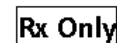



201800 NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip
UPOZORNĚNÍ: Pouze pro export do USA

 Pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx™ 288 Molecular System a NeuMoDx™ 96 Molecular System

Před použitím produktu si určitě pečlivě prostudujte tuto příbalovou informaci. Je nutné odpovídajícím způsobem dodržovat pokyny uvedené v příbalové informaci.
Spolehlivost výsledků analýzy nelze zaručit, pokud dojde k odchýlení od pokynů uvedených v této příbalové informaci.
Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx™ 288 Molecular System, výr. č. 40600108.
Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx™ 96 Molecular System, výr. č. 40600317.


ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay je automatizovaný *in vitro* test amplifikace nukleové kyseliny pro identifikaci a kvantifikaci DNA BK viru (BKV) ve vzorcích extrahovaných z lidské plazmy/séra a moči. Analýza NeuMoDx BKV prováděná na molekulárních soustavách NeuMoDx™ 288 Molecular System a NeuMoDx™ 96 Molecular System (soustava (soustavy) NeuMoDx™ System) obsahuje automatizovanou extrakci DNA k izolování cílové nukleové kyseliny ze vzorku a polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (Polymerase Chain Reaction, PCR) k zacílení na sekvence v genomu BKV.

Analýza NeuMoDx BKV Quant Assay je spolu s dalšími klinickými a laboratorními nálezy určena jako pomůcka při diagnostice a sledování infekce BK virem.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Plnou lidskou krev, odebranou do sterilních zkumavek pro odběr krve, které obsahují kyselinu ethylendiamintetraoctovou (Ethylendiaminetetraacetic Acid, EDTA) jako antikoagulant, případně odebranou do zkumavek pro přípravu plazmy (Plasma Preparation Tubes, PPT), lze použít pro přípravu plazmy, zatímco sérum by mělo být odebráno do zkumavek pro separaci séra nebo zkumavek pro separaci (Serum Separation Tubes, SST). Pro testování vzorku moči se vzorek moči odebírá do běžného pohárku na odběr moči bez konzervačních nebo přídatných látek. Aby byly plazma/sérum nebo moč připraveny k testování, vloží se v primární nebo sekundární zkumavce se vzorkem kompatibilní se soustavou NeuMoDx™ System pomocí k tomu určeného stojanu na zkumavky se vzorkem do soustavy NeuMoDx™ System, kde začne automatizované zpracování. U vzorků plazmy/séra se alikvotní podíl vzorku 550 µl smísí s lyzačním pufrům NeuMoDx™ Lysis Buffer 1 z přístroje anebo se alikvotní podíl vzorku plazmy/séra 100 µl smísí s lyzačním pufrům NeuMoDx™ Lysis Buffer 5. U vzorků moči se alikvotní podíl vzorku 550 µl smísí s lyzačním pufrům NeuMoDx™ Lysis Buffer 2 z přístroje. Soustava NeuMoDx™ System automaticky provede všechny kroky nezbytné k získání cílové nukleové kyseliny, přípravě izolované DNA pro amplifikaci pomocí PCR v reálném čase a, pokud jsou přítomny, k amplifikaci a detekci produktů amplifikace. Analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay obsahuje kontrolu zpracování vzorků DNA (Sample Process Control, SPC1), která pomáhá sledovat přítomnost možných inhibičních látek a také selhání soustavy NeuMoDx™ System nebo reagentie, ke kterému může dojít během extrakce a amplifikace.

BK polyomavirus (BKV) je členem rodiny dvouvláknových DNA (dsDNA) virů Polyomaviridae. BKV způsobuje běžnou dětskou infekci bez větších klinických následků a přibližně > 80 % dospělých je séropozitivních na BKV.¹ Primární infekce tímto dsDNA virem je obecně asymptomatická a vyskytuje se v dětství. Nejběžnějšími příznaky, pokud jsou zaznamenány, jsou horečka a nespecifická infekce horních cest dýchacích.² Jakmile dojde k primární infekci, virus může zůstat latentní na mnoha místech, zejména v ledvinách. K přenosu může dojít při kontaktu s tělesnými tekutinami. Ve stavech relativní nebo absolutní buněčné imunodeficiency se virus může reaktivovat a vyvolat onemocnění.²

Kvantifikace virové zátěže v plazmě/séru a moči pomocí PCR je standardním klinickým nástrojem pro sledování reaktivity BKV. Studie uvádějící kvantitativní výsledky z PCR pro BKV vykazují pozitivní korelaci mezi vyšší virovou zátěží a zvýšenou pravděpodobností vzniku nefropatie spojené s BKV (BKVAN)¹. Dalšími klinickými nástroji používanými k popisu agregátů BKV v moči je elektronová mikroskopie, která počítá trojrozměrné agregáty BKV. Analýza však není vzhledem k nákladům a omezené dostupnosti elektronové mikroskopie v rutinní klinické praxi proveditelná.¹

PRINCIPY POSTUPU

K provedení analýzy využívá analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay na soustavě NeuMoDx™ System testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, kalibrační soupravu NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit, soupravu pro externí kontrolu NeuMoDx™ BKV External Control Kit, lyzační pufr NeuMoDx™ Lysis Buffer 1, lyzační pufr NeuMoDx™ Lysis Buffer 2, lyzační pufr NeuMoDx™ Lysis Buffer 5 a obecně použitelné reagentie NeuMoDx™. Teplota pro uchovávání reagentie je +15/+30 °C.

Analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay v sobě spojuje automatizovanou extrakci DNA, amplifikaci a detekci pomocí PCR v reálném čase. Vzorky plazmy/séra nebo moči v primárních nebo sekundárních zkumavkách se vzorkem, kompatibilních se soustavou NeuMoDx™ System, jsou umístěny do stojanu na zkumavky se vzorkem, který je poté vložen do soustavy NeuMoDx™ System ke zpracování. Žádný další zásah obsluhy není nutný.

Soustavy NeuMoDx™ System k automatickému provedení buněčné lýzy, extrakce DNA a odstranění inhibitorů využívají kombinace zahřívání, působení lytických enzymů a extrakčních reagentie. Uvolněné nukleové kyseliny jsou zachyceny paramagnetickými částicemi. Částice se s navázanými nukleovými kyselinami vloží do zásobníku NeuMoDx™ Cartridge, kde se nenavázané složky, jiné než DNA, dále vymyjí promývací reagentie NeuMoDx™ Wash Reagent a navázaná DNA se eluuje pomocí uvolňovací reagentie NeuMoDx™ Release Reagent. Soustavy NeuMoDx™ System potom eluovanou DNA využijí k rehydrataci patentově chráněných amplifikačních reagentie Sentinel CH. (STAT-NAT® technology), které obsahují všechny prvky nezbytné k PCR amplifikaci cílů specifických na BKV a SPC1. Po rekonstituci lyofilizovaných reagentie PCR soustava NeuMoDx™ System nadávákuje připravenou PCR-ready směs do zásobníku NeuMoDx™ Cartridge. K amplifikaci a detekci kontrolní a cílové (pokud je přítomna) sekvence DNA dochází v PCR komoře zásobníku NeuMoDx™ Cartridge. Zásobník NeuMoDx™ Cartridge je navržen tak, aby obsahoval amplikon po PCR v reálném čase, čímž se prakticky eliminuje riziko kontaminace po amplifikaci.

Amplifikované cíle jsou detekovány v reálném čase pomocí chemizmu hydrolyzační sondy (běžně označovaný jako chemizmus TaqMan®) za použití fluorogenních oligonukleotidových molekul sondy, specifických pro amplikony jejich příslušných cílů.

Sondy TaqMan® sestávají z fluoroforu kovalentně připojeného k 5' konci oligonukleotidové sondy a ze zhášedla na 3' konci. Když je sonda neporušená, fluorofor a zhášedlo jsou v blízkosti, což má za následek, že molekula zhášedla zháší fluorescenci emitovanou fluoroforem prostřednictvím Försterova rezonančního přenosu energie (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

TaqMan® sondy jsou určeny k reasociaci v úseku DNA amplifikovaném specifickou sadou primerů. Jak polymeráza Taq DNA prodlužuje primer a syntetizuje nové vlákno, 5' až 3' exonukleázová aktivita polymerázy Taq DNA degraduje sondu, která reasociovala na templát. Degradaci sondy se uvolňuje fluorofor a rozbíjí blízkost ke zhášedlu, takže účinek zhášení je díky FRET překonán a je možná detekce fluoroforu fluorescencí. Výsledný fluorescenční signál, detekovaný v termocykleru soustavy NeuMoDx™ System s kvantitativní PCR je přímo úměrný uvolněnému fluoroforu a lze jej korelovat s množstvím přítomné cílové DNA.³

K detekci DNA BKV a DNA SPC1 se používají sondy TaqMan® značené fluorofory na 5' konci a zhášedly na 3' konci. Software soustavy NeuMoDx™ System monitoruje fluorescenční signál vydávaný sondami TaqMan na konci každého amplifikačního cyklu. Když je amplifikace hotova, software soustavy NeuMoDx™ System údaje analyzuje a podá zprávu o konečném výsledku (POSITIVE (POZITIVNÍ) / NEGATIVE (NEGATIVNÍ) / INDETERMINATE (NEURČITÝ) / UNRESOLVED (NEROZLIŠENO) / NO RESULT (BEZ VÝSLEDKU)). Pokud je výsledek pozitivní a vypočítaná koncentrace je v mezích stanovitelnosti, software soustavy NeuMoDx System také poskytuje kvantitativní hodnotu spojenou se vzorkem.

REAGENCIE / SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Dodaný materiál

REF.	Obsah	Počet jednotek v balení	Počet testů na jednotku	Počet testů v balení
201800	Testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip Vysušené reagencie PCR obsahující TaqMan® sondy a primery specifické na BKV spolu s TaqMan® sondou a primery specifickými na SPC1.	6	16	96

Požadované, ale nedodávané reagencie a spotřební materiál (k dispozici samostatně od společnosti NeuMoDx)

REF.	Obsah
100200	NeuMoDx™ Extraction Plate Suché paramagnetické částice, lytický enzym a kontroly zpracování vzorků
800600	NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit Jednorázové sady suchých kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot BKV pro stanovení validity standardní křivky
900601	NeuMoDx™ BKV External Control Kit Jednorázové sady suchých kontrol pozitivních na BKV a negativních kontrol pro stanovení každodenní validity analýzy NeuMoDx BKV Quant Assay
400400	NeuMoDx™ Lysis Buffer 1
400500	NeuMoDx™ Lysis Buffer 2
400900	NeuMoDx™ Lysis Buffer 5
400100	NeuMoDx™ Wash Reagent
400200	NeuMoDx™ Release Reagent
100100	NeuMoDx™ Cartridge
235903	Hroty Hamilton CO-RE (300 µl) s filtry
235905	Hroty Hamilton CO-RE (1000 µl) s filtry

Potřebné přístrojové vybavení

Molekulární soustava NeuMoDx™ 288 Molecular System [REF 500100] nebo NeuMoDx™ 96 Molecular System [REF 500200]

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip je určen pouze pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx™ System.
- Před provedením testu si prostudujte všechny pokyny obsažené v příbalové informaci v soupravě.
- Spotřební materiál ani reagencie po uvedené době expirace nepoužívejte.

- Nepoužívejte žádné reagenty, pokud je bezpečnostní těsnění rozbito nebo je při dodání poškozen obal.
- Spotřební materiál nebo reagenty nepoužívejte, pokud je ochranný váček při dodání otevřený nebo rozbitý.
- Nemíchejte reagenty pro amplifikaci z jiných komerčních souprav.
- Nepoužívejte opakovaně.
- Všechny testovací proužky NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip chraňte před světlem a vlhkostí a uchovávejte je v hliníkových pouzdrech.
- K dispozici musí být platná kalibrace testování (generovaná zpracováním kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot z kalibrační soupravy NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit REF 800600) předtím, než lze výsledky testu generovat pro klinické vzorky.
- Souprava pro externí kontrolu NeuMoDx™ BKV External Control Kit (REF 900601) musí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay zpracována každých 24 hodin.
- Minimální objem vzorku závisí na velikosti zkumavky, stojanu se vzorky a postupu zpracování objemu vzorku, jak je definován níže. Objem menší, než je specifikované minimum, může vést k chybě „Quantity Not Sufficient“ (Nedostatečné množství).
- Provádění analýzy BKV na vzorcích skladovaných při nevhodných teplotách nebo po určené době skladování může za použití testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip přinést neplatné nebo chybné výsledky.
- U všech reagentů a spotřebního materiálu zabraňte mikrobiální a deoxyribonukleázové (DNázové) kontaminaci. Při použití sekundárních zkumavek se vzorkem se doporučuje používat sterilní jednorázové přenosové pipety bez DNázy. Pro každý vzorek použijte novou pipetu.
- Abyste předešli kontaminaci, se zásobníkem NeuMoDx™ Cartridge po amplifikaci nemanipulujte ani jej nerozebírejte. Za žádných okolností nevyjímajte zásobníky NeuMoDx™ Cartridge z nádoby na biologicky nebezpečný odpad (NeuMoDx™ 288 Molecular System) nebo z koše na nebezpečný biologický odpad (NeuMoDx™ 96 Molecular System). Zásobník NeuMoDx™ Cartridge je zkonstruován tak, aby kontaminaci zabraňoval.
- V případě, že laboratoř provádí také testy PCR s otevřenými zkumavkami, musí být zajištěno, že testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, doplňkový spotřební materiál a reagenty nezbytné k testování, ochranné osobní prostředky, jako například rukavice a laboratorní pláště, a soustava NeuMoDx™ System nebudou kontaminovány.
- Při manipulaci s reagenty a spotřebním materiálem NeuMoDx™ byste měli nosit čisté nitrilové rukavice bez obsahu pudru. Měli byste dávat pozor, abyste se nedotýkali horního povrchu zásobníku NeuMoDx™ Cartridge, fóliového těsnění testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip ani extrakční destičky NeuMoDx™ Extraction Plate, případně horního povrchu nádob s lyzačními pufrů NeuMoDx™ Lysis Buffer 1, 2 a 5; při manipulaci se spotřebním materiálem a reagenty byste se měli dotýkat pouze bočních stran.
- Pro každou reagentii jsou v příslušných případech poskytnuty bezpečnostní listy (BL), viz www.neumodx.com/client-resources.
- Svislá čára u okraje textu označuje změny ve srovnání s předchozí verzí návodu k použití.
- Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy. Nekuřte, nepijte ani nejzte v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo reagenty.
- Se vzorky vždy zacházejte tak, jako by byly infekční, a v souladu s bezpečnými laboratorními postupy, které jsou například popsány dle normy OSHA pro krevní patogeny⁴, úroveň biologické bezpečnosti 2⁵, anebo v souladu s jinými vhodnými postupy biologické bezpečnosti^{6,7}, určené pro materiály, které obsahují nebo u nich panuje podezření, že obsahují infekční agens.
- Nepoužité reagenty a odpad likvidujte podle státních, federálních, oblastních a místních předpisů.
- Výsledky analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay by měly být interpretovány ve spojení s ostatními klinickými a laboratorními nálezy.
- Stejně jako u jiných testů negativní výsledky neznamenají vyloučení infekce BKV.

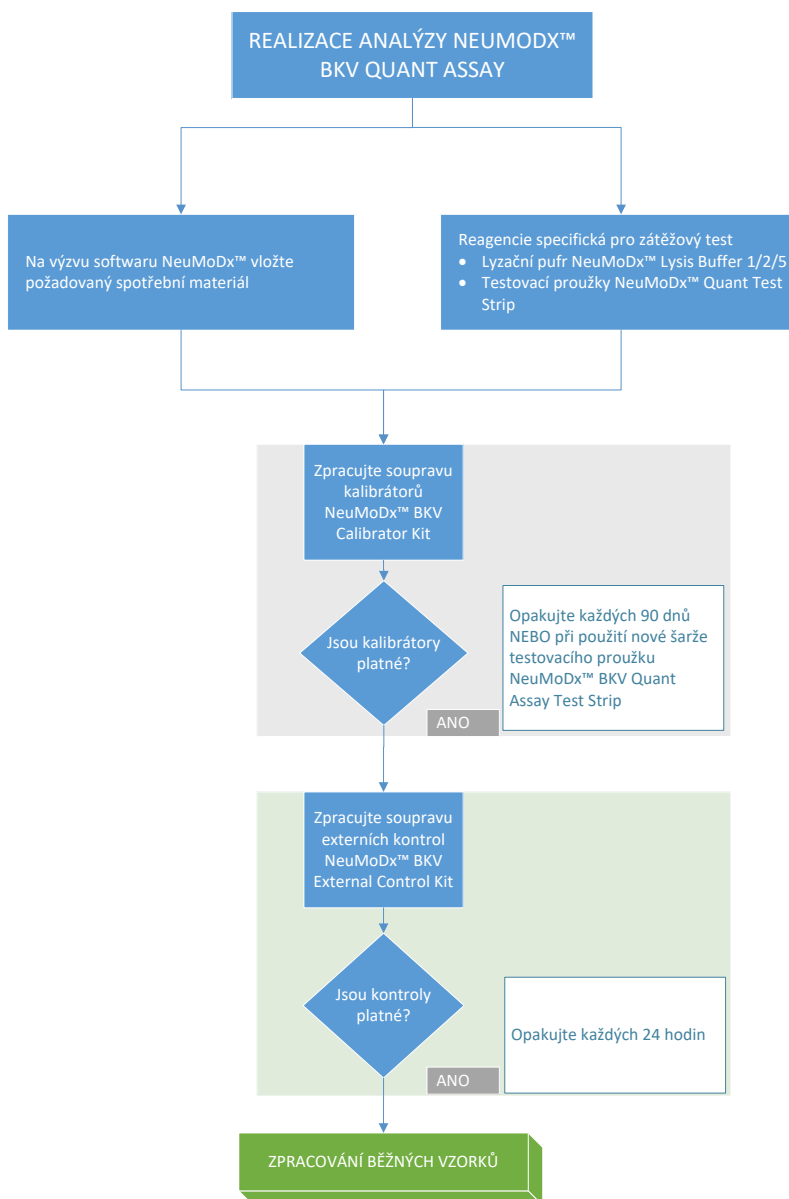
UCHOVÁVÁNÍ, MANIPULACE A STABILITA PRODUKTU

- Testovací proužky NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip jsou stabilní v primárním obalu po dobu expirace uvedenou na štítku produktu při skladování při teplotě mezi 15 a 30 °C.
- Testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip vložený do soustavy NeuMoDx™ System je stabilní po dobu 32 dní; software soustavy NeuMoDx™ System vyzve k vyjmutí testovacích proužků, které byly v soustavě NeuMoDx™ System používány déle než 32 dnů a bude třeba otevřít a do soustavy NeuMoDx System vložit nové testovací proužky NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip. Během vkládání do soustavy NeuMoDx System neodstraňujte z proužku hliníkovou fólii.
- Kalibrátory a kontroly NeuMoDx™ jsou neinfekční, ale po použití by měly být zlikvidovány s laboratorním biologicky nebezpečným odpadem, jelikož po zpracování na soustavě budou obsahovat cílový materiál, což by při nesprávné manipulaci mohlo způsobit kontaminaci.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

1. Se všemi vzorky manipulujte, jako kdyby byly schopné přenosu infekčních agens.
2. Plnou krev ani vzorky plazmy/séra skladované v primárních zkumavkách nezmrazujte.
3. Pro přípravu vzorků plazmy by měla být plná krev odebrána do sterilních zkumavek za použití EDTA jako antikoagulantu. Vzorky séra by měly být připraveny ve zkumavkách pro separaci séra. Vzorky moči by měly být odebírány do sterilních zkumavek nebo pohárků. Postupujte podle pokynů výrobce zkumavek pro odběr vzorků.
4. Plná krev odebraná v zařízeních vyjmenovaných výše může být před přípravou plazmy/séra skladována a/nebo přepravována až po dobu 24 hodin při 2 °C až 8°C. Příprava vzorků by měla být prováděna podle pokynů výrobce.
5. Skladování čerstvé, nezpracované moči při okolní teplotě by mělo být minimalizováno, protože nízké pH a vysoký obsah močoviny DNA rychle denaturují, zejména při teplotě 25 °C a vyšší.
6. Připravené vzorky plazmy/séra a moči mohou před zpracováním zůstat v soustavě NeuMoDx[™] System po dobu až 24 hodin. Pokud je třeba delší doby skladování, doporučujeme vzorky buď zchladit, nebo zmrazit jako sekundární alikvotní podíly.
7. Připravené vzorky plazmy/séra a moči by při teplotě 2 až 8 °C neměly být před testováním skladovány déle než 8 dnů a maximálně 24 hodin při teplotě místnosti.
8. Připravené vzorky mohou být před zpracováním skladovány při teplotě < -20 °C po dobu až 8 týdnů v případě plazmy a 2 týdny v případě séra; jak vzorky plazmy, tak vzorky séra by před použitím neměly být vystaveny více než 2 cyklům zmrazení/rozmrazení:
 - a. Pokud jsou vzorky zmrazené, nechte je úplně rozmrazit při teplotě místnosti (15–30 °C); pro vytvoření rovnoměrně rozloženého vzorku vzorek zviřte.
 - b. Jakmile jsou zmrazené vzorky rozmrazeny, testování by mělo proběhnout do 24 hodin.
 - c. Zmrazení plazmy/séra ve zkumavkách pro primární odběr se nedoporučuje.
9. Po zpracování mohou být vzorky moči skladovány při teplotě 2 až 8 °C.
10. Pokud jsou vzorky přepravovány, měly by být zabaleny a označeny v souladu s platnými předpisy země a/nebo mezinárodními předpisy.
11. Zřetelně vzorky označte a uveďte, že se jedná o vzorky k testování BKV.
12. Přejděte k části *Příprava testu*.

Celý proces realizace analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay je shrnutý níže, viz *Obrázek 1*:



Obrázek 1: Pracovní postup při realizaci analýzy NeuMoDx BKV Quant Assay

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava testu

V případě vzorků plazmy/séra může analýza NeuMoDx BKV Quant Assay proběhnout přímo v primárních zkumavkách pro odběr krve, případně z alikvotních podílů vzorků v sekundárních zkumavkách. Zpracování lze spustit pomocí jednoho ze dvou pracovních postupů zpracování objemů vzorků – pracovní postup pro zpracování vzorku o objemu 550 µl nebo pracovní postup pro zpracování vzorku o objemu 100 µl. Vzorky moči jsou zpracovány pouze pomocí pracovního postupu pro zpracování vzorku o objemu 550 µl.

1. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx™ System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky. Primární zkumavka na odběr krve může být označena a po odstředění umístěna přímo do 32místného stojanu na zkumavky se vzorkem; viz pokyny výrobce.
2. Pokud testujete vzorek plazmy/séra v primární odběrové zkumavce, vložte zkumavku označenou čárovým kódem do stojanu na zkumavky se vzorkem a před vložením do soustavy NeuMoDx System se ujistěte, že je sejmuto víčko. Minimální objemy **nad** gelovou vrstvou / buffy coat jsou definovány níže a budou splněny, pokud budou vzorky odebrány a zpracovány podle pokynů výrobce zkumavek. U vzorků, které jsou odebrány nesprávně, není provedení testu zaručeno.

Odběr krve Typ zkumavky	Minimální požadovaný objem vzorku	
	Pracovní postup pro 550 µl	Pracovní postup pro 100 µl
SST – 3,5 ml	1 550 µl	1 150 µl
PPT/SST – 5,0 ml	1 800 µl	1 400 µl
PPT/SST – 8,5 ml	2 500 µl	2 150 µl
K ₂ EDTA/sérum – 4,0 ml	1050 µl	650 µl
K ₂ EDTA/sérum – 6,0 ml	1250 µl	850 µl
K ₂ EDTA/sérum – 10,0 ml	1600 µl	1 200 µl

3. V případě vzorků moči anebo v případě vzorků plazmy/séra v sekundární zkumavce přeneste alikvotní podíl vzorku do zkumavky se vzorkem opatřené čárovým kódem, která je kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, a to podle objemů definovaných níže:

Stojan na zkumavky se vzorkem	Velikost zkumavky	Minimální požadovaný objem vzorku	
		Pracovní postup pro 550 µl	Pracovní postup pro 100 µl (pouze pro plazmu/sérum)
32-Tube Specimen Tube Carrier (32místný stojan na zkumavky se vzorkem)	Průměr 11–14 mm a výška 60–120 mm	700 µl	350 µl
24-Tube Specimen Tube Carrier (24místný stojan na zkumavky se vzorkem)	Průměr 14,5–18 mm a výška 60–120 mm	1 100 µl	750 µl
Low Volume Specimen Tube Carrier (Stojan na zkumavky se vzorkem o malém objemu)	1,5ml mikrocentrifugační zkumavka s kónickým dnem	650 µl	250 µl

Obsluha soustavy NeuMoDx System

Podrobné pokyny naleznete v návodech k obsluze molekulárních soustav NeuMoDx™ 288 Molecular System a NeuMoDx™ 96 Molecular System (výr. č. 40600108 a 40600317).

1. Podle požadovaného typu zkumavky a vzorku načtěte do soustavy NeuMoDx System objednávku testu:
 - Objem vzorku 550 µl je testován definováním typu vzorku jako „Plasma“ (Plazma), „Serum“ (Sérum) nebo „Urine“ (Moč).
 - Objem vzorku 100 µl je testován definováním typu vzorku jako „Plasma2“ (Plazma 2) nebo „Serum2“ (Sérum 2).
 - Pokud to není v objednávce testu definováno, použijte se jako výchozí typ vzorku **Plasma** (Plazma) ve zkumavce **Secondary Tube** (Sekundární zkumavka).
2. Rozstříhnete hliníková pouzdra testovacích proužků NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip v místě označeném bočními zářezy.
3. Proužky z pouzdra vyjměte až těsně před použitím.
4. Před použitím pouzder se vždy ujistěte, že jsou dobře uzavřeny a že je stále uvnitř sáček s vysoušedlem. Používejte pouze tehdy, je-li obal nepoškozen.

5. Pokud se barva sáčků s vysoušečem změní z oranžové na zelenou, hliníková pouzdra a jejich obsah zlikvidujte.
6. Osadte jeden nebo více stojanů na testovací proužky NeuMoDx™ Test Strip testovacím proužkem (proužky) NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip a k založení stojanu (stojanů) na testovací proužky do soustavy NeuMoDx™ System použijte dotykovou obrazovku.
7. Pokud vás software soustavy NeuMoDx™ System vyzve, přidejte do stojanu na spotřební materiál soustavy NeuMoDx™ System nezbytný spotřební materiál a k založení stojanu (stojanů) do soustavy NeuMoDx™ System použijte dotykovou obrazovku.
8. Pokud vás software soustavy NeuMoDx™ System vyzve, vyměňte podle potřeby promývací reagenty NeuMoDx™ Wash Reagent, uvolňovací reagenty NeuMoDx™ Release Reagent, vyprázdněte odpadní reagenty z plnění, nádobu na biologicky nebezpečný odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 288 Molecular System), odpadní koš na hroty (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System) nebo koš na nebezpečný biologický odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System).
9. Pokud vás software soustavy NeuMoDx™ System vyzve, zpracujte dle nutnosti kalibrátory calibrators (REF 800600) a/nebo externí kontroly external controls (REF 900601). Další informace, týkající se kalibrátorů a kontrol, lze najít v části *Zpracování výsledků*.
10. Zkumavku (zkumavky) se vzorky/kalibrátory/kontrolami vložte do běžného 32místného stojanu na zkumavky a ujistěte se, že jsou ze všech zkumavek odstraněna víčka.
11. Stojan na zkumavky se vzorkem umístěte do jakékoli otevřené pozice na přihrádku automatického podavače a k založení stojanu do soustavy NeuMoDx™ System použijte dotykovou obrazovku. Tím se zahájí zpracování vložených vzorků pro identifikovaný test (identifikované testy), pokud je v soustavě přítomna platná objednávka testů.

OMEZENÍ

- Testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip lze použít pouze na soustavách NeuMoDx™ System.
- Účinnost testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip byla stanovena pro vzorky plazmy a séra, připravenými z plné krve, odebranými do EDTA jako antikoagulantu i pro vzorky moči; použití testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip nebylo u jiných klinických typů vzorků vyhodnoceno a výkonové charakteristiky tohoto testu jsou u jiných typů vzorků neznámé.
- Při použití pracovního postupu pro objem vzorku 100 µl bylo pozorováno malé zvýšení meze detekce a dolní meze stanovitelnosti analýzy NeuMoDx BKV Quant Assay.
- Analýza NeuMoDx BKV Quant Assay se nesmí používat se vzorky od osob užívajících heparin.
- Protože detekce BKV závisí na množství organismů přítomných ve vzorku, závisí spolehlivost výsledků na správném odběru vzorků, zacházení s nimi a jejich skladování.
- Kalibrátory a externí kontroly musejí být zpracovány podle doporučení uvedených v příbalové informaci, a pokud zpracování běžných klinických vzorků předchází výzva softwaru soustavy NeuMoDx™ System.
- K chybným výsledkům testů může dojít kvůli nesprávnému odběru vzorků, zacházení s nimi, jejich nevhodnému skladování, technické chybě nebo nesprávné identifikaci zkumavek se vzorkem. Kromě toho by se mohly objevit falešně negativní výsledky kvůli tomu, že množství virových částic ve vzorku je pod mezí detekce analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay.
- Obsluha soustavy NeuMoDx™ System je omezena pouze na personál vyškolený v používání soustavy NeuMoDx™ System.
- Pokud se ani cílový BKV, ani cílová SPC1 neamplifikují, bude oznámen neplatný výsledek (Indeterminate (Neurčitý), No Result (Bez výsledku) nebo Unresolved (Nerozlišeno)) a test by měl být zopakován.
- Pokud je výsledek analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay Positive (Pozitivní), ale hodnota stanovitelnosti je mimo meze stanovitelnosti, soustava NeuMoDx™ System oznámí, zda byl detekovaný BKV pod dolní mezí stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) nebo nad horní mezí stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- V případě, že detekovaný BKV byl pod LLoQ, může být analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay zopakována (podle přání) s jiným alikvotním podílem vzorku.
- V případě, že detekovaný BKV byl nad ULoQ, může být analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay zopakována se zředěným alikvotním podílem původního vzorku. Doporučujeme ředění 1 : 1 000 v plazmě negativní na BKV nebo diluentu BaseMatrix 53 Diluent (BaseMatrix; SeraCare, Milford, MA). Původní koncentraci vzorku lze vypočítat takto:

$$\text{Původní koncentrace vzorku} = \log_{10}(\text{faktor ředění}) + \text{ohlášená koncentrace zředěného vzorku.}$$

- Důsledkem občasně přítomnosti PCR inhibitorů v plazmě/séru nebo moči může být chyba stanovitelnosti v soustavě; pokud k tomu dojde, doporučujeme test zopakovat se stejným vzorkem zředěným v diluentu BaseMatrix v poměru 1 : 10 nebo 1 : 100.
- Pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat přítomnost životaschopných organismů. Avšak pozitivní výsledek je pro přítomnost DNA viru BKV presumptivní.
- Delece nebo mutace v konzervovaných oblastech zacílených analýzou NeuMoDx™ BKV Quant Assay může za použití testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip ovlivnit detekci nebo vést k chybnému výsledku.
- Výsledky z analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay by měly být použity jako doplněk klinických pozorování a dalších informací, které má lékař k dispozici; test není určen k diagnostice infekce.
- Aby nedošlo ke kontaminaci, doporučujeme mezi manipulacemi s pacientskými vzorky dodržovat správnou laboratorní praxi, včetně výměny rukavic.

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Dostupné výsledky lze zobrazit nebo vytisknout na kartě „Results“ (Výsledky) v okně Results (Výsledky) na dotykové obrazovce soustavy NeuMoDx™ System, případně je lze odtud vytisknout.

Výsledky analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay automaticky generuje software soustavy NeuMoDx™ System používající algoritmus rozhodování a parametry zpracování výsledků popsané v souboru definic analýzy NeuMoDx™ BKV Assay (BKV ADF). Výsledek analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay může být ohlášen jako Negative (Negativní), Positive (Pozitivní) s ohlášením koncentrace BKV, Positive (Pozitivní) nad ULoQ, Positive (Pozitivní) pod LLoQ, Indeterminate (IND; Neurčitý), Unresolved (UNR; Nerozlišeno) nebo No Result (NR; Bez výsledku) na základě stavu amplifikace cíle a kontroly zpracování vzorku. Výsledky jsou oznamovány na základě algoritmu rozhodování, který je shrnut v *Tabulka 1* níže.

Tabulka 1: Shrnutí rozhodovacího algoritmu pro analýzu NeuMoDx BKV Quant Assay

Výsledek	BKV	Kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1)	Interpretace výsledků
Positive (Pozitivní) s ohlášenou koncentrací	Amplified (Amplifikováno) $1,3 \leq [BKV] \leq 8,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 550 μl)* $2,3 \leq [BKV] \leq 8,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 100 μl)*	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	DNA viru BKV detekována v kvantitativním rozmezí
Positive (Pozitivní), nad horní mezí stanovitelnosti [Upper Limit of Quantitation, ULoQ]	Amplified (Amplifikováno) $[BKV] > 8,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	DNA viru BKV detekována nad kvantitativním rozmezím
Positive (Pozitivní), pod dolní mezí stanovitelnosti [Lower Limit of Quantitation, LLoQ]	Amplified (Amplifikováno) $[BKV] < 1,3 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 550 μl)* $[BKV] < 2,3 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 100 μl)*	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	DNA viru BKV detekována pod kvantitativním rozmezím
Negative (Negativní)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	DNA viru BKV nebyla detekována
Indeterminate (Neurčitý)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků dokončeno)		Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu†
No Result (Bez výsledku)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků zrušeno)		Zpracování vzorku bylo přerušeno; otestujte vzorek znovu†
Unresolved (Nerozlišeno)	Not Amplified, No System Error Detected (Není amplifikováno, Nebyla zjištěna žádná chyba systému)		Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu†

* Pracovní postup pro objem 550 μl se používá pro vzorky plazmy/séra a moči. Pracovní postup pro objem 100 μl se používá pouze pro vzorky plazmy/séra.

† Soustava NeuMoDx System je opatřena automatickou funkcí Rerun (Nová analýza) / Repeat (Opakovat), kterou si může koncový uživatel zvolit k zajištění, že výsledek IND/NR/UNR bude automaticky znovu zpracován, a tak se minimalizovaly prodlevy v hlášení výsledků.

Výpočet testu

- U vzorků v mezích stanovitelnosti analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay se koncentrace DNA viru BKV ve vzorcích počítá za pomoci uložené standardní křivky ve spojení s koeficientem kalibrace a objemem vzorku.
 - „Koeficient kalibrace“ se vypočítá na základě výsledků kalibrační soupravy NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit zpracované tak, aby byla stanovena validita standardní křivky pro konkrétní šarži testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip na konkrétní soustavě NeuMoDx™ System.
 - Koeficient kalibrace je zahrnut do konečného stanovení koncentrace DNA viru BKV.
 - Software soustavy NeuMoDx zohledňuje při stanovování koncentrace DNA viru BKV v jednom ml vzorku vstupní objem vzorku.
- Výsledky analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay se udávají jako $\log_{10} \text{ IU/ml}$.
- Výsledná stanovitelnost u neznámých vzorků je vysledovatelná k 1. mezinárodnímu standardu organizace WHO pro BK virus (BKV) (14/212)⁹.

Kalibrace testu

Platná kalibrace na základě standardní křivky je pro kvantitativní vyjádření DNA viru BKV ve vzorcích nezbytná. Pro získání platných výsledků musí být kalibrace testu provedena za použití kalibrátorů dodaných společností NeuMoDx™ Molecular, Inc.

Kalibrátory

1. Kalibrátory NeuMoDx™ BKV Calibrator jsou dodávány v soupravě (REF 800600) a jsou složeny ze sušené pelety ze syntetické DNA viru BKV.
2. Sada kalibrátorů pro BKV musí být zpracována s každou novou šarží testovacích proužků NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, nebo pokud je do soustavy NeuMoDx™ System nahrán nový soubor definic analýzy BKV anebo pokud je aktuální sada kalibrátorů za dobou platnosti (v současnosti nastavenou na 90 dnů), případně pokud je upraven software soustavy NeuMoDx™ System.
3. Software soustavy NeuMoDx™ System uživatele uvědomí, kdy je třeba kalibrátory zpracovat; novou šarží testovacích proužků nelze k testování použít, dokud nebyly kalibrátory úspěšně zpracovány.
4. Pokud je třeba zpracovat novou sadu kalibrátorů pro BKV, před provedením testu si prostudujte všechny pokyny obsažené v příbalové informaci ke kalibrační soupravě NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit.
5. Validita kalibrace je zajištěna následovně:
 - a) Pro zajištění validity je třeba zpracovat sadu se dvěma kalibrátory-pro vysokou a nízkou hodnotu.
 - b) Pro získání platných výsledků je nutné mít výsledky nejméně 2 ze 3 replikátů v mezích předem stanovených parametrů. Nominální cíl kalibrátoru pro nízkou hladinu je $3 \log_{10}$ IU/ml a nominální cíl kalibrátoru pro vysokou hladinu je $5 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Koeficient kalibrace se vypočítá tak, aby zohledňoval očekávanou variaci mezi šaržemi testovacích proužků; tento koeficient kalibrace se používá ke stanovení finální koncentrace BKV.
6. Pokud jeden nebo oba kalibrátory kontrolou validity neprojdou, zpracování neúspěšného kalibrátoru (kalibrátorů) zopakujte za použití nové ampulky. V případě, že validitou neprojde jeden kalibrátor, je možné zopakovat pouze neúspěšný kalibrátor, jelikož soustava nevyžaduje, aby uživatel znovu kontroloval oba kalibrátory.

Kontrola kvality

Místní předpisy obvykle stanoví, že laboratoř je odpovědná za kontrolní postupy, které monitorují přesnost celého analytického procesu, a musí stanovit počet, typ a četnost testů kontrolních materiálů pomocí ověřených specifikací výkonu pro nemodifikovaný a schválený testovací systém.

Externí kontroly

1. Externí kontroly pro BKV poskytuje společnost NeuMoDx Molecular, Inc. v soupravě externích kontrol BKV External Control Kit (REF900601). Pozitivní kontroly obsahují sušenou peletu syntetické DNA viru BKV.
2. Pozitivní a negativní externí kontroly je třeba provést jednou za 24 hodin. Pokud sada platných externích kontrol neexistuje, software soustavy NeuMoDx™ System vyzve uživatele k provedení těchto kontrol dřív, než budou moci být ohlášeny výsledky vzorků.
3. Pokud je třeba provést externí kontroly, připravte si před provedením testu pozitivní a negativní kontroly, jak je uvedeno v příbalové informaci k soupravě pro externí kontrolu NeuMoDx BKV External Control Kit.
4. Za použití dotykové obrazovky a stojanu zkumavek se vzorkem umístěného na přihrádce automatického podavače vložte ampulky s pozitivní a negativní kontrolou do soustavy NeuMoDx™ System. Soustava NeuMoDx™ System rozpozná čárový kód a začne zpracovávat zkumavky se vzorkem, pokud jsou reagentie či spotřební materiál nezbytný k testování k dispozici.
5. Validita externích kontrol bude vyhodnocena soustavou NeuMoDx™ System na základě očekávaného výsledku. Pozitivní kontrola by měla přinést výsledek BKV Positive (Pozitivní) a negativní kontrola by měla přinést výsledek BKV Negative (Negativní).
6. S neshodným výsledkem externích kontrol by mělo být zacházeno následovně:
 - a) Výsledek testu Positive (Pozitivní), ohlášený u negativní kontroly vzorku, ukazuje na problém s kontaminací vzorku.
 - b) Výsledek Negative (Negativní) testu u pozitivního kontrolního vzorku může naznačovat problém související s reagentií nebo přístrojem.
 - c) V každém výše uvedeném případě anebo v případě výsledku Indeterminate (IND; Neurčitý) či No Result (NR; Bez výsledku) externí kontrolu/y NeuMoDx™ BKV External Control zopakujte s novými ampulkami kontroly/kontrol, které testem validity neprošly.
 - d) Pokud pozitivní externí kontrola NeuMoDx™ BKV External Control nepřestává hlásit výsledek Negative (Negativní), kontaktujte zákaznický servis společnosti NeuMoDx™.
 - e) Pokud negativní externí kontrola NeuMoDx™ BKV External Control nepřestává hlásit výsledek Positive (Pozitivní), pokuste se eliminovat všechny zdroje možné kontaminace, včetně výměny VŠECH reagentií, dřív než kontaktujete zákaznický servis společnosti NeuMoDx™.

Kontroly (interní) zpracování vzorků

Exogenní kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1) je zabudována do extrakční destičky NeuMoDx™ Extraction Plate a u každého vzorku prochází celým procesem extrakce nukleové kyseliny a amplifikace s PCR v reálném čase. Každý testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip obsahuje primery a sondu specifické pro SPC1, které umožňují detekci přítomnosti SPC1 spolu s cílovou DNA BKV (pokud je přítomna) prostřednictvím multiplexové PCR v reálném čase. Detekce amplifikace SPC1 umožňuje softwaru soustavy NeuMoDx™ System sledovat účinnost extrakce DNA a procesy amplifikace pomocí PCR.

Neplatné výsledky

Pokud se analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay prováděná na soustavě NeuMoDx™ System nepodaří vyprodukovat platný výsledek, bude na základě typu chyby, ke které došlo, oznámen výsledek buď jako Indeterminate (IND; Neurčitý), No Result (NR; Bez výsledku), nebo Unresolved (UNR; Nerozlišeno).

Výsledek IND bude ohlášen tehdy, pokud je během zpracování vzorků detekována chyba soustavy NeuMoDx™ System. V případě ohlášení výsledku IND doporučujeme test zopakovat.

Pokud nebude detekována žádná platná amplifikace DNA BKV nebo SPC1, bude oznámen výsledek UNR, který ukazuje na možné selhání reagencie nebo na přítomnost inhibitorů. V případě oznámení výsledku UNR (Nevyřešený) můžete jako první krok test opakovat. Pokud opakovaný test není úspěšný, lze použít zředěný vzorek pro snížení účinků jakékoli inhibice vzorku.

Pokud analýza NeuMoDx BKV Quant Assay provedená na soustavě NeuMoDx System nedokáže přinést platný výsledek a zpracování vzorku se před dokončením přeruší, bude ohlášen výsledek No Result (NR; Bez výsledku). V případě ohlášení výsledku NR doporučujeme test zopakovat.

VÝKONOVÁ CHARAKTERISTIKA

Analytická citlivost – mez detekce¹²

Analytická citlivost analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay byla charakterizována testováním série ředění ověřovacího panelu EDX BKV (Exact Diagnostics), kalibrovaného podle 1. mezinárodního standardu organizace WHO pro BK virus (BKV) (14/212)⁹, ve vzorcích plazmy/séra a moči negativních na BKV s cílem stanovit mez detekce (Limit of Detection; LoD) na soustavách NeuMoDx System. Pro plazmu/sérum (550 µl) a moč byla LoD definována jako experimentálně stanovená nejnižší hladina cíle nad koncentrací stanovenou probitovou analýzou s 95% intervalem spolehlivosti (Confidence Interval; CI). Pro plazmu/sérum (100 µl) byla pomocí analýzy míry shody zkoumána koncentrace jednoho vzorku 200 IU/ml a byla validována pro LoD, pokud byla míra detekce vyšší než 95%. Měření bylo prováděno po dobu 3 dnů napříč několika soustavami s několika šaržemi reagentů NeuMoDx™. Každá soustava zpracovávala denně 42 replikátů na každé úrovni ředění (pozitivní vzorky) a 8 replikátů pro negativní vzorky. Míry detekce jsou zobrazeny, viz *Tabulka 2 a 3*.

Tabulka 2: Míry pozitivní detekce pro stanovení LoD analýzy NeuMoDx BKV Quant Assay (plazma/sérum 550 µl a moč)

Cílová koncentrace (IU/ml)	Cílová koncentrace [log ₁₀ IU/ml]	PLAZMA/SÉRUM, pracovní postup pro objem 550 µl			MOČ		
		Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce	Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
50	1,70	41	41	100 %	41	41	100 %
20	1,30	42	42	100 %	40	39	98 %
10	1,00	41	35	85 %	41	31	76 %
5	0,30	41	16	39 %	41	12	29 %
NEG	0,00	20	0	0 %	24	0	0 %

Tabulka 3: Míry pozitivní detekce pro stanovení LoD analýzy NeuMoDx BKV Quant Assay (plazma/sérum 100 µl)

Cílová koncentrace (IU/ml)	Cílová koncentrace [log ₁₀ IU/ml]	PLAZMA/SÉRUM, pracovní postup pro objem 100 µl		
		Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
200	2,30	89	88	99%

LoD analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay v plasmě/séru (pracovní postup pro objem 550 µl) byla stanovena na 20 IU/ml (1,3 log₁₀ IU/ml) s 95% intervalem spolehlivosti (Confidence Interval; CI) 11,03; v moči byla LoD stanovena na 20,0 IU/ml (1,3 log₁₀ IU/ml) s 95% intervalem spolehlivosti (Confidence Interval; CI) 13,09; v plasmě/séru (pracovní postup pro objem 100 µl) byla LoD stanovena na 200 IU/ml (2,3 log₁₀ IU/ml).

Analytická citlivost – dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) a horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)¹²

Dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) a horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) jsou definovány jako nejnižší, respektive horní cílová hladina, při které je dosaženo detekce > 95 % A hodnoty TAE ≤ 1,0. Za účelem stanovení LLoQ a ULoQ byla pro každou z cílových hladin BKV, které vykazovaly detekci > 95 %, spočítána celková analytická chyba (Total Analytical Error, TAE). TAE je stanovena následovně:

$$TAE = \text{odchylka} + 2 \times SD \text{ [Westgardova pravidla]}$$

Odchylka je absolutní hodnota mezi průměrem vypočítané koncentrace a očekávanou koncentrací. SD označuje směrodatnou odchylku kvantitativně vyjádřené hodnoty vzorku.

Zpracované výsledky pro 5 hladin vzorků plazmy/séra nebo moči s BKV, použitých při měření LLoQ/UloQ, viz *Tabulka 4 a 5*. Na základě tohoto souboru dat a dříve stanovené LoD byla pro plazmu/sérum a pracovní postup pro objem vzorku 550 μ l a pro moč stanovena LLoQ 20 IU/ml ($1,3 \log_{10}$ IU/ml) a ULoQ $7,58 \times 10^7$ IU/ml (zde přibližně $8 \log_{10}$ IU/ml); pro plazmu/sérum a pracovní postup pro objem vzorku 100 μ l byla stanovena hodnota 200 IU/ml ($2,3 \log_{10}$ IU/ml).

Tabulka 4: ULoQ a LLoQ pro testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, s odchylkou a TAE (plazma/sérum, 550 μ l, a moč)

Cílová konc. (IU/ml)	Cílová konc. [\log_{10} IU/ml]	Plazma/sérum, 550 μ l					Moč				
		Průměrná konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE	Průměrná konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE
$7,58 \times 10^7$	8	8	100	0,09	0,05	0,23	8	100	0,09	0,10	0,29
50	1,70	1,80	100	0,18	0,10	0,46	1,84	100	0,22	0,14	0,59
20	1,30	1,56	100	0,25	0,26	0,76	1,66	100	0,29	0,36	0,93
10	1,00	1,46	85	0,27	0,46	1,01	1,41	85%	0,41	0,41	1,22
5	0,30	1,27	39	0,48	0,97	1,92	1,31	38%	0,52	1,01	2,04

Tabulka 5: ULoQ a LLoQ pro testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, s odchylkou a TAE (plazma/sérum, 100 μ l)

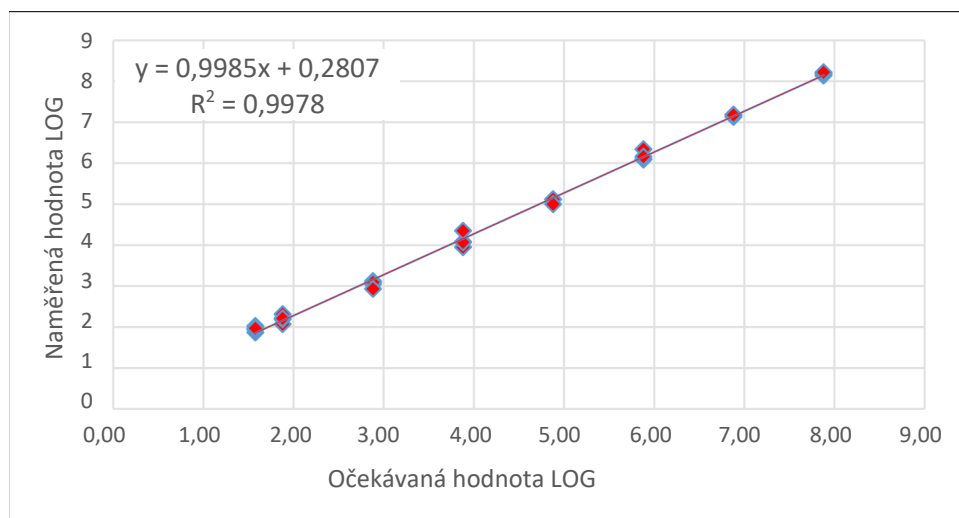
Cílová konc. (IU/ml)	Cílová konc. [\log_{10} IU/ml]	Plazma/sérum, 100 μ l				
		Průměrná konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE
$7,58 \times 10^7$	8	8	100	0,09	0,07	0,25
200	2,30	2,30	99	0,39	0,003	0,78

Na základě výsledku těchto studií byly obě hodnoty LoD a LLoQ analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay stanoveny jako 20 IU/ml ($1,3 \log_{10}$ IU/ml) pro plazmu/sérum a moč s pracovním postupem pro objem vzorku 550 μ l a jako 200 IU/ml ($2,30 \log_{10}$ IU/ml) pro plazmu/sérum při použití pracovního postupu pro objem vzorku 100 μ l. ULoQ je pro všechny typy vzorků $7,58 \times 10^7$ IU/ml ($8 \log_{10}$ IU/ml).

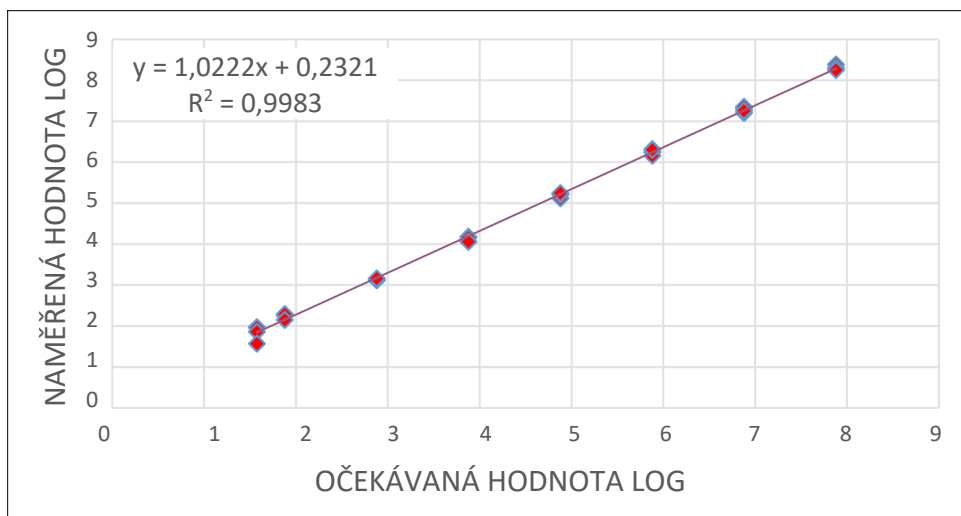
Linearita¹³

Linearita testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip byla stanovena v plazmě/séru a moči přípravou řady ředění pomocí syntetického plazmidu BKV (Integrated DNA Technologies) se zavedenou výsledovatelností k 1. mezinárodnímu standardu organizace WHO pro BK virus (BKV) (14/212)⁹. Bylo vytvořeno 11 sériových ředění syntetického plazmidu BKV, připraveného v diluentu BaseMatrix 53 negativním na BKV nebo ve směsné lidské moči negativní na BKV tak, aby se vytvořilo koncentrační rozmezí $7,88$ – $1,58 \log_{10}$ IU/ml pro plazmu/sérum, 550 μ l, a moč a koncentrační rozmezí $6,88$ – $2,88 \log_{10}$ IU/ml pro plazmu/sérum, 100 μ l.

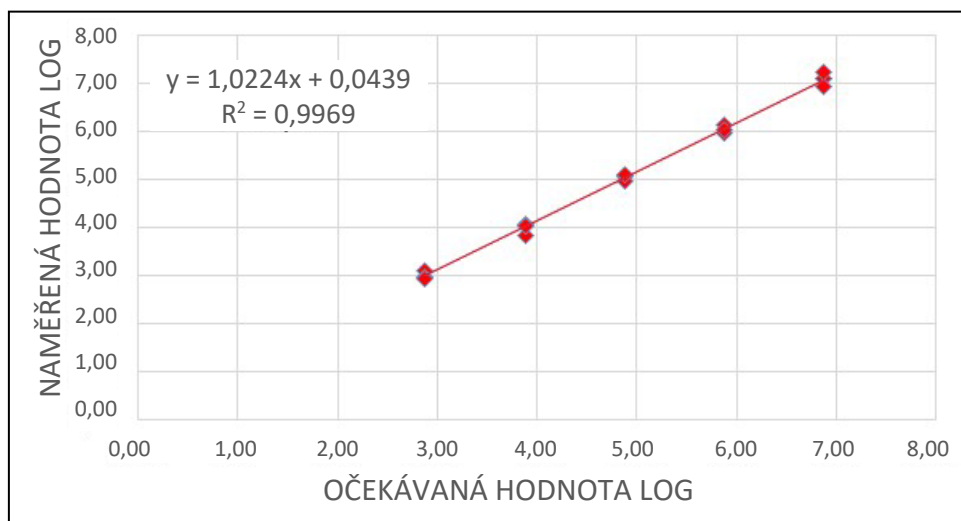
Koncentrace analýzy BKV ohlášené soustavou NeuMoDx™ System ve srovnání s očekávanými hodnotami, viz *Obrázek 2*, 3 a 4.



Obrázek 2: Linearita analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay pro plazmu/sérum (pracovní postup pro objem vzorku 550 μ l)



Obrázek 3: Linearita testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip pro vzorky moči



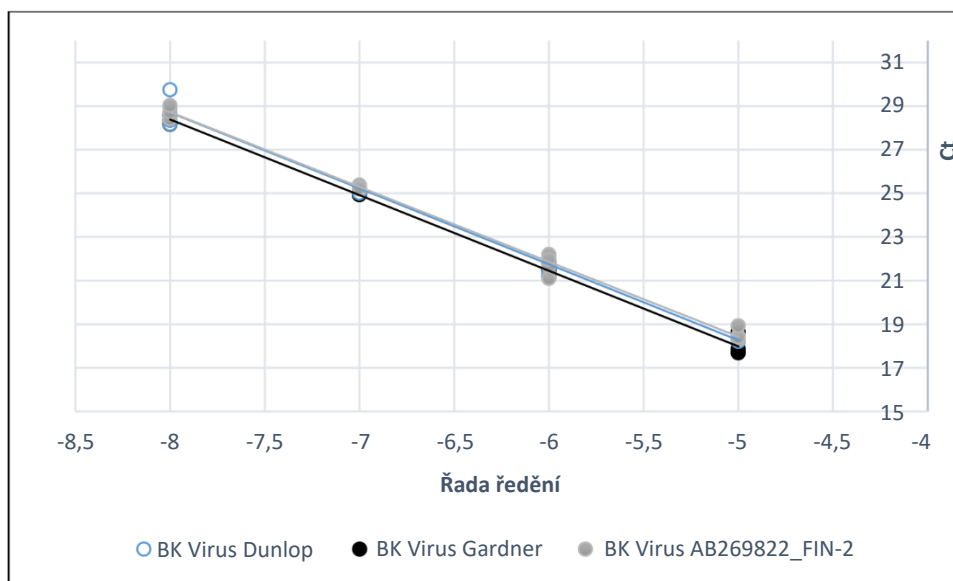
Obrázek 4: Linearita testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip pro plazmu/sérum (pracovní postup pro objem vzorku 100 µl)

Linearita napříč genotypy¹⁶

Linearita analýzy NeuMoDx BKV Quant Assay napříč třemi genotypy BKV (BK Virus Dunlop, BK Virus Gardner, BK Virus AB269822_FIN-2) byla charakterizována testováním čtyř různých koncentrací u každého genotypu BKV připraveného v diluentu BaseMatrix 53 negativním na BKV. Genotyp BK Virus S72390 nepředstavuje polymorfismy v cílové oblasti genu pokryté testovacím proužkem NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip. Měření proběhlo u každého ze 3 genotypů při 6 koncentracích za použití 4 replikátů (řada 10násobného ředění). Linearitu napříč třemi genotypy BKV, viz *Tabulka 6* a *Obrázek 5*.

Tabulka 6: Linearita testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip napříč genotypy

Genotyp	Rovnice linearity $y = \text{NeuMoDx BKV Assay Ct}$ $x = \text{řada ředění}$	R ²
BK Virus Dunlop	$y = -3,4808x + 0,8595$	0,9926
BK Virus Gardner	$y = -3,4682x + 0,6395$	0,9959
BK Virus AB269822_FIN-2	$y = -3,432x + 1,2683$	0,9947



Obrázek 5: Linearita testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip napříč genotypy

Analytická specifičnost – zkřížená reaktivita^{10,11}

Analytická specifičnost byla prokázána screeningem zkřížené reaktivity 22 organismů, které se ve vzorcích plazmy/séra nebo moči běžně nacházejí, a také druhů, které se BKV fylogeneticky podobají. Organismy byly připraveny ve směsích skládajících se z 5–6 organismů testovaných při vysoké koncentraci. Testované organismy uvádí *Tabulka 7*. U žádného z testovaných organismů nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita, což potvrzuje 100% analytickou specifičnost analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay.

Tabulka 7: Patogeny použité k prokázání analytické specifičnosti

Necílové organismy					
HTLV-1/2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Virus hepatitidy B	Adenovirus typu 5	Virus Epstein-Barrové	Varicella zoster virus	Virus hepatitidy C
Herpes simplex virus 1	Herpes simplex virus 2	Lidský herpesvirus 6	Lidský herpesvirus 7	Lidský herpesvirus 8	Virus lidské imunitní nedostatečnosti – 1
Virus lidské imunitní nedostatečnosti – 2	JC virus	SV40	<i>Cytomegalovirus</i>		

Analytická specifičnost – interferující látky, komenzálové organismy^{10,11}

Interference u analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay byla vyhodnocena za přítomnosti necílových organismů, a to za použití stejných směsí organismů, jaké byly připraveny pro testování zkřížené reaktivity, viz *Tabulka 7* výše. Plazma negativní na BKV byla obohacena o organismy smíšené do skupin po 5–6 a při koncentraci 4 log₁₀ IU/ml takto obohacena o cílový virus BKV. Jak naznačila minimální odchylka stanovitelnosti z kontrolních vzorků, které neobsahovaly žádný interferující přípravek, nebyla za přítomnosti těchto komenzálů pozorována žádná významná interference.

Analytická specifičnost – interferující látky, endogenní a exogenní látky^{10,11}

Analýza NeuMoDx™ BKV Quant Assay byla hodnocena za přítomnosti typických exogenních a endogenních interferujících látek, které se v klinických BKV vzorcích plazmy/séra či moči objevily. Mezi tyto látky patřily neobvykle vysoké hladiny krevních složek anebo složek moči a také běžné antivirové léky, které jsou zařazeny do *Tabulka 8*. Každá látka byla přidána k vyšetřenému diluentu BaseMatrix 53 nebo lidské moči, negativní na BKV a obohaceny o 3 log₁₀ IU/ml BKV a u vzorků byla analyzována interference. Průměrná koncentrace a odchylka u všech testovaných látek ve srovnání s kontrolními vzorky uměle obohacenými o stejnou hladinu viru BKV jsou uvedeny v *Tabulka 9*. Žádná z exogenních a endogenních látek specifitu analýzy NeuMoDx™ BKV Quant Assay neovlivnila.

Tabulka 8: Testování interference – exogenní přípravky (klasifikace léků)

Směs	Název léku	Klasifikace
Směs 1	Valganciclovir	ANTIVIROTIKUM
	Prednison	IMUNOSUPRESIVUM
	Cidofovir	ANTIVIROTIKUM
	Cefotaxime	ANTIBIOTIKUM
	Mycophenolate mofetil	IMUNOSUPRESIVUM
Směs 2	Vankomycin	ANTIBIOTIKUM
	Takrolimus	IMUNOSUPRESIVUM
	Famotidin	HISTAMINOVÝ ANTAGONISTA
	Valaciclovir	ANTIVIROTIKUM
	Leflunomid	IMUNOSUPRESIVUM

Tabulka 9: Testování interference – exogenní a endogenní přípravky

Endogenní (plazma/sérum)	Průměrná konc.	Odchylka
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Triglyceridy 500 mg/dl	3,09	0,16
Konjugovaný bilirubin (0,25 g/l)	3,09	0,16
Nekonjugovaný bilirubin (0,25 g/l)	3,31	-0,06
Albumin (58,7 g/l)	3,12	0,13
Hemoglobin (2,9 g/l)	3,02	0,23
Endogenní (moč)	Průměrná konc.	Odchylka
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Urobilirubin (> 2 mg/dl)	3,74	-0,09
Glukóza (1 000 mg/dl)	4,00	0,04
Moč, pH 4	3,75	0,29
Moč, pH 10	3,77	0,27
Leukocyty (1E5 buněk/ml)	3,68	-0,06
Krev, 7 %	3,42	-0,32
Protein (albumin > 100 mg/dl)	3,96	0,08
Mastkový prášek	3,92	0,12
Exogenní (přípravky)	Průměrná konc.	Odchylka
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Směs 1: Valganciclovir, Prednison, Cidofovir, Cefotaxim, Mycophenolate mofetil	4,04	-0,06
Směs 2: Vankomycin, Takrolimus, Famotidin, Valaciclovir, Leflunomid	4,07	-0,09

Opakovatelnost a vnitřní laboratorní preciznost¹⁴

Preciznost testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip byla stanovena testováním 2 replikátů 5prvkového panelu se vzorky BKV, připravovanými s plazmidem BKV dvakrát denně, za použití jedné soustavy NeuMoDx™ 96 System po dobu 20 dnů. Preciznost byla charakterizována v rámci jednoho cyklu a jednoho dne a celková směrodatná odchylka byla stanovena jako $\leq 0,30 \log_{10}$ IU/ml. Napříč dny nebo cykly byla prokázána vynikající preciznost, viz *Tabulka 10*. Preciznost mezi pracovníky obsluhy charakterizována nebyla, jelikož obsluha při zpracování vzorků za použití soustavy NeuMoDx™ System nehraje žádnou významnou roli.

Tabulka 10: Vnitřní laboratorní preciznost – analýza NeuMoDx BKV Quant Assay na soustavách NeuMoDx System

Vzorek	SD v rámci dne (log ₁₀ IU/ml)	SD mezi různými dny (log ₁₀ IU/ml)	SD v rámci cyklu (log ₁₀ IU/ml)	SD mezi různými cykly (log ₁₀ IU/ml)	SD v rámci laboratoře (log ₁₀ IU/ml)
Vzorek plazmy/séra (vstupní objem 550 µl)					
RISppHIGH	0,10	0,08	0,10	0,01	0,13
RISppMIDDLE	0,14	0,10	0,11	0,06	0,17
RISppMLOW	0,22	0,12	0,21	0,02	0,25
RISppLOW	0,21	0,03	0,18	0,10	0,21
RISppNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Vzorek moči					
RISpuHIGH	0,16	0,10	0,11	0,12	0,20
RISpuMIDDLE	0,21	0,09	0,16	0,13	0,23
RISpuMLOW	0,14	0,12	0,13	0,02	0,18
RISpuLOW	0,29	0,05	0,25	0,13	0,30
RISpuNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Reprodukovatelnost mezi šaržemi¹⁴

Reprodukovatelnost mezi šaržemi byla u testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip stanovena za použití tří různých šarží proužků NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip. K hodnocení výkonu na jedné molekulární soustavě NeuMoDx™ 96 Molecular System ve 3 samostatných cyklech byl použit 5prvkový panel BKV připravený s plazmidem BKV. Byla analyzována odchylka v rámci šarže i mezi různými šaržemi a výsledky byly vyjádřeny jako absolutní odchylka kvantifikace mezi šaržemi; výsledky, viz *Tabulka 11*. Maximální celková odchylka byla 0,27 log₁₀ IU/ml. Ekvivalentní účinnost byla prokázána napříč šaržemi, jelikož stanovitelnost všech prvků panelu byla v mezích stanovené tolerance.

Tabulka 11: Reprodukovatelnost mezi šaržemi – analýza NeuMoDx BKV Quant Assay

Vzorek	Absolutní odchylka mezi šarží 1 a šarží 2 (log ₁₀ IU/ml)	Absolutní odchylka mezi šarží 1 a šarží 3 (log ₁₀ IU/ml)	Absolutní odchylka mezi šarží 2 a šarží 3 (log ₁₀ IU/ml)
Vzorek plazmy/séra (550 µl)			
7 log ₁₀ IU/ml	0,05	0,10	0,05
4 log ₁₀ IU/ml	0,02	0,03	0,05
3 log ₁₀ IU/ml	0,20	0,05	0,15
2 log ₁₀ IU/ml	0,02	0,24	0,26
0 log ₁₀ IU/ml	0,00	0,00	0,00
Vzorek moči (550 µl)			
7 log ₁₀ IU/ml	0,09	0,27	0,19
4 log ₁₀ IU/ml	0,25	0,06	0,19
3 log ₁₀ IU/ml	0,06	0,08	0,14
2 log ₁₀ IU/ml	0,03	0,11	0,14
0 log ₁₀ IU/ml	0,00	0,00	0,00

Reprodukovatelnost mezi přístroji¹⁴

Reprodukovatelnost testovacího proužku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip mezi přístroji byla stanovena pomocí tří různých soustav (dvě molekulární soustavy NeuMoDx™ 288 Molecular System a jedna molekulární soustava NeuMoDx™ 96 Molecular System). K hodnocení účinnosti byl použit 5prvkový panel BKV připravený s plazmidem BKV. Testování bylo prováděno na soustavách paralelně po dobu 5 dnů. Odchylka byla charakterizována v rámci jednoho dne a mezi soustavami a celková směrodatná odchylka byla stanovena jako ≤ 0,30 log₁₀ IU/ml. Ekvivalentní účinnost byla prokázána napříč soustavami, jelikož SD stanovitelnosti všech prvků panelu byla v mezích stanovené tolerance (*Tabulka 12*).

Tabulka 12: Reprodukovatelnost mezi přístroji – testovací proužek NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip

Vzorek	SD mezi různými dny (log ₁₀ IU/ml)	Mezi různými dny (log ₁₀ IU/ml)	SD v rámci přístroje (log ₁₀ IU/ml)	SD mezi různými přístroji (log ₁₀ IU/ml)	SD reprodukovatelnosti (log ₁₀ IU/ml)
Vzorek plazmy/séra (vstupní objem 550 µl)					
RISppHIGH	0,10	0,05	0,11	0,06	0,12
RISppMIDDLE	0,13	0,05	0,13	0,04	0,13
RISppMLOW	0,10	0,06	0,12	0,04	0,12
RISppLOW	0,12	0,05	0,13	0,04	0,13
RISppNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Vzorek moči					
RISpuHIGH	0,11	0,05	0,12	0,06	0,14
RISpuMIDDLE	0,10	0,01	0,10	0,05	0,11
RISpuMLOW	0,09	0,04	0,10	0,07	0,12
RISpuLOW	0,15	0,02	0,15	0,05	0,16
RISpuNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

REFERENCE

- Ambalathingal R, Francis R S *et al.* 2017. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev* 30(2):503-528.
- Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. Bk virus: a clinical review. 2001 *Clin Infect Dis.* 15;33(2):191-202.
- Navarro E, Serrano-Heras G *et al.* 2015. Real-time PCR Detection Chemistry. *Clin Chim Acta.*15;439:231-50.
- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens, <https://www.osha.gov/lawsregs/regulations/standardnumber/1910/1910.1030>
- US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Ed. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
- World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2004.
- CLSI. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline — Fourth Edition (M29-A4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline—First Edition CLSI Document MM13-A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005
- Sheila Govind, Jason Hockley, Clare Morris, Neil Almond, Collaborative Study Group. 2019. The Development and Establishment of the 1st WHO BKV International Standard for Nucleic Acid Based Techniques. *Biologicals*; 60:75-84.
- CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. Approved Guideline – Third Edition. CLSI document MM03. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
- CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document MM06-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2010.
- CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2012.
- CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline – First Edition. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2003.
- CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2014.
- CLSI. Metrological Traceability and Its Implementation; Approved Guideline – Second Edition. CLSI Report EP32-R. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2006.

OCHRANNÉ ZNÁMKY















NeuMoDx™ je ochranná známka společnosti NeuMoDx Molecular, Inc.

TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

STAT-NAT® je registrovaná ochranná značka společnosti SENTINEL CH. S.p.A.

Všechny ostatní názvy produktů, ochranné známky a registrované ochranné známky, které se mohou objevit v tomto dokumentu, jsou majetkem příslušných vlastníků.

SYMBOLY

SYMBOL	VÝZNAM
	Pouze na předpis
	Výrobce
	Distributor
	Prostředek zdravotnické techniky pro diagnostiku <i>in vitro</i>
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Přečtěte si návod k použití
	Upozornění, prostudujte si doprovodnou dokumentaci
	Teplotní omezení
	Uchovávejte v suchu
	Nepoužívejte opakovaně
	Nevystavujte světlu
	Obsahuje dostatečné množství pro „n“ testů
	Použijte do



SENTINEL CH. S.p.A.
Via Robert Koch, 2
20152 Milán, Italy

www.sentinel diagnostics.com



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

+1 888 301 NMDX (6639)
techsupport@neumodx.com

Vigilanční hlášení: www.neumodx.com/contact-us

Patent: www.neumodx.com/patents