REF **201400 NeuMoDx™ CMV Quant Test Strip** ℞ only

UPOZORNĚNÍ: Pouze pro export do USA

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

Chcete-li vložit aktualizace, přejděte na internetové stránky: www.qiagen.com/neumodx-ifu
Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 288 Molecular System, výr. č. 40600108 [REF 500100]
Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 96 Molecular System, výr. č. 40600317 [REF 500200] nebo výr. č. 40600655 [REF 500201]

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Analýza NeuMoDx CMV Quant Assay je automatizovaný test *in vitro* amplifikace nukleové kyseliny pro stanovitelnost DNA cytomegaloviru (CMV) ve vzorcích lidské plazmy pro genotypy CMV gB1 až gB4 u jedinců infikovaných virem CMV. Analýza NeuMoDx CMV Quant Assay prováděná na molekulárních soustavách NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx96 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 vysoce konzervované sekvence v genomu cytomegaloviru.

Analýza NeuMoDx CMV Quant Assay je určena ke stanovitelnosti DNA cytomegaloviru (CMV) *in vitro* u čerstvých a zmrazených vzorků lidské plazmy za použití molekulárních soustav NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System. Tato analýza je určena k použití ve spojení s klinickou přítomností a jinými laboratorními markery postupujícího onemocnění pro klinické řízení a monitoring CMV infekce. Analýza není určena k použití jako vyšetřovací test na přítomnost CMV v krvi nebo přípravcích z krve.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

K přípravě plazmy lze použít plnou lidskou krev odebranou do sterilních zkumavek pro odběr krve buď s obsahem EDTA, nebo ACD jako antikoagulantů. Aby byla plazma připravena k testování, vloží se ve zkumavce kompatibilní se soustavou NeuMoDx System za použití k tomu určeného nosiče na zkumavky se vzorky do soustavy NeuMoDx System, kde začne zpracování. U každého vzorku se poměrné množství 550 µl vzorku plazmy smíchá s lýzovým pufrem NeuMoDx Lysis Buffer 1 a 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 (úseků cílového genomu CMV ve vysoce konzervovaných oblastech). Analýza NeuMoDx CMV 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 reagencie, ke kterému může dojít během extrakce a amplifikace.

CMV je běžný virus s dvoušroubovicovou DNA, který patří do čeledi lidských herpesvirů, které infikují lidi v každém věku. Odhaduje se, že do 40. roku věku se virem CMV nakazí více než polovina populace.[1] CMV se šíří tělesnými tekutinami, jako jsou sliny, moč, krev, slzy, sperma a mateřské mléko. Imunokompetentní jedinci infikováni CMV jsou typicky asymptomatičtí, ale infekce virem může být vážná u dětí a osob s oslabeným imunitním systémem. Těhotné ženy mohou CMV přenést na své nenarozené děti a způsobit vrozenou CMV infekci, která může, kromě jiných vývojových a motorických vad, vyústit ve ztrátu sluchu. CMV je hlavní patogen u imunokompromitovaných pacientů, včetně příjemců transplantace pevných orgánů, příjemců transplantace krvetvorné tkáně, pacientů infikovaných virem HIV a pacientů léčených imunomodulačními léky.[2] Primárně se zátěž virem CMV sleduje u této imunokompromitované populace, kde může způsobit vysokou nemocnost, včetně zápalu plic, onemocnění zažívacího traktu, hepatitidu a encefalitidu a také zvyšuje možnost odmítnutí orgánů a jiných oportunních infekcí.

Diagnostika CMV infekce se nezakládá pouze na testu nukleové kyseliny (Nucleic Acid Testing, NAT); NAT se používá jako doplněk testování antigenu, kam patří barvení polymorfonukleárních leukocytů (PMN) kvůli rané nízké hladině matrice strukturní bílkoviny CMV a také jiným příznakům, které pacient může mít. Testování zátěže virem CMV se běžně používá k určení nutnosti antivirové léčby a také k monitorování účinnosti takové léčby.[3] Zatímco současné směrnice pro řízení a léčbu CMV infekcí u imunokompromitovaných jedinců nejsou jednoznačné, pokud jde o to, *kdy* s antivirovou léčbou začít, všechny po zahájení antivirové léčby vyžadují nepřetržitý monitoring virové zátěže, což by mělo pomoci se snížením vážných vedlejších účinků léků u takové populace.

PRINCIPY POSTUPU

K vlastnímu provedení analýza NeuMoDx CMV Quant Assay na soustavě NeuMoDx System využívá testovací proužek NeuMoDx CMV Quant Test Strip, kalibrátory NeuMoDx CMV Calibrator, externí kontroly NeuMoDx CMV External Control, lýzový pufr NeuMoDx Lysis Buffer 1 a obecně použitelné reagencie NeuMoDx. Analýza NeuMoDx CMV Quant Assay kombinuje automatizovanou extrakci DNA, amplifikaci a detekci pomocí PCR v reálném čase. K přípravě plazmy se odebírají vzorky plné krve ve zkumavkách s obsahem EDTA nebo ACD. Vzorek plazmy ve zkumavce kompatibilní se soustavou NeuMoDx System je umístěn do stojanu na zkumavky se vzorky, který je pak vložen do soustavy NeuMoDx System ke zpracování. Žádný další zásah ze strany obsluhy není nutný.

Soustavy NeuMoDx System k automatickému provedení buněčné lýzy, extrakce DNA a odstranění inhibitorů využívají kombinace zahřívání, lytických enzymů a extrakčních činidel. Uvolněné nukleové kyseliny jsou zachyceny paramagnetickými částicemi. Částice s navázanými nukleovými kyselinami jsou vloženy do zásobníku NeuMoDx Cartridge, kde jsou nenavázané komponenty neobsahující DNA dále vypláchnuty promývací reagencií NeuMoDx Wash Reagent a navázaná DNA je eluována za použití uvolňovací reagencie NeuMoDx Release Reagent. Soustavy NeuMoDx System potom eluovanou DNA využijí k rehydrataci patentově chráněných amplifikačních reagencií NeuDry™, které obsahují všechny prvky nezbytné k amplifikaci za pomoci PCR specifické pro cílový CMV a cílovou SPC1. Po rekonstituci reagencií PCR NeuDry rozdělí soustava NeuMoDx System 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. Kazeta NeuMoDx Cartridge je určena také k tomu, aby v ní následně po PCR v reálném čase byl amplikon, čímž je po amplifikaci podstatně eliminováno riziko kontaminace.

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

Sondy TaqMan sestávají z fluoroforu, kovalentně připojeného k 5‘ konci oligonukleotidové sondy, a zhášedla na 3‘ konci. Zatímco sonda je intaktní, fluorofor a zhášedlo jsou v blízkosti, čímž molekula zhášedla zháší fluorescenci emitovanou fluoroforem přes FRET (Förster Resonance Energy Transfer, Försterův rezonanční přenos energie).

TaqMan sondy jsou určeny k reasociaci DNA v úseku 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. Degradací 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 kvantitativní PCR v termocykléru soustavy NeuMoDx System je přímo úměrný uvolněnému fluoroforu a lze jej korelovat s množstvím přítomné cílové DNA.

K detekci DNA CMV se používá sonda TaqMan značená fluoroforem (excitace: 490 nm, emise: 521 nm) na 5’ konci a tmavým zhášedlem na 3’ konci. K detekci kontroly zpracování vzorku SPC1 je sonda TaqMan značena alternativním fluorescenčním barvivem (excitace: 535 nm, emise: 556 nm) na 5’ konci a tmavým zhášedlem 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 / NEGATIVE / INDETERMINATE / UNRESOLVED) (POZITIVNÍ / NEGATVINÍ / NEJEDNOZNAČNÝ / NEVYŘEŠENÝ). Pokud je výsledek POSITIVE (Pozitivní), software soustavy NeuMoDx System dodá také kvantitativní hodnotu přidruženou ke vzorku nebo oznámí, zda je vypočítaná koncentrace v mezích stanovitelnosti.

REAGENCIE / SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Dodaný materiál

REF.	Obsah	Počet testů na jednotku	Počet testů v balení
201400	**NeuMoDx CMV Quant Test Strip** *Suché reagencie PCR obsahující sondy TaqMan a primery specifické pro CMV spolu se sondou TaqMan a primery specifickými pro SPC1.*	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*
800400	**NeuMoDx CMV Calibrators** *Sady jednorázových kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot CMV pro stanovení validity standardní křivky*
900401	**NeuMoDx CMV External Controls** *Jednorázové sady pozitivních a negativních kontrol CMV pro stanovení každodenní validity analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay*
400400	**NeuMoDx Lysis Buffer 1**
400100	**NeuMoDx Wash Reagent**
400200	**NeuMoDx Release Reagent**
100100	**NeuMoDx Cartridge**
235903	**Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (300 µl) s filtry**
235905	**Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (1 000 µl) s filtry**

Potřebné přístrojové vybavení

Molekulární soustava **NeuMoDx 288 Molecular System** [REF 500100] nebo **NeuMoDx 96 Molecular System** [REF 500200 nebo 500201]

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Testovací proužek NeuMoDx CMV Quant Test Strip je určen pouze pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx System.
- Spotřební materiál ani reagencie po uvedené době exspirace nepoužívejte.
- Nepoužívejte žádné reagencie, pokud je bezpečnostní těsnění rozbito nebo je při dodání poškozen obal.
- Spotřební materiál nebo reagencie nepoužívejte, pokud je ochranný váček při dodání otevřený nebo rozbitý.

- K dispozici musí být platná kalibrace testování (generovaná zpracováním kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot z kalibrátorů NeuMoDx CMV Calibrators (REF 800400) předtím než lze výsledky testu generovat pro klinické vzorky.
- Externí kontroly NeuMoDx CMV External Control [REF 900401] musejí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay zpracovány každých 24 hodin.
- Minimální objem vzorku je 1 ml EDTA/ACD plazmy při použití 32místného stojanu; důsledkem objemu menšího než 1 ml může být chyba v soustavě NeuMoDx System.
- Provádění CMV analýzy na vzorcích skladovaných při nevhodných teplotách nebo po určené době skladování může za použití testovacího proužku NeuMoDx CMV Quant Test Strip přinést neplatné nebo chybné výsledky.
- Vždy u všech reagencií a spotřebního materiálu zabraňte mikrobiální a deoxyribonukleázové (DNázové) kontaminaci. Doporučujeme použití sterilních jednorázových přenosových pipet bez obsahu DNázy. Na každý vzorek použijte novou pipetu.
- Abyste předešli kontaminaci, se zásobníkem NeuMoDx Cartridge po amplifikaci nemanipulujte ani jej nerozebírejte. Za žádných okolností nevyjímejte 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 zabránil.
- V případě, že laboratoř provádí také PCR testy s otevřenými zkumavkami, musí být zajištěno, že testovací pásek NeuMoDx CMV Quant Test Strip, přídavný spotřební materiál a činidla nezbytná k testování, ochranné osobní prostředky, jako například rukavice a laboratorní pláště, a soustava NeuMoDx System nejsou kontaminovány.
- Při manipulaci s reagenciemi a spotřebním materiálem NeuMoDx byste měli nosit čisté nitrilové rukavice bez obsahu pudru. Měli byste dávat pozor, abyste se nedotýkali vrchního povrchu zásobníku NeuMoDx Cartridge, fóliového těsnění testovacího proužku NeuMoDx CMV Quant Test Strip nebo extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate nebo vrchního povrchu lýzového pufru NeuMoDx Lysis Buffer 1; při manipulaci se spotřebním materiálem a reagenciemi byste se měli dotýkat pouze bočních stran.
- Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com/safety
- Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy. Nekuřte, nepijte ani nejezte v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo reagenciemi.
- Se vzorky vždy zacházejte tak, jako by byly infekční a v souladu s bezpečnými laboratorními postupy, například těmi popsanými v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*[4] a v dokumentu M29-A4[5] institutu CLSI.
- Nepoužité reagencie a odpad likvidujte podle státních, federálních, oblastních a místních předpisů.
- Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (BL).

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

NeuMoDx CMV Quant Test Strip	
NEBEZPEČÍ	Obsahuje: kyselinu boritou. Nebezpečí! Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky. Před použitím si obstarejte speciální instrukce. Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Skladujte uzamčené. Obsah/nádobu zlikvidujte ve schváleném zařízení v souladu s místními, regionálními, národními a mezinárodními předpisy.

Informace pro případ nouze

CHEMTREC
Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

Likvidace

Likvidujte jako nebezpečný odpad v souladu s místními a vnitrostátními předpisy. To platí i pro nepoužité produkty.
Dodržujte doporučení uvedená v bezpečnostním listu (BL).

UCHOVÁVÁNÍ, MANIPULACE A STABILITA PRODUKTU

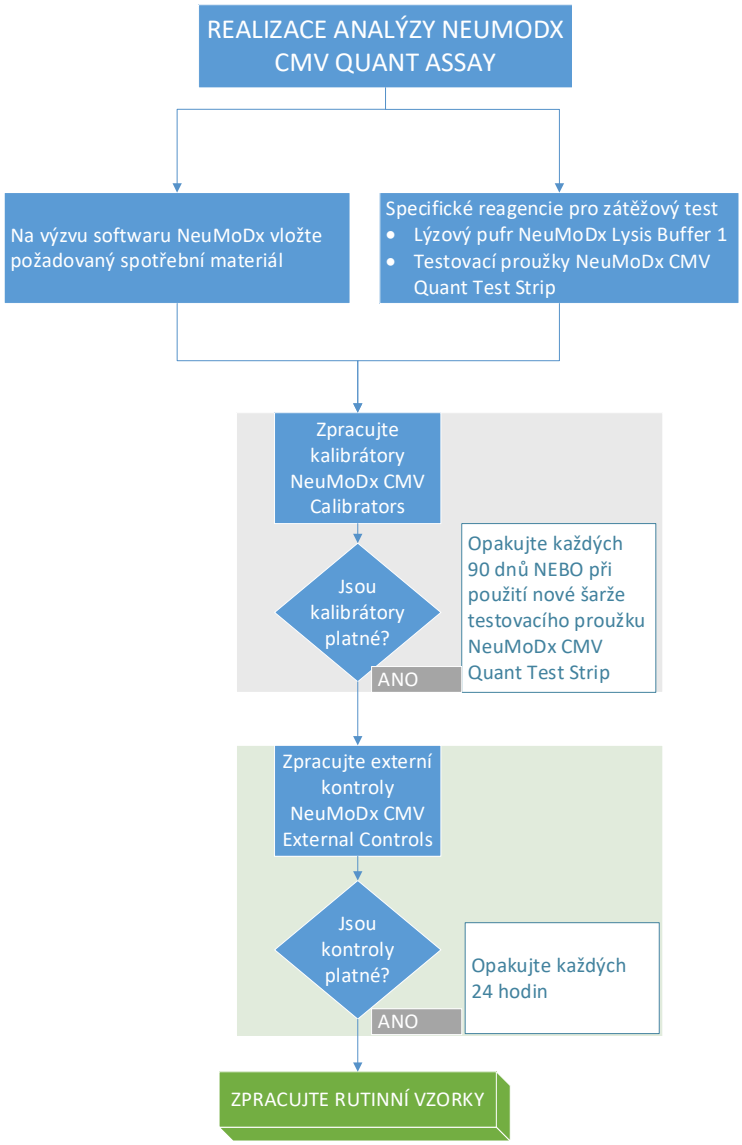
- Všechny reagencie a potřební materiál NeuMoDx (s výjimkou externích kontrol a kalibrátorů) jsou stabilní, pokud jsou skladovány v primárním obalu, při teplotě mezi 18 až 23 °C po dobu exspirace uvedenou na štítku přímo na produktu.
- Testovací proužek NeuMoDx CMV Quant Test Strip vložený do soustavy NeuMoDx System je stabilní 14 dní; software systému NeuMoDx System vyzve k vyjmutí testovacích proužků, které byly v přístroji NeuMoDx System používány déle než 14 dnů a bude třeba otevřít a do soustavy NeuMoDx System vložit nové testovací pásky NeuMoDx CMV Quant Test Strip.

- Kalibrátory a kontroly NeuMoDx jsou neinfekční, ale po použití by měly být zlikvidovány v laboratorním biologicky nebezpečném odpadu, 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 nebo jakékoli vzorky skladované v původních zkumavkách nezmrazujte.
3. Pro přípravu vzorků plazmy by měla být plná krev odebrána do sterilních zkumavek za použití EDTA nebo ACD jako antikoagulantů. Postupujte podle pokynů výrobce zkumavek pro odběr vzorků.
4. Plná krev odebraná v zařízeních vyjmenovaných výše může být před přípravou plazmy skladována a/nebo přepravována až po dobu 24 hodin při teplotě 2 °C až 25 °C. Příprava plazmy by měla být prováděna podle pokynů výrobce.
5. Připravené vzorky plazmy mohou před zpracováním zůstat na soustavě NeuMoDx System až po dobu 8 hodin. Pokud je třeba delší doby skladování, doporučujeme vzorky buď zchladit nebo zmrazit.
6. Připravené vzorky plazmy by při 2 až 8 °C neměly být před testováním skladovány déle než 7 dnů a maximálně 8 hodin při pokojové teplotě.
7. Připravené vzorky mohou být před zpracováním skladovány při teplotě ≤ –20 °C po dobu až 26 týdnů; vzorky plazmy 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 zvířte.
    b. Jakmile jsou zmrazené vzorky rozmrazeny, testování by mělo proběhnout do 8 hodin.
8. Pokud jsou vzorky přepravovány, měly by být zabaleny a označeny v souladu s platnými předpisy země a/nebo mezinárodními předpisy.
9. Zřetelně vzorky označte a uveďte, že se jedná o vzorky k testování CMV.
10. Přejděte k části *Příprava testu*.

Celý proces realizace analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay je shrnut níže na *obrázku 1*.



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

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava testu

1. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky.
2. Za použití přenosové pipety přeneste ≥ 1 ml plazmy do zkumavky na vzorky (sekundární) označené čárovým kódem, pokud používáte 32místný stojan na zkumavky, nebo > 2 ml, pokud používáte 24místný stojan na zkumavky. Dejte pozor, abyste do zkumavky nepřenesli ze vzorku plazmy žádné sraženiny. Na každý vzorek použijte jinou přenosovou pipetu.
3. Sekundární zkumavka musí splňovat následující specifikace pro zkumavky kompatibilní se soustavou NeuMoDx System podle stojanu na zkumavky se vzorky, který se ke zpracování používá.
   - 32místný stojan: průměr 11 mm až 14 mm, výška 60 mm až 120 mm
   - 24místný stojan: průměr 14,5 mm až 18 mm, výška 60 mm až 120 mm

Obsluha soustavy NeuMoDx™ System

Podrobné pokyny jsou uvedeny v návodech k obsluze molekulárních soustav NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System (výr. č. 40600108 a 40600317/40600655).

1. Osaďte jeden nebo více stojanů na testovací proužky NeuMoDx System Test Strip testovacím proužkem (testovacími proužky) NeuMoDx CMV Quant Test Strip a k založení stojanu (stojanů) na testovací proužky do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
2. 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.
3. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, vyměňte promývací činidlo NeuMoDx Wash Reagent, uvolňovací činidlo NeuMoDx Release Reagent, vhodným způsobem vyprázdněte nádobu na primární a biologicky nebezpečný odpad.
4. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, zpracujte dle nutnosti kalibrátory (REF 800400) a/nebo externí kontroly (REF 900401). Další informace týkající se kalibrátorů a kontrol lze najít v oddíle *Zpracování výsledků*.
5. Zkumavku (zkumavky) se vzorky/kalibrátory/kontrolami vložte do běžného 32zkumavkového nosiče a ujistěte se, že ze všech zkumavek se vzorky jsou odstraněna víčka.
6. Nosič na zkumavky se vzorky umístěte do jakékoli otevřené pozice na přihrádku pro automatické zakládání a k založení nosiče do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku. Takto bude zahájeno zpracování založených vzorků pro určený test (určené testy).

OMEZENÍ

- Testovací proužek NeuMoDx CMV Quant Test Strip lze použít pouze na soustavách NeuMoDx System.
- Účinnost testovacího proužku NeuMoDx CMV Quant Test Strip byla stanovena u vzorků plazmy připravených z plné krve odebrané s EDTA/ACD jako antikoagulantem; použití testovacího proužku NeuMoDx CMV Quant Test Strip nebylo u jiných typů klinických vzorků vyhodnoceno a funkční vlastnosti tohoto testu nejsou u jiných typů vzorků známé.
- Protože detekce CMV závisí na množství organismů přítomných ve vzorku, závisí spolehlivost výsledků na správném odběru vzorků, zacházení s nimi a jejich skladování.
- Kalibrátory a externí kontroly musí být zpracovány podle doporučení vložených do balení 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 CMV Quant Assay.
- Obsluha soustavy NeuMoDx System je omezena pouze na personál vyškolený v používání soustavy NeuMoDx System.
- Pokud se ani cílový CMV, ani cílová SPC1 neamplifikují, bude oznámen neplatný výsledek (Indeterminate (nejednoznačný) nebo Unresolved (nevyřešený)) a test by měl být zopakován.
- Pokud je výsledek analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay Positive (pozitivní), ale hodnota stanovitelnosti je mimo meze stanovitelnosti, soustava NeuMoDx System oznámí, zda byl detekovaný CMV *pod* dolní mezí stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) nebo *nad* horní mezí stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- V případě, že detekovaný CMV byl pod hodnotou LLoQ, může být analýza NeuMoDx CMV Quant Assay zopakována (podle přání) s jiným alikvotním podílem vzorku.
- V případě, že detekovaný CMV byl nad ULoQ, může být analýza NeuMoDx CMV Quant Assay zopakována se zředěnou částí původního vzorku. Doporučujeme ředění 1:100 nebo 1:1 000 v CMV negativní plazmě nebo diluentu Basematrix 53 (Basematrix), (SeraCare, Milford, Massachusetts). Původní koncentraci vzorku lze vypočítat takto:

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

- Důsledkem občasné přítomnosti PCR inhibitorů v plazmě může být chyba stanovitelnosti v systému; 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 cytomegaloviru presumptivní.
- Delece nebo mutace v konzervovaných oblastech zacílených analýzou NeuMoDx CMV Quant Assay mohou při použití testovacího proužku NeuMoDx CMV Quant Test Strip ovlivnit detekci nebo vést k chybnému výsledku.
- Výsledky z analýzy NeuMoDx CMV 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 správnou laboratorní praxi, včetně výměny rukavic mezi manipulacemi s pacientskými vzorky.

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

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

Výsledky analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay automaticky generuje software soustavy NeuMoDx System používající algoritmus rozhodování a parametry zpracování výsledků zadané v souboru definic analýzy NeuMoDx CMV Assay Definition File (CMV ADF). Výsledek analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay může být ohlášen jako Negative (negativní), Positive (pozitivní) s ohlášením koncentrace CMV, Positive above ULoQ (pozitivní nad ULoQ), Positive below LLoQ (pozitivní pod LLoQ), Indeterminate (nejednoznačný) nebo Unresolved (nevyřešený) na základě stavu amplifikace cíle a kontroly zpracování vzorku. Výsledky jsou oznamovány na základě algoritmu rozhodování v *tabulce 1*.

Tabulka 1: Rozhodovací algoritmus pro analýzu NeuMoDx CMV Quant Assay

Výsledek	CMV	Kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Pozitivní)	[2 ≤ Ct ≤ 9 A EPR > 2 A EP ≥ 1500] NEBO [9 ≤ Ct ≤ 41 A EP ≥ 1500]	N/A
Positive (Pozitivní), nad horní mezí stanovitelnosti [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONC.) > 8,0 log_{10} IU/ml, NO QUANT (NENÍ STANOV.)	N/A
Positive (Pozitivní), pod dolní mezí stanovitelnosti [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONC.) < 1,3 log_{10} IU/ml, NO QUANT (NENÍ STANOV.)	N/A
Negative (Negativní)	N/A NEBO [2 <Ct < 9 A EPR ≤2] NEBO [9 < Ct <41 A EP <1500] NEBO Ct >41	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) (28 < Ct <34) and (a) EP ≥2 000
Indeterminate (neurčitý)	NOT AMPLIFIED/ Systems Errors Noted (NEAMPLIFIKOVÁNO/ Zaznamenány systémové chyby)	
Unresolved (nerozlišeno)	NOT AMPLIFIED/ No System Errors Noted (NEAMPLIFIKOVÁNO / Žádné systémové chyby nebyly zaznamenány)	

EP = End Point Fluorescence (hraniční fluorescence) (po korekci výchozí hodnoty); EPR = End Point Fluorescence Ratio (poměr hraniční fluorescence); C_t = Cycling Threshold (prahová hodnota cyklování);
Quant (Stanov.) = vypočtené množství přítomného CMV vyjádřené v log_{10} IU/ml. Viz Výpočet testu níže.

Výpočet testu

1. U vzorků v mezích stanovitelnosti analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay, se koncentrace DNA CMV ve vzorcích počítá za pomoci uložené standardní křivky ve spojení s koeficientem kalibrace.
    a. „Koeficient kalibrace“ se vypočítá na základě výsledků kalibrátorů NeuMoDx CMV Calibrator zpracovaných tak, aby byla zajištěna validita standardní křivky pro konkrétní šarži testovacího proužku NeuMoDx CMV Quant Test Strip na konkrétní soustavě NeuMoDx System.
    b. Koeficient kalibrace je do konečného stanovení koncentrace DNA CMV zahrnutý.
2. Výsledky analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay se udávají jako log_{10} IU/ml.
3. Výsledná stanovitelnost u neznámých vzorků je navázaná na 1. mezinárodní standard pro CMV stanovený organizací WHO.

Kalibrace testu

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

Externí kalibrátory

1. Kalibrátory NeuMoDx CMV Calibrator jsou dodávány v soupravě (REF 800400) a obsahují cílový neinfekční opouzdřený virus CMV připravený v diluentu Basematrix.
2. Sada CMV kalibrátorů musí být zpracována s každou novou šarží testovacích proužků NeuMoDx CMV Quant Test Strip nebo pokud je do soustavy NeuMoDx System nahrán nový soubor definic analýzy CMV nebo pokud je aktuální sada kalibrátorů za dobou platnosti (v současnosti nastavenou na 90 dnů) nebo pokud je software soustavy NeuMoDx System upraven.
3. Software soustavy NeuMoDx System uživatele uvědomí, kdy je třeba kalibrátory zpracovat; novou šarži testovacích proužků nelze k testování použít, dokud nebyly kalibrátory úspěšně zpracovány.

4. 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 pásků; tento koeficient kalibrace se používá ke stanovení finální koncentrace CMV.
5. 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.
6. Pokud kalibrátor (kalibrátory) neprojdou kontrolou validity podruhé za sebou, kontaktujte společnost NeuMoDx Molecular, Inc.

Kontrola kvality

Místní předpisy obvykle stanoví, že laboratoř je odpovědná za kontrolní postupy, které monitorují přesnost a preciznost 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 kontrolní materiály, které pro pozitivní kontroly obsahují cílový neinfekční opouzdřený virus CMV v diluentu Basematrix, dodává společnost NeuMoDx Molecular, Inc. v soupravě obsahující externích kontroly NeuMoDx CMV External Controls (REF 900401).
2. Pozitivní a negativní externí kontroly je třeba zpracovat jednou za 24 hodin. Pokud sada validních externích kontrol neexistuje, software soustavy NeuMoDx System vyzve uživatele k provedení těchto kontrol dřív, než budou moci být ohlášeny výsledky vzorků.
3. Pokud jsou externí kontroly třeba, vytáhněte sadu externích kontrol z mrazáku a nechte ampule stát při pokojové teplotě (15-30 °C), dokud nejsou zcela rozmrazené. Pro zajištění homogenity je jemně zvířte.
4. Za použití dotykové obrazovky a nosiče zkumavek se vzorky umístěného na přihrádce automatického podavače vložte ampule pozitivní a negativní kontroly do soustavy NeuMoDx System. Soustava NeuMoDx System rozpozná čárový kód a začne zpracovávat zkumavky se vzorky, pokud reagencie a tavidla nezbytná k testování nejsou k dispozici.
5. Validita externích kontrol bude vyhodnocena soustavou NeuMoDx System na základě očekávaného výsledku. Pozitivní kontrola by měla přinést CMV Positive (pozitivní) výsledek a negativní kontrola by měla přinést CMV Negative (negativní) výsledek.
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 reagencií nebo přístrojem.
    c) V obou případech neúspěšnou kontrolu (kontroly) NeuMoDx CMV External Control zopakujte s čerstvě rozmrazenou ampulkou kontroly (kontrol), která neprošla testem validity.
    d) Pokud pozitivní externí kontrola NeuMoDx CMV External Control nepřestává hlásit Negative (negativní) výsledek, kontaktujte zákaznický servis společnosti NeuMoDx.
    e) Pokud negativní externí kontrola NeuMoDx CMV External Control nepřestává hlásit Positive (pozitivní) výsledek, pokuste se eliminovat všechny zdroje možné kontaminace, včetně výměny VŠECH činidel, 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 CMV Quant Test Strip obsahuje primery a sondu specifické pro SPC1, které umožňují detekci přítomnosti SPC1 spolu s cílovou DNA CMV (pokud je přítomna) prostřednictvím multiplexní 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 analýze NeuMoDx CMV Quant Assay prováděné na soustavě NeuMoDx System nepodaří vyprodukovat platný výsledek, bude oznámen buď jako Indeterminate (IND, nejednoznačný) nebo Unresolved (UNR, nevyřešený) na základě typu chyby, ke které došlo.

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

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

VÝKONOVÁ CHARAKTERISTIKA

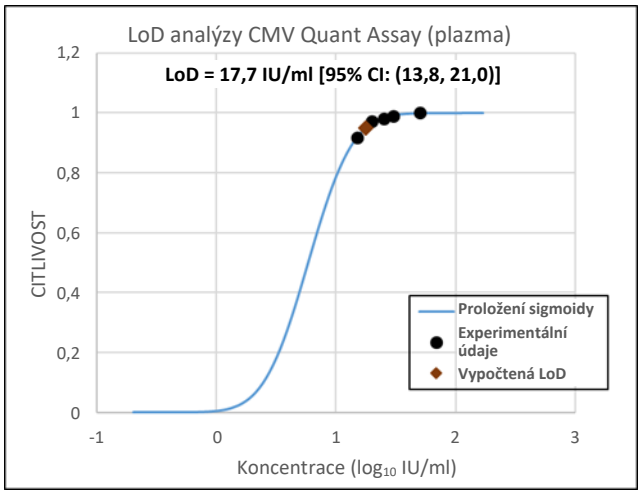
Analytická citlivost – mez detekce za použití standardu WHO

Analytická citlivost analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay byla charakterizována testováním negativních vzorků a série ředění roztoku 1. mezinárodního standardu WHO ve vyšetřené negativní lidské plazmě za účelem stanovit na soustavách NeuMoDx System mez detekce (Limit of Detection, LoD). LoD byla definována jako nejnižší hladina cíle detekovaná s mírou 95 %, jak bylo určeno probitovou analýzou. Měření bylo prováděno po dobu 3 dnů napříč několika soustavami s několika šaržemi reagencií NeuMoDx. Každá soustava zpracovala 18 replikátů denně u každé úrovně zředění. Míry detekce jsou uvedeny v *tabulce 2*.

Tabulka 2: Pozitivní míry detekce ke stanovení LoD analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay

Cílová koncentrace [IU/ml]	Cílová koncentrace [log_{10} IU/ml]	PLAZMA		
		Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
50	1,70	108	108	100,0 %
30	1,48	108	107	99,1 %
25	1,40	108	106	98,1 %
20	1,30	108	105	97,2 %
15	1,18	108	99	91,7 %
NEG	---	108	0	0,0 %

LoD analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay u plazmy pro variantu gB1 byla stanovena jako 17,7 IU/ml (1,25 log_{10} IU/ml) s 95% intervalem spolehlivosti (Confidence Interval, CI) 13,8–21,0 IU/ml, (1,14–1,32 log_{10} IU/ml) [*obrázek 2*]. LoD napříč genotypy je 20,0 IU/ml (1,30 log_{10} IU/ml), jak určila analýza míry shody (hit-rate).



Obrázek 2: Probitová analýza použitá ke stanovení LoD analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay u vzorků plazmy

Analytická citlivost – mez stanovitelnosti – dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

Dolní mez stanovitelnost (LLoQ) je definována jako nejnižší hladina cíle, při které je dosaženo detekce > 95 % A hodnoty TAE ≤ 1,0. S cílem stanovit LLoQ, byla pro každou z hladin cílového CMV, které jako součást výpočtu LoD vykazovaly > 95 % detekce, spočítána celková analytická chyba (Total Analytical Error, TAE). TAE je definována následovně:

TAE = odchylka + 2 * SD (Westgardova pravidla)

Odchylka je absolutní hodnota mezi průměrem vypočítané koncentrace a očekávanou koncentrací. SD odkazuje na standardní odchylku kvantitativně vyjádřené hodnoty vzorku.

Zpracované výsledky pro 5 hladin CMV vzorků plazmy (varianta gB1) použitých při měření LLoQ jsou uvedeny v *tabulce 3*. Na základě těchto údajů a dříve stanovené LoD byla LLoQ stanovena jako 20,0 IU/ml (1,30 log_{10} IU/ml) a potvrzena napříč genotypy.

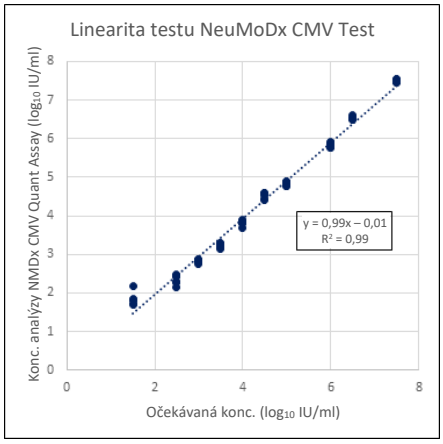
Tabulka 3: LLoQ analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay, s odchylkou a TAE

Cílová konc. [IU/ml]	Cílová konc. [log_{10} IU/ml]	Plazma				
		Průměrná konc. [log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE
50	1,70	1,75	100,0	0,16	0,05	0,37
30	1,48	1,62	99,1	0,24	0,14	0,62
25	1,40	1,56	98,1	0,19	0,17	0,55
20	1,30	1,57	97,2	0,22	0,27	0,72
15	1,18	1,52	91,7	0,21	0,35	0,78

Na základě výstupů těchto měření byly LoD i LLoQ analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay stanoveny jako 20,0 IU/ml [1,30 log_{10} IU/ml].

Linearita a určení horní meze stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearita a horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay u plazmy byly stanoveny přípravou série roztoků za použití zapouzdřeného cílového CMV NeuMoDx a přesné pozitivní kontroly CMV (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) se zajištěním návaznosti na 1. mezinárodní standard WHO. Ve smísené CMV negativní plazmě byl připraven 9prvkový panel za účelem vytvořit panel, který by pokryl rozsah koncentrací 8–1,7 log_{10} IU/ml. ULoQ analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay byla stanovena jako 8,0 log_{10} IU/ml. Koncentrace analýzy CMV ohlášené soustavou NeuMoDx System ve srovnání s očekávanými hodnotami jsou uvedeny na *obrázku 3.*



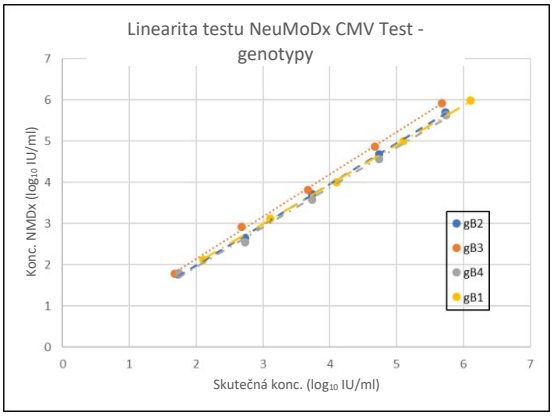
Obrázek 3: Linearita analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay

Linearita napříč genotypy

Linearita analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay napříč čtyřmi genotypy CMV (gB1, gB2, gB3 a gB4) byla charakterizována testováním pěti různých koncentrací u každého genotypu CMV připraveného ve smísené CMV negativní plazmě. Testované hladiny cílového CMV použité při tomto měření závisely na koncentraci zdrojového vzorku, a tudíž se napříč genotypy lišily. Měření proběhlo u každého ze 4 genotypů při 5 koncentracích za použití 6 replikátů. Linearita napříč čtyřmi genotypy viru CMV je znázorněna v *tabulce 4* a na *obrázku 4*.

Tabulka 4: Linearita analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay napříč genotypy

Genotyp	Rovnice linearity y = stanovitelnost analýzy NeuMoDx CMV Assay x = očekávaná stanovitelnost	R^2
gB1	y = 0,960x + 0,103	0,994
gB2	y = 0,989x + 0,009	0,996
gB3	y = 1,023x + 0,099	0,967
gB4	y = 0,968x + 0,004	0,992



Obrázek 4: Linearita analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay napříč genotypy

Analytická specificita – zkřížená reaktivita

Analytická specificita byla prokázána screeningem zkřížené reaktivity 35 organismů, které se ve vzorcích krve/plazmy běžně nacházejí, a také druhů, které se CMV fylogeneticky podobají**.** Organismy byly připraveny ve směsích skládajících se z 5–6 organismů testovaných při vysoké koncentraci. Testované organismy jsou uvedeny v *tabulce 5*. U žádného z testovaných organismů nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita, což potvrzuje 100 % analytickou specificitu analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay.

Tabulka 5: Patogenypoužité k prokázání analytické specificity

Necílové organismy					
Polyomavirus BK	Adenovirus typu 5	Herpes simplex virus 1	*Clostridium perfringens*	*Mycoplasma pneumoniae*	*Streptococcus pneumoniae*
Virus Epstein-Barrové	Virus hepatitidy C	Herpes simplex virus 2	*Enterococcus faecalis*	*Neisseria gonorrhoeae*	*Streptococcus pyogenes*
Lidský herpesvirus 6	Parvovirus B19	Varicella zoster virus	*Escherichia coli*	*Propionibacterium acnes*	*Aspergillus niger*
Lidský herpesvirus 7	JC virus	HIV 1	*Klebsiella pneumoniae*	*Salmonella typhimurium*	*Candida albicans*
Lidský herpesvirus 8	Lidský papilomavirus 16	HIV 2	*Listeria monocytogenes*	*Staphylococcus aureus*	*Cryptococcus neoformans*
Virus hepatitidy B	Lidský papilomavirus 18	*Chlamydia trachomatis*	*Mycobacterium avium*	*Staphylococcus epidermidis*	

Analytická specificita – interferující látky, komenzální organismy

Interference u analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay byla vyhodnocena za přítomnosti necílových organismů, a to za použití stejných směsí organismů, jaké byly připraveny pro testování zkřížené reaktivity, uvedených výše v *tabulce 5*. Plazma negativní na CMV byla obohacena o organismy smísené do skupin po 4–7 a při koncentraci 3 $\log_{10}$ IU/ml takto obohacena o cílový virus CMV. Jak naznačila minimální odchylka stanovitelnosti z kontrolních vzorků, které neobsahovaly žádný interferující přípravek, nebyla za přítomnosti těchto komenzálů pozorována žádná významná interference.

Analytická specificita – interferující látky, endogenní a exogenní látky

Analýza NeuMoDx CMV Quant Assay byla hodnocena za přítomnosti typických exogenních a endogenních interferujících látek, které se v klinických CMV vzorcích plazmy objevily. Mezi tyto látky patřily neobvykle vysoké hladiny krevních složek a také běžné antivirové léky, které byly zařazeny do *tabulky 6*. Každá látka byla přidána k vyšetřené CMV negativní lidské plazmě obohacené o 3 $\log_{10}$ IU/ml CMV a u vzorků byla zkoumána interference. Kromě toho byla na možnou interferenci testována i plazma ve stavu při běžném onemocnění souvisejícím s infekcí virem CMV. Průměrná koncentrace a odchylka u všech testovaných látek ve srovnání s kontrolními vzorky obohacenými o stejnou hladinu CMV jsou uvedeny v *tabulce 7.* Žádná z exogenních a endogenních látek specificita analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay neovlivnila.

Tabulka 6: Testování interference – exogenní přípravky (klasifikace léků)

Směs	Název léku	Klasifikace	Směs	Název léku	Klasifikace
Směs 1	Azathioprin	Imunosupresivum	Směs 4	Trimethoprim	Antibiotikum
	Cyklosporin	Imunosupresivum		Vankomycin	Antibiotikum
	Foscarnet	Antivirotikum (herpetické viry)		Takrolimus	Imunosupresivum
	Ganciclovir	Antivirotikum (CMV)		Everolimus	Imunosupresivum
	Valganciklovir hydrochlorid	Antivirotikum (CMV)		Klavulanát draselný	Antibiotikum
Směs 2	Prednison	Kortikosteroid/imunosupresivum	Směs 5	Famotidin	Blokátor histaminových receptorů
	Cidofovir	Antivirotikum (CMV)		Sulfamethoxazol	Antibiotikum
	Cefotetan	Antibiotikum (širokospektré)		Valaciklovir	Antivirotikum (herpetické viry)
	Cefotaxime	Antibiotikum (širokospektré)		Letermovir	Antivirotikum (CMV)
	Flukonazol	Protiplísňový lék		Ticarcillin disodium	Antibiotikum
Směs 3	Mycophenolate mofetil	Imunosupresivum		Leflunomid	Imunosupresivum
	Mycophenolate sodium	Imunosupresivum			
	Piperacillin	Antibiotikum			
	Sirolimus/ Rapamycin	Imunosupresivum			
	Tazobactam	Modifikované antibiotikum			

Tabulka 7: Testování interference – exogenní a endogenní přípravky

Endogenní	**Průměrná konc.**	**Odchylka**
	log_{10} IU/ml	**log_{10} IU/ml**
Hemoglobin	2,97	0,07
Triglyceridy	3,03	0,13
Bilirubin	3,01	0,11
Albumin	2,88	-0,02
Exogenní (medikace)	**Průměrná konc.**	**Odchylka**
	log_{10} IU/ml	**log_{10} IU/ml**
Směs 1: Azathioprin, Cyklosporin, Foskarnet, Ganciklovir, Valganciklovir hydrochlorid	2,88	-0,02
Směs 2: Prednison, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxime, Flukonazol	2,91	0,01
Směs 3: Mycophenolate mofetil, Mycophenolate sodium, Piperacillin, Sirolimus/Rapamycin, Tazobactam	2,98	0,08
Směs 4: Trimethoprim, Vankomycin, Takrolimus, Everolimus, Klavulanát draselný	3,05	0,15
Směs 5: Famotidin, Sulfamethoxazol, Letermovir, Valaciklovir, Ticarcillin disodium, Leflunomid	2,87	-0,03
Stav onemocnění	**Průměrná konc.**	**Odchylka**
	log_{10} IU/ml	**log_{10} IU/ml**
Antinukleární protilátka (Antinuclear Antibody, ANA)	2,90	0,00
Systémový lupus erythematodes (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,04	0,14
Revmatoidní artritida	2,99	0,09

Vnitrolaboratorní preciznost

Preciznost analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay byla stanovena testováním 3 replikátů 4prvkového panelu se vzorky CMV připravených s přesnou pozitivní CMV kontrolou (Exact Diagnostics, Fort Worth, Texas) dvakrát denně za použití dvou soustav NeuMoDx 288 System a jedné soustavy NeuMoDx 96 System po dobu 12 dnů. Preciznost byla charakterizována v rámci jednoho cyklu, jednoho dne a jedné soustavy a celková směrodatná odchylka byla stanovena jako ≤ 0,15 $\log_{10}$ IU/ml. Napříč soustavami, dny nebo cykly byla prokázána vynikající preciznost, jak je uvedeno v *tabulce 8*. Preciznost mezi pracovníky obsluhy charakterizována nebyla, jelikož obsluha při zpracování vzorků za použití soustavy NeuMoDx System nehraje žádnou významnou roli.

Tabulka 8: Vnitřní laboratorní preciznost — analýza NeuMoDx CMV Quant Assay na soustavách NeuMoDx System

Cílová konc. CMV [$\log_{10}$ IU/ml]	Průměrná konc. CMV [$\log_{10}$ IU/ml]	SD v rámci soustavy	SD v rámci dne	SD v rámci cyklu	Celková SD (v rámci laboratoře)
5,7	5,64	0,09	0,09	0,07	0,13
4,7	4,58	0,10	0,10	0,08	0,14
3,7	3,60	0,09	0,09	0,07	0,12
2,7	2,62	0,13	0,13	0,10	0,15

Reprodukovatelnost mezi šaržemi

Reprodukovatelnost mezi šaržemi u analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay byla stanovena za použití tří různých šarží klíčových reagencií – lýzového pufru NeuMoDx Lysis Buffer 1, extrakčních destiček NeuMoDx Extraction Plate a testovacích proužků NeuMoDx CMV Quant Test Strip. K hodnocení účinnosti byl použit 4prvkový panel CMV s přesnou CMV kontrolou. Testování bylo provedeno za použití tří šarží reagencií na třech soustavách po dobu 6 dnů. Byla zkoumána variace v rámci jedné šarže a mezi šaržemi a výsledky jsou prezentovány v *tabulce 9*. Maximální celková odchylka byla 0,12 $\log_{10}$ IU/ml a celková maximální SD byla 0,39 $\log_{10}$ IU/ml. Provedený ekvivalent byl prokázán napříč šaržemi, jelikož stanovitelnost všech prvků panelu byla v mezích stanovené tolerance.

Tabulka 9: Reprodukovatelnost mezi šaržemi — analýza NeuMoDx CMV Quant Assay

Cílová konc. CMV [$\log_{10}$ IU/ml]	Průměrná konc. CMV [$\log_{10}$ IU/ml]	N (Počet platných výsledků v jedné šarži)	Odchylka	SD mezi šaržemi	SD v rámci jedné šarže	Celková SD
5,7	5,65	36	0,05	0,27	0,15	0,31
4,7	4,63	36	0,07	0,22	0,13	0,26
3,7	3,58	36	0,12	0,34	0,18	0,39
2,7	2,64	36	0,06	0,12	0,14	0,18

Účinnost kontroly

Analýza NeuMoDx CMV Quant Assay obsahuje SPC1, která má ohlásit selhání jakéhokoli kroku zpracování nebo inhibici ovlivňující výkon analýzy. Účinnost byla testována za podmínek reprezentativních pro kritická selhání zpracování, ke kterým by během zpracování vzorku mohlo teoreticky dojít a která *by nemusela být detekována*senzory, které výkon soustavy NeuMoDx System monitorují. Pozitivní (při 3 $\log_{10}$ IU/ml) a negativní vzorky se musely za přítomnosti kontroly vypořádat s následujícími podmínkami: přítomností inhibitoru, absencí nedodané promývací reagencie a absencí propláchnutí. Neúčinnost procesu, která měla na detekci/stanovitelnost CMV nepříznivý vliv, se odrazila v účinnosti cílové SPC1, jak ukazuje *tabulka 10*. Ve všech testovaných případech bylo prokázáno, že buď kontrola zpracování vzorků dostatečně monitorovala neúčinnost procesu a přítomnost inhibitorů, nebo nepříznivý vliv předpokládané neúčinnosti procesu na detekci SPC1 ani na detekci a stanovitelnost CMV nebyl významný. Tudíž efektivní monitoring účinnosti analýzy na soustavě NeuMoDx System kontrolou SPC1 byl s úspěchem prokázán.

Tabulka 10: Účinnost kontroly zpracování vzorků

Testované selhání kroků zpracování	Stav amplifikace kontroly zpracování vzorků 1	Stav amplifikace cílového CMV	Výsledek analýzy
Presence of Inhibitor (Přítomnost inhibitoru)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Delivered (Promytí nebylo dodáno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Blowout (Bez pročištění)	Amplified (Amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	Positive (Pozitivní) se stanovitelností do 0,3 $\log_{10}$ IU/ml kontroly

Míra platných výsledků

Ke stanovení podílu platných výsledků bylo použito retrospektivní analýzy dat získaných při hodnocení účinnosti analýzy NeuMoDx CMV Assay na soustavách NeuMoDx System. Platné výsledky jsou oznámeny jako Positive (pozitivní) nebo Negative (negativní); neplatné výsledky mohou být oznámeny buď jako Indeterminate (IND, nejednoznačné) nebo jako Unresolved (UNR, nevyřešené) na základě stavu cíle a kontroly zpracování vzorku. Oznámení výsledku IND je obvykle způsobeno chybou přístroje, která vede k selhání amplifikace cíle a/nebo vnitřní kontroly zpracování. Oznámení výsledku UNR se připisuje vzorkům, kdy amplifikace jak cíle, tak vnitřní kontroly zpracování selže při absenci detekovaného selhání přístroje. Retrospektivní analýza, zahrnující údaje získané jak ze soustavy NeuMoDx 288, tak ze soustavy NeuMoDx 96 System, zahrnovala 1 100 individuálních výsledků analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay. Míra výsledků UNR byla stanovena jako 0,91 % (10/1100) a míra výsledků IND byla stanovena jako 0,36 % (4/1100); tím jsou splněna kritéria přijatelnosti analýzy. Podíl platných výsledků analýzy NeuMoDx CMV Assay napříč soustavami NeuMoDx System byl tudíž uzavřen na 98,7 % při CI 95 % (97,9- 99,2).

Křížová kontaminace

Míra zkřížené kontaminace analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay byla stanovena testováním tří sad vzorků CMV, kde se střídaly vzorky vysoce pozitivní a negativní. Celkem bylo testováno 108 replikátů plazmy negativní na CMV a 108 replikátů plazmy uměle obohacené o CMV v koncentraci 6,0 log10 IU/ml. Všech 108 replikátů negativního vzorku bylo negativních, což je důkazem, že během zpracování vzorku na soustavě NeuMoDx System k žádné křížové kontaminaci nedošlo.

Ekvivalence matrice vzorků

Bylo provedeno testování k prokázání ekvivalence matrice vzorků mezi plnou krví odebranou jak v odběrných zkumavkách s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA), tak v odběrových zkumavkách s kyselinou-citrátem-dextrózou (Acid Citrate Dextrose, ACD) pro přípravu plazmy. Kromě toho bylo ke stanovení ekvivalence provedeno další testování mezi čerstvými a zmrazenými vzorky plazmy (odebraných ve dvou typech zkumavek). Čerstvé vzorky byly uchovávány při 4 °C, dokud nebyly obohaceny třemi hladinami CMV a otestovány na ekvivalenci. Vzorky byly dále zmrazeny při teplotě –20 °C po dobu minimálně 24 hodin. Po této době skladování v mrazu byly vzorky rozmrazeny a znovu testovány. Regresní analýzou byla u výsledků mezi čerstvými a zmrazenými vzorky a mezi EDTA a ACD porovnána ekvivalence. Tyto údaje vykázaly vynikající ekvivalenci mezi vzorky plazmy v EDTA a v ACD a mezi čerstvými a zmrazenými vzorky se směrnicemi do 0,02 z 1,0 a velmi nízkou odchylkou (průsečíkem), jak je uvedeno v *tabulce 11* níže.

Tabulka 11: Ekvivalence matrice vzorků

Požadavek na parametry	ACD vs. K2EDTA		Čerstvé vzorky vs. zmrazené vzorky	
	Čerstvý vzorek	Zmrazený vzorek	ACD	EDTA
Směrnice (0,9-1,1)	1,000	0,982	1,014	1,000
Průsečík [< 0,5 $\log_{10}$ IU/ml]	-0,050	0,018	-0,061	0,020
p hodnota > 0,05	0,848	0,644	0,895	0,631

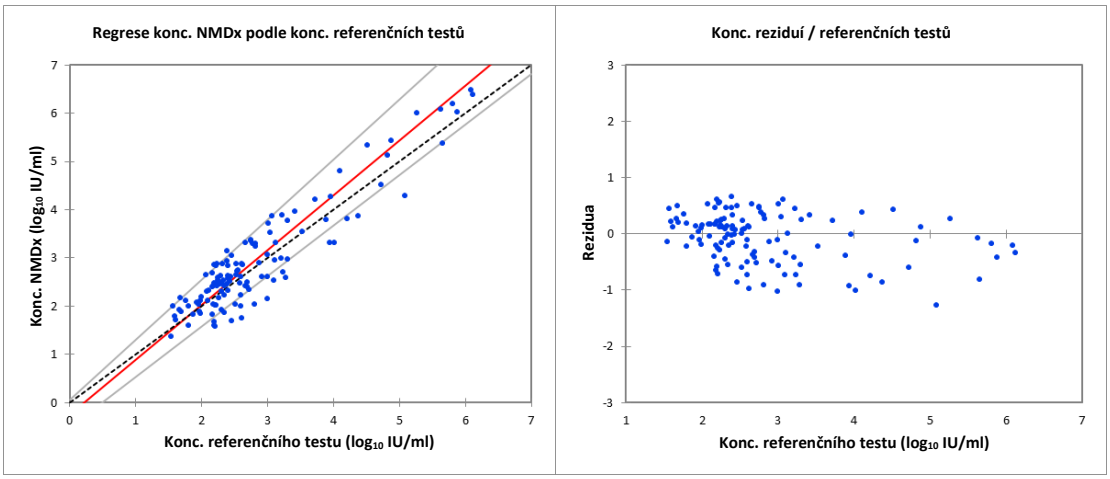
Srovnání klinickou metodou

Kvantitativní účinnost analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay byla hodnocena ve srovnání s analýzami komparátorů schválených úřadem FDA/označených značením CE testováním neředěných klinických vzorků od pacientů infikovaných virem CMV. Testování interně provedla společnost NeuMoDx prostřednictvím jednoduše zaslepené studie anonymizovaných, reziduálních klinických vzorků získaných od čtyř nezávislých referenčních laboratoří. Pomocí analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay bylo zpracováno celkem 284 vzorků plazmy (jednoduše) zaslepeným způsobem napříčněkolika soustavami NeuMoDx Molecular System.

Chyby zpracování a soustavy získané napříč soustavami NeuMoDx Molecular System byly minimální a splnily kritéria. Ze vzorků byly získány celkem 3 výsledky Indeterminate (IND, neurčitý), v důsledku čehož byla celková míra počátečních výsledků IND 1 % s 95% CI (0,27–3,32 %). Za normálního pracovního postupu nebyl k přepracování těchto 3 vzorků dostatečný objem. Zpočátku bylo získáno 10 výsledků Unresolved (UNR, nerozlišeno), ale podle doporučeného postupu u analýzy CMV Quant Assay pro výsledky UNR u zředění 1 : 10 v diluentu Basematrix byly po opakovaném testování všech 10 vzorků UNR, řádně zředěných, vzorků získány výsledky platné. Celková chybovost zpracování tedy byla 1,06 % s 95% CI (0,27 % – 3,3 %) kvůli výsledkům Indeterminate (neurčitý), jejichž testování nebylo možné zopakovat z důvodu nedostatečného objemu.

4 vzorky generovaly příznak chyby stanovitelnosti a 3 z těchto 4 vzorků bylo možné testovat opakovaně podle doporučeného postupu za použití ředění vzorku v diluentu Basematrix v poměru 1 : 10. Z 283 platných výsledků získaných v této studii bylo 129 vzorků analýzou NeuMoDx CMV Assay ohlášeno jako Positive (Pozitivní) s odpovídajícími hodnotami koncentrace přidělenými referenčními testy. Pět z šesti těchto vzorků bylo referenčním testem oznámeno pod LLoQ a jeden byl hlášen nad ULoQ, celkem 123 vzorků mělo tudíž odpovídající hodnoty koncentrace přidělené jak analýzou NeuMoDx CMV Quant Assay, tak referenčními testy CE IVD a byly použity pro kvantitativní korelační analýzu. Ke korelaci mezi hodnotami koncentrace z analýzy NeuMoDx CMV Assay a hodnotami udávanými referenčními testy byly použity regresní analytické metody podle Demminga a Passinga-Babloka.

Pro znázornění korelace mezi koncentracemi analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay a hodnotami koncentrace referenčních testů u všech vzorků testovaných za pomoci Demingovy a Passingovy-Bablokovy metody byly vytvořeny grafy ekvivalence, které jsou uvedeny na *obrázku 5*.



Obrázek 5: Graf ekvivalence (*vlevo*) a graf reziduí (*vpravo*) – kumulativní analýza (napříč oběma soustavami NeuMoDx System) výsledků analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay ve srovnání s výsledky referenčního testu u VŠECH vzorků na základě Passingovy-Bablokovy regresní analýzy.

Kvalita Demingovy regresní metody je ilustrována koeficientem směrnice 1,1 s 95% CI (1,0, 1,2) a průsečíkem (odchylkou) –0,18 s 95% CI (–0,39, 0,03), což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx CMV Quant Assay a referenčními testy jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou. Kvalita Passingovy-Bablokovy lineární metody je ilustrována koeficientem směrnice 1,1 s 95%CI (1,0, 1,2) a průsečíkem (odchylkou) −0,24 s 95% CI (−0,51, 0,06), což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx CMV Quant Assay a referenčními testy jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou, tak jak ukazuje *tabulka 12*.

Tabulka 12: Shrnutí lineární regresní analýzy metodami Demming a Passing-Bablok

Analýza metodou podle Deminga		Analýza metodou podle Passinga-Babloka	
Průsečík	**Koeficient směrnice**	**Průsečík**	**Koeficient směrnice**
-0,18 95% CI (-0,39, 0,03)	1,1 95% CI (1,0, 1,2)	-0,24 95%CI (-0,51, 0,06)	1,1 95% CI (1,0, 1,2)

REFERENCE

1. Centers for Disease Control (CDC). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. (2018). Retrieved from https://www.cdc.gov/cmv/clinical/features.html
2. Kraft, C. S., Armstrong, W. S., & Caliendo, A. M. (2012). Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. Clinical infectious diseases, 54(12), 1793-1797.
3. A Ross, S., Novak, Z., Pati, S., & B Boppana, S. (2011). Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders), 11(5), 466-474.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6th edition. HHS Publication HHS Publication No. (CDC) 300859, Revised June 2020
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

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

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

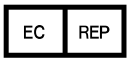
SYMBOLY

V návodu k použití nebo na obalu a etiketě se mohou vyskytovat následující symboly:

SYMBOL	VÝZNAM
℞ only	**Pouze na lékařský předpis**
	Výrobce
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku *in vitro*
	Autorizovaný zástupce pro Evropské společenství
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Datum spotřeby
	Omezení teploty
	Omezení vlhkosti
	Nepoužívejte opakovaně
	Obsahuje dostatečné množství pro <*n*> testů
	Prostudujte si návod k použití
	Upozornění
	Biologická rizika
	Značka CE
	Nebezpečnost pro zdraví
	Nebezpečí

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

Technická podpora / vigilanční hlášení: support.qiagen.com
Patent: www.neumodx.com/patents



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

CE 2797