INMI1	22 kopije/ml ¹	24	95,8 %	
			67 kopija/ml ¹	24	100 %
Izolat Hong Kong/VM20001061/2020	22 kopije/ml ¹	24	57,1 %		
		67 kopija/ml ¹	24	100 %	

¹Ove varijante isporučene su samo s određivanjem „ukupne RNK“, što uključuje RNK virusa i RNK stanice domaćina.

Reaktivnost ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay u detekciji različitih kliničkih izolata virusa SARS-CoV-2 dokazana je izvođenjem *in silico* analize s pomoću početnica i proba ispitivanja u odnosu na sve sekvence dostupne u banci GenBank (od studenog 2021.) primjenom algoritma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Rezultati pokazuju da početnice i probe za SARS-CoV-2 imaju 100-postotnu homologiju s preko 98 % sekvenci. Početnice i probe imaju ukupno homologiju >95 % za sve analizirane sekvence.

Obnovljivost unutar laboratorija

Obnovljivost unutar laboratorija za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay opisana je testiranjem deset panela virusa Flu A, Flu B, RSV A, RSV B ili SARS-CoV-2 pojedinačno dodanih na 2 razine [umjereno pozitivno (5x LoD) i nisko pozitivno (2x LoD)] te jednog negativnog panela. Paneli su testirani trima serijama testnih traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip proizvedenih u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (Good Manufacturing Practice, GMP), na dvama sustavima NeuMoDx System i tijekom šest neuzastopnih dana. Sastavnice panela pripremljene su u simuliranim ispitcima nazofaringealnih brisova pripremljenih s pomoću 3000 humanih epitelnih stanica po ml transportnog medija Universal Viral Transport medium (UVT) te im je dodan reprezentativni soj virusa Flu A, Flu B, RSV A, RSV B i SARS-CoV-2. Testne trake NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip i pufer NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) identificirani su kao ključni reagensi specifični za test koji imaju sposobnost utjecanja na radne značajke ispitivanja pa je stoga primijenjen tijekom rada s prethodnom obradom kako bi se pufer VVLB uključio u ispitivanje. Standardna devijacija vrijednosti Ct unutar serija i među trima serijama testnih traka ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2, na dvama sustavima NeuMoDx Molecular System bila je $\leq 1,2$ s koeficijentima varijacije (Coefficient of Variation, CV) $\leq 4,0$ % za sve ciljne sekvence koje su pokazale izvrsnu obnovljivost, *tablica 11, 12 i 13*.

Tablica 11. Obnovljivost testnih traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip na svim sustavima / u svim serijama / tijekom svih dana

Ciljna sekvenca	Ciljna razina	Valjani br.	% pozitivnih	Prosječni Ct	SD	% CV
Flu A	Umj. poz.	72	100 %	31,21	0,59	1,9 %
	Nisko poz.	72	100 %	32,01	0,58	1,8 %
Flu B	Umj. poz.	72	100 %	31,02	0,39	1,3 %
	Nisko poz.	72	100 %	31,88	0,56	1,7 %
RSV A	Umj. poz.	72	100 %	29,71	0,95	3,2 %
	Nisko poz.	72	100 %	30,75	1,18	3,8 %
RSV B	Umj. poz.	72	100 %	28,43	0,53	1,9 %
	Nisko poz.	72	100 %	29,45	0,56	1,9 %
SARS-CoV-2	Umj. poz.	72	100 %	32,70	0,51	1,5 %
	Nisko poz.	72	100 %	33,68	0,56	1,7 %
Istinski negativno		72	0 %	N/P	N/P	N/P

Tablica 12. Obnovljivost testnih traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip po pojedinačnom sustavu

Panel		N0000096					N000012				
Ciljna sekvenca	Ciljna razina	Valjani br.	% pozitivnih	Prosječni Ct	SD	% CV	Valjani br.	% pozitivnih	Prosječni Ct	SD	% CV
Flu A	Umj. poz.	36	100 %	31,37	0,66	2,1 %	36	100 %	31,05	0,46	1,5 %
	Nisko poz.	36	100 %	32,07	0,65	2,0 %	36	100 %	31,95	0,51	1,6 %
Flu B	Umj. poz.	36	100 %	31,10	0,40	1,3 %	36	100 %	30,94	0,37	1,2 %
	Nisko poz.	36	100 %	31,84	0,57	1,8 %	36	100 %	31,91	0,55	1,7 %
RSV A	Umj. poz.	36	100 %	29,94	0,97	3,2 %	36	100 %	29,49	0,89	3,0 %
	Nisko poz.	36	100 %	30,93	1,19	3,8 %	36	100 %	30,57	1,16	3,8 %
RSV B	Umj. poz.	36	100 %	28,60	0,58	2,0 %	36	100 %	28,26	0,42	1,5 %
	Nisko poz.	36	100 %	29,60	0,53	1,8 %	36	100 %	29,29	0,56	1,9 %
SARS-CoV-2	Umj. poz.	36	100 %	32,80	0,56	1,7 %	36	100 %	32,61	0,43	1,3 %
	Nisko poz.	36	100 %	33,83	0,64	1,9 %	36	100 %	33,52	0,42	1,2 %
Istinski negativno		36	0 %	N/P	N/P	N/P	36	0 %	N/P	N/P	N/P

Tablica 13. Obnovljivost testnih traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip po pojedinačnoj seriji reagensa

Panel		Serija 1				Serija 2				Serija 3			
Ciljna sekvenca	Ciljna razina	Valjani br.	Prosječni Ct	SD	% CV	Valjani br.	Prosječni Ct	SD	% CV	Valjani br.	Prosječni Ct	SD	% CV
Flu A	Umj. poz.	24	31,06	0,38	1,2 %	24	31,49	0,62	2,0 %	24	31,08	0,65	2,1 %
	Nisko poz.	24	32,02	0,59	1,8 %	24	32,18	0,50	1,6 %	24	31,82	0,61	1,9 %
Flu B	Umj. poz.	24	31,05	0,39	1,2 %	24	31,08	0,47	1,5 %	24	30,94	0,29	0,9 %
	Nisko poz.	24	31,93	0,36	1,1 %	24	32,01	0,77	2,4 %	24	31,69	0,42	1,3 %
RSV A	Umj. poz.	24	29,04	0,71	2,4 %	24	30,40	0,66	2,2 %	24	29,69	0,94	3,2 %
	Nisko poz.	24	31,53	0,50	1,6 %	24	29,45	0,79	2,7 %	24	31,25	0,87	2,8 %
RSV B	Umj. poz.	24	28,65	0,54	1,9 %	24	28,29	0,52	1,8 %	24	28,35	0,47	1,7 %
	Nisko poz.	24	29,31	0,48	1,6 %	24	29,46	0,64	2,2 %	24	29,57	0,55	1,8 %
SARS-CoV-2	Umj. poz.	24	32,82	0,43	1,3 %	24	32,70	0,56	1,7 %	24	32,59	0,50	1,5 %
	Nisko poz.	24	33,42	0,58	1,7 %	24	33,80	0,57	1,7 %	24	33,81	0,47	1,4 %
Istinski negativno		24	N/P	N/P	N/P	24	N/P	N/P	N/P	24	N/P	N/P	N/P

Kliničke radne značajke

Kliničke radne značajke ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay utvrđene su s pomoću internog retrospektivnog ispitivanja usporedbe metoda korištenjem preostalih ispitaka nazofaringealnih (Nasopharyngeal, NP) brisova iz 4 klinička laboratorija na različitim zemljopisnim lokacijama. U ovo ispitivanje uključena su i razrjeđena kliničkih uzoraka pozitivnih na SARS-CoV-2 kako bi se pokazala klinička osjetljivost blizu vrijednosti LoD.

Preostali ispiti nazofaringealnih (Nasopharyngeal, NP) brisova prikupljeni od simptomatskih pacijenata anonimizirani su te im je opskrbeni laboratorij dodijelio jedinstveni ID broj, čime je stvoren povjerljivi popis koji povezuje ID pacijenta s anonimiziranim ispitcima testiranim u svrhu ispitivanja. Za ovo je ispitivanje prikupljeno ukupno 747 pojedinačnih ispitaka nazofaringealnih (Nasopharyngeal, NP) brisova. Svi ispiti obrađeni su primjenom izravnog tijeka rada i tijeka rada s prethodnom obradom, čime je u konačnici dobiveno 739 važećih i 8 nevažećih rezultata u izravnom tijeku rada, te 736 važećih i 11 nevažećih rezultata u tijeku rada s prethodnom obradom. Među važećim uzorcima, 121 uzorak bio je isključivo namijenjen procjeni ciljnih sekvenci virusa Flu A, Flu B i RSV. Od tih ispitaka, 54 su bila pozitivni uzorci na Flu A, dok su 34 uzorka bila pozitivna na Flu B, a 33 uzorka bila su pozitivna na RSV. Unutar te kohorte od 121 uzorka, opskrbeni klinički laboratoriji stavili su na raspolaganje rezultate za sve 3 ciljne sekvence od interesa. Prema tome, ova kohorta pozitivnih uzoraka sadržavala je i 67 negativnih rezultata za Flu A, 87 negativnih rezultata za Flu B i 88 negativnih rezultata za RSV. Prethodno spomenuti negativni rezultati dodatno su nadopunjeni s 59 kliničkih ispitaka koji su za sve 4 ciljne sekvence imali negativne rezultate potvrđene komparativnim ispitivanjem. Sveukupno, 106 uzoraka identificirano je kao pozitivno na SARS-CoV-2 u obama tijekovima rada. Klinički uzorci negativni na SARS-CoV-2 potvrđeni su važećim rezultatom na sustavu NeuMoDx kod 512 uzoraka s izravnom tijekom rada i 509 uzoraka s tijekom rada s prethodnom obradom.

Stanje testiranja ovih uzoraka skriveno je od korisnika kako bi se moglo provesti „jednostruko slijepo ispitivanje“. Za analizu usporedbe metoda upotrijebljeni su rezultati dobiveni određenim molekularnim proizvodima zakonito stavljenima na tržišta koje je odobrila agencija FDA i koji nose oznaku CE te koje laboratoriji upotrebljavaju za ispitivanje standarda skrbi.

Rezultati ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 pokazali su kliničku osjetljivost od 98,1 % u obama tijekovima rada za ciljnu sekvencu virusa Flu A i kliničku specifičnost od 100 % i 99,2 % za izravne tijekove rada odnosno tijekove rada s prethodnom obradom (*tablica 14A*). Rezultati za ciljnu sekvencu virusa Flu B pokazali su kliničku osjetljivost i kliničku specifičnost od 97,1 % odnosno 100 % za oba tijeka rada (*tablica 14B*). Rezultati za ciljnu sekvencu virusa RSV (nediferenciranog) pokazali su kliničku osjetljivost od 97 % za oba tijeka rada i kliničku specifičnost od 99,3 % i 98,6 % u izravnim tijekovima rada odnosno tijekovima rada s prethodnom obradom (*tablica 14C*). Rezultati za ciljnu sekvencu virusa SARS-CoV-2 pokazali su kliničku osjetljivost od 97,2 % za oba tijeka rada i kliničku specifičnost od 98,4 % u izravnom tijekom rada te 98,2 % u tijeku rada s prethodnom obradom (*tablica 14D*). Donje i gornje granice 95-postotnih intervala pouzdanosti prikazane su u tablicama 14A, 14B, 14C i 14D u nastavku, a izračunate su primjenom Wilsonova postupka s korekcijom kontinuiteta.

Tablica 14A. Sažetak kliničkih radnih značajki – testna traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: detekcija virusa **Flu A**
(a) izravni tijek rada i (b) tijek rada s prethodnom obradom

(a) Izravni tijek rada

Flu A		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	53	0	53
	NEG.	1	126	127
	Ukupno	54	126	180
Klinička osjetljivost (Flu A) = 98,1 % (88,8 % – 99,9 %)				
Klinička specifičnost (Flu A) = 100 % (96,3 %– 100 %)				

(b) Tijek rada s prethodnom obradom

Flu A		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	53	1	54
	NEG.	1	125	126
	Ukupno	54	126	180
Klinička osjetljivost (Flu A) = 98,1 % (88,8 % – 99,9 %)				
Klinička specifičnost (Flu A) = 99,2 % (95,0 % – 100 %)				

Tablica 14B. Sažetak kliničkih radnih značajki – testna traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: detekcija virusa **Flu B**
(a) izravni tijek rada i (b) tijek rada s prethodnom obradom

(a) Izravni tijek rada

Flu B		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	33	0	33
	NEG.	1	146	147
	Ukupno	34	146	180
Klinička osjetljivost (Flu B) = 97,1% (82,9% – 99,8 %)				
Klinička specifičnost (Flu B) = 100 % (96,8 % – 100 %)				

(b) Tijek rada s prethodnom obradom

Flu B		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	33	0	33
	NEG.	1	146	147
	Ukupno	34	146	180
Klinička osjetljivost (Flu B) = 97,1% (82,9% – 99,8 %)				
Klinička specifičnost (Flu B) = 100 % (96,8 % – 100 %)				

Tablica 14C. Sažetak kliničkih radnih značajki – testna traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: detekcija virusa **RSV** primjenom
(a) izravnog tijeka rada i (b) tijeka rada s prethodnom obradom

(a) Izravni tijek rada

RSV		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	32	1	33
	NEG.	1	146	147
	Ukupno	33	147	180
Klinička osjetljivost (RSV) = 97,0 % (82,5 % – 99,8 %)				
Klinička specifičnost (RSV) = 99,3 % (95,7 % – 100 %)				

(b) Tijek rada s prethodnom obradom

RSV		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	32	2	34
	NEG.	1	145	146
	Ukupno	33	147	180
Klinička osjetljivost (RSV) = 97,0 % (82,5 % – 99,8 %)				
Klinička specifičnost (RSV) = 98,6 % (94,7 % – 99,8 %)				

Tablica 14D. Sažetak kliničkih radnih značajki – testna traka NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: detekcija virusa SARS-CoV-2 primjenom (a) izravnog tijeka rada i (b) tijeka rada s prethodnom obradom

(a) Izravni tijek rada

SARS-CoV-2		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	103	8	111
	NEG.	3	504	507
	Ukupno	106	512	618
Klinička osjetljivost (SARS-CoV-2) = 97,2 % (91,3 % – 99,3 %)				
Klinička specifičnost (SARS-CoV-2) = 98,4 % (96,8 % – 99,3 %)				

(b) Tijek rada s prethodnom obradom

SARS-CoV-2		Referentni rezultat testa koji je odobrila FDA / s CE oznakom		
		POZ.	NEG.	Ukupno
Rezultat testa NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POZ.	103	9	112
	NEG.	3	500	503
	Ukupno	106	509	615
Klinička osjetljivost (SARS-CoV-2) = 97,2 % (91,3 % – 99,3 %)				
Klinička specifičnost (SARS-CoV-2) = 98,2 % (96,5 % – 99,1 %)				

Analitička specifičnost i križna reaktivnost

Analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay procijenjena je testiranjem panela od 47 organizama, koji se sastoji od 22 virusna, 24 bakterijska i 1 gljivičnog soja koji predstavljaju česte respiratorne patogene ili floru koja je obično prisutna u respiratornom traktu. Bakterije i gljivice testirane su u koncentracijama od ~6E6 CFU/ml ili IFU/ml, osim ako je drugačije navedeno. Virusi su testirani u koncentracijama od 1E5 do 1E6 TCID₅₀/ml ili kopija/ml, osim ako je drugačije navedeno. Kako bi se potvrdila potencijalna križna reaktivnost između virusa SARS-CoV-2 i porodice koronavirusa (229E, OC43, NL63, MERS i SARS-1) zajedno s bakterijom *Legionella pneumophila*, uključena su dodatna ponavljanja (> 20) kako bi se ispunio zahtjev Koordinacijske skupine za medicinske proizvode (Medical Device Coordination Group, MDCG) za in vitro dijagnostičke medicinske proizvode za SARS-CoV-2. Analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay bila je 100 % za Flu A, Flu B, RSV A, RSV B i SARS-CoV-2.

HKU1 je još jedan član porodice koronavirusa koji je trebao biti testiran, međutim, zbog nedostupnosti virusa i genomske RNK testirana su 4 ponavljanja sintetičkog materijala. Kako bi se istražila potencijalna križna reaktivnost, obavljena je i *in-silico* analiza početnica i proba NeuMoDx SARS-CoV-2 i genoma koronavirusa HKU1 objavljena u banci GenBank. Iz baze podataka o virusima Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (National Center for Biotechnology Information, NCBI) u sklopu Nacionalnih instituta za zdravlje (National Institutes of Health, NIH) dobiveno je ukupno 57 sekvenci genoma HKU1. Sve sekvence HKU1 imale su 3 ili više nepodudaranja sa svakom od početnica i proba NeuMoDx SARS-CoV-2. Nije detektirana bliska homologija. Zbog toga se ne očekuje križna reaktivnost između koronavirusa HKU1 i ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

Tablica 15. Rezultati analitičke specifičnosti

Organizam	Koncentracija	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
Adenovirus tipa 1	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Adenovirus tipa 7	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> 1176	10 ng/ml	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	10 ng/ml	-	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
EBV	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-

Organizam	Koncentracija	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
<i>Escherichia coli</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Hemophilus influenzae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
HHV 6A	1E6 kopija/ml	-	-	-	-
HHV 7	1E6 kopija/ml	-	-	-	-
HHV 8	1E6 kopija/ml	-	-	-	-
HSV 1	1E6 kopija/ml	-	-	-	-
HSV 2	1E6 kopija/ml	-	-	-	-
Humani koronavirus 229E	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humani koronavirus HKU1	1E6 kopija/ml	-	-	-	-
Humani koronavirus NL63	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humani koronavirus OC43	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humani enterovirus 68	1E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humani metapneumovirus	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humana parainfluenca, tip 1	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humana parainfluenca, tip 2	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humana parainfluenca, tip 3	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
Humani rinovirus, tip 1A	5E3 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus jensoni</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
Virus ospica	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
MERS koronavirus EMC/2012	1E4 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
Virus mumps	5E5 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero A	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero B	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero C	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero D	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
SARS koronavirus	1E6 TCID ₅₀ /ml	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	6E6 CFU/ml	-	-	-	-
Flu A, Singapore/INFM1H-16-0019/2016	3x LoD	+	-	-	-
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	3x LoD	-	+	-	-
RSV A2	3x LoD	-	-	+	-
RSV B (WV/14617/85)	3x LoD	-	-	+	-
SARS-CoV-2, 1. međunarodni standard SZO-a	3x LoD	-	-	-	+
Negativna kontrola (bez patogena)	N/P	-	-	-	-

Tablica 16. Analiitička specifičnost – porodica koronavirusa zajedno s bakterijom *Legionella pneumophila* (testirano > 20 ponavljanja)

Organizam	Koncentracija	SARS-CoV-2
Humani koronavirus NL63	1,00E+04 TCID ₅₀ /ml	-
SARS koronavirus 1	1,00E+06 pfu/ml	-
MERS koronavirus EMC/2012	1,00E+04 TCID ₅₀ /ml	-
Humani koronavirus 229E	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml	-
Humani koronavirus OC43	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6,00E+06 CFU/ml	-
Pozitivna kontrola: SARS-CoV-2, Prvi međunarodni standard SZO-a	3x LoD	+
Negativna kontrola (bez patogena)	N/P	-

Interferirajuće tvari – komenzalni organizmi

Ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay testirano je na interferenciju u prisutnosti neciljnih organizama (koji su potencijalno prisutni u gornjem respiratornom traktu) procjenom radnih značajki ispitivanja pri niskim razinama (~3X LoD) virusa Flu A, Flu B, RSV A, RSV B i SARS-CoV-2 u prisutnosti visokih koncentracija organizama prethodno navedenih u *tablici 15*. Dodatno, kako bi se potvrdila potencijalna interferencija između virusa SARS-CoV-2 i porodice koronavirusa (229E, OC43, NL63, MERS i SARS-1) zajedno s bakterijom *Legionella pneumophila* (*tablica 16*), uključena su dodatna ponavljanja (> 20) kako bi se ispunio zahtjev Koordinacijske skupine za medicinske proizvode (Medical Device Coordination Group, MDCG) za in vitro dijagnostičke medicinske proizvode za SARS-CoV-2. Tim uzorcima dodan je virus SARS-CoV-2 pri samo ~3X LoD i to za dio ispitivanja koji se odnosi na interferencije. Za sve ciljne sekvence uočena je stopa detekcije od 100 %. Dakle, nije uočena interferencija pri detekciji bilo koje ciljne sekvence ni kod jednog od komenzalnih organizama.

Interferirajuće tvari – endogene/egzogene

Za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay procijenjena je osjetljivost na interferenciju uzrokovanu tvarima potencijalno povezanim s prikupljanjem ispitaka nazofaringealnih brisova. U rezidualne kliničke negativne ispitke nazofaringealnih brisova pojedinačno su dodani virusi Flu A, Flu B, RSV A, RSV B ili SARS-CoV-2 pri 3X LoD te su ispitci obrađeni u prisutnosti i u odsustvu agensa prikazanih u *tablici 17*. Nijedna tvar uključena u testiranje nije imala negativan učinak na radne značajke ispitivanja ni za koju ciljnu sekvencu.

Tablica 17. Tvari testirane na interferenciju

	Tvar	Opis / aktivni sastojak	Koncentracija*
Egzogeni	Neo-Synephrine	Fenilefrin	15 % v/v
	Gel za nos – Ayr Saline Nasal Gel	Natrijev klorid s konzervansima	15 % v/v
	Homeopatski lijek za olakšavanje alergijskih tegoba – Similasan	Cardiospermum, Sabadilla, Luffa operculata, Galphimia glauca	15 % v/v
	Nature's Bounty Zinc	Cink glukonat	0,1 mg/ml
	Oralni anestetik/analgetik – Oragel	Benzokain, benzalkonijev klorid	1 % v/v
	Sprej za nos – Afrin	Oksimetazolin	15 % w/v
	Sprej za nos – Zicam	<i>Luffa operculata</i> , <i>Galphimia glauca</i> , Histaminum hydrochloricum, sumpor	15 % v/v
	Nazalni kortikosteroid – Flonase	Flutikazon	5 % v/v
	Nazalni kortikosteroid – Rhinocort	Budezonid	5 % v/v
	Nazalni kortikosteroid – Nasacort	Triamkinolon	5 % v/v
	Nazalni kortikosteroid – deksametazon	Deksametazon	10 mg/ml
	Nazalni kortikosteroid – mometazon	Mometazon	10 mg/ml
	Nazalni kortikosteroid – beklometazon	Beklometazon	10 mg/ml
	Pastile za grlo Chloraseptic	Benzokain, mentol	2 mg/ml
	Antibiotik, mast za nos	Mupirocin	10 mg/ml
	Antivirusni lijek Relenza	Zanamivir	7,5 mg/ml
Antivirusni lijek Tamiflu	Oseltamivir	25 mg/ml	
Sistemska antibiotik	Tobramicin	15 mg/ml	
Endogeni	Mucin	Pročišćeni protein mucin	2,5 % w/v
	Humana krv	Krv	2 % v/v

*Napomena: Prikazane koncentracije odnose se na one koje se upotrebljavaju za zasićivanje brisova prije doziranja pozitivnih kliničkih surogat uzoraka s interferirajućom tvari. One su stoga reprezentativne za razinu na mjestu prikupljanja brisa koju je moguće tolerirati.

Križna kontaminacija

Stopa križne kontaminacije za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na sustavima NeuMoDx Molecular 288 i 96 određena je naizmjeničnom obradom visoko pozitivnih i negativnih uzoraka. Svi uzorci sastojali su se od simuliranog materijala nazofaringealnog (Nasopharyngeal, NP) brisa, s time da su pozitivni uzorci pojačani na $\geq 10^5$ TCID₅₀/ml (ili $\geq 10\,000$ LoD). Izvedeno je pet setova naizmjeničnog testiranja, čime je u konačnici dobiveno ukupno 60 negativnih ponavljanja i 60 pozitivnih ponavljanja na oba sustava NeuMoDx 288 i 96 Molecular System. Na objema vrstama sustava svih 120 ponavljanja obrade negativnih uzoraka točno je iskazano kao negativno, što pokazuje da ne dolazi do nikakve križne kontaminacije tijekom obrade uzoraka na sustavima NeuMoDx System.

Vrijeme obrade

Utvrđeno je da je vrijeme obrade 8 uzoraka primjenom ispitivanja NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay ~85 minuta na sustavu N288 i ~78 minuta na sustavu NeuMoDx 96 za obradu 4 uzorka.

Stopa pogreške cijelog sustava

Stopa pogreške cijelog sustava za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay procijenjena je testiranjem 1 razine ciljne sekvence virusa SARS-CoV-2 pri koncentraciji od ~3X LoD, pripremljene tako da je kliničkim negativnim ispitcima nazofaringealnih brisova dodan 1. međunarodni standard SZO-za za SARS-CoV-2. Obrađeno je ukupno 200 ponavljanja primjenom izravnog tijeka rada na sustavima NeuMoDx 96 i 288 Molecular System (100 ponavljanja po sustavu). Stopa pogreške izračunata je kao postotak lažno negativnih rezultata od ukupnog broja dobivenih važećih rezultata. Utvrđeno je da je stopa detekcije za ciljnu sekvencu virusa SARS-CoV-2 u ispitivanju NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay 100 % za sustave NeuMoDx 96 i 288 Molecular System, što pokazuje stopu pogreške od 0 % za oba sustava.

Otpornost sustava – inhibicija

Stopa inhibicije određena je izračunavanjem stope za Unresolved (Nerazriješeno) (kontrola obrade uzorka nije amplificirana pri nepostojanju pogreške sustava) za sve negativne uzorke obrađene tijekom studija verifikacije i validacije. Od ukupno 1221 obrađenog negativnog uzorka, dobiveno je ukupno 11 rezultata Unresolved (Nerazriješeno), što pokazuje stopu inhibicije od 0,9 % za ispitivanje NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

REFERENCE

1. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
2. 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

BD™ je zaštitni znak tvrtke Becton, Dickinson and Company

Hamilton® je registrirani zaštitni znak tvrtke Hamilton Company

Minitip Nylon® Flocked Swab je registrirani zaštitni znak tvrtke Copan Diagnostics, Inc.









NeuMoDx™ i NeuDry™ su zaštitni znakovi tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.


TaqMan® je registrirani zaštitni znak tvrtke Roche Molecular Systems, Inc.

UTM-RT® je registrirani zaštitni znak tvrtke Copan Diagnostics, 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	Samo za upotrebu po nalogu liječnika		Nije za ponovnu upotrebu
	Proizvođač		Sadržava dovoljno za <n> testova
IVD	<i>In vitro</i> dijagnostički medicinski proizvod		Pročitajte upute za upotrebu
EC REP	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici		Oprez
REF	Kataloški broj	CE	Oznaka CE
LOT	Kôd šarže	CONT	Sadržava
	Upotrijebiti do		Sadržava biološki materijal životinjskog porijekla
	Temperaturno ograničenje		

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

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANY
+49 2103 290

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

Patent: www.neumodx.com/patents

CE