

REF 300300 NeuMoDx™ HCV Quant Test Strip

R only

VORSICHT: Nur für den US-Export

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

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

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

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

VERWENDUNGSZWECK

Der NeuMoDx HCV Quant Assay ist ein automatisierter *In-vitro*-Nukleinsäureamplifikationstest für die Quantifizierung der RNA des Hepatitis-C-Virus (HCV) in Humanplasma- und -serumproben zum Nachweis der HCV-Antikörper-positiven Genotypen 1 bis 6 bei HCV-infizierten Personen. Der NeuMoDx HCV Quant Assay, implementiert auf dem NeuMoDx 288 Molecular System und dem NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System(s)), umfasst eine automatisierte RNA-Extraktion zur Isolation der Zielnukleinsäure aus der Probe und eine Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), die auf die hochkonservierten Sequenzen des Hepatitis-C-Virusgenoms abzielt.

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

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Zur Plasmagewinnung kann humanes Vollblut verwendet werden, das in sterilen Blutentnahmeröhrchen mit entweder Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) oder ACD-Stabilisator (Acid Citrate Dextrose, ACD) als Antikoagulans oder in Plasmapräparationsröhrchen (Plasma Preparation Tubes, PPT) entnommen wurde. Serum sollte in Serumröhrchen oder -trennröhrchen (Serum Separation Tubes, SST) entnommen werden. Zur Vorbereitung des Tests wird das Plasma oder Serum in einem sekundären Probenröhrchen oder das fraktionierte Blut in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen primären Probenröhrchen mithilfe eines speziellen Probenröhrchenträgers in das NeuMoDx System geladen. Für jede Probe wird ein Aliquot der Plasma- oder Serumprobe mit NeuMoDx Lysis Buffer 3 vermischt, und das NeuMoDx System führt automatisch alle Schritte durch, die erforderlich sind, um die Zielnukleinsäure zu extrahieren, die isolierte RNA für die Echtzeit-RT-PCR-Amplifikation vorzubereiten, eine Amplifikation zu erreichen und die Amplifikationsprodukte, falls vorhanden, nachzuweisen. Der NeuMoDx HCV Quant Assay zielt auf zwei hochkonservierte Regionen des HCV-Genoms ab, um die Robustheit zu erhöhen. Der NeuMoDx HCV Quant Assay umfasst auch eine RNA-Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC2), mit der überwacht wird, ob potenziell inhibitorische Stoffe vorhanden sind oder während der Extraktions- und Amplifikationsprozesse Fehler am NeuMoDx System oder bei den Reagenzien auftreten.

HCV ist ein einzel- und positivsträngiges RNA-Virus, das sowohl eine akute als auch eine chronische Infektion auslösen kann.¹ Einen Impfstoff gegen Hepatitis C gibt es derzeit nicht. Während die akute Infektion in der Regel asymptomatisch verläuft und nur sehr selten mit einer lebensbedrohlichen Erkrankung einhergeht, könnten mehr als der Hälfte der HCV-Infizierten eine chronische Infektion entwickeln. Bei chronisch HCV-Infizierten liegt das Risiko für das Auftreten einer Leberzirrhose innerhalb von 20 Jahren bei 15–30 %. Es wird vermutet, dass weltweit schätzungsweise 71 Millionen Menschen eine chronische HCV-Infektion haben, und es ist zu erwarten, dass sich bei einer erheblichen Anzahl der Betroffenen eine Leberzirrhose oder ein Leberkarzinom entwickelt.²⁻⁴ HCV wird primär durch Blut und Blutprodukte übertragen. Die verbreitete Einführung von Blut-Screening-Tests hat die Inzidenz der Übertragung durch Blutspenden deutlich verringert.¹

Der Nachweis von Antikörpern gegen HCV erlaubt nicht die Unterscheidung zwischen einer aktiven und einer ausgeheilten Infektion. Daher erfordern Algorithmen für HCV-Labortests die Diagnose einer aktiven HCV-Infektion bei Antikörper-positiven Personen durch den Nachweis von HCV-RNA im Plasma oder Serum, bevor (gegebenenfalls) eine Behandlung eingeleitet wird. Die Quantifizierung der HCV-RNA (Viruslast) wird inzwischen routinemäßig für die Definition und Überwachung einer erfolgreichen HCV-Therapie eingesetzt.

Aktuelle Leitlinien für das Management und die Behandlung von HCV-Infektionen empfehlen quantitative HCV-RNA-Tests vor Beginn einer antiviralen Therapie, um einen Ausgangswert zu ermitteln, sowie nach 12 Wochen oder später nach Ende der Behandlung. Die Erfassung weiterer Zeitpunkte kann mitunter empfehlenswert sein. Das Ziel einer HCV-Therapie ist ein anhaltendes virologisches Ansprechen (Sustained Virologic Response, SVR), das als nach der Behandlung mithilfe eines Assays, dessen Nachweisgrenze < 25 IU/ml beträgt, nicht nachweisbare HCV-RNA definiert ist.⁵⁻⁷ Die aktuellen Leitlinien der American Association for the Study of Liver Diseases (Amerikanische Assoziation für die Erforschung von Lebererkrankungen) schlagen Tests auf HCV-RNA nicht nur zum Ausgangszeitpunkt sondern auch regelmäßig während der Behandlung (d. h. alle 4 Wochen) und 12 Wochen nach Abschluss der Behandlung vor. Zur Erkennung einer aktiven HCV-Infektion werden Tests zum Nachweis von HCV-RNA in Kombination mit serologischen Tests eingesetzt.⁶

PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Der NeuMoDx HCV Quant Assay kombiniert die automatisierte RNA-Extraktion, die Amplifikation und den Nachweis mittels Echtzeit-RT-PCR. Vollblutproben werden für die Gewinnung von Plasma in EDTA-, ACD- oder PPT-Röhrchen und/oder für die Gewinnung von Serum in SST-Röhrchen entnommen. Die primäre (fraktionierte) Blutprobe oder ein Plasma-/Serumaliquot in einem kompatiblen sekundären Probenröhrchen wird mit Barcode versehen und in das NeuMoDx System geladen. Das NeuMoDx System aspiriert automatisch ein Aliquot des Plasmas/Serums und mischt es mit NeuMoDx Lysis Buffer 3 und den Agenzien in der NeuMoDx Extraction Plate, um die Verarbeitung zu beginnen. Das NeuMoDx System automatisiert und integriert die RNA-Extraktion und -Konzentration, die Reagenz Vorbereitung und die Nukleinsäureamplifikation/den Nachweis der Zielsequenzen mittels Echtzeit-RT-PCR. Die enthaltene Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC2) unterstützt die Überwachung auf das Vorhandensein von inhibitorischen Stoffen und System-, Prozess- oder Reagenzfehlern. Es ist kein Bedieneringriff erforderlich, sobald die Probe in das NeuMoDx System geladen ist.

Das NeuMoDx System verwendet eine Kombination aus Wärme, lytischem Enzym und Extraktionsreagenzien, um automatisch Lyse, RNA-Extraktion und die Entfernung von Inhibitoren durchzuführen. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden durch paramagnetische Partikel aufgenommen. Die Partikel werden zusammen mit den gebundenen Nukleinsäuren in die NeuMoDx Cartridge geladen, wo die ungebundenen Elemente mit NeuMoDx Wash Reagent ausgewaschen werden. Die gebundene RNA wird dann mit NeuMoDx Release Reagent eluiert. Das NeuMoDx System verwendet die eluierte RNA zur Rehydrierung proprietärer NeuDry™ Amplifikationsreagenzien, die alle für die Amplifikation der HCV- und SPC2-Zielsequenzen erforderlichen Elemente enthalten. Auf diese Weise können Amplifikation und Nachweis von Ziel- und Kontroll-RNA-Sequenzen gleichzeitig erfolgen. Nach der Rekonstitution der RT-PCR-Trockenreagenzien dispensiert das NeuMoDx System die vorbereitete RT-PCR-fertige Mischung in eine PCR-Kammer (pro Probe) der NeuMoDx Cartridge. Reverse Transkription, Amplifikation und Nachweis der Kontroll- und Zielsequenzen (falls vorhanden) erfolgen in der PCR-Kammer. Die NeuMoDx Cartridge ist dafür konzipiert, das Amplifikat nach der PCR zu enthalten, wodurch das Kontaminationsrisiko nach Amplifikation nahezu eliminiert wird.

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

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

Eine TaqMan-Sonde, die mit einem Fluorophor (Anregung: 490 nm und Emission: 521 nm) am 5'-Ende und einem dunklen Quencher am 3'-Ende markiert ist, wird zum Nachweis von HCV-RNA verwendet. Für den Nachweis der SPC2 wird die TaqMan-Sonde mit einem alternativen Fluoreszenzfarbstoff (Anregung: 535 nm und Emission: 556 nm) am 5'-Ende und einem dunklen Quencher am 3'-Ende markiert. Die NeuMoDx System Software überwacht das von den TaqMan Sonden am Ende jedes Amplifikationszyklus abgegebene Fluoreszenzsignal. Nach Abschluss der Amplifikation analysiert die NeuMoDx System Software die Daten und gibt ein endgültiges Ergebnis aus (POSITIVE (Positiv)/NEGATIVE (Negativ)/INDETERMINATE (Unbestimmt)/UNRESOLVED (Offen)/NO RESULT (Kein Ergebnis)). Wenn ein Ergebnis positiv ist und die berechnete Konzentration innerhalb der Quantifizierungsgrenzen liegt, gibt die NeuMoDx System Software auch einen quantitativen Wert für die Probe aus.

REAGENZIEN/VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bereitgestelltes Material

REF	Inhalt	Einheiten pro Packung	Tests pro Einheit	Tests pro Packung
300300	NeuMoDx HCV Quant Test Strip <i>RT-PCR-Trockenreagenzien, die HCV- und SPC2-spezifische TaqMan Sonden und Primer enthalten</i>	6	16	96

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

REF	Inhalt
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Getrocknete paramagnetische Partikel und Probenprozesskontrollen sowie getrocknetes lytisches Enzym</i>
800200 oder 800202	NeuMoDx HCV Calibrators <i>Sets aus HCV-Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration für den Einmalgebrauch, zur Validierung der Kalibrationskurve</i>
900201 oder 900202	NeuMoDx HCV External Controls <i>Sets aus HCV-Positiv- und Negativkontrollen für den Einmalgebrauch</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hamilton CO-RE/CO-RE II Spitzen (300 µL) mit Filtern
235905	Hamilton CO-RE/CO-RE II Spitzen (1000 µL) mit Filtern

Benötigte Instrumente

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


WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Der NeuMoDx HCV Quant Test Strip ist ausschließlich zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik mit den NeuMoDx Molecular Systems bestimmt.
- Die Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn das Sicherheitssiegel aufgebrochen oder die Verpackung bei Ankunft beschädigt ist.
- Verbrauchsmaterialien oder Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbeutel bei der Ankunft geöffnet oder beschädigt ist.
- Bevor Testergebnisse für klinische Proben generiert werden können, muss eine gültige Testkalibrierung (generiert durch Verarbeitung von Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration aus den NeuMoDx HCV Calibrators) verfügbar sein.
- NeuMoDx HCV External Controls müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden, solange Tests mit dem NeuMoDx HCV Quant Assay durchgeführt werden.
- Das Mindestprobenvolumen von Sekundäraliquoten ist abhängig von der Röhrchengröße, dem Probenröhrchenträger und der Verarbeitung des Probenvolumens wie nachstehend definiert. Ein Volumen, das niedriger ist als das angegebene Minimum, kann zu dem Fehler „Quantity Not Sufficient“ (Menge nicht ausreichend) führen.
- Die Verwendung von Proben, die bei nicht geeigneten Temperaturen oder über die angegebenen Lagerzeiten hinaus aufbewahrt wurden, kann zu ungültigen oder fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Eine Kontamination von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien mit Mikroben und Ribonuklease (RNase) ist stets zu vermeiden. Bei Verwendung von Sekundärprobenröhrchen wird die Verwendung steriler, RNase-freier Einwegtransferpipetten empfohlen. Für jede Probe eine neue Pipette verwenden.
- Zur Vermeidung von Kontamination NeuMoDx Cartridge nach der Amplifikation weder handhaben noch beschädigen. NeuMoDx Cartridges unter keinen Umständen aus dem Behälter für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 288 Molecular System) oder dem Eimer für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 96 Molecular System) entnehmen. Die NeuMoDx Cartridge ist dafür konzipiert, Kontamination zu verhindern.
- Wenn das Labor auch PCR-Tests mit offenen Röhrchen ausführt, muss unbedingt gewährleistet werden, dass der NeuMoDx HCV Quant Test Strip, die für die Tests zusätzlich benötigten Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, persönliche Schutzausrüstung wie Handschuhe und Laborkittel sowie das NeuMoDx System nicht kontaminiert werden.
- Bei der Handhabung von NeuMoDx Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sollten saubere, puderfreie Nitrilhandschuhe getragen werden. Es ist darauf zu achten, dass die Oberseite der NeuMoDx Cartridge, die Oberfläche der Versiegelungsfolie eines NeuMoDx HCV Quant Test Strip und einer NeuMoDx Extraction Plate oder die Oberseiten von Behältern mit NeuMoDx Lysis Buffer 3 nicht berührt werden; die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien dürfen ausschließlich an den Seitenflächen angefasst werden.
- Für jedes Reagenz werden, sofern erforderlich, Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) bereitgestellt unter www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Nach der Durchführung des Tests Hände gründlich waschen.

- Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen Proben oder Reagenzien verarbeitet werden, nicht rauchen, trinken oder essen.
- Proben sind immer wie infektiöses Material und entsprechend den sicheren Laborverfahren (beschrieben in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁸ und im CLSI-Dokument M29-A4) zu behandeln.⁹
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfall entsprechend den nationalen, bundesstaatlichen, regionalen, kommunalen und lokalen Vorschriften entsorgen.
- Nicht zur Wiederverwendung.



LAGERUNG, HANDHABUNG UND STABILITÄT VON PRODUKTEN

- Die NeuMoDx HCV Quant Test Strips sind in der Primärverpackung bei Lagerung bei 4–28 °C bis zum angegebenen Ablaufdatum stabil.
- Die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwenden.
- Testprodukte nicht verwenden, wenn die Primär- oder Sekundärverpackung sichtbar beschädigt ist.
- Testprodukte, die bereits auf ein anderes NeuMoDx System geladen wurden, nicht erneut laden.
- Ein einmal in das NeuMoDx System geladener NeuMoDx HCV Quant Test Strip kann dort bis zu 14 Tage belassen werden. Die verbleibende Haltbarkeitsdauer der im Gerät befindlichen Teststreifen wird durch die Software verfolgt und dem Benutzer in Echtzeit mitgeteilt. Das System fordert zur Entfernung von Teststreifen auf, die schon über den zulässigen Zeitraum hinaus in Verwendung sind.

PROBENNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

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

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

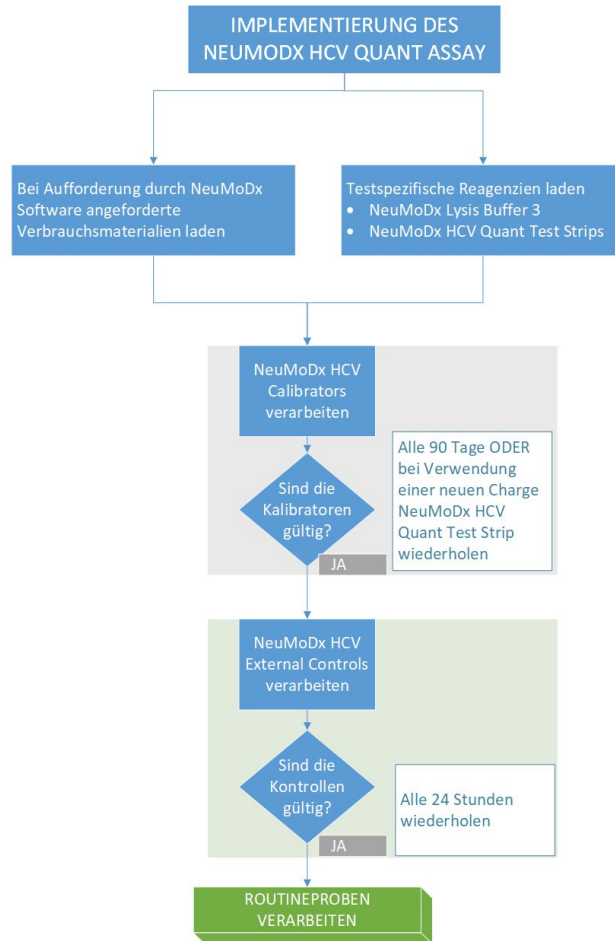


Abbildung 1: Workflow zur Implementierung des NeuMoDx HCV Quant Assay

GEBRAUCHSANWEISUNG

Testvorbereitung

Der NeuMoDx HCV Quant Assay kann direkt mit Material aus den primären Blutentnahmeröhrchen oder mit Probenaliquoten in Sekundäröhrchen durchgeführt werden. Für die Probenverarbeitung kann einer von zwei Workflows gewählt werden – Workflow mit 550 µl Probenvolumen oder Workflow mit 200 µl Probenvolumen.

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

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

3. Bei Verwendung eines Sekundärröhrchens:

- a. Die Probe vorsichtig im Vortexer mischen, um eine einheitliche Verteilung zu erhalten.
- b. Unter Verwendung einer neuen Transferpipette für jede Probe ein Aliquot des Plasmas oder Serums in ein mit dem NeuMoDx System kompatibles, mit Barcode versehenes Probenröhrchen überführen. Dabei die unten angegebenen Volumina beachten:

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

- c. Es sollte darauf geachtet werden, dass keine Gerinnsel aus der Probe ins Probenröhrchen überführt werden.

Betrieb des NeuMoDx System

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

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

ANWENDUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

1. Der NeuMoDx HCV Quant Test Strip kann ausschließlich auf NeuMoDx Systems verwendet werden.
2. Die Leistung des NeuMoDx HCV Quant Test Strip wurde für Plasmaproben, die mit EDTA/ACD als Antikoagulans vorbereitet wurden, oder für Serumproben, die in Serumentrennröhrchen vorbereitet wurden, ermittelt. Die Verwendung des NeuMoDx HCV Quant Test Strip mit Proben anderer Herkunft wurde nicht bewertet und die Leistungsmerkmale sind für andere Probentypen unbekannt.
3. Die Leistung des NeuMoDx HCV Quant Test Strip wurde für Tests im Primärröhrchen bei Verwendung von BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tubes, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tubes, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tubes und BD Vacutainer SST Tubes ermittelt.
4. Eine Handhabung der Proben außerhalb der Lagerungsbedingungen kann die quantitative Genauigkeit des NeuMoDx HCV Quant Assay beeinträchtigen, ein Einfluss auf die Rate qualitativer Ergebnisse (Positiv/Negativ) ist jedoch weniger wahrscheinlich.
5. Werden Serumproben, nachdem sie längere Zeit gefroren gelagert und zwei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen wurden, im System aufbewahrt und nicht sofort getestet, kann dies die quantitative Genauigkeit des NeuMoDx HCV Quant Assay beeinträchtigen.
6. Bei Anwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen wurden eine kleine Erhöhung der Nachweisgrenze und eine niedrigere Quantifizierungsgrenze für den NeuMoDx HCV Quant Assay beobachtet.
7. Der NeuMoDx HCV Quant Assay darf nicht für Proben von heparinisierten Patienten verwendet werden.
8. Da der HCV-Nachweis von der Anzahl der in der Probe vorhandenen Ziel-RNA-Partikel abhängig ist, sind ordnungsgemäße Probennahme, Handhabung und Lagerung für zuverlässige Ergebnisse erforderlich.
9. Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software müssen zunächst NeuMoDx HCV Calibrators und NeuMoDx HCV External Controls entsprechend den Empfehlungen in der Packungsbeilage verarbeitet werden, bevor mit der routinemäßigen Verarbeitung klinischer Proben begonnen werden kann.
10. Eine unsachgemäße Probennahme, Handhabung, Lagerung, technische Fehler oder eine Verwechslung von Probenröhrchen könnte zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zusätzlich können negative Ergebnisse erhalten werden, wenn die Anzahl von Viruspartikeln in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des NeuMoDx HCV Quant Assay liegt.
11. Das NeuMoDx System darf ausschließlich von Personal bedient werden, das in der Anwendung des NeuMoDx System geschult ist.
12. Wenn weder das HCV-Ziel noch das SPC2-Ziel amplifiziert werden, wird ein ungültiges Ergebnis (Indeterminate (Unbestimmt), No Result (Kein Ergebnis) oder Unresolved (Offen)) ausgegeben und der Test sollte wiederholt werden.
13. Wenn das Ergebnis des NeuMoDx HCV Quant Assay Positive (Positiv) ist, der Quantifizierungswert jedoch außerhalb der Quantifizierungsgrenzen liegt, gibt das NeuMoDx System an, ob die nachgewiesene HCV-Konzentration *unterhalb* der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) oder *oberhalb* der oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) liegt.
14. Sollte die nachgewiesene HCV-Konzentration *unterhalb* der LLoQ liegen, kann der NeuMoDx HCV Quant Assay (falls gewünscht) mit einem anderen Aliquot der Probe wiederholt werden.
15. Sollte die nachgewiesene HCV oberhalb der ULoQ liegen, kann der NeuMoDx HCV Quant Assay mit einem verdünnten Aliquot der Originalprobe wiederholt werden. Empfohlen wird eine Verdünnung von 1:100 oder 1:1000 in HCV-negativem Plasma oder Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Die Konzentration der Originalprobe lässt sich wie folgt berechnen:

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

ERGEBNISVERARBEITUNG

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

Tabelle 1. Zusammenfassung des Entscheidungsalgorithmus des NeuMoDx HCV Quant Assay

ERGEBNIS	HCV-Ziel	Probenprozesskontrolle (SPC2)	Ergebnisinterpretation
Positive (Positiv) mit Angabe der Konzentration	Amplified (Amplifiziert) $0,9 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (550- μl -Workflow) $1,5 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (200- μl -Workflow)	Amplified (Amplifiziert) oder Not Amplified (Nicht amplifiziert)	HCV-RNA innerhalb des quantitativen Bereichs nachgewiesen
Positive (Positiv), oberhalb der ULoQ	Amplified (Amplifiziert) $[\text{HCV}] > 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplifiziert) oder Not Amplified (Nicht amplifiziert)	HCV-RNA oberhalb des quantitativen Bereichs nachgewiesen
Positive (Positiv), unterhalb der LLoQ	Amplified (Amplifiziert) $[\text{HCV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (550- μl -Workflow) $[\text{HCV}] < 1,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (200- μl -Workflow)	Amplified (Amplifiziert) oder Not Amplified (Nicht amplifiziert)	HCV-RNA unterhalb des quantitativen Bereichs nachgewiesen
Negative (Negativ)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Amplified (Amplifiziert)	HCV-RNA nicht nachgewiesen
Indeterminate (Unbestimmt)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nicht amplifiziert, Systemfehler festgestellt, Probenverarbeitung abgeschlossen)		Die Ergebnisse für alle Ziele waren ungültig; Probe erneut testen†
No Result* (Kein Ergebnis)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nicht amplifiziert, Systemfehler festgestellt, Probenverarbeitung abgebrochen)		Probenverarbeitung wurde abgebrochen; Probe erneut testen†
Unresolved (Offen)	Not Amplified, No System Error Detected (Nicht amplifiziert, kein Systemfehler festgestellt)		Die Ergebnisse für alle Ziele waren ungültig; Probe erneut testen†

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

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

Testberechnung

1. Für Proben innerhalb des Quantifizierungsbereichs des NeuMoDx HCV Quant Assay wird die Konzentration der HCV-RNA in den Proben anhand der gespeicherten Standardkurven in Verbindung mit dem Kalibrationskoeffizienten und dem Probenvolumen berechnet.
 - a. Ein Kalibrationskoeffizient wird auf Grundlage der Ergebnisse für die verarbeiteten NeuMoDx HCV Calibrators berechnet und dient dazu, die Gültigkeit der Standardkurve für eine gegebene Charge des NeuMoDx HCV Quant Test Strip auf einem spezifischen NeuMoDx System nachzuweisen.
 - b. Der Kalibrationskoeffizient wird in die endgültige Bestimmung der Konzentration der HCV-RNA einbezogen.
 - c. Die NeuMoDx Software berücksichtigt das eingesetzte Probenvolumen bei der Bestimmung der Konzentration an HCV-RNA pro ml Probe.
2. Die Ergebnisse des NeuMoDx HCV Quant Assay werden in $\log_{10} \text{ IU/ml}$ angegeben.
3. Die resultierende Quantifizierung unbekannter Proben kann auf den 5. internationalen HCV-Standard der WHO zurückgeführt werden.

Testkalibrierung

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

Kalibratoren

1. Ein Set der NeuMoDx HCV Calibrators muss verarbeitet werden, wenn eine neue Charge der NeuMoDx HCV Quant Test Strips verwendet wird, eine neue HCV-Assay-Definitionsdatei auf das NeuMoDx System geladen wird, der Gültigkeitszeitraum des aktuellen Kalibratorsets abgelaufen ist (aktuell auf 90 Tage festgelegt) oder Veränderungen an der NeuMoDx System Software vorgenommen werden.

2. Die NeuMoDx System Software benachrichtigt den Benutzer, wenn eine Verarbeitung von Kalibratoren erforderlich ist. Bis zur erfolgreichen Verarbeitung der Kalibratoren kann keine neue Teststreifencharge für Tests verwendet werden.
3. Die Gültigkeit der Kalibrierung wird wie folgt ermittelt:
 - a) Zum Nachweis der Gültigkeit muss ein Set aus zwei Kalibratoren – einer (1) mit hoher und einer (1) mit niedriger Konzentration – verarbeitet werden.
 - b) Mindestens zwei (2) der drei (3) Replikate müssen Ergebnisse innerhalb der vordefinierten Parameter ergeben. Das Nominalziel für den Kalibrator mit niedriger Konzentration liegt bei $3 \log_{10}$ IU/ml und das Nominalziel für den Kalibrator mit hoher Konzentration bei $5 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Ein Kalibrationskoeffizient wird berechnet, um der erwarteten Variation zwischen verschiedenen Teststreifenchargen Rechnung zu tragen. Dieser Kalibrationskoeffizient wird bei der Bestimmung der HCV-Endkonzentration herangezogen.
4. Wenn ein oder beide Kalibratoren die Gültigkeitsprüfung nicht bestehen, ist die Verarbeitung für den/die fehlgeschlagenen Kalibrator(en) mit einem neuen Fläschchen zu wiederholen. Sollte einer der Kalibratoren die Gültigkeitsprüfung nicht bestehen, reicht es aus, nur die Verarbeitung des fehlgeschlagenen Kalibrators zu wiederholen; das System erfordert nicht, dass beide Kalibratoren erneut verarbeitet werden.
5. Wenn der/die Kalibrator(en) die Gültigkeitsprüfung wiederholt nicht besteht/bestehen, NeuMoDx Molecular, Inc. kontaktieren.

Qualitätskontrolle

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

Externe Kontrollen

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

(Interne) Probenprozesskontrollen

In der NeuMoDx Extraction Plate ist eine exogene Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC2) enthalten, die mit jeder Probe dem vollständigen Prozess der Nukleinsäure-Extraktion und Echtzeit-RT-PCR-Amplifikation unterzogen wird. Zudem enthält jeder NeuMoDx HCV Quant Test Strip SPC2-spezifische Primer und Sonden, was den Nachweis von SPC2 zusammen mit der Ziel-HCV-RNA (falls vorhanden) in der Multiplex-Echtzeit-RT-PCR ermöglicht. Der Nachweis der SPC2-Amplifikation erlaubt der NeuMoDx System Software die Überwachung der Effizienz der RNA-Extraktion und der RT-PCR-Amplifikation.

Ungültige Ergebnisse

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

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

Das Ergebnis UNR wird gemeldet, wenn trotz der Abwesenheit von Systemfehlern keine gültige Amplifikation von HCV-RNA oder SPC2 nachweisbar ist, was auf einen möglichen Reagenzfehler oder das Vorliegen von Inhibitoren hinweist. Falls das Ergebnis UNR gemeldet wird, empfiehlt sich als erster Schritt ein erneuter Test. Wenn der Wiederholungstest fehlschlägt, kann eine Probenverdünnung verwendet werden, um die Effekte einer möglichen Probeninhibition abzumildern.

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

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität – Bestimmung der Nachweisgrenze unter Verwendung des WHO-Standards

Die analytische Sensitivität des NeuMoDx HCV Quant Assay wurde durch Testen von Negativproben und einer Verdünnungsreihe des 5. internationalen Standards der WHO (Genotyp 1) in gescreentem negativem Humanplasma und -serum charakterisiert, um die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) auf den NeuMoDx Systemen zu bestimmen. Die LoD war definiert als die niedrigste Zielkonzentration, die gemäß Analyse im Probit-Stil mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen wird. Die Studien wurden über 3 Tage mit verschiedenen Systemen und mehreren Chargen der NeuMoDx Reagenzien durchgeführt. Pro Tag wurden mit jedem System (N288 und N96) 18 Replikate jeder Verdünnungsstufe verarbeitet. Die Nachweisraten sind in *Tabelle 2* dargestellt. Eine zusätzliche Studie wurde durchgeführt, um die LoD des NeuMoDx HCV Quant Assay bei Anwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 3* dargestellt.

Tabelle 2. Positiv-Nachweisraten für die LoD-Bestimmung des NeuMoDx HCV Quant Assay – Workflow mit 550 µl

Zielkonzentration [IU/ml]	Zielkonzentration [\log_{10} IU/ml]	PLASMA			SERUM		
		Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate	Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate
30	1,48	108	108	100 %	108	108	100 %
15	1,18	108	108	100 %	108	107	99 %
10	1,00	108	105	97 %	108	102	94 %
7,5	0,88	108	102	94 %	108	105	97 %
3,75	0,57	108	84	78 %	108	86	80 %
1,875	0,27	108	47	44 %	108	63	58 %
NEG	0	108	0	0 %	107	1	0,93%

Tabelle 3. Positiv-Nachweisraten für die LoD-Bestimmung des NeuMoDx HCV Quant Assay – Workflow mit 200 µl

Zielkonzentration [IU/ml]	Zielkonzentration [\log_{10} IU/ml]	PLASMA			SERUM		
		Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate	Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate
75	1,88	n. z.	n. z.	n. z.	22	22	100 %
60	1,78	22	22	100 %	22	22	100 %
30	1,48	22	21	95,5 %	22	20	90,9 %
15	1,18	22	17	77,3 %	22	19	86,4 %
10	1,00	22	13	59,1 %	22	15	68,2 %
NEG	0	22	0	0 %	22	0	0 %

Die LoD des NeuMoDx HCV Quant Assay in Plasma wurde auf dem NeuMoDx 288 Molecular System unter Verwendung des Workflows mit 550 µl Probenvolumen für alle Genotypen mit 7,5 IU/ml (95%-KI 6,4–9,2 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95%-KI 0,8–1,0 \log_{10} IU/ml)] bestimmt (*Abbildung 2*). Die LoD des NeuMoDx HCV Quant Assay für Serumproben wurde unter Verwendung des Workflows für 550 µl Probenvolumen mit 8,0 IU/ml (95%-KI 6,6–10,4 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95%-KI 0,8–1,0 \log_{10} IU/ml)] bestimmt (*Abbildung 2*). Die LoD für beide Probentypen bei Verwendung des Workflows mit 550 µl Probenvolumen beträgt **8,0 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)**.

Die LoD des NeuMoDx HCV Quant Assay unter Verwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen wurde mit 27,9 IU/ml (95%-KI 20,1–81,9 IU/ml) in Plasmaproben und mit 29,8 IU/ml (95%-KI 20,5–94,0 IU/ml) in Serumproben bestimmt (*Abbildung 3*). Die LoD für beide Probentypen bei Verwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen beträgt **30,0 IU/ml (1,5 \log_{10} IU/ml)**.

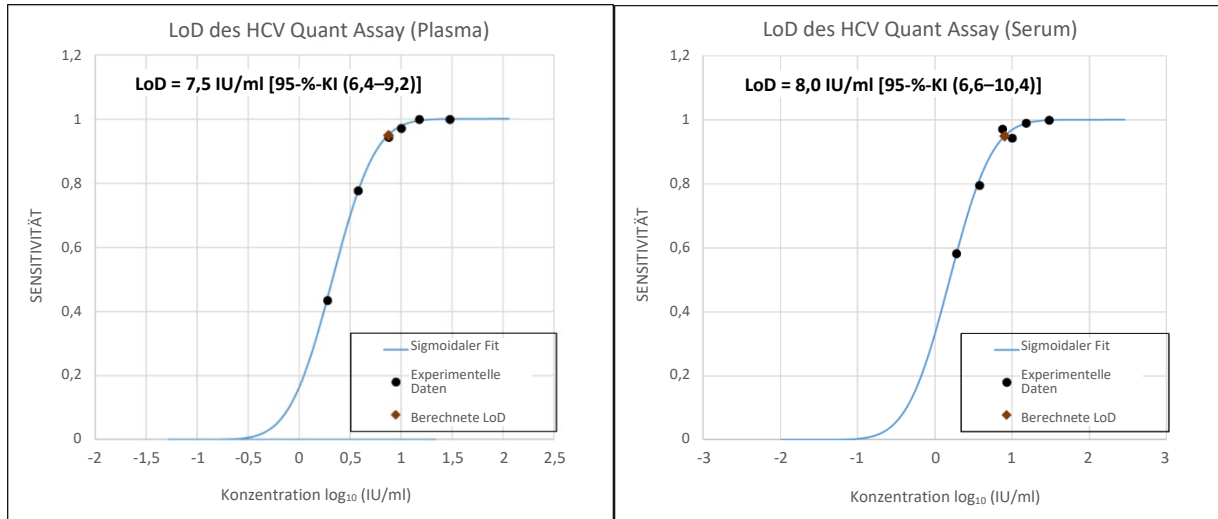


Abbildung 2: Analyse mit der Probit-Methode zur Bestimmung der LoD des NeuMoDx HCV Quant Assay; Plasma (links) und Serum (rechts) – Workflow mit 550 µl

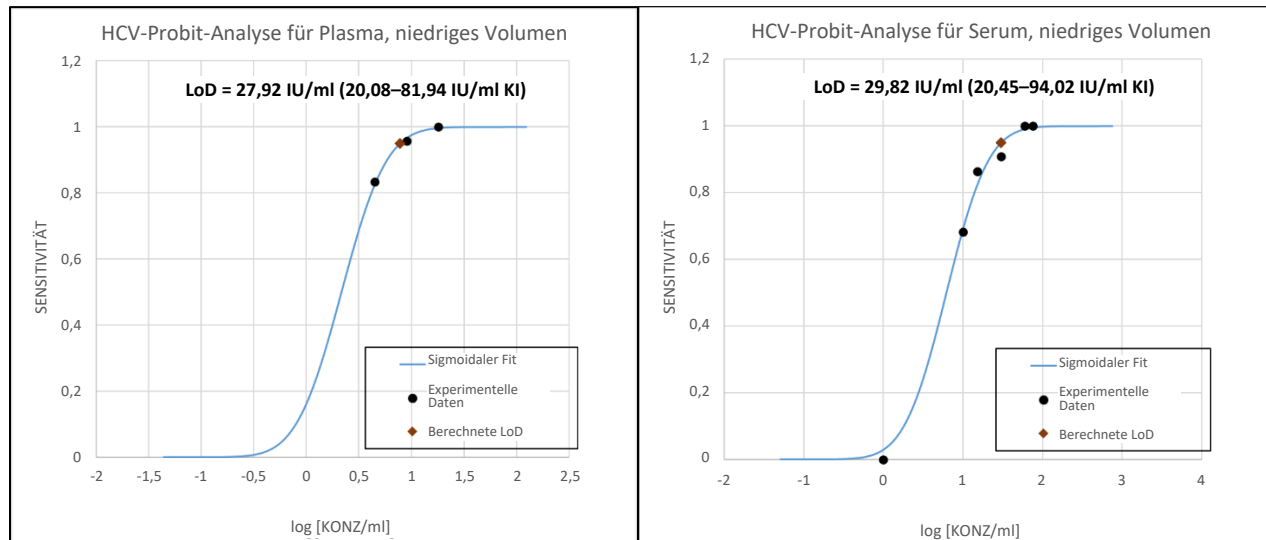


Abbildung 3: Analyse mit der Probit-Methode zur Bestimmung der LoD des NeuMoDx HCV Quant Assay; Plasma (links) und Serum (rechts) – Workflow mit 200 µl

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

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

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

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

Die zusammengestellten Ergebnisse für die 6 Konzentrationen der HCV-Plasma und -serumproben, die in der LLoQ-Studie unter Verwendung von Genotyp 1 mit dem Workflow für 550 µl Probenvolumen getestet wurden, sind in *Tabelle 4* aufgeführt. Ergebnisse von weiteren Tests mit dem Workflow für 200 µl Probenvolumen sind in *Tabelle 5* gezeigt.

Tabelle 4. LLoQ des NeuMoDx HCV Quant Assay mit Bias und TAE – 550 µl

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

Tabelle 5. LLoQ des NeuMoDx HCV Quant Assay mit Bias und TAE – 200 µl

Zielkonz. [IU/ml]	Zielkonz. [\log_{10} IU/ml]	Plasma					Serum				
		Konz.-Durchschnitt [\log_{10} IU/ml]	Nachweis (%)	SD	Bias	TAE	Konz.-Durchschnitt [\log_{10} IU/ml]	Nachweis (%)	SD	Bias	TAE
75	1,88	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.	1,56	100	0,23	0,32	0,78
60	1,78	1,93	100	0,39	0,15	0,93	1,56	100	0,27	0,22	0,76
30	1,48	1,35	96	0,44	0,11	0,99	1,45	91	0,41	0,03	0,85
15	1,18	1,37	77	0,42	0,18	1,03	1,36	86	0,53	0,18	1,25
10	1,00	1,26	59	0,56	0,25	1,36	1,15	68	0,53	0,15	1,21

Die LLoQ des NeuMoDx HCV Quant Assay wurde unter Anwendung des Workflows mit 550 µl Probenvolumen als 7,7 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml) für Plasma und als 8,4 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml) für Serum bestimmt. Die LLoQ für sowohl Plasma als auch Serum wurde unter Anwendung des Workflows mit 550 µl Probenvolumen als **8,4 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)** bestimmt.

Die LLoQ des NeuMoDx HCV Quant Assay wurde unter Anwendung des WHO-Standards und des Workflows mit 200 µl Probenvolumen als 30,0 IU/ml (1,5 \log_{10} IU/ml) für Plasma und als 29,8 IU/ml (1,37 \log_{10} IU/ml) für Serum bestimmt. Die LLoQ für sowohl Plasma als auch Serum wurde unter Anwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen **30,0 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)** bestimmt.

Analytische Sensitivität – LoD und LLoQ über HCV-Genotypen hinweg

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

Der analytische Gesamtfehler bei diesen Konzentrationen wurde ebenfalls berechnet. Die niedrigste Konzentration mit einer Positiv-Nachweisrate von 95 % und einem berechneten TAE von $\leq 1,0$ wurde entsprechend als LLoQ für den jeweiligen Genotyp festgelegt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der NeuMoDx HCV Quant Assay eine hervorragende und, mit einem Bereich von 4,5–7,5 IU/ml, über alle sechs Genotypen hinweg äquivalente Nachweisleistung aufweist, einschließlich des 5. Internationalen WHO-Standards (Genotyp 1). Insgesamt wurde die LoD des NeuMoDx HCV Quant Assay über die sechs Genotypen hinweg als 7,5 IU/ml (0,88 \log_{10} IU/ml) bestimmt. Die LLoQ wurde als der höchste Wert, nämlich 7,7 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml) bestimmt, wie für den 5. Internationalen Standard (Genotyp 1, oben) berichtet. *Tabelle 6* zeigt die für die LoD und die LLoQ bei Tests über alle HCV-Genotypen hinweg in Plasma erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 6. In Plasma unter Anwendung des Workflows mit 550 µl Probenvolumen getestete HCV-Genotypen

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

Aufgrund der Ergebnisse der oben dargestellten Studien gibt NeuMoDx für den NeuMoDx HCV Quant Assay bei Anwendung des **Workflows für 550 µl Probenvolumen** eine LoD von **8,0 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml)** und eine LLoQ von **8,4 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml)** in **Plasma und Serum** an.

Die angegebene **LoD und LLoQ** des NeuMoDx HCV Quant Assay für **beide Probenarten (Plasma und Serum)** unter **Verwendung des Workflows für 200 µl** beträgt jeweils **30,0 IU/ml (1,5 log₁₀ IU/ml)**.

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

Linearität und obere Bestimmungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) des NeuMoDx HCV Quant Assay wurden in Plasma anhand einer Verdünnungsreihe von HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX, USA) und AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit etablierter Rückführbarkeit auf den 5. Internationalen WHO-Standard ermittelt. In gepooltem HCV-negativem Plasma wurde ein Panel mit 11 Proben vorbereitet, das einen Konzentrationsbereich von 8,2–1,5 log₁₀ IU/ml abdeckt. Der NeuMoDx HCV Quant Assay war in der Lage, HCV über den linearen Bereich von 8 log₁₀ hinweg mit einer Genauigkeit von ± 0,3 log₁₀ IU/ml zu quantifizieren (basierend auf dem Standardfehler gemäß Berechnung anhand des 95%-Konfidenzintervalls). Die Anwendung von Regressionsanpassungen 2. und 3. Ordnung brachte keinen signifikanten Vorteil. Die ULoQ in Plasma wurde als 8,2 log₁₀ IU/ml bestimmt. Eine Folgestudie wurde durchgeführt, um die Matrixäquivalenz zu bestätigen. In dieser Analyse wurden die quantitativen Ergebnisse des NeuMoDx HCV für in Plasma und Serum vorbereitete Proben mithilfe von zwei verschiedenen Regressionsanpassungsmodellen (MS Excel-Regressionstool und Passing-Bablok) verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine starke Korrelation, was an Werten für Steigung und den Achsenabschnitt sehr nahe bei 1,00 bzw. 0,00 und einen R²-Wert von 0,99 (MS Excel-Regressionstool) oder einen p-Wert von 0,600 (Passing-Bablok) deutlich wird. Die vom NeuMoDx System ausgegebenen Konzentrationen für den HCV-Assay im Vergleich mit den Erwartungswerten sind in *Abbildung 4* dargestellt.

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

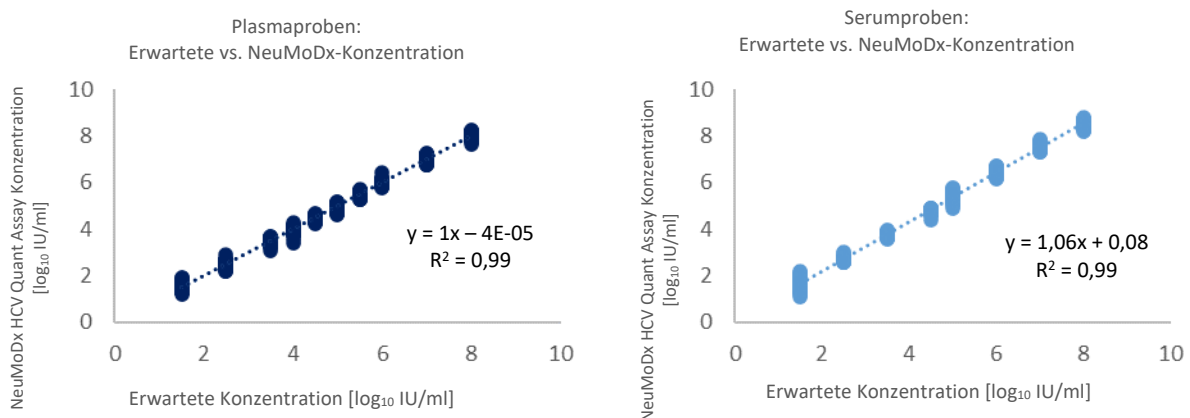


Abbildung 4: Linearer Bereich des NeuMoDx HCV Quant Assay in Plasma (links) und Serum (rechts) – 550-µl-Workflow

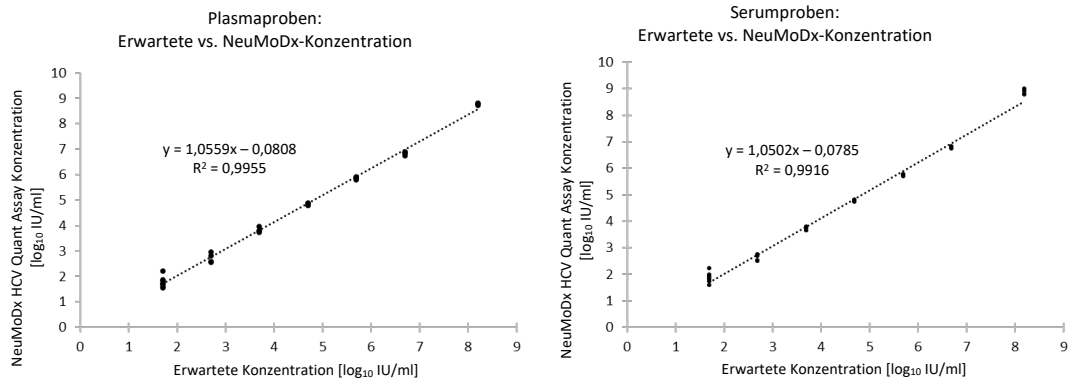


Abbildung 5: Linearer Bereich des NeuMoDx HCV Quant Assay in Plasma (links) und Serum (rechts) – 200-µl-Workflow

Analytische Sensitivität – Linearität über Genotypen hinweg

Die Linearität des NeuMoDx HCV Quant Assay über sechs HCV-Genotypen hinweg wurde durch Testen von mindestens vier (4) verschiedenen Konzentrationen für jeden HCV-Genotyp, hergestellt in gepoolten HCV-negativen Plasmaproben, charakterisiert. Die Konzentrationen der in dieser Studie getesteten HCV-Ziele waren abhängig von der jeweiligen Konzentration der ursprünglichen Probe, weshalb sie sich für die verschiedenen Genotypen unterscheiden. Die Studie wurde mit jedem Genotyp unter Verwendung von jeweils 6 Replikaten pro Konzentration durchgeführt. Die Linearität über sechs HCV-Genotypen hinweg ist in *Tabelle 7* und *Abbildung 6* dargestellt.

Tabelle 7. Linearität des NeuMoDx HCV Quant Assay über Genotypen hinweg

Genotyp	Linearitätsgleichung y = NeuMoDx HCV Assay Quantifizierung x = erwartete Bestimmung	R ²
1	$y = 1,054x + 0,1325$	0,979
2	$y = 1,0792x - 0,0748$	0,985
3	$y = 1,0423x - 0,0439$	0,981
4	$y = 1,0158x + 0,0292$	0,973
5	$y = 0,9873x + 0,1524$	0,994
6	$y = 1,0393x + 0,0396$	0,997

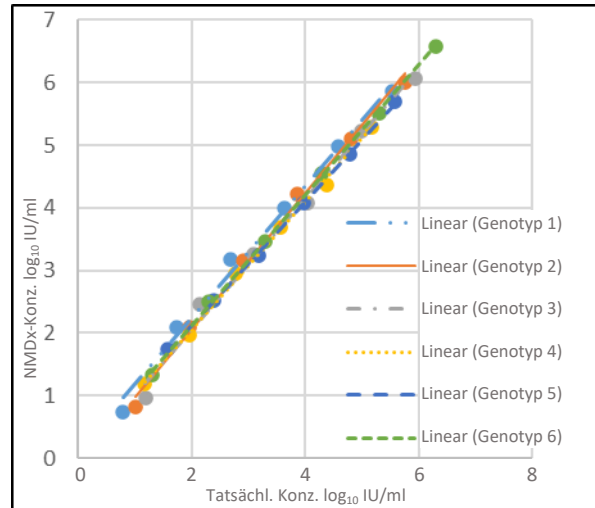


Abbildung 6: Linearität des NeuMoDx HCV Quant Assay über Genotypen hinweg

Analytische Spezifität – Kreuzreaktivität

Die analytische Spezifität wurde demonstriert, indem 33 häufig in Blut-/Plasmaproben vorkommende Organismen sowie Spezies, die phylogenetisch mit HCV verwandt sind, auf Kreuzreaktivität gescreent wurden. Die Organismen wurden in Pools mit jeweils 4–6 Organismen vorbereitet und bei hoher Konzentration getestet. Die getesteten Organismen sind in *Tabelle 8* dargestellt. Mit keinem der getesteten Organismen wurde eine Kreuzreaktivität beobachtet, was eine analytische Spezifität von 100 % für den NeuMoDx HCV Quant Assay bestätigt.

Tabelle 8. Zur Demonstration der analytischen Spezifität verwendete Pathogene

Nicht-Zielorganismen						
Adenovirus 2	Dengue V1	Hepatitis A	Humanes Immundefizienzvirus 2	Humanes T-lymphotropes Virus 1	Propionibacterium acnes	West-Nil-Virus
Adenovirus 5	Dengue V2	Hepatitis-B-Virus	Humanes Papillomvirus 16	Humanes T-lymphotropes Virus 2	Rubella	Gelbfieber
Candida albicans	Dengue V3	Herpes-simplex-Virus (HSV) 1	Humanes Papillomvirus 18	Influenza A	St.-Louis-Enzephalitis	Zika-Virus
Chlamydia trachomatis	Dengue V4	Herpes-simplex-Virus (HSV) 2	Humanes Herpesvirus 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Zytomegalievirus	Epstein-Barr-Virus	Humanes Immundefizienzvirus 1	Humanes Herpesvirus 8	Parvovirus B19	Staphylococcus epidermidis	

Analytische Spezifität – Störende Stoffe, kommensale Organismen

Der NeuMoDx HCV Quant Assay wurde auf Störungen in Gegenwart von Nicht-Zielorganismen untersucht. Dafür wurden dieselben Organismen eingesetzt wie für die Tests auf Kreuzreaktivität, die oben in *Tabelle 8* aufgeführt sind. HCV-negatives Plasma wurde mit den in Gruppen zu 4–6 gepoolten Organismen sowie mit einer HCV-positiven Kontrollen in einer Konzentration von 1,4 log₁₀ IU/ml versetzt. Es wurde keine signifikante Störung in Gegenwart dieser kommensalen Organismen beobachtet, was aus der minimalen Abweichung der Quantifizierung von Kontrollproben ohne störende Agenzien hervorgeht.

Analytische Spezifität – störende Stoffe, endogene und exogene Stoffe

Die Leistung des NeuMoDx HCV Quant Assay wurde in Gegenwart typischer exogener und endogener Störstoffe, die in klinischen HCV-Plasmaproben vorkommen, bewertet. Diese umfassten ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Blutkomponenten sowie häufige antivirale Medikamente, welche in *Tabelle 9* klassifiziert sind. Jeder Stoff wurde einem gescreenten HCV-negativen Humanplasma zugesetzt, das mit 1,7 log₁₀ IU/ml HCV versetzt war, und die Proben wurden auf Störungen analysiert. Zusätzlich wurde auch für den mit einer Hepatitis- C-Infektion verbundenen Krankheitszustand repräsentatives Plasma auf potenzielle Störungen getestet. Die durchschnittliche Konzentration und das Bias aller getesteten Stoffe sind in *Tabelle 10* aufgeführt. Keine der exogenen und endogenen Stoffe beeinflusste die Spezifität des NeuMoDx HCV Quant Assay.

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

	Produkt	Einstufung		Produkt	Einstufung
Pool 1	Sofosbuvir	Direkt wirkendes HCV-Antiviren-Medikament	Pool 2	Paritaprevir	HCV-NS3/4A-Proteaseinhibitor
	Ledipasvir	HCV-Inhibitor		Ombitasvir	HCV-Antiviren-Medikament
	Velpatasvir	HCV-NS5A-Inhibitor		Ritonavir	HIV-Proteaseinhibitor
	Clarithromycin	Antibiotikum		Abacavirsulfat	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
	Interferon alfa-2a	Immunmodulator		Ribavirin	Immunmodulator
Pool 3	Grazoprevir	HCV-NS3/4A-Proteaseinhibitor	Pool 4	Efavirenz	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
	Elbasvir	HCV-NS5A-Inhibitor		Lopinavir	Proteaseinhibitor
	Tenofoviridisoproxil	HBV-/HIV-Antiviren-Medikament		Azithromycin	Antibiotikum
	Lamivudin	HBV-/HIV-Antiviren-Medikament		Dolutegravir	HIV-Antiviren-Medikament
	Valganciclovir	CMV-Antiviren-Medikament		Simeprevir	HCV-NS3/4A-Proteaseinhibitor
Pool 5	Emtricitabin	HIV-Antiviren-Medikament			
	Raltegravir	HIV-Antiviren-Medikament			
	Amoxicillin	Antibiotikum			
	Rilpivirin	HIV-Antiviren-Medikament			
	Dasabuvir	Direkt wirkendes HCV-Antiviren-Medikament			
	Glecaprevir	HCV-NS3/4A-Proteaseinhibitor			

Tabelle 10. Störungstests – exogene und endogene Agenzien

Endogen	Konz.- Durchschnitt log ₁₀ IU/ml	Bias log ₁₀ IU/ml
Hämoglobin	1,61	0,28
Triglyceride	1,31	-0,02
Bilirubin	1,47	0,14
Albumin	1,47	0,14
Exogen (Medikamente)	Konz.- Durchschnitt log ₁₀ IU/ml	Bias log ₁₀ IU/ml
Pool 1: Zidovudin (ZDV), Saquinavir, Ritonavir, Clarithromycin, Interferon alfa-2a, Interferon alfa-2b	1,48	0,15
Pool 2: Abacavirsulfat, Amprenavir, Ribavirin, Entecavir, Fluoxetin, Valacyclovirhydrochlorid	1,40	0,07
Pool 3: Tenofoviridisoproxil, Lamivudin, Ganciclovir, Valganciclovir, Nevirapin	1,40	0,07
Pool 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtid, Ciprofloxacin, Paroxetin	1,51	0,18
Pool 5: Adefovir(-Dipivoxil), Azithromycin, Indinavirsulfat, Sertralin	1,40	0,07
Krankheitszustand	Konz.- Durchschnitt log ₁₀ IU/ml	Bias log ₁₀ IU/ml
Antinukleäre Antikörper (ANA)	1,53	0,18
Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)	1,29	-0,06
Rheumatoide Arthritis	1,39	0,04
HBV-Antikörper	1,45	0,10
Alkoholzerrhose	1,43	0,08
Rheumafaktor	1,43	0,08
Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)	1,32	-0,03

Laborinterne Präzision

Die Präzision des NeuMoDx HCV Quant Assay wurde durch Testen eines Panels aus 7 vorbereiteten HCV-Proben (mit sowohl HCV Armored RNA als auch AcroMetrix HCV Control) mit drei NeuMoDx Systemen über 12 Tage bestimmt. Die Intra-Lauf-, Intra-Tag- und Intra-System-Präzision wurden charakterisiert und die Gesamt-Standardabweichung wurde als $\leq 0,26 \log_{10}$ IU/ml bestimmt. Es wurden keine signifikanten Leistungsunterschiede zwischen den Systemen, Tagen oder Läufen festgestellt, wie in *Tabelle 11* dargestellt. Die Präzision von Bediener zu Bediener wurde nicht charakterisiert, da der Bediener bei der Verarbeitung von Proben mit dem NeuMoDx System keine wesentliche Rolle spielt.

Tabelle 11. Laborinterne Präzision – NeuMoDx HCV Quant Assay auf NeuMoDx Systemen

	Zielkonz. [log ₁₀ IU/ml]	Konz.- Durchschn. [log ₁₀ IU/ml]	Intra-System- SD	Intra-Tag-SD	Intra-Lauf-SD	Laborinterne SD (gesamt)
ARMORED	6	5,95	0,17	0,13	0,10	0,17
	5	4,87	0,20	0,14	0,12	0,20
	3	2,89	0,19	0,17	0,17	0,19
ACROMETRIX	4,4	4,45	0,12	0,10	0,08	0,13
	3,4	3,45	0,12	0,12	0,11	0,13
	2,4	2,41	0,17	0,15	0,15	0,17
	1,4	1,40	0,26	0,25	0,25	0,24

Interchargen-Reproduzierbarkeit

Die Interchargen-Reproduzierbarkeit des NeuMoDx HCV Quant Test Strip wurde unter Verwendung von je drei verschiedenen Chargen der wesentlichen Reagenzien – NeuMoDx Lysis Buffer 3, NeuMoDx Extraction Plates und NeuMoDx HCV Quant Test Strips – bestimmt. Zur Leistungsbewertung wurde ein Panel aus 7 HCV-Proben (mit sowohl HCV Armored RNA als auch AcroMetrix HCV Control) verwendet. Die Tests wurden mit je drei verschiedenen Reagenzchargen auf drei Systemen über 6 Tage durchgeführt. Die Variation innerhalb der und zwischen den Chargen wurde analysiert und die Ergebnisse sind in *Tabelle 12* aufgeführt. Das maximale Gesamt-Bias lag bei $0,24 \log_{10}$ IU/ml und die maximale Gesamt-SD bei $0,33 \log_{10}$ IU/ml. Es wurde kein signifikanter Leistungsunterschied zwischen den Chargen festgestellt, da die Quantifizierung aller Panel-Mitglieder innerhalb der Toleranzanforderungen lag.

Tabelle 12. Interchargen-Reproduzierbarkeit – NeuMoDx HCV Quant Assay

	Zielkonz. [log ₁₀ IU/ml]	Mittlere Konz. GESAMT [log ₁₀ IU/ml]	n (Gültige Ergebnisse pro Charge)	ABS-BIAS	Interchargen- SD	Intrachargen -SD	Gesamt-SD
ARMORED	6	5,76	36	0,24	0,35	0,13	0,37
	5	4,84	36	0,16	0,16	0,22	0,27
	3	2,81	36	0,19	0,31	0,16	0,35
ACROMETRIX	4,4	4,35	36	0,05	0,21	0,11	0,24
	3,4	3,31	36	0,09	0,17	0,11	0,20
	2,4	2,33	36	0,07	0,24	0,13	0,27
	1,4	1,38	36	0,02	0,23	0,13	0,33

Wirksamkeit der Kontrolle

Die SPC2 ist im NeuMoDx HCV Quant Assay enthalten, um Prozessschrittfehler oder Inhibition nachzuweisen, die die Leistung des Assays beeinträchtigen könnten. Die Effizienz wurde unter Bedingungen getestet, die repräsentativ für kritische Fehlschläge von Prozessschritten sind, welche potenziell bei der Probenverarbeitung auftreten und von den Sensoren des NeuMoDx System zur Leistungsüberwachung *möglicherweise nicht erkannt* werden. Positive ($3 \log_{10}$ IU/ml) und negative Proben wurden in Anwesenheit einer Kontrolle unter folgenden Bedingungen getestet: Vorliegen eines Inhibitors, kein Wash Reagent abgegeben, kein Wash Blow out. Prozessschwächen, die sich nachteilig auf den Nachweis/die Quantifizierung von HCV auswirkten, spiegelten sich in der Leistung des SPC2-Ziels wider, wie in *Tabelle 13* dargestellt. In allen getesteten Fällen zeigte sich, dass entweder die Probenprozesskontrolle Prozessschwächen und das Vorliegen von Inhibitoren korrekt überwachte oder dass die erwarteten Prozessschwächen keine signifikanten negativen Auswirkungen auf SPC2-Nachweis und HCV-Nachweis und -Quantifizierung hatten. Daher erwies sich die SPC2 als erfolgreich bei der Überwachung der Assayleistung auf dem NeuMoDx System.

Tabelle 13. Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle

Getesteter Prozessschrittfehler	Amplifikationsstatus Probenprozesskontrolle	HCV-Ziel Amplifikationsstatus	Assayergebnis
Presence of Inhibitor (Vorhandensein von Inhibitor)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Delivered (Keine Waschlösung abgegeben)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Blowout (Kein Wasch-Blowout)	Amplified (Amplifiziert)	Amplified (Amplifiziert)	Positive (Positiv) mit Quantifizierung innerhalb von 0,3 log ₁₀ IU/ml der Kontrolle

Rate gültiger Ergebnisse

Eine retrospektive Analyse der Daten, die während der Leistungsbewertung des NeuMoDx HCV Quant Assay auf den NeuMoDx Systems erhalten wurden, wurde zur Bestimmung des Prozentsatzes der gültigen Ergebnisse verwendet. Gültige Testergebnisse werden als Positive (Positiv) oder Negative (Negativ) angegeben. Ungültige Testergebnisse können entweder als Indeterminate (IND) (Unbestimmt) oder Unresolved (UNR) (Offen) berichtet werden, basierend auf dem Amplifikationszustand des Ziels und der Probenprozesskontrolle. Ein IND-Ergebnis wird typischerweise durch einen Fehler am Instrument verursacht, der dazu führt, dass die Amplifikation des Ziels und/oder der internen Prozesskontrolle fehlschlägt. Ein UNR-Ergebnis wird Proben zugewiesen, wenn eine Amplifikation weder beim Ziel noch bei der internen Prozesskontrolle erfolgte, ohne dass ein Fehler am Instrument erkannt wurde. In die retrospektive Analyse wurden 1.962 individuelle NeuMoDx HCV Quant Assay-Ergebnisse einbezogen, die auf den Systemen NeuMoDx 288 und NeuMoDx 96 gewonnene Daten sowohl von Serum- als auch von Plasmaproben einschlossen. Die UNR-Rate wurde mit 0,61 % (12/1962) und die IND-Rate mit 0,41 % (8/1962) bestimmt. Diese Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien der Analyse. Daher wurde geschlossen, dass die Rate gültiger Ergebnisse des NeuMoDx HCV Quant Assay über klinische Matrices und NeuMoDx Systems hinweg 99,0 % mit 95%-KI (98,4–99,3) beträgt.

Kreuzkontamination

Zur Bestimmung der Kreuzkontaminationsrate des NeuMoDx HCV Quant Assay wurden drei Sätze von HCV-Proben aus abwechselnd stark positiven und stark negativen Proben analysiert. Insgesamt wurden dabei 144 Replikate einer HCV-negativen humanen Probe und 144 Replikate einer HCV-Probe mit einem hohen Titer von 8,2 log₁₀ IU/ml getestet. Alle 144 Replikate der negativen Probe wurden als negativ berichtet, was zeigt, dass während der Probenverarbeitung im NeuMoDx System keine Kreuzkontamination aufgetreten ist.

Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Tests wurden durchgeführt, um die Gleichwertigkeit der Probenmatrices für Vollblut zur Gewinnung von Plasma zu demonstrieren, das in Entnahmeröhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Acid-Citrate-Dextrose (ACD) entnommen wurde. Zusätzliche Tests wurden durchgeführt, um die Gleichwertigkeit von frischen und gefrorenen Plasmaproben (entnommen in den zwei Röhrchentypen) sowie frischen und gefrorenen Serumproben zu bestimmen. Die frischen Proben wurden bei 4 °C aufbewahrt, bis sie mit vier Konzentrationen von HCV versetzt und auf Äquivalenz getestet wurden. Als Nächstes wurden die Proben mindestens 24 Stunden lang bei -20 °C eingefroren. Nach diesem Zeitraum der gefrorenen Lagerung wurden die Proben aufgetaut und erneut getestet. Die Ergebnisse für frisches vs. gefrorenes Serum und Plasma sowie EDTA- vs. ACD-Plasmaproben wurden mittels Regressionsanalyse auf ihre Gleichwertigkeit untersucht. Die Daten zeigten eine hervorragende Äquivalenz zwischen EDTA- und ACD-Plasmaproben, frischen und gefrorenen Plasmaproben sowie frischen und gefrorenen Serumproben.

Zusätzliche Tests wurden durchgeführt, um die Gleichwertigkeit der Leistung des NeuMoDx HCV Quant Assay bei Primärproben vs. Sekundärproben zu demonstrieren. Panels von HCV-negativen Spenderproben, die mit HCV-Ziel (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) versetzt wurden, und von HCV-positiven Spenderproben wurden zunächst aus dem primären Probenröhrchen heraus verarbeitet. Nach der Verarbeitung im primären Probenröhrchen wurde das verbleibende Plasma oder Serum jeder Probe in ein sekundäres Probenröhrchen aliquotiert und erneut verarbeitet. Es wurde keine signifikante Differenz zwischen den gemeldeten Ergebnissen bei Verarbeitung im primären und sekundären Probenröhrchen festgestellt.

Klinischer Methodenvergleich

Die qualitative und quantitative Leistung des NeuMoDx HCV Quant Assay wurde im Vergleich mit FDA-/CE-zugelassenen Assays bewertet. Dazu wurden unverdünnte klinische Proben von HCV-infizierten Patienten getestet. Die Tests wurden in Form einer Einfachblindstudie intern bei NeuMoDx mit anonymisierten, restlichen klinischen Proben durchgeführt, die von drei externen Referenzlabors bezogen wurden. Insgesamt wurden 323 Plasmaproben und 336 Serumproben mit dem NeuMoDx HCV Quant Assay in (einfach) verblindeter Weise auf mehreren NeuMoDx Molecular Systems verarbeitet. Von diesen Proben wurden 35 Plasmaproben und 13 Serumproben auf SOWOHL dem NeuMoDx 288 als auch dem NeuMoDx 96 Molecular System verarbeitet. Einige der Proben, die das Ergebnis INVALID (UNGÜLTIG) lieferten, konnten mangels Verfügbarkeit einer ausreichenden Probenmenge nicht erneut verarbeitet werden.

Die Verarbeitungs- und Systemfehler, die auf den NeuMoDx Molecular Systems auftraten, waren minimal und erfüllten die Kriterien. Insgesamt wurden anfänglich 4 INDETERMINATE (IND) (unbestimmte) Ergebnisse für Plasmaproben und 4 IND-Ergebnisse für Serumproben erzielt, was zu einer anfänglichen IND-Rate von insgesamt 1 % (95-%-KI 0,5 %, 3 %) für Plasma und 1% (95-%-KI 0,4 %, 3 %) für Serum führte. Insgesamt wurden anfänglich 3 UNRESOLVED (UNR) (offene) Ergebnisse für Plasmaproben und 5 UNR-Ergebnisse für Serumproben erzielt, was zu einer Gesamtrate von 1 % (95-%-KI 0,2 %, 3 %) für Plasma und 1 % (95-%-KI 0,6 %, 4%) für Serum führte.

Proben, die ungültige Ergebnisse (IND/UNR) oder einen „Quantifizierungsfehler“ ergaben, wurden wiederholt getestet, wenn noch genügend Volumen vorhanden war. Bei einigen Proben wurde ein Verdünnungsschritt durchgeführt, um gültige Ergebnisse zu erhalten. Von den 13 Proben, deren Volumen ausreichte, um erneut getestet zu werden (verdünnt ODER unverdünnt), wurde ein gültiges Ergebnis erzielt.

Von den 321 gültigen Ergebnissen, die für Plasmaproben, und den 334 gültigen Ergebnissen, die für Serumproben erzielt wurden, wurden 206 Plasmaproben und 154 Serumproben vom NeuMoDx HCV Quant Assay als POSITIVE (Positiv) gemeldet, wobei die entsprechenden Konzentrationswerte durch die Referenztests zugewiesen wurden. Deming- und Passing-Bablok-Regressionsanalysen wurden zur Korrelation der Konzentrationswerte des NeuMoDx HCV Assay mit den im Referenztest erhaltenen Werten für Plasma- und Serumproben verwendet.

Gleichwertigkeitsplots wurden generiert, um für alle getesteten Proben die mittels Deming- und Passing-Bablok-Regressionsanalyse ermittelte Korrelation zwischen den Konzentrationswerten des NeuMoDx HCV Quant Assay und den Konzentrationswerten des Referenztests darzustellen. Diese sind in *Abbildung 7* und *Abbildung 8* zu sehen. Die Qualität der Anpassung der Deming-Regression wird durch einen Steigungskoeffizienten von 1,00 mit 95-%-KI (0,97, 1,03) und einen Achsenabschnitt (Bias) von -0,16 mit 95-%-KI (-0,37, 0,06) illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx HCV Quant Assay und Referenztests erhaltenen Konzentrationsergebnisse hochkorreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen. Die Qualität der linearen Anpassung nach Passing-Bablok wird durch einen Steigungskoeffizienten von 1,02 mit 95-%-KI (0,99, 1,05) und einen Achsenabschnitt (Bias) von -0,28 mit 95-%-KI (-0,43, -0,14) illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx HCV Quant Assay und Referenztests erhaltenen Konzentrationsergebnisse hochkorreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen, wie in *Tabelle 14* gezeigt.

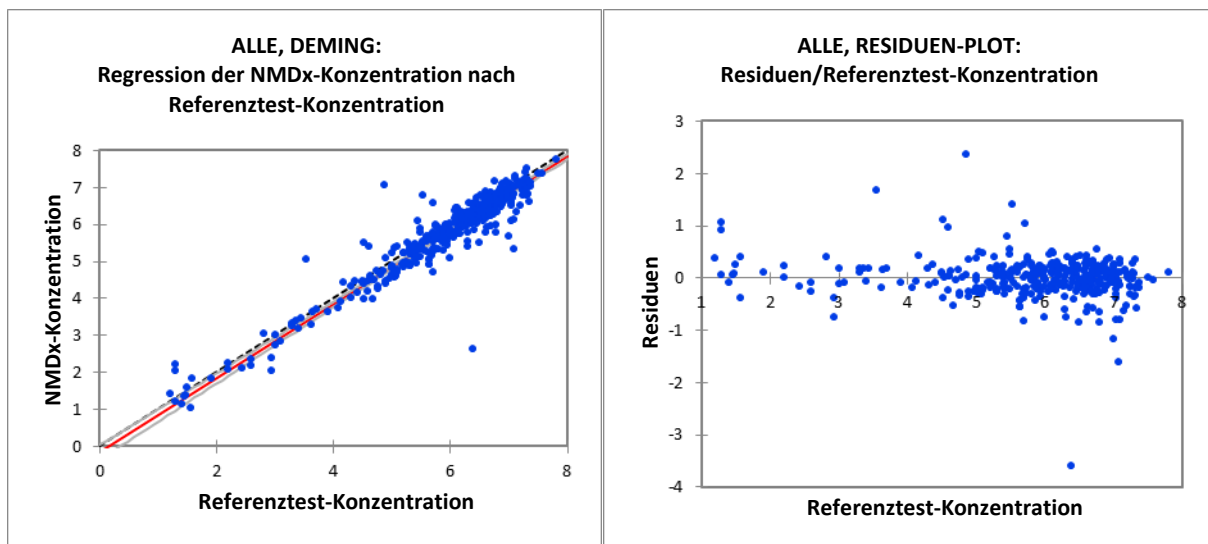


Abbildung 7: Gleichwertigkeits- (links) und Residuen-Plot (rechts) – Kumulative Analyse (für beide NeuMoDx Systems) der NeuMoDx HCV Quant Assay-Ergebnisse im Vergleich zu den Referenztest-Ergebnissen für ALLE Proben auf Grundlage einer Deming-Regressionsanalyse.

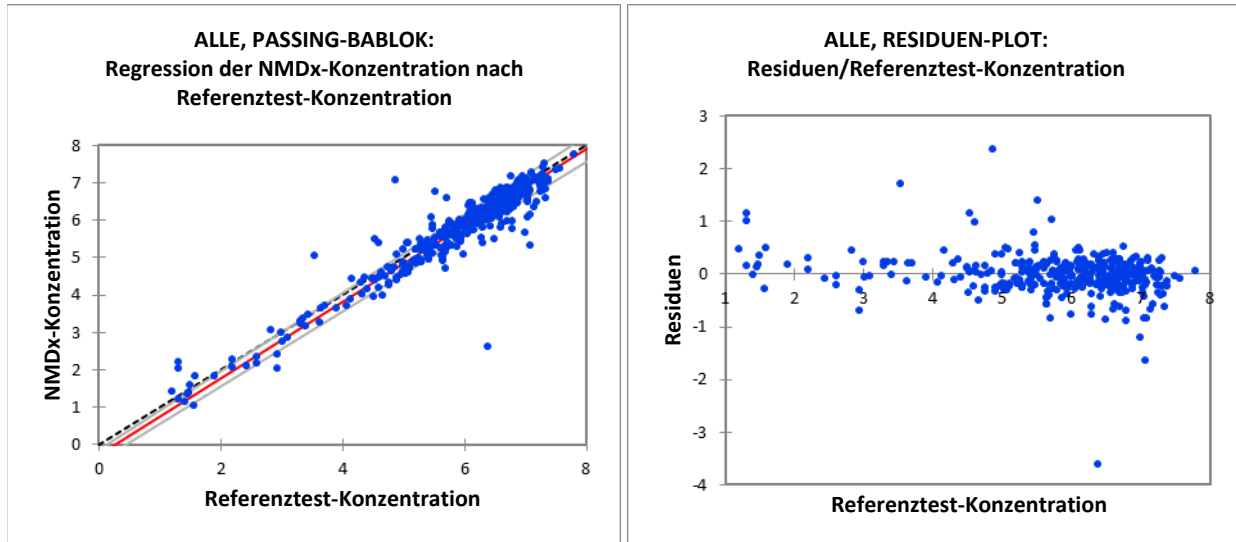


Abbildung 8: Gleichwertigkeits- (links) und Residuen-Plot (rechts) – Kumulative Analyse (für beide NeuMoDx Systems) der NeuMoDx HCV Quant Assay-Ergebnisse im Vergleich zu den Referenztest-Ergebnissen für ALLE Proben auf Grundlage einer Passing-Bablok-Regressionsanalyse.

Tabelle 14. Zusammenfassung der Deming- und der linearen Passing-Bablok-Regressionsanalyse

	Deming-Analyse		Passing-Bablok-Analyse	
	Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient	Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient
KUMULATIV (Alle Plasma + Serum)	-0,16 95-%-KI (-0,37, 0,06)	1,00 95-%-KI (0,97, 1,03)	-0,28 95-%-KI (-0,43, -0,14)	1,02 95-%-KI (0,99, 1,05)

Von den 655 mit dem NeuMoDx HCV Quant Assay für Plasma- und Serumproben erhaltenen gültigen Ergebnissen wurden vom Referenztest auf HCV 361 als positiv und 294 als negativ gemeldet. Die Sensitivität und Spezifität des NeuMoDx HCV Quant Assay wurden anhand der Daten von allen gültigen klinischen Proben im Vergleich zum Referenztest berechnet und sind in *Tabelle 15* zusammengefasst und dargestellt. Von den 361 getesteten positiven Proben wurden 360 vom NeuMoDx HCV Quant Assay ebenfalls als positiv gemeldet, was einer Sensitivität von 99,7 % mit 95-%-KI (98,2 %–100,0 %) entspricht. Von den 294 getesteten negativen Proben wurden 271 vom NeuMoDx HCV Quant Assay ebenfalls als negativ gemeldet, was einer Spezifität von 92,2 % mit 95-%-KI (88,3 %–94,9 %) entspricht.

Die Gleichwertigkeit der Leistung des NeuMoDx HCV Quant Assay wurde durch eine hohe Korrelation der Ergebnisse für die Assay-Leistung zwischen dem NeuMoDx 288 Molecular System, dem NeuMoDx 96 Molecular System und dem Referenztest sowohl für Plasma- als auch für Serumproben bestätigt.

Tabelle 15. Ergebnisse des qualitativen Methodenvergleichs zwischen dem NeuMoDx HCV Quant Assay und den Referenztests – Plasma and Serum

	Referenzassay (POS)	Referenzassay (NEG)	GESAMT
NeuMoDx HCV Quant Assay (POS)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
GESAMT	361	294	655
SENSITIVITÄT = 99,7 % 95-%-KI (98,2 %–100 %) * SPEZIFITÄT = 92,2 % 95-%-KI (88,3 %–94,9 %)			

***HINWEIS:** Die LLoQ für den NeuMoDx HCV Quant Assay beträgt 0,9 log₁₀ IU/ml und ist damit niedriger als die LLoQ des Vergleichsassays, der als Referenztest verwendet wurde. Es wurde eine anschließende Analyse durchgeführt, wobei 9 Proben ausgeschlossen wurden, bei denen mit NeuMoDx HCV nachgewiesen wurde, die jedoch vom Vergleichstest als negativ gemeldet wurden. Die unter Ausschluss dieser 9 Proben neu berechnete Spezifität des NeuMoDx HCV Quant Assay betrug 95,1 % mit einem 95%-KI (91,7–97,2).

Tests künstlicher Proben – Workflow mit 200 µl Probenvolumen

Die quantitative Korrelation zwischen den Workflows mit 200 µl und 550 µl Probenvolumen wurde anhand eines Panels aus einzelnen, HCV-negativen Plasma- und Serumproben bestätigt, die mit vier bekannten Konzentrationen von auf den 5. internationalen Standard der WHO für HCV-RNA für Nukleinsäuretests rückführbarem Accuplex HCV-Kontrollmaterial versetzt wurden. Diese einzelnen Plasma- und Serumproben wurden unter Anwendung beider Workflows (550 µl und 200 µl Probenvolumen) in insgesamt 324 Tests verarbeitet. Auf Basis einzelner Proben wurden Vergleiche der Gleichwertigkeit der von der NeuMoDx Software für den 200-µl- und den 550-µl-Workflow gemeldeten Konzentrationen durchgeführt. Die Regressionsanalysen nach Deming und Passing-Bablok ergaben eine Steigung von 1,003 bzw. 1,000 mit Achsenabschnitten von –0,082 bzw. –0,085 für Plasma und 0,974 bzw. 0,984 mit Achsenabschnitten von 0,086 bzw. 0,037 für Serum, was eine ausgezeichnete Übereinstimmung der HCV-Quantifizierungen zwischen den Workflows für die beiden verschiedenen Verarbeitungsvolumen demonstriert. Ein Bland-Altman-Vergleich zeigte ein minimales Bias zwischen den beiden Workflows. Zusätzlich ergaben sich für einfache lineare Regressionsanalysen mit der erwarteten und der gemeldeten Konzentration für den 200 µl-Workflow eine Steigung von 1,0432 und ein Korrelationskoeffizient von 0,994 (Plasma) bzw. 1,0007 und 0,993 (Serum), was die ausgezeichnete Leistung des NeuMoDx HCV Quant Assay bei Anwendung des Workflows mit 200 µl Probenvolumen weiter untermauert. Die Ergebnisse dieser Studien sind nachstehend in *Abbildung 9* und *Abbildung 10* zusammengefasst.

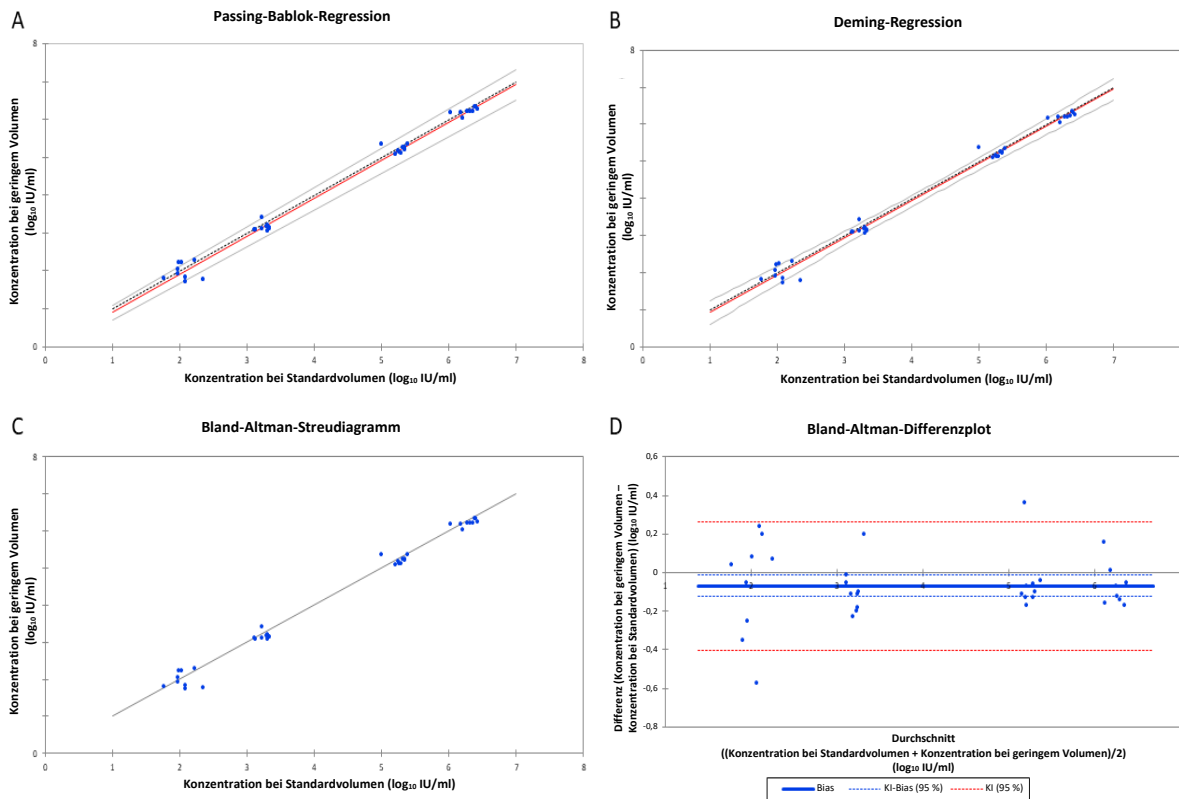


Abbildung 9: Gleichwertigkeitsplot: Vergleich der vom Workflow für 200 µl Probenvolumen und vom Workflow für 550 µl Probenvolumen gemeldeten Konzentrationen. A) Passing-Bablok-Regression. B) Deming-Regression. C) Bland-Altman-Streudiagramm D) Bland-Altman-Differenzplot – Plasmaproben

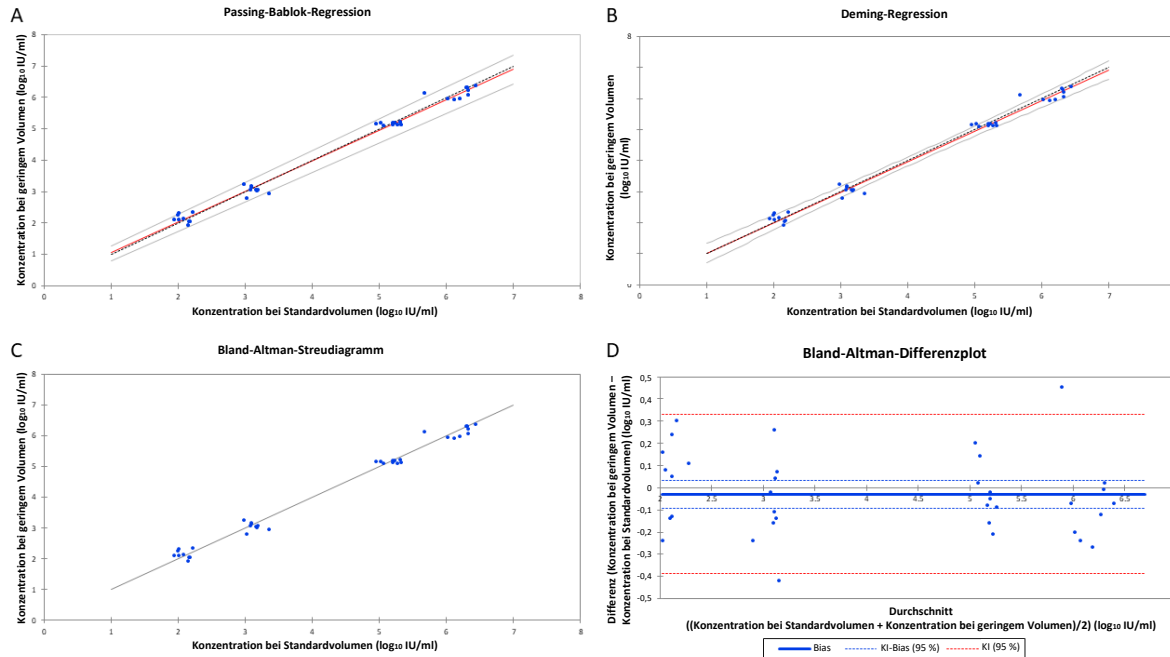


Abbildung 10: Gleichwertigkeitsplot: Vergleich der vom Workflow für 200 µl Probenvolumen und vom Workflow für 550 µl Probenvolumen gemeldeten Konzentrationen. A) Passing-Bablok-Regression. B) Deming-Regression. C) Bland-Altman-Streudiagramm D) Bland-Altman-Differenzplot – Serumproben

LITERATUR










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

MARKENNAMEN

NeuMoDx™ und NeuDry™ sind Marken von NeuMoDx Molecular, Inc.
 AcroMetrix™ ist eine Marke von Thermo Fisher Scientific.
 Armored RNA® ist eine eingetragene Marke von Asuragen, Inc.
 BD Vacutainer® ist eine eingetragene Marke von Becton, Dickinson and Company
 BD, PPT™ und SST™ sind Marken von Becton, Dickinson and Company
 TaqMan® ist eine eingetragene Marke von Roche Molecular Systems, Inc.

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

SYMBOLSCHLÜSSEL

R only	Nur zur Anwendung durch Fachpersonal		Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller		Nicht zur Wiederverwendung
IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft		Gebrauchsanweisung beachten
REF	Katalognummer		Vorsicht
LOT	Chargencode		Biologische Risiken
	Verfallsdatum	CE	CE-Kennzeichnung



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

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



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



Technischer Support/Vigilanzberichterstattung: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents