

REF 201500 NeuMoDx™ EBV 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

NeuMoDx EBV Quant Assay ist ein automatisierter *In-vitro*-Nukleinsäureamplifikationstest zur Quantifizierung der DNA des humanen Epstein-Barr-Virus (EBV) in Plasma. Der NeuMoDx EBV Quant Assay, implementiert auf dem NeuMoDx 288 Molecular System und dem NeuMoDx 96 Molecular System (den NeuMoDx System(s)), umfasst eine automatisierte DNA-Extraktion zur Isolation der Zielnukleinsäure aus Plasma und eine Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), die auf zwei hochkonservierte Regionen im Genom des Epstein-Barr-Virus abzielt.

Der NeuMoDx EBV Quant Assay ist für Nachweis und Quantifizierung der DNA des Epstein-Barr-Virus *in vitro* in frischen und gefrorenen Humanplasmaproben unter Anwendung der NeuMoDx 288 und NeuMoDx 96 Molecular Systems bestimmt. Der NeuMoDx EBV Assay ist für den Einsatz zur Diagnose und Überwachung von EBV-Infektionen vorgesehen. Der Assay kann zur Messung der Konzentration an EBV-DNA verwendet werden, um das Ansprechen auf eine antivirale Behandlung zu bewerten. Dieser Assay ist für die Verwendung im Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild und anderen Labormarkern für die Krankheitsprognose vorgesehen und soll das klinische Management und die Überwachung von EBV-Infektionen unterstützen. Der Assay ist nicht für die Verwendung als Screeningtest auf das Vorhandensein von EBV in Blut oder Blutprodukten vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Zur Plasmagewinnung kann humanes Vollblut verwendet werden, das in sterilen Blutentnahmeröhrchen mit EDTA als Antikoagulans entnommen wurde. Um einen Test zu beginnen, wird Plasma in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen in einen Probenröhrchenträger gesetzt und auf die NeuMoDx Systemarbeitsplattform geladen. Für jede Probe wird ein 250- μ l-Aliquot der Plasmaprobe mit NeuMoDx Lysis Buffer 5 vermischt, und das NeuMoDx System führt automatisch alle Schritte durch, die erforderlich sind, um die Zielnukleinsäure zu extrahieren, die isolierte DNA für die Echtzeit-PCR-Amplifikation vorzubereiten, eine Amplifikation zu erreichen und die Amplifikationsprodukte (zwei hochkonservierte Regionen im EBV-Genom), falls vorhanden, nachzuweisen. Der NeuMoDx EBV Quant Assay enthält eine DNA-Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1). Diese Kontrolle erlaubt es, möglicherweise in der Probe vorhandene inhibitorische Substanzen sowie Fehler des NeuMoDx Systems oder von Reagenzien während des Extraktions- und Amplifikationsprozesses zu erkennen.

EBV ist ein verbreitetes doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der humanen Herpesviren, das Menschen aller Altersgruppen infiziert. Schätzungen zufolge sind oder waren > 90 % aller Personen weltweit mit EBV infiziert.¹ EBV wird über Körperflüssigkeiten wie Speichel, Blut oder Samen und bei Organtransplantationen übertragen. Viele Personen infizieren sich bereits in der Kindheit mit EBV. Diese Personen sind in der Regel zwar mit EBV infiziert, aber asymptomatisch. Bei immungeschwächten Patienten kann eine EBV-Infektion mit schwereren Symptomen und Komplikationen verbunden sein. Latente EBV-Infektionen stellen besonders für Patienten nach der Transplantation ein großes Risiko dar. Zu den lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLDs) zählt die EBV-induzierte Tumorbildung in B-Zellen, die durch die Auswirkungen von Immunsuppressiva auf die Immunkontrolle von EBV bedingt ist. Diese stellt eine der bedeutendsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen bei Patienten nach Organtransplantation jeglicher Art dar.²

Die Überwachung der EBV-Viruslast erleichtert die Diagnose und das Management EBV-assoziiierter PTLDs. Allerdings ist der Nachweis von EBV-Nukleinsäuren im Blut für die Diagnose einer EBV-assoziierten PTLD nicht ausreichend. Nukleinsäuretests (Nucleic Acid Testing, NAT) sollten ausschließlich in Verbindung mit dem klinischen Erscheinungsbild und anderen Labormarkern für die Krankheitsprognose eingesetzt werden, um das klinische Management und die Überwachung EBV-infizierter Patienten zu unterstützen. Die aktuellen Richtlinien für das Management und die Behandlung von EBV-Infektionen bei immungeschwächten Personen sind zwar uneindeutig, was den *Zeitpunkt* des Beginns der antiviralen Therapie angeht, doch sie alle schreiben eine Überwachung der Viruslast ab Beginn der antiviralen Therapie vor. Diese soll dabei helfen, die schweren Nebenwirkungen von Medikamenten in diesen Populationen abzuschwächen.^{3,4}

PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Der NeuMoDx EBV Quant Assay verwendet zur Durchführung der Analyse auf dem NeuMoDx System den NeuMoDx EBV Quant Test Strip, NeuMoDx EBV Calibrators, NeuMoDx EBV External Controls, NeuMoDx Lysis Buffer 5 sowie allgemeine Verbrauchsreagenzien von NeuMoDx. Der NeuMoDx EBV Quant Assay kombiniert die automatisierte DNA-Extraktion, die Amplifikation und den Nachweis mittels Echtzeit-PCR. Vollblutproben werden für die Gewinnung von Plasma in EDTA-Röhrchen entnommen. Die Plasmaprobe wird in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen in einen Probenröhrchenträger gesetzt und zur Verarbeitung auf die NeuMoDx Systemarbeitsplattform geladen. Es sind keine weiteren Bedieneingriffe erforderlich.

Die NeuMoDx Systems verwenden eine Kombination aus Wärme, lytischem Enzym und Extraktionsreagenzien, um automatisch Zellyse, DNA-Extraktion und die Entfernung von Inhibitoren durchzuführen. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden durch paramagnetische Partikel aufgenommen. Die Partikel werden dann zusammen mit den gebundenen Nukleinsäuren in die NeuMoDx Cartridge geladen, wo die ungebundenen Nicht-DNA-Komponenten mithilfe des NeuMoDx Wash Reagent ausgewaschen werden. Zuletzt wird die gebundene DNA mit NeuMoDx Release Reagent eluiert. Die NeuMoDx Systems verwenden die eluierte DNA anschließend zur Rehydrierung der proprietären NeuDry™ Amplifikationsreagenzien, die alle für die PCR-Amplifikation der EBV-spezifischen Zielsequenzen sowie der SPC1 erforderlichen Elemente enthalten. Nach der Rekonstitution der NeuDry PCR-Reagenzien dispensiert das NeuMoDx System die vorbereitete PCR-fertige Mischung in die NeuMoDx Cartridge. Amplifikation und Nachweis der Kontroll- und Ziel-DNA-Sequenzen (falls vorhanden) erfolgen in der PCR-Kammer der NeuMoDx Cartridge. Die NeuMoDx Cartridge ist so konzipiert, dass sie nach der Echtzeit-PCR das Amplifikat enthält, wodurch im Wesentlichen das Kontaminationsrisiko nach der Amplifikation beseitigt wird.

Der NeuMoDx EBV Quant Assay zielt auf zwei hochkonservierte Regionen des EBV-Genoms ab, BALF5 und BXFL1. Das duale Zieldesign reduziert das Risiko falsch negativer Ergebnisse im Fall einer Mutation und steigert so die Robustheit des Assays. Die amplifizierten Ziele werden in Echtzeit anhand von Hydrolyse-Sonden-Chemie (allgemein als TaqMan® Chemie bezeichnet) nachgewiesen, wobei fluorogene Oligonukleotidsondenmoleküle angewendet werden, 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, wodurch sich der Abstand zum Quencher vergrößert. Dadurch wird der Löscheffekt durch FRET aufgehoben und die Fluoreszenz des Fluorophors kann nachgewiesen werden. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zum freigesetzten Fluorophor und kann zur Menge der vorliegenden Ziel-DNA korreliert werden.

Eine mit einem Fluorophor (490/521 nm) am 5'-Ende und einem dunklen Quencher am 3'-Ende markierte TaqMan Sonde wird zum Nachweis der EBV-DNA verwendet. Die Detektion der SPC1 erfolgt über eine TaqMan Sonde, die am 5'-Ende mit einem alternativen Fluoreszenzfarbstoff (535/556 nm) und am 3'-Ende ebenfalls mit einem dunklen Quencher markiert ist. 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 Ergebnis aus (POSITIVE (Positiv)/NEGATIVE (Negativ)/INDETERMINATE (Unbestimmt)/UNRESOLVED (Offen)). Lautet das Ergebnis POSITIVE (positiv), gibt die NeuMoDx System Software auch einen quantitative Wert für die Probe aus oder meldet, ob die berechnete Konzentration außerhalb der Quantifizierungsgrenzen liegt.

REAGENZIEN/VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bereitgestelltes Material

REF	Inhalt	Tests pro Einheit	Tests pro Packung
201500	NeuMoDx EBV Quant Test Strip <i>PCR-Trockenreagenzien, die EBV- und SPC1-spezifische TaqMan Sonden und Primer enthalten.</i>	16	96

Zusätzlich 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>
800500	NeuMoDx EBV Calibrators <i>Sets aus EBV-Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration für den Einmalgebrauch, zur Validierung der Standardkurve</i>
900501	NeuMoDx EBV External Controls <i>Sets aus EBV-Positiv- und Negativkontrollen zum Einmalgebrauch, zum täglichen Nachweis der Gültigkeit des NeuMoDx EBV Quant Assay</i>
400900	NeuMoDx Lysis Buffer 5
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 EBV Quant Assay ist ausschließlich zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik mit NeuMoDx Systems vorgesehen.
- Proben sind immer wie infektiöses Material und entsprechend den sicheren Laborverfahren (beschrieben in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁵ und im CLSI-Dokument M29-A4⁶) zu behandeln.
- Ein positives Ergebnis zeigt das Vorhandensein von EBV-DNA an.
- Die Leistung des NeuMoDx EBV Quant Assay kann nur bei Verwendung durch Personal gewährleistet werden, das in der Verwendung des NeuMoDx System und in der Handhabung infektiöser Materialien geschult ist.
- 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 NeuMoDx EBV Calibrators [REF 800500] mit hoher und niedriger Konzentration verfügbar sein.
- NeuMoDx EBV External Controls [REF 900501] müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden, solange Tests mit dem NeuMoDx EBV Quant Assay durchgeführt werden.
- Das Mindestprobenvolumen von Sekundäraliquoten ist abhängig von der Röhrchengröße bzw. dem Probenröhrchenträger wie nachstehend definiert. Ein Volumen unter dem angegebenen Mindestvolumen kann zu dem Fehler „Quantity Not Sufficient“ (Menge nicht ausreichend) führen.
- Die Verwendung von Proben, die bei nicht geeigneten Temperaturen oder über die angegebenen Lagerzeiten hinaus aufbewahrt wurden, kann zu ungültigen oder fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Eine Kontamination von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien mit Mikroorganismen und Desoxyribonuklease (DNase) ist stets zu vermeiden. Es wird die Verwendung steriler, DNase-freier Einwegtransferpipetten empfohlen. Für jede Probe eine neue Pipette verwenden.
- Zur Vermeidung von Kontamination NeuMoDx Cartridge nach der Amplifikation weder handhaben noch beschädigen. NeuMoDx Cartridges unter keinen Umständen aus dem Behälter für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 288 Molecular System) oder dem Eimer für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 96 Molecular System) entnehmen. Die NeuMoDx Cartridge ist dafür konzipiert, Kontamination zu verhindern.
- Wenn das Labor auch PCR-Tests mit offenen Röhrchen ausführt, muss unbedingt gewährleistet werden, dass der NeuMoDx EBV 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 EBV Quant Test Strip oder einer NeuMoDx Extraction Plate oder die Oberseiten von Behältern mit NeuMoDx Lysis Buffer 5 nicht berührt werden; die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien dürfen ausschließlich an den Seitenflächen angefasst werden.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage erhältlich.
- 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.
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfall entsprechend den nationalen, bundesstaatlichen, regionalen, kommunalen und lokalen Vorschriften entsorgen.

LAGERUNG, HANDHABUNG UND STABILITÄT VON PRODUKTEN

- Die NeuMoDx EBV Quant Test Strips sind in der Primärverpackung bei Lagerung bei 18–23 °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 EBV 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.
- Obwohl die NeuMoDx EBV Calibrators und NeuMoDx EBV External Controls nicht infektiös sind, sollten sie nach Verwendung als biogefährlicher Laborabfall entsorgt werden, um das Risiko einer Kontamination durch die enthaltene Zielnukleinsäure zu verringern.

PROBENNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

Alle Proben so handhaben, als seien sie in der Lage, Infektionserreger zu übertragen.

- Vollblut oder andere Proben, die in Primärrohrchen aufbewahrt werden, nicht einfrieren.
- Zur Gewinnung von Plasmaproben sollte Vollblut in sterilen Röhrchen entnommen werden, die EDTA als Antikoagulans enthalten. Die Anweisungen des Herstellers der Probenentnahmeröhrchen befolgen.
- Vollblut, das in den oben aufgeführten Produkten entnommen wurde, kann vor der Plasmagewinnung bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 25 °C gelagert und/oder transportiert werden. Die Plasmagewinnung ist gemäß den Anweisungen des Herstellers durchzuführen.
- Die vorbereiteten Plasmaproben können bis zu 8 Stunden vor Beginn der Verarbeitung im NeuMoDx System aufbewahrt werden. Falls zusätzliche Lagerungszeit benötigt wird, empfiehlt es sich, die Proben in entweder gekühlt zu lagern oder einzufrieren.
- Die vorbereiteten Plasmaproben sollten vor den Tests zwischen 2 und 8 °C nicht länger als 7 Tage und bei Raumtemperatur maximal 8 Stunden lang gelagert werden.
- Die vorbereiteten Plasmaproben können vor der Verarbeitung bei < -20 °C bis zu 8 Wochen lang gelagert werden. Plasmaproben sollten vor der Verwendung nicht mehr als 2 Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.
 - 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.
 - Nach dem Auftauen gefrorener Proben sollten diese innerhalb von 8 Stunden getestet werden.
- Wenn die Proben verschickt werden, sind sie in Übereinstimmung mit den geltenden Vorschriften auf Landes- und/oder internationaler Ebene zu verpacken und beschriften.
- Proben eindeutig beschriften und darauf hinweisen, dass die Proben für EBV-Tests bestimmt sind.
- Mit dem Abschnitt Testvorbereitung fortfahren.

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

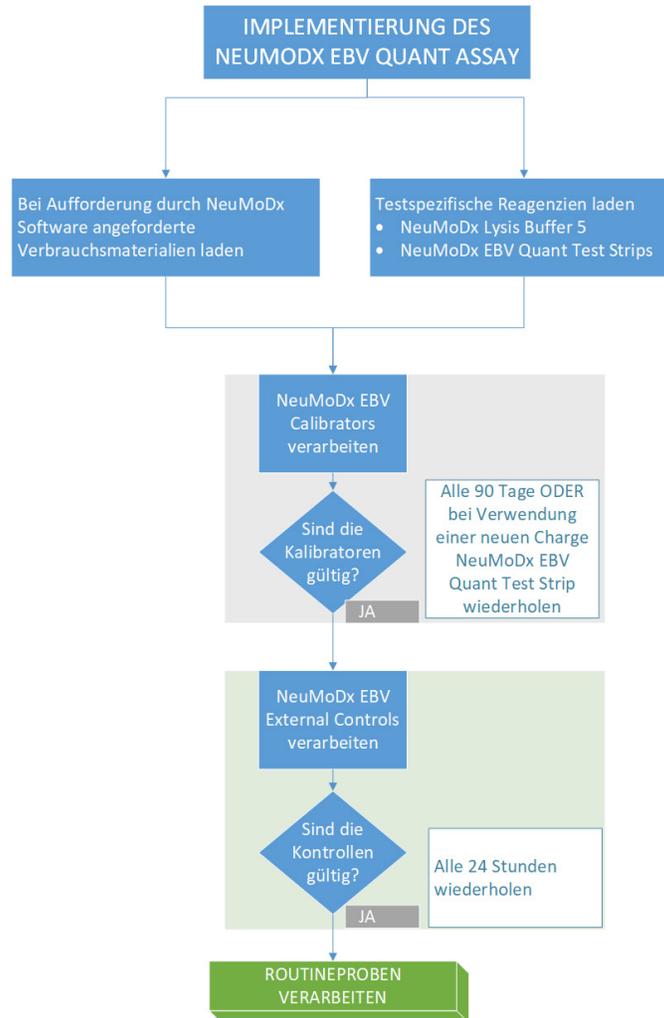


Abbildung 1: Workflow zur Implementierung des NeuMoDx EBV Quant Assay

GEBRAUCHSANWEISUNG

Testvorbereitung

1. Proben-Barcodeetikett auf einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen anbringen.
2. Ein Aliquot des Plasmas in ein mit dem NeuMoDx System kompatibles, mit Barcode versehenes Probenröhrchen überführen. Dabei die unten angegebenen Volumina beachten:
 - Probenröhrchenträger (32 Röhrchen): 11–14 mm Durchmesser und 60–120 mm Höhe; Mindestfüllvolumen ≥ 400 ml
 - Probenröhrchenträger (24 Röhrchen): 14,5–18 mm Durchmesser und 60–120 mm Höhe; Mindestfüllvolumen ≥ 850 ml

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.

1. Einen oder mehrere NeuMoDx System Teststreifenräger mit NeuMoDx EBV Quant Test Strip(s) befüllen und den/die Teststreifenräger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
2. Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software die erforderlichen Verbrauchsmaterialien in die Verbrauchsmaterialräger des NeuMoDx System geben und den/die Träger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
3. Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software das NeuMoDx Wash Reagent oder NeuMoDx Release Reagent ersetzen, oder den Priming-Abfall oder den Eimer für biogefährlichen Abfall leeren.

- Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software die Calibrators [REF 800500] und/oder External Controls [REF 900501] wie erforderlich verarbeiten. Weitere Informationen hinsichtlich der Kalibratoren und Kontrollen sind dem Abschnitt *Ergebnisverarbeitung* zu entnehmen.
- Das/die Proben-/Kalibrator-/Kontrollröhrchen in einen 32-Röhrchenträger laden und darauf achten, dass die Deckel von allen Probenröhrchen entfernt wurden.
- Den Probenröhrchenträger in eine beliebige freie Position auf dem Autolader-Regal setzen und über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden. Dadurch wird die Verarbeitung der für den/die angegebenen Test(s) geladenen Proben eingeleitet.

ANWENDUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Der NeuMoDx EBV Quant Test Strip kann ausschließlich auf NeuMoDx Systems verwendet werden.
- Die Leistung des NeuMoDx EBV Quant Test Strip wurde für Plasmaproben ermittelt, die unter Verwendung von EDTA als Antikoagulans aus Vollblut gewonnen wurden. Die Verwendung des NeuMoDx EBV Quant Test Strip mit anderen klinischen Probentypen wurde nicht bewertet und die Leistungsmerkmale des Tests sind für andere Probentypen unbekannt.
- Da der EBV-Nachweis von der Anzahl der in der Probe vorhandenen Viren abhängig ist, sind ordnungsgemäße Probennahme, Handhabung und Lagerung für zuverlässige Ergebnisse erforderlich.
- Bevor mit der routinemäßigen Verarbeitung klinischer Proben begonnen werden kann, müssen zunächst Kalibratoren und externe Kontrollen entsprechend den Empfehlungen in der Packungsbeilage sowie bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software verarbeitet werden.
- Eine unsachgemäße Probennahme, Handhabung, Lagerung, technische Fehler oder eine Verwechslung von Probenröhrchen könnten zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zusätzlich können negative Ergebnisse erhalten werden, wenn die Anzahl von Viruspartikeln in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des NeuMoDx EBV Quant Assay liegt.
- Das NeuMoDx System darf ausschließlich von Personal bedient werden, das in der Anwendung des NeuMoDx System geschult ist.
- Wenn weder die EBV-Zielsequenzen noch das SPC1-Ziel amplifiziert werden, wird ein ungültiges Ergebnis („Indeterminate“ (Unbestimmt) oder „Unresolved“ (Offen)) ausgegeben und der Test sollte wiederholt werden.
- Wenn das Ergebnis des NeuMoDx EBV Quant Assay Positive (Positiv) ist, der Quantifizierungswert jedoch außerhalb der Quantifizierungsgrenzen liegt, gibt das NeuMoDx System an, ob die nachgewiesene EBV-Konzentration *unterhalb* der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) oder *oberhalb* der oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) liegt.
- Sollte die nachgewiesene EBV-Konzentration unterhalb der LLoQ liegen, kann der NeuMoDx EBV Quant Assay (falls gewünscht) mit einem anderen Aliquot der Probe wiederholt werden.
- Sollte die nachgewiesene EBV-Konzentration oberhalb der ULoQ liegen, kann der NeuMoDx EBV Quant Assay mit einem verdünnten Aliquot der Originalprobe wiederholt werden. Empfohlen wird eine Verdünnung von 1:100 oder 1:1000 in EBV-negativem Plasma oder Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare, Milford, MA). Das System berechnet anhand folgender Gleichung automatisch die Konzentration der Originalprobe: $\text{Konzentration der Originalprobe} = \log_{10}(\text{Verdünnungsfaktor}) + \text{gemeldete Konzentration der verdünnten Probe}$, sofern der Verdünnungsfaktor vor der Wiederholung korrekt in der Software ausgewählt wurde.
- Das gelegentliche Vorliegen von PCR-Inhibitoren in Plasma kann zu einem Quantifizierungsfehler im System führen. Tritt ein solcher auf, empfiehlt sich eine Testwiederholung mit der gleichen Probe nach 1:10- oder 1:100-Verdünnung in Basematrix.
- Ein positives Ergebnis zeigt nicht unbedingt das Vorliegen einer aktiven Virusinfektion an. Vielmehr deutet ein positives Ergebnis auf das Vorhandensein von Epstein-Barr-Virus-DNA hin.
- Obwohl dieser Fall sehr unwahrscheinlich ist, können Deletionen oder Mutationen in beiden konservierten Regionen des EBV-Genoms, auf die der NeuMoDx EBV Quant Assay abzielt, den Nachweis beeinträchtigen oder zu einem fehlerhaften Ergebnis bei Verwendung des NeuMoDx EBV Quant Test Strip führen.
- Die Ergebnisse des NeuMoDx EBV 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.
- 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 EBV Quant Assay werden unter Anwendung des Entscheidungsalgorithmus und der Verarbeitungsparameter, die in der NeuMoDx EBV Assay-Definitionsdatei (EBV-ADF) spezifiziert sind, automatisch durch die NeuMoDx System Software generiert. Abhängig vom Amplifikationsstatus von Zielsequenz und Probenprozesskontrolle kann das Ergebnis des NeuMoDx EBV Quant Assay „Negative“ (Negativ), „Positive“ (Positiv) mit Angabe der EBV-Konzentration, „Positive“ (Positiv) oberhalb der oberen Quantifizierungsgrenze, „Positive“ (Positiv) unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze, „Indeterminate“ (Unbestimmt) oder „Unresolved“ (Offen) sein. Die Ergebnisse werden auf Grundlage des Entscheidungsalgorithmus in *Tabelle 1* ausgegeben.

Tabelle 1: Entscheidungsalgorithmus des NeuMoDx EBV Quant Assay

Ergebnis	EBV	Probenprozesskontrolle (SPC1)
Positive (Positiv)	$[2 \leq Ct \leq 9 \text{ AND (UND) } EPR > 2$ $\text{AND (UND) } EP \geq 1500]$ OR (ODER) $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND (UND) } EP \geq 1500]$	n. z.
Positive (Positiv), oberhalb der oberen Quantifizierungsgrenze [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (\log_{10} IU/ml)	$[CONC] \text{ (KONZ)} > 8,0 \log_{10} \text{ IU/ml,}$ NO QUANT (KEINE QUANT)	n. z.
Positive (Positiv), unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (\log_{10} IU/ml)	$[CONC] \text{ (KONZ)} < 2,3 \log_{10} \text{ IU/ml,}$ NO QUANT (KEINE QUANT)	n. z.
Negative (Negativ)	k. A. OR (ODER) $[2 \leq Ct < 9$ $\text{UND } EPR \leq 2]$ OR (ODER) $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND (UND) } EP < 1500]$ OR $(ODER) Ct > 38$	AMPLIFIED (AMPLIFIZIERT) $(29 \leq Ct \leq 35)$ and (und) $EP \geq 2000$
Indeterminate (Unbestimmt)	NOT AMPLIFIED/System Errors Noted (NICHT AMPLIFIZIERT/Systemfehler festgestellt)	
Unresolved (Offen)	NOT AMPLIFIED/No System Errors Noted (NICHT AMPLIFIZIERT/keine Systemfehler festgestellt)	

EP = End Point Fluorescence (Endpunktfluoreszenz) (nach Basislinien-Korrektur); EPR = End Point Fluorescence Ratio (Endpunktfluoreszenzverhältnis); Ct = Cycling Threshold (Zyklusschwellenwert);
 Quant = berechnete Menge an vorliegendem EBV, angegeben in \log_{10} IU/ml. Siehe Testberechnung unten.

Testberechnung

1. Für Proben innerhalb des Quantifizierungsbereichs des NeuMoDx EBV Quant Assay wird die Konzentration der EBV-DNA in den Proben anhand der gespeicherten Standardkurven in Verbindung mit dem Kalibrationskoeffizienten berechnet.
 - a. Ein „Kalibrationskoeffizient“ wird auf Grundlage der Ergebnisse für die verarbeiteten NeuMoDx EBV Calibrators berechnet und dient dazu, die Gültigkeit der Standardkurve für jede Charge der NeuMoDx EBV Quant Test Strips auf einem spezifischen NeuMoDx System nachzuweisen.
 - b. Der Kalibrationskoeffizient wird vom System automatisch in die endgültige Bestimmung der Konzentration der EBV-DNA einbezogen.
2. Die Ergebnisse des NeuMoDx EBV Quant Assay werden in \log_{10} IU/ml angegeben.
3. Die resultierende Quantifizierung der unbekanntenen Proben ist rückführbar auf den 1. Internationalen Standard der WHO für das Epstein-Barr-Virus für Nukleinsäureamplifikationstechniken.

Testkalibrierung

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

Kalibratoren

1. Die NeuMoDx EBV Calibrators sind in einem Kit [REF 800500] verfügbar und enthalten nicht infektiöse verkapselte EBV-Ziele in Basematrix.
2. Ein Set der EBV-Kalibratoren muss verarbeitet werden, wenn eine neue Charge der NeuMoDx EBV Quant Test Strips verwendet wird, eine neue EBV-Assay-Definitionsdatei auf das NeuMoDx System geladen wird, der Gültigkeitszeitraum des aktuellen Kalibratorsets abgelaufen ist (auf 90 Tage festgelegt) oder Veränderungen an der NeuMoDx System Software vorgenommen werden.
3. Die NeuMoDx System Software benachrichtigt den Benutzer, wenn die Kalibratoren verarbeitet werden müssen. Bis zur erfolgreichen Verarbeitung der Kalibratoren kann keine neue Teststreifencharge für Tests verwendet werden.

4. Die Gültigkeit der Kalibrierung wird wie folgt ermittelt:
 - a) Zum Nachweis der Gültigkeit muss ein Set aus zwei Kalibratoren – hohe und niedrige Konzentration – verarbeitet werden.
 - b) Um gültige Ergebnisse zu erhalten, müssen mindestens 2 der 3 Replikate Ergebnisse innerhalb vordefinierter Parameter ergeben. Das Nominalziel für den Kalibrator mit niedriger Konzentration liegt bei $4 \log_{10}$ IU/ml und das Nominalziel für den Kalibrator mit hoher Konzentration bei $6 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Ein Kalibrationskoeffizient wird berechnet, um der erwarteten Variation zwischen verschiedenen Teststreifenchargen Rechnung zu tragen. Dieser Kalibrationskoeffizient kommt bei der Bestimmung der endgültigen EBV-Konzentration zum Einsatz.
5. Wenn ein oder beide Kalibratoren die Gültigkeitsprüfung nicht besteht/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.
6. Wenn der/die Kalibrator(en) die Gültigkeitsprüfung zweimal in Folge 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. Externe Kontrollmaterialien, die nicht infektiöse verkapselte EBV-Ziele in Basematrix als Positivkontrollen enthalten, werden von NeuMoDx Molecular, Inc. in einem Kit angeboten, das die NeuMoDx EBV External Controls enthält [REF 900501].
2. Externe Positiv- und Negativkontrollen müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden. Wenn kein Satz gültiger externer Kontrollen vorhanden ist, fordert das NeuMoDx System den Benutzer dazu auf, diese Kontrollen zu verarbeiten, bevor Probenergebnisse ausgegeben werden können.
3. Wenn externe Kontrolle benötigt werden, ein Set externer Kontrollen aus dem Gefrierschrank entnehmen und die Fläschchen bei Raumtemperatur (15–30 °C) auftauen lassen. Vorsichtig vortexen, um die Homogenität zu gewährleisten.
4. Die Positiv- und Negativkontrollfläschchen in einen auf dem Autolader-Regal platzierten Probenröhrchenträger setzen und über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden. Das NeuMoDx System erkennt den Barcode und beginnt die Verarbeitung der Probenröhrchen, sofern die für die Tests erforderlichen Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien verfügbar sind.
5. 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 EBV ergeben.
6. 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 die Verarbeitung der fehlgeschlagenen NeuMoDx EBV External Control(s) mit einem frisch aufgetauten Fläschchen der Kontrolle(n), die den Gültigkeitstest nicht bestanden hat/haben, wiederholen.
 - d) Wenn die positive NeuMoDx EBV External Control weiterhin das Ergebnis „Negative“ (Negativ) ergibt, den Kundenservice von NeuMoDx kontaktieren.
 - e) Wenn die negative NeuMoDx EBV External Control weiterhin das Ergebnis „Positive“ (Positiv) ergibt, vor dem Kontaktieren des Kundenservice von NeuMoDx möglichst alle in Frage kommenden Kontaminationsquellen eliminieren, was den Austausch ALLER Reagenzien und Verbrauchsmaterialien einschließt.

(Interne) Probenprozesskontrollen

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

Wenn ein auf dem NeuMoDx System ausgeführter NeuMoDx EBV Quant Assay kein gültiges Ergebnis liefert, wird das Ergebnis basierend auf der aufgetretenen Fehlerart entweder als „Indeterminate“ (IND) (Unbestimmt) 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 (Offen) wird gemeldet, wenn keine gültige Amplifikation von EBV-DNA oder SPC1 nachweisbar ist, was auf einen möglichen Reagenzfehler oder das Vorliegen von Inhibitoren hinweist. Falls das Ergebnis UNR (Offen) gemeldet wird, kann als erster Schritt ein erneuter Test durchgeführt werden. Wenn der Wiederholungstest fehlschlägt, kann eine Probenverdünnung verwendet werden, um die Effekte einer möglichen Probeninhibition abzumildern.

LEISTUNGSMERKMALE

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

Die analytische Sensitivität des NeuMoDx EBV Quant Assay wurde durch Testen von EBV-negativen Plasmaproben bestätigt, die mit einer geringen Verdünnung des 1. Internationalen Standards der WHO für EBV für Nukleinsäureamplifikationstechniken versetzt waren. Dieser Bestätigungstest wurde bei der erwarteten Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des NeuMoDx EBV Quant Assay auf den NeuMoDx Systems – 200 IU/ml – durchgeführt. Die LoD war definiert als die niedrigste Zielkonzentration, die mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 95\%$ nachgewiesen werden kann. Die Studien wurde mit verschiedenen Systemen und qualifizierten Chargen der NeuMoDx Reagenzien durchgeführt. Die Nachweisraten sind in *Tabelle 2* dargestellt.

Tabelle 2: LoD-Bestimmung des NeuMoDx EBV Quant Assay; Positiv-Nachweisraten für Plasmaproben

Zielkonzentration [IU/ml]	PLASMA		
	Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate
200	120	117	97,5 %
0	60	0	0 %

Analytische Sensitivität – untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation , LLoQ)

Die untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ist definiert als die niedrigste Zielkonzentration, bei der ein Nachweis von $> 95\%$ erreicht wird UND der analytische Gesamtfehler (Total Analytical Error, TAE) $\leq 1,0$ ist. Zur Bestätigung von 200 IU/ml als sowohl die LoD als auch die LLoQ für den EBV Quant Assay wurde anhand der Ergebnisse der Trefferquotenanalyse der TAE bestimmt. Dieser berechnete TAE war definiert als:

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

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.

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

Zielkonz. [IU/ml]	Zielkonz. [log ₁₀ IU/ml]	Plasma				
		Konz.- Durchschnitt [log ₁₀ IU/ml]	Nachweis (%)	SD	Bias	TAE
200	2,30	2,35	97,5	0,28	0,05	0,61

Basierend auf dem Ergebnis dieser Studien wurden die LoD und die LLoQ des NeuMoDx EBV Quant Assay beide als 200,0 IU/ml [2,30 log₁₀ IU/ml] bestimmt.

Linearität und Bestimmung der oberen Bestimmungsgrenze (ULoQ)

Linearität und obere Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) des NeuMoDx EBV Quant Assay wurden in Plasma anhand einer Verdünnungsreihe des verkapselten EBV-Ziels von NeuMoDx und der Exact EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX, USA) mit etablierter Rückführbarkeit auf den 1. Internationalen WHO-Standard für EBV ermittelt. In gepooltem EBV-negativem Plasma wurde ein Panel mit 10 Proben vorbereitet, das einen Konzentrationsbereich von 2,0–8,0 log₁₀ IU/ml abdeckte. Die ULoQ des NeuMoDx EBV Quant Assay wurde als 8,0 log₁₀ IU/ml bestimmt. Es wurde ein Bestätigungspanel zur Bewertung der Linearität der Standardkurve vorbereitet. Die vom NeuMoDx System ausgegebenen EBV-Assaykonzentrationen im Vergleich mit den Erwartungswerten sind in *Abbildung 2* dargestellt.

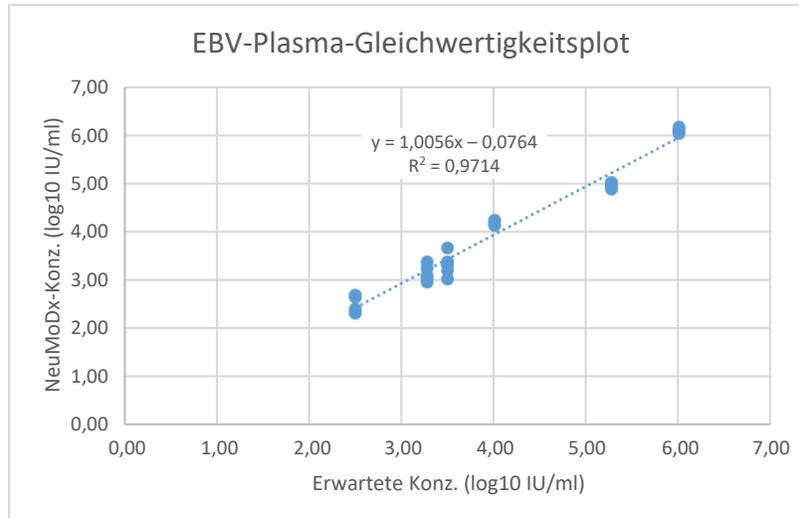


Abbildung 2: Linearität des NeuMoDx EBV Quant Assay

Analytische Spezifität – Kreuzreaktivität

Die analytische Spezifität wurde demonstriert, indem 35 in Blut-/Plasmaproben vorkommende Organismen sowie Spezies, die phylogenetisch mit EBV verwandt sind, auf Kreuzreaktivität gescreent wurden. Die Organismen wurden in hohen Konzentrationen in Pools zu jeweils 5–6 Organismen angesetzt. Die getesteten Organismen sind in *Tabelle 4* dargestellt. Mit keinem der getesteten Organismen wurde eine Kreuzreaktivität beobachtet, was eine analytische Spezifität von 100 % für den NeuMoDx EBV Quant Assay bestätigt.

Tabelle 4: Zur Demonstration der analytischen Spezifität verwendete Pathogene

Nicht-Zielorganismen					
BK-Polyomavirus	Adenovirus Typ 5	Herpes-simplex-Virus Typ 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Zytomegalievirus	Hepatitis-C-Virus	Herpes-simplex-Virus Typ 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Humanes Herpesvirus Typ 6	Parvovirus B19	Varicella-Zoster-Virus	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Humanes Herpesvirus Typ 7	JC-Virus	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Humanes Herpesvirus Typ 8	Humanes Papillomvirus 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Hepatitis-B-Virus	Humanes Papillomvirus 18	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Analytische Spezifität – Störende Stoffe, kommensale Organismen

Der NeuMoDx EBV 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 4* aufgeführt sind. EBV-negatives Plasma wurde mit den in Gruppen zu 4–7 gepoolten Organismen versetzt. Diese Pools wurden dann mit EBV-Ziel in einer Konzentration von 3 log₁₀ IU/ml versetzt. Es wurde keine signifikante Störung in Gegenwart dieser Organismen beobachtet, was aus der minimalen Abweichung der Bestimmung von Kontrollproben ohne störende Agenzien hervorgeht.

Analytische Spezifität – störende Stoffe, endogene und exogene Stoffe

Die Leistung des NeuMoDx EBV Quant Assay wurde in Gegenwart typischer exogener und endogener Störstoffe, die in klinischen EBV-Plasmaproben vorkommen, bewertet. Diese umfassten ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Blutkomponenten sowie häufige antivirale Medikamente und Immunsuppressiva, welche in *Tabelle 5* aufgelistet sind. Jeder Stoff wurde gescreent, EBV-negativem Humanplasma zugegeben, das mit 3 log₁₀ IU/ml EBV versetzt war, und die Proben wurden auf Störungen analysiert. Zusätzlich wurde auch für den mit einer EBV-Infektion verbundenen Krankheitszustand repräsentatives Plasma auf potenzielle Störungen getestet. Die durchschnittlichen Konzentrationen sowie das Bias aller getesteten Stoffe verglichen mit den mit der gleichen EBV-Konzentration versetzten Kontrollproben sind in *Tabelle 6* angegeben. Keine der exogenen und endogenen Stoffe beeinflusste die Spezifität des NeuMoDx EBV Quant Assay.

Tabelle 5: Störungstests – exogene Agenzien (Medikamenten-Klassifizierungen)

Pool	Name des Medikaments	Einstufung	Pool	Name des Medikaments	Einstufung
Pool 1	Azathioprin	Immunsuppressivum	Pool 4	Trimethoprim	Antibiotikum
	Cyclosporin	Immunsuppressivum		Vancomycin	Antibiotikum
	Foscarnet	Antiviren-Medikament (Herpesviridae)		Tacrolimus	Immunsuppressivum
	Ganciclovir	Antiviren-Medikament (EBV)		Everolimus	Immunsuppressivum
	Valganciclovirhydrochlorid	Antiviren-Medikament (EBV)		Clavulanat-Kalium	Antibiotikum
Pool 2	Prednison	Corticosteroid/Immunsuppressivum	Pool 5	Famotidin	Antihistaminikum
	Cidofovir	Antiviren-Medikament (EBV)		Sulfamethoxazol	Antibiotikum
	Cefotetan	Antibiotikum (Breitspektrum)		Valacyclovir	Antiviren-Medikament (Herpesviridae)
	Cefotaxim	Antibiotikum (Breitspektrum)		Letermovir	Antiviren-Medikament (EBV)
	Fluconazol	Antimykotikum		Ticarcillin-Dinatrium	Antibiotikum
Pool 3	Mycophenolat-Mofetil	Immunsuppressivum	Leflunomid	Immunsuppressivum	
	Mycophenolat-Natrium	Immunsuppressivum			
	Piperacillin	Antibiotikum			
	Sirolimus/Rapamycin	Immunsuppressivum			
	Tazobactam	Modifiziertes Antibiotikum			

Tabelle 6: Störungstests – exogene und endogene Agenzien

Endogen	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Hämoglobin	3,20	0,23
Triglyceride	3,15	0,28
Bilirubin	3,48	-0,05
Albumin	3,2	0,22
Exogen (Medikamente)	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Pool 1: Azathioprin, Cyclosporin, Foscarnet, Ganciclovir, Valganciclovirhydrochlorid	3,30	0,13
Pool 2: Prednison, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxim, Fluconazol	3,22	0,21
Pool 3: Mycophenolat-Mofetil, Mycophenolat-Natrium, Piperacillin, Sirolimus/Rapamycin, Tazobactam	3,36	0,07
Pool 4: Trimethoprim, Vancomycin, Tacrolimus, Everolimus, Clavulanat-Kalium	3,32	0,11
Pool 5: Famotidin, Sulfamethoxazol, Letermovir, Valacyclovir, Ticarcillin-Dinatrium, Leflunomid	3,47	-0,10
Krankheitszustand	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)	3,23	0,20
Antinukleäre Antikörper (ANA)	3,33	0,10
Rheumatoide Arthritis (RA)	3,19	0,24

Laborinterne Präzision

Die Präzision des NeuMoDx EBV Quant Assay wurde durch Testen von 3 Replikaten eines 4-teiligen Panels aus EBV-Proben bestimmt, die mit EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) hergestellt wurden. Die Tests wurden dreimal pro Tag und unter Einsatz von zwei NeuMoDx 288 Systems und einem NeuMoDx 96 System über zwei Tage durchgeführt. Die Intra-Lauf-, Intra-Tag- und Intra-System-Präzision wurden charakterisiert und die Gesamt-Standardabweichung wurde als $\leq 0,33 \log_{10}$ IU/ml bestimmt. Über alle Systeme, Tage und Läufe hinweg wurde eine ausgezeichnete Präzision demonstriert, wie in *Tabelle 7* zu sehen ist. 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 7: Laborinterne Präzision – NeuMoDx EBV Quant Assay auf NeuMoDx Systems

EBV-Zielkonz. [\log_{10} IU/ml]	EBV-Durchschnittskonz. [\log_{10} IU/ml]	Intra-System-SD	Intra-Tag-SD	Intra-Lauf-SD	Gesamt SD (laborintern)
5,2	5,30	0,27	0,25	0,25	0,27
4,2	4,25	0,21	0,21	0,12	0,21
3,2	3,38	0,22	0,20	0,20	0,22
2,7	3,03	0,30	0,30	0,30	0,33

Interchargen-Reproduzierbarkeit

Die Interchargen-Reproduzierbarkeit des NeuMoDx EBV Quant Assay wurde durch Bewertung von drei Chargen der wesentlichen Reagenzien – NeuMoDx EBV Quant Test Strips und Lysis Buffer 5 – im Rahmen der Qualifikationsprüfung (Qualification Testing, QT) ermittelt. Zur Bewertung der Leistung wurde ein 4-teiliges Panel aus EBV-positivem Plasma verwendet (*Tabelle 8*). Die Variation innerhalb der und zwischen den Chargen wurde analysiert und die Ergebnisse sind in den *Tabellen 8–9* aufgeführt. Für die NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strips lag das maximale Gesamt-Bias bei $0,03 \log_{10}$ IU/ml und die maximale Gesamt-SD bei $0,20 \log_{10}$ IU/ml. Für den NeuMoDx Lysis Buffer 5 lag das maximale Gesamt-Bias bei $0,12 \log_{10}$ IU/ml und die maximale Gesamt-SD bei $0,41 \log_{10}$ IU/ml. Es wurde eine über alle Chargen hinweg gleichbleibende Leistung demonstriert, da die Bestimmung aller Panel-Mitglieder innerhalb der Toleranzanforderungen lag.

Tabelle 8: Interchargen-Reproduzierbarkeit – NeuMoDx EBV Quant Assay, Test Strip

EBV-Zielkonz. [IU/ml]	EBV-Durchschnittskonz. [\log_{10} IU/ml]	N (Gültige Ergebnisse pro Charge)	Bias	Interchargen-SD	Intrachargen-SD	Gesamt-SD
5,0	4,98	18	0,02	0,06	0,08	0,10
4,0	3,98	18	0,02	0,08	0,09	0,12
3,0	3,02	18	0,02	0,06	0,10	0,12
2,0	2,03	18	0,03	0,05	0,20	0,20

Tabelle 9: Interchargen-Reproduzierbarkeit – NeuMoDx EBV Quant Assay, Lysis Buffer 5

EBV-Zielkonz. [\log_{10} IU/ml]	EBV-Durchschnittskonz. [\log_{10} IU/ml]	N (Gültige Ergebnisse pro Charge)	Bias	Interchargen-SD	Intrachargen-SD	Gesamt-SD
5,0	4,97	5	0,03	0,05	0,03	0,06
4,0	3,96	5	0,04	0,22	0,10	0,24
3,0	3,03	5	0,03	0,09	0,11	0,15
2,0	2,12	5	0,12	0,39	0,13	0,41

Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle

Die Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1) ist im NeuMoDx EBV Quant Assay enthalten, um Prozessschrittfehler oder Inhibition nachzuweisen, die die Leistung des Assays beeinträchtigen könnten. Die Effizienz der SPC1 wurde für Plasmaproben unter Anwendung des NeuMoDx CMV Quant Assay als Modell unter Bedingungen getestet, die repräsentativ für kritische Fehlschläge von Verarbeitungsschritten sind, welche potenziell bei der Probenverarbeitung auftreten und von den Sensoren des NeuMoDx System zur Leistungsüberwachung *möglicherweise nicht erkannt* werden. Cytomegalie-Virus-positive (bei $3 \log_{10}$ IU/ml) und -negative Proben wurden unter folgenden Bedingungen getestet: Vorliegen eines Inhibitors, keine Waschlösung abgegeben, kein Wasch-Blowout. Prozessschwächen, die sich nachteilig auf den Nachweis/die Bestimmung des viralen Ziels auswirkten, spiegelten sich in der Leistung des SPC1-Ziels wider, wie in *Tabelle 10* 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 Detektion und Bestimmung von SPC1 und viralem Ziel hatten. Daher erwies sich die SPC1 als erfolgreich bei der Überwachung der Assayleistung auf dem NeuMoDx System.

Tabelle 10: Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle für virale DNA in Plasma*

Getesteter Prozessschrittfehler	Amplifikationsstatus Probenprozesskontrolle 1	Status der CMV-Zielamplifikation	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

*Als Modellsystem zur Bewertung der Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle wurde Cytomegalie-Virus (CMV) in Plasmaproben verwendet.

Kreuzkontamination

Die Kreuzkontaminationsrate für Plasmaproben wurde durch die abwechselnde Verarbeitung stark positiver und negativer Proben eines ähnlichen über das Blut übertragenen DNA-Virus, des Cytomegalie-Virus (CMV), bestimmt. Es wurden drei Sätze dieser schachbrettartigen Tests mit insgesamt 108 Replikaten von CMV-negativem Plasma und 108 Replikaten von mit 6,0 log₁₀ IU/ml CMV versetztem Plasma durchgeführt. Alle 108 Replikate der negativen Proben wurden als negativ gemeldet, was zeigt, dass während der Verarbeitung der Plasmaproben im NeuMoDx System keine Kreuzkontamination aufgetreten ist.

Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Unter Anwendung eines ähnlichen über das Blut übertragenen Virus, des Cytomegalie-Virus (CMV), wurden Tests durchgeführt, um die Gleichwertigkeit von frischen und gefrorenen Plasmaproben zu demonstrieren. Die frischen Proben wurden bei 4 °C aufbewahrt, bis sie mit drei Konzentrationen von CMV versetzt und auf Gleichwertigkeit 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 frische vs. gefrorene Plasmaproben wurden mittels Regressionsanalyse auf ihre Gleichwertigkeit untersucht. Die Daten ergaben eine ausgezeichnete Gleichwertigkeit zwischen frischen und gefrorenen Plasmaproben, mit einer Steigung von 1,0 und einem sehr geringen Bias (Achsenabschnitt), wie in *Tabelle 11* unten dargestellt.

Tabelle 11: Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Parameteranforderung	Frisch vs. gefroren, EDTA
Steigung [0,9–1,1]	1,000
Achsenabschnitt < 0,5 log ₁₀ IU/ml	0,020
p-Wert > 0,05	0,631

Charakterisierung der Quantifizierungsleistung

Die Quantifizierungsleistung des NeuMoDx EBV Quant Assay wurde charakterisiert, indem zwei im Handel erhältliche EBV-Verifizierungspanels von AcroMetrix und Exact Diagnostics (rückführbar auf den 1. Internationalen Standard der WHO für EBV) auf den NeuMoDx Molecular Systems verarbeitet wurden.

Es wurde eine ausgezeichnete Korrelation zwischen dem NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 und den zwei im Handel erhältlichen EBV-Verifizierungspanels erhalten (*Abbildung 3*), sowohl mittels Deming-Regression (*Abbildung 3A*) als auch mittels Passing-Bablok-Methode (*Abbildung 3B*).

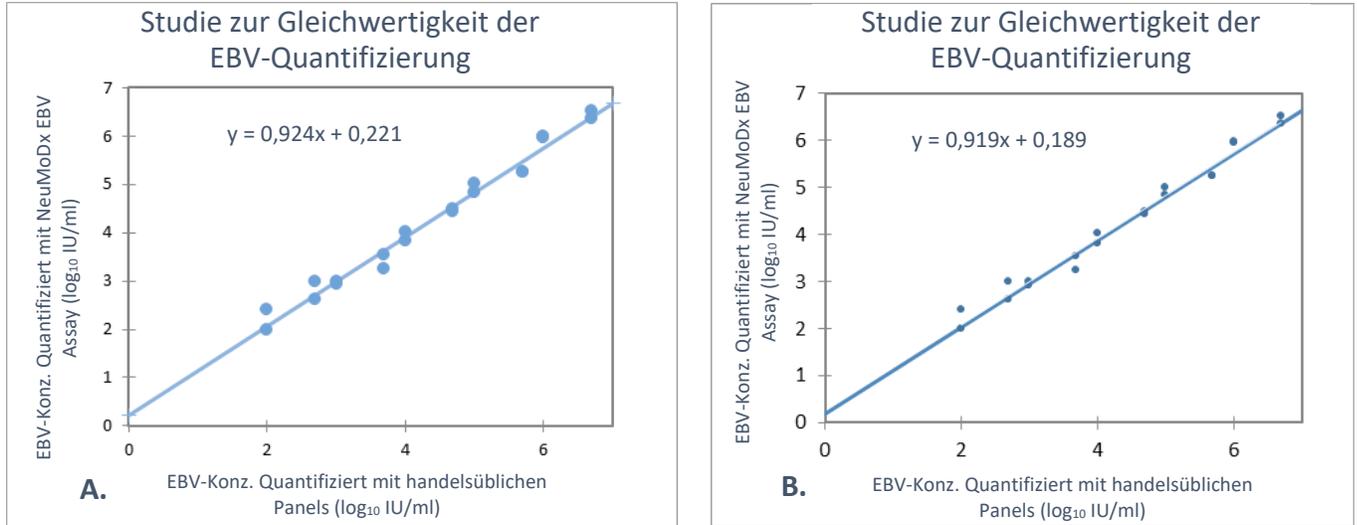


Abbildung 3. Gleichwertigkeitsplot zwischen AcroMetrix und Exact Diagnostics Verifizierungspanels und NeuMoDx EBV Quant Assay.

A. Lineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Deming-Methode. B. Lineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Passing-Bablok-Methode.

Die Qualität der Anpassung der Deming-Regression wird durch einen Gesamt-Steigungskoeffizienten von 0,92 und einen Achsenabschnitt (Bias) von 0,22 illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx EBV Quant Assay und den EBV-Verifizierungspanels erhaltenen Konzentrationsergebnisse korreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen. Die lineare Passing-Bablok-Anpassung unterstützt mit einem Gesamt-Steigungskoeffizienten von 0,92 und einem Achsenabschnitt (Bias) von 0,19 ebenfalls die Signifikanz der Korrelation zwischen den mit dem NeuMoDx EBV Quant Assay und den EBV-Verifizierungspanels erhaltenen Ergebnissen. Der *p*-Wert der Passing-Bablok-Analyse wurde als 0,40 berechnet.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Deming- und der linearen Passing-Bablok-Regressionsanalyse

Deming-Analyse		Passing-Bablok-Analyse	
Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient	Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient
0,22	0,92	0,19	0,92
95%-KI (-0,11, 0,55)	95%-KI (0,86, 0,99)	95%-KI (-0,08, 0,41)	95%-KI (0,87, 0,99)

LITERATUR

1. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
2. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. Transplant Direct. 2016 Jan; 2(1): e48.
3. Evidence based clinical practice guideline for management of EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) in solid organ transplant. Cincinnati Children’s Hospital Medical Center. 2011- June, revised Jan, 2012.
<https://www.guidelinecentral.com/summaries/evidence-based-clinical-practice-guideline-for-management-of-ebv-associated-post-transplant-lymphoproliferative-disease-ptld-in-solid-organ-transplant/>
4. Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients. American Journal of Transplantation 2009; 9 (Suppl 4): S87–S96. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02898.x
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARKENNAMEN

NeuMoDx™ ist eine Marke von NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry™ ist eine Marke von NeuMoDx Molecular, Inc.

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

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

SYMBOLE

SYMBOL	BEDEUTUNG
R only	Nur zur Anwendung durch Fachpersonal
	Hersteller
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">IVD</div>	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
<div style="display: inline-block; border: 1px solid black; padding: 2px;">EC</div> <div style="display: inline-block; border: 1px solid black; padding: 2px; margin-left: 10px;">REP</div>	Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">REF</div>	Katalognummer
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">LOT</div>	Chargencode
	Verfallsdatum
	Zulässiger Temperaturbereich
	Zulässiger Luftfeuchtigkeitsbereich
	Nicht zur Wiederverwendung
	Inhalt ausreichend für $\langle n \rangle$ Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vorsicht
	Biologische Risiken
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