

REF 201400 NeuMoDx™ CMV Quant Test Strip

R only

VORSICHT: Nur für den US-Export

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

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


Detaillierte Anleitungen sind dem Benutzerhandbuch für das NeuMoDx 288 Molecular System, Teile-Nr. 40600108 [REF 500100], zu entnehmen.

Detaillierte Anleitungen sind dem Benutzerhandbuch für das NeuMoDx 96 Molecular System, Teile-Nr. 40600317 [REF 500200] oder Teile-Nr. 40600655 [REF 500201] zu entnehmen.

VERWENDUNGSZWECK

Der NeuMoDx CMV Quant Assay ist ein automatisierter In-vitro-Nukleinsäureamplifikationstest für die Quantifizierung der DNA des Zytomegalievirus (CMV) in Humanplasmaproben zum Nachweis der CMV-Genotypen gB1 bis gB4 bei CMV-infizierten Personen. Der NeuMoDx CMV Quant Assay, implementiert auf dem NeuMoDx 288 Molecular System und dem NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System(s)), umfasst eine automatisierte DNA-Extraktion zur Isolation der Zielnukleinsäure aus der Probe und eine Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR), die auf die hochkonservierten Sequenzen im Genom des Zytomegalievirus abzielt.

Der NeuMoDx CMV Quant Assay ist für die Quantifizierung der DNA des Zytomegalievirus (CMV) *in vitro* in frischen und gefrorenen Humanplasmaproben unter Anwendung der NeuMoDx 288 und NeuMoDx 96 Molecular Systems bestimmt. Dieser Assay ist für die Verwendung im Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild und anderen Labormarkern für den Krankheitsverlauf vorgesehen und soll das klinische Management und die Überwachung von CMV-Infektionen unterstützen. Der Assay ist nicht für die Verwendung als Screeningtest auf das Vorhandensein von CMV in Blut oder Blutprodukten vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Zur Plasmagewinnung kann humanes Vollblut verwendet werden, das in sterilen Blutentnahmeröhrchen mit entweder EDTA oder ACD als Antikoagulant entnommen wurde. Zur Vorbereitung des Tests wird das Plasma in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen mithilfe eines speziellen Probenröhrchenträgers in das NeuMoDx System geladen, um die Verarbeitung zu beginnen. Für jede Probe wird ein 550-µl-Aliquot der Plasmaprobe mit NeuMoDx Lysis Buffer 1 vermischt, und das NeuMoDx System führt automatisch alle Schritte durch, die erforderlich sind, um die Zielnukleinsäure zu extrahieren, die isolierte DNA für die Echtzeit-PCR-Amplifikation vorzubereiten, eine Amplifikation zu erreichen und die Amplifikationsprodukte (Abschnitte des CMV-Genomziels in hochkonservierten Regionen), falls vorhanden, nachzuweisen. Der NeuMoDx CMV Quant Assay umfasst auch eine DNA-Probenprozesskontrolle (Sample Process Control, SPC1), mit der überwacht wird, ob potenziell inhibitorische Stoffe vorhanden sind oder während der Extraktions- und Amplifikationsprozesse Fehler am NeuMoDx System oder bei den Reagenzien auftreten.

CMV ist ein verbreitetes doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der humanen Herpesviren, das Menschen aller Altersgruppen infiziert. Schätzungen zufolge ist bis zum 40. Lebensjahr mehr als die Hälfte der Bevölkerung mit CMV infiziert worden.¹ CMV wird über Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Blut, Tränen, Samen und Muttermilch übertragen. Mit CMV infizierte immunkompetente Personen zeigen in der Regel keine Symptome; für Säuglinge und Personen mit geschwächtem Immunsystem kann eine Infektion mit dem Virus jedoch schwerwiegende Folgen haben. Schwangere können CMV auf ihr ungeborenes Kind übertragen, wodurch es neben motorischen und anderen Entwicklungsverzögerungen unter anderem zu Hörverlust kommen kann. CMV ist ein bedeutendes Pathogen für immungeschwächte Patienten, zu denen u. a. Empfänger von Organtransplantaten und hämatopoetischen Stammzellen, HIV-infizierte Patienten und Patienten unter Behandlung mit immunmodulierenden Medikamenten zählen.² Eine Überwachung der CMV-Viruslast wird in erster Linie bei diesen immungeschwächten Populationen durchgeführt, in denen CMV viele Morbiditäten wie Pneumonie, Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, Hepatitis und Enzephalitis verursacht und die Wahrscheinlichkeit einer Organabstoßung und anderer opportunistischer Infektionen erhöht.

Die Diagnose einer CMV-Infektion basiert nicht ausschließlich auf Nukleinsäuretests (NATs); NATs werden zusätzlich zu Antigentests, zu denen die Färbung polymorphkerniger Leukozyten (PMNs) für das frühe strukturelle untere Matrixprotein von CMV zählt, und anderen beim Patienten auftretenden Symptomen herangezogen. Tests der CMV-Viruslast werden routinemäßig verwendet, um zu ermitteln, wann eine antivirale Therapie erforderlich ist, und um die Wirksamkeit einer solchen Therapie zu überwachen.³ Die aktuellen Richtlinien für das Management und die Behandlung von CMV-Infektionen bei immungeschwächten Personen sind zwar nicht eindeutig, was den *Zeitpunkt* des Beginns der antiviralen Therapie angeht, doch sie alle schreiben eine Überwachung der Viruslast ab Beginn der antiviralen Therapie vor. Diese soll dabei helfen, die schweren Nebenwirkungen von Medikamenten in diesen Populationen abzuschwächen.

PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Der NeuMoDx CMV Quant Assay verwendet zur Durchführung der Analyse auf dem NeuMoDx System den NeuMoDx CMV Quant Test Strip, NeuMoDx CMV Calibrators, NeuMoDx CMV External Controls, NeuMoDx Lysis Buffer 1 sowie allgemeine Reagenzien von NeuMoDx. Der NeuMoDx CMV Quant Assay kombiniert die automatisierte DNA-Extraktion die Amplifikation und den Nachweis mittels Echtzeit-PCR. Vollblutproben werden für die Gewinnung von Plasma in EDTA- oder ACD-Röhrchen entnommen. Die Plasmaprobe wird in einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen in einen Probenröhrchenträger gesetzt, welcher zur Verarbeitung in das NeuMoDx System geladen wird. Es sind keine weiteren Bedieneingriffe erforderlich.

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

Die amplifizierten Ziele werden in Echtzeit anhand von Hydrolyse-Sonden-Chemie (allgemein als TaqMan® Chemie bezeichnet) nachgewiesen, wobei fluorogene Oligonukleotidsondenmoleküle angewendet werden, die spezifisch für die Amplifikate ihrer jeweiligen Ziele sind.

TaqMan Sonden bestehen aus einem Fluorophor, das kovalent am 5'-Ende der Oligonukleotidsonde gebunden ist, und einem Quencher am 3'-Ende. Solange die Sonde intakt ist, führt die Nähe des Fluorophors zum Quencher dazu, dass das Quencher-Molekül die Fluoreszenz des Fluorophors durch Förster-Resonanzenergietransfer (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) auslöscht.

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

Eine TaqMan-Sonde, die mit einem Fluorophor (Anregung: 490 nm und Emission: 521 nm) am 5'-Ende und einem dunklen Quencher am 3'-Ende markiert ist, wird zum Nachweis von GAS-DNA verwendet. Für den Nachweis der SPC1 wird die TaqMan Sonde mit einem alternativen Fluoreszenzfarbstoff (Anregung: 535 nm und Emission: 556 nm) am 5'-Ende und einem dunklen Quencher am 3'-Ende markiert. Die NeuMoDx System Software überwacht das von den TaqMan Sonden am Ende jedes Amplifikationszyklus abgegebene Fluoreszenzsignal. Nach Abschluss der Amplifikation analysiert die NeuMoDx System Software die Daten und gibt ein Endergebnis aus (POSITIVE (Positiv)/ NEGATIVE (Negativ) / INDETERMINATE (Unbestimmt) / UNRESOLVED (Offen)). Lautet das Ergebnis POSITIVE (Positiv), gibt die NeuMoDx System Software auch einen quantitative Wert für die Probe aus oder meldet, ob die berechnete Konzentration innerhalb der Quantifizierungsgrenzen liegt.

REAGENZIEN/VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bereitgestelltes Material

REF	Inhalt	Tests pro Einheit	Tests pro Packung
201400	NeuMoDx CMV Quant Test Strip <i>PCR-Trackreagenzien, die CMV-spezifische TaqMan Sonden und Primer sowie eine SPC1-spezifische TaqMan Sonde und SPC1-spezifische TaqMan Primer enthalten.</i>	16	96

Benötigte, aber nicht bereitgestellte Reagenzien und Verbrauchsmaterialien (separat bei NeuMoDx erhältlich)

REF	Inhalt
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Getrocknete paramagnetische Partikel und Probenprozesskontrollen sowie getrocknetes lytisches Enzym</i>
800400	NeuMoDx CMV Calibrators <i>Sets aus CMV-Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration für den Einmalgebrauch, zur Validierung der Standardkurve</i>
900401	NeuMoDx CMV External Controls <i>Sets aus CMV-Positiv- und Negativkontrollen zum Einmalgebrauch, zum täglichen Nachweis der Gültigkeit des NeuMoDx CMV Quant Assay</i>
400400	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hamilton CO-RE/CO-RE II Spitzen (300 µl) mit Filtern
235905	Hamilton CO-RE / CO-RE II Spitzen (1000 µl) mit Filtern

Benötigte Instrumente

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] oder NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200 oder 500201]

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Der NeuMoDx CMV Quant Test Strip ist ausschließlich zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik mit den NeuMoDx Molecular Systems bestimmt.
- Die Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn das Sicherheitssiegel aufgebrochen oder die Verpackung bei Ankunft beschädigt ist.
- Verbrauchsmaterialien oder Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbeutel bei der Ankunft geöffnet oder beschädigt ist.
- Bevor Testergebnisse für klinische Proben generiert werden können, muss eine gültige Testkalibrierung (generiert durch Verarbeitung von Kalibratoren mit hoher und niedriger Konzentration aus den NeuMoDx CMV Calibrators [REF 800400]) vorliegen.
- NeuMoDx CMV External Controls [REF 900401] müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden, solange Tests mit dem NeuMoDx CMV Quant Assay durchgeführt werden.
- Das Mindestprobenvolumen beträgt 1 ml EDTA/ACD-Plasma bei Verwendung eines Probenröhrchenträgers mit 32 Röhrchen; ein Volumen von weniger als 1 ml kann einen Fehler des NeuMoDx System zur Folge haben.
- Die Durchführung eines CMV-Assays mit Proben, die bei ungeeigneten Temperaturen oder über das angegebene Ablaufdatum hinaus aufbewahrt wurden, kann zu ungültigen oder falschen Ergebnissen bei Verwendung des NeuMoDx CMV Quant Test Strip führen.
- Eine Kontaminierung von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien mit Mikroorganismen und Desoxyribonuklease (DNase) ist stets zu vermeiden. Es wird die Verwendung steriler DNase-freier Einwegtransferpipetten empfohlen. Für jede Probe eine neue Pipette verwenden.
- Zur Vermeidung von Kontamination die NeuMoDx Cartridge nach der Amplifikation weder handhaben noch beschädigen. NeuMoDx Cartridges unter keinen Umständen aus dem Behälter für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 288 Molecular System) oder dem Eimer für biogefährlichen Abfall (NeuMoDx 96 Molecular System) entnehmen. Die NeuMoDx Cartridge ist dafür konzipiert, Kontamination zu verhindern.
- Wenn das Labor auch PCR-Tests mit offenen Röhrchen ausführt, muss unbedingt gewährleistet werden, dass der NeuMoDx CMV Quant Test Strip, die für die Tests zusätzlich benötigten Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, persönliche Schutzausrüstung wie Handschuhe und Laborkittel sowie das NeuMoDx System nicht kontaminiert werden.
- Bei der Handhabung von NeuMoDx Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sollten saubere, puderfreie Nitrilhandschuhe getragen werden. Es ist darauf zu achten, dass die Oberseite der NeuMoDx Cartridge, die Oberfläche der Versiegelungsfolie eines NeuMoDx CMV Quant Test Strip oder einer NeuMoDx Extraction Plate oder die Oberseite von Behältern mit NeuMoDx Lysis Buffer 1 nicht berührt werden; die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien dürfen ausschließlich an den Seitenflächen angefasst werden.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind unter www.qiagen.com/safety verfügbar.
- Nach der Durchführung des Tests Hände gründlich waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen Proben oder Reagenzien verarbeitet werden, nicht rauchen, trinken oder essen.
- Proben sind immer wie infektiöses Material und entsprechend den sicheren Laborverfahren (beschrieben in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ und im CLSI-Dokument M29-A4⁵) zu behandeln.
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfall entsprechend den nationalen, bundesstaatlichen, regionalen, kommunalen und lokalen Vorschriften entsorgen.
- Beim Arbeiten mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen. Weitere Informationen sind den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) zu entnehmen.

VORSICHTSMAßNAHMEN

NeuMoDx CMV Quant Test Strip	
GEFAHR 	<p>Enthält: Borsäure.</p> <p>Gefahr! Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.</p> <p>Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle Vorsichtsmaßnahmen lesen und verstehen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI Exposition oder FALLS betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Unter Verschluss aufbewahren. Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften bei einem zugelassenen Abfallentsorgungsdienst entsorgen.</p>

Notfallinformationen

CHEMTREC

Außerhalb der USA und Kanadas +1 703-527-3887

Entsorgung

In Übereinstimmung mit lokalen und nationalen Vorschriften als gefährlichen Abfall entsorgen. Dies gilt auch für ungebrauchte Produkte. Die Empfehlungen im Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheet, SDS) befolgen.

LAGERUNG, HANDHABUNG UND STABILITÄT VON PRODUKTEN

- Alle NeuMoDx Reagenzien und Verbrauchsmaterialien (mit Ausnahme der externen Kalibratoren) sind in der Primärverpackung bei 18 bis 23 °C bis zu dem auf dem oberen Produktetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.
- Ein in das NeuMoDx System geladener NeuMoDx CMV Quant Test Strip ist 14 Tage lang stabil; die NeuMoDx System Software fordert zur Entfernung von Teststreifen auf, die schon über 14 Tage lang im NeuMoDx System verwendet wurden, und es müssen neue NeuMoDx CMV Quant Test Strips geöffnet in das NeuMoDx System geladen werden.
- Die NeuMoDx Kalibratoren und Kontrollen sind nicht infektiös, sollten nach der Verwendung jedoch als biogefährlicher Laborabfall entsorgt werden, da sie nach der Verarbeitung im System Zielmaterial enthalten, das bei falscher Handhabung Kontaminationen verursachen kann.

PROBENNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

1. Alle Proben so handhaben, als könnten sie Infektionserreger übertragen.
2. Vollblut oder andere Proben, die in Primärröhrchen aufbewahrt werden, nicht einfrieren.
3. Zur Gewinnung der Plasmaproben sollte Vollblut in sterilen Röhrchen entnommen werden, die EDTA oder ACD als Antikoagulans enthalten. Die Anweisungen des Herstellers der Probenentnahmeröhrchen befolgen.
4. Vollblut, das in den oben aufgeführten Produkten entnommen wurde, kann vor der Plasmagewinnung bis zu 24 Stunden bei 2°C bis 25°C gelagert und/oder transportiert werden. Die Plasmagewinnung ist gemäß den Anweisungen des Herstellers durchzuführen.
5. Die vorbereiteten Plasmaproben können bis zu 8 Stunden vor Beginn der Verarbeitung im NeuMoDx System aufbewahrt werden. Falls zusätzliche Lagerungszeit benötigt wird, empfiehlt es sich, die Proben in entweder gekühlt zu lagern oder einzufrieren.
6. Die vorbereiteten Plasmaproben sollten vor den Tests zwischen 2 und 8 °C nicht länger als 7 Tage und bei Raumtemperatur maximal 8 Stunden lang gelagert werden.
7. Die vorbereiteten Proben können vor der Verarbeitung bei ≤ -20 °C bis zu 26 Wochen lang gelagert werden. Plasmaproben sollten vor der Verwendung nicht mehr als 2 Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.
 - a. Wenn die Proben gefroren sind, diese bei Raumtemperatur (15–30 °C) vollständig auftauen lassen und dann vortexen, um eine gleichmäßige Verteilung in der Probe zu erhalten.
 - b. Nach dem Auftauen gefrorener Proben sollten diese innerhalb von 8 Stunden getestet werden.
8. Wenn die Proben verschickt werden, sind sie in Übereinstimmung mit den geltenden Vorschriften auf Landes- und/oder internationaler Ebene zu verpacken und beschriften.
9. Proben eindeutig beschriften und darauf hinweisen, dass die Proben für CMV-Tests bestimmt sind.
10. Mit dem Abschnitt *Testvorbereitung* fortfahren.

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

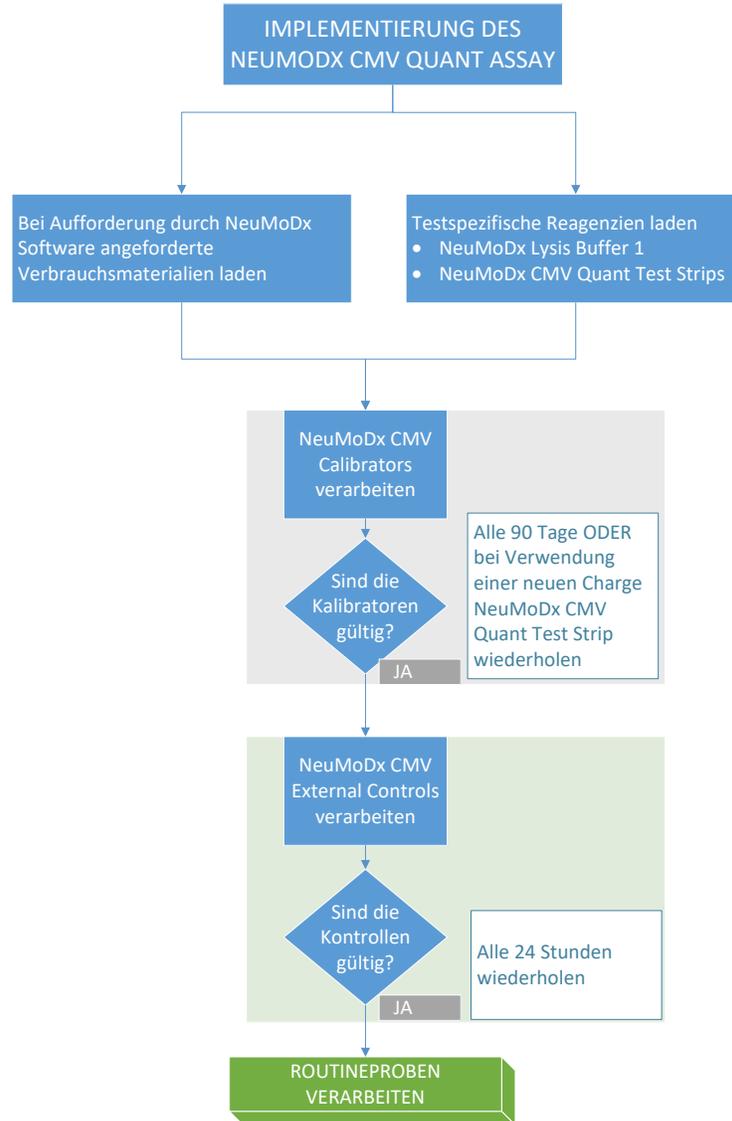


Abbildung 1: Workflow zur Implementierung des NeuMoDx CMV Quant Assay

GEBRAUCHSANWEISUNG

Testvorbereitung

1. Proben-Barcodeetikett auf einem mit dem NeuMoDx System kompatiblen Probenröhrchen anbringen.
2. Mit einer Transferpipette bei Verwendung des 32-Röhrchenträgers ≥ 1 ml oder bei Verwendung des 24-Röhrchenträgers > 2 ml Plasma in das mit Barcode versehene Probenröhrchen überführen. Es ist darauf zu achten, dass keine Gerinnsel aus der Plasmaprobe ins Probenröhrchen überführt werden. Für jede Probe eine andere Transferpipette verwenden.
3. Das Sekundärröhrchen muss die folgenden Röhrchenspezifikationen erfüllen, die basierend auf dem Probenröhrchenträger, der zur Verarbeitung eingesetzt wird, mit dem NeuMoDx System kompatibel sind.
 - 32-Röhrchenträger: zwischen 11 mm und 14 mm Durchmesser und zwischen 60 mm und 120 mm Höhe
 - 24-Röhrchenträger: zwischen 14,5 mm und 18 mm Durchmesser und zwischen 60 mm und 120 mm Höhe

Betrieb des NeuMoDx™ System

Detaillierte Anleitungen sind den Benutzerhandbüchern für die NeuMoDx 288 und 96 Molecular Systems (Teile-Nr. 40600108 und 40600317/40600655) zu entnehmen.

1. Einen oder mehrere NeuMoDx System Test Strip Carrier mit NeuMoDx CMV Quant Test Strip(s) befüllen und den/die Teststreifenträger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
2. Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software die erforderlichen Verbrauchsmaterialien in die Verbrauchsmaterialträger des NeuMoDx System geben und den/die Träger über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden.
3. Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software das NeuMoDx Wash Reagent oder NeuMoDx Release Reagent ersetzen oder den Priming-Abfall oder den Behälter für biogefährlichen Abfall leeren.
4. Bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software die Calibrators [REF 800400] und/oder External Controls [REF 900401] wie erforderlich verarbeiten. Weitere Informationen hinsichtlich der Kalibratoren und Kontrollen sind dem Abschnitt *Ergebnisverarbeitung* zu entnehmen.
5. Das/die Proben-/Kalibrator-/Kontrollröhrchen in einen 32-Röhrchenträger laden und darauf achten, dass die Deckel von allen Probenröhrchen entfernt wurden.
6. Den Probenröhrchenträger in eine beliebige freie Position auf dem Autolader-Regal setzen und über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden. Dadurch wird die Verarbeitung der für den/die angegebenen Test(s) geladenen Proben eingeleitet.

ANWENDUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Der NeuMoDx CMV Quant Test Strip kann ausschließlich auf NeuMoDx Systems verwendet werden.
- Die Leistung des NeuMoDx CMV Quant Test Strip wurde für Plasmaproben etabliert, die aus mit EDTA/ACD als Antikoagulans entnommenem Vollblut gewonnen wurden; die Verwendung des NeuMoDx CMV Quant Test Strip mit anderen klinischen Probentypen wurde nicht bewertet und die Leistungsmerkmale des Tests sind für andere Probentypen unbekannt.
- Da der CMV-Nachweis von der Anzahl der in der Probe vorhandenen Organismen abhängig ist, sind ordnungsgemäße Probennahme, Handhabung und Lagerung für zuverlässige Ergebnisse erforderlich.
- Bevor mit der routinemäßigen Verarbeitung klinischer Proben begonnen werden kann, müssen zunächst Kalibratoren und externe Kontrollen entsprechend den Empfehlungen in der Packungsbeilage sowie bei Aufforderung durch die NeuMoDx System Software verarbeitet werden.
- Eine unsachgemäße Probennahme, Handhabung, Lagerung, technische Fehler oder eine Verwechslung von Probenröhrchen kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zusätzlich können negative Ergebnisse erhalten werden, wenn die Anzahl von Viruspartikeln in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des NeuMoDx CMV Quant Assay liegt.
- Das NeuMoDx System darf ausschließlich von Personal bedient werden, das in der Verwendung des NeuMoDx Systems geschult ist.
- Wenn weder die CMV-Zielsequenz noch das SPC1-Ziel amplifiziert wird, wird ein ungültiges Ergebnis („Indeterminate“ (Unbestimmt) oder „Unresolved“ (Offen)) ausgegeben und der Test sollte wiederholt werden.
- Wenn das Ergebnis des NeuMoDx CMV Quant Assay Positive (Positiv) ist, der Quantifizierungswert jedoch außerhalb der Quantifizierungsgrenzen liegt, gibt das NeuMoDx System an, ob die nachgewiesene CMV-Konzentration *unterhalb* der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) oder *oberhalb* der oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) liegt.
- Sollte die nachgewiesene CMV-Konzentration unterhalb der LLoQ liegen, kann der NeuMoDx CMV Quant Assay (falls gewünscht) mit einem anderen Aliquot der Probe wiederholt werden.
- Sollte die nachgewiesene CMV-Konzentration oberhalb der ULoQ liegen, kann der NeuMoDx CMV Quant Assay mit einem verdünnten Aliquot der Originalprobe wiederholt werden. Empfohlen wird eine Verdünnung von 1:100 oder 1:1000 in CMV-negativem Plasma oder Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Die Konzentration der Originalprobe lässt sich wie folgt berechnen:
$$\text{Konzentration der Originalprobe} = \log_{10}(\text{Verdünnungsfaktor}) + \text{gemeldete Konzentration der verdünnten Probe}.$$
- Das gelegentliche Vorliegen von PCR-Inhibitoren in Plasma kann zu einem Quantifizierungsfehler im System führen. Tritt ein solcher auf, empfiehlt sich eine Testwiederholung mit der gleichen Probe nach 1:10- oder 1:100-Verdünnung in Basematrix.
- Ein positives Ergebnis zeigt nicht unbedingt das Vorhandensein lebensfähiger Organismen an. Allerdings deutet ein positives Ergebnis auf das Vorhandensein von DNA des Zytomegalievirus hin.
- Deletionen oder Mutationen in den konservierten Regionen, auf die der NeuMoDx CMV Quant Assay abzielt, können den Nachweis beeinträchtigen oder zu einem fehlerhaften Ergebnis bei Verwendung des NeuMoDx CMV Quant Test Strip führen.
- Die Ergebnisse des NeuMoDx CMV Quant Assay sollten zusätzlich zu klinischen Beobachtungen und sonstigen Informationen, die dem Arzt zur Verfügung stehen, herangezogen werden. Der Test ist nicht zur Diagnose einer Infektion bestimmt.
- Um Kontaminationen zu vermeiden, wird eine gute Laborpraxis, wie etwa das Wechseln der Handschuhe beim Umgang mit Proben verschiedener Patienten, empfohlen.

ERGEBNISVERARBEITUNG

Die verfügbaren Ergebnisse können unter der Registerkarte „Results“ (Ergebnisse) im Fenster „Results“ (Ergebnisse) auf dem Touchscreen des NeuMoDx Systems angezeigt oder ausgedruckt werden.

Die Ergebnisse des NeuMoDx CMV Quant Assay werden unter Anwendung des Entscheidungsalgorithmus und der Verarbeitungsparameter, die in der NeuMoDx CMV Assay-Definitionsdatei (CMV-ADF) spezifiziert sind, automatisch durch die NeuMoDx System Software generiert. Abhängig vom Amplifikationsstatus von Zielsequenz und Probenprozesskontrolle kann das Ergebnis des NeuMoDx CMV Quant Assay „Negative“ (Negativ), „Positive“ (Positiv) mit Angabe der CMV-Konzentration, „Positive“ (Positiv) oberhalb der oberen Quantifizierungsgrenze, „Positive“ (Positiv) unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze, „Indeterminate“ (Unbestimmt) oder „Unresolved“ (Offen) sein. Die Ergebnisse werden auf Grundlage des Entscheidungsalgorithmus in *Tabelle 1* ausgegeben.

Tabelle 1: Entscheidungsalgorithmus des NeuMoDx CMV Quant Assay

Ergebnis	CMV	Probenprozesskontrolle (SPC1)
Positive (Positiv)	$[2 \leq Ct \leq 9 \text{ AND (UND) } EPR > 2 \text{ AND (UND) } EP \geq 1500]$ OR (ODER) $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (UND) } EP \geq 1500]$	Nicht zutreffend.
Positive (Positiv), oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (\log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONZ) > 8,0 \log_{10} IU/ml, NO QUANT (KEINE QUANT)	Nicht zutreffend.
Positive (Positiv), unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (\log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONZ) < 1,3 \log_{10} IU/ml, NO QUANT (KEINE QUANT)	Nicht zutreffend.
Negative (Negativ)	Nicht zutreffend OR (ODER) $[2 < Ct < 9 \text{ AND (UND) } EPR \leq 2]$ OR (ODER) $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (UND) } EP < 1500]$ OR (ODER) $Ct > 41$	AMPLIFIED (AMPLIFIZIERT) $(28 \leq Ct \leq 34)$ and (und) $EP \geq 2.000$
Indeterminate (Unbestimmt)	NOT AMPLIFIED/System Errors Noted (NICHT AMPLIFIZIERT/Systemfehler festgestellt)	
Unresolved (Offen)	NOT AMPLIFIED/No System Errors Noted (NICHT AMPLIFIZIERT/keine Systemfehler festgestellt)	

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

Testberechnung

1. Für Proben innerhalb des Quantifizierungsbereichs des NeuMoDx CMV Quant Assay wird die Konzentration der CMV-DNA in den Proben anhand der gespeicherten Standardkurven in Verbindung mit dem Kalibrationskoeffizienten berechnet.
 - a. Ein „Kalibrationskoeffizient“ wird auf Grundlage der Ergebnisse für die verarbeiteten NeuMoDx CMV Calibrators berechnet und dient dazu, die Gültigkeit der Standardkurve für eine bestimmte Charge des NeuMoDx CMV Quant Test Strip auf einem spezifischen NeuMoDx System nachzuweisen.
 - b. Der Kalibrationskoeffizient wird in die endgültige Bestimmung der Konzentration der CMV-DNA einbezogen.
2. Die Ergebnisse des NeuMoDx CMV Quant Assay werden in \log_{10} IU/ml angegeben.
3. Die resultierende Quantifizierung unbekannter Proben kann auf den 1. internationalen CMV-Standard der WHO zurückgeführt werden.

Testkalibrierung

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

Externe Kalibratoren

1. Die NeuMoDx CMV Calibrators sind in einem Kit [REF 800400] verfügbar und enthalten nicht infektiöse verkapselte CMV-Ziele in Basematrix.
2. Ein Set der CMV-Kalibratoren muss verarbeitet werden, wenn eine neue Charge der NeuMoDx CMV Quant Test Strips verwendet wird oder eine neue CMV-Assay-Definitionsdatei auf das NeuMoDx System geladen wird oder der Gültigkeitszeitraum des aktuellen Kalibratorsets abgelaufen ist (aktuell auf 90 Tage festgelegt) oder Veränderungen an der NeuMoDx System Software vorgenommen werden.
3. Die NeuMoDx System Software benachrichtigt den Benutzer, wann die Kalibratoren verarbeitet werden müssen. Bis zur erfolgreichen Verarbeitung der Kalibratoren kann keine neue Teststreifencharge für Tests verwendet werden.
4. Die Gültigkeit der Kalibrierung wird wie folgt ermittelt:

- a) Zum Nachweis der Gültigkeit muss ein Set aus zwei Kalibratoren – hohe und niedrige Konzentration – verarbeitet werden.
 - b) Um gültige Ergebnisse zu erhalten, müssen mindestens 2 der 3 Replikate Ergebnisse innerhalb vordefinierter Parameter ergeben. Das Nominalziel für den Kalibrator mit niedriger Konzentration liegt bei $3 \log_{10}$ IU/ml und das Nominalziel für den Kalibrator mit hoher Konzentration bei $5 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Ein Kalibrationskoeffizient wird berechnet, um der erwarteten Variation zwischen verschiedenen Teststreifenchargen Rechnung zu tragen. Dieser Kalibrationskoeffizient kommt bei der Bestimmung der endgültigen CMV-Konzentration zum Einsatz.
5. Wenn ein oder beide Kalibrator(en) die Gültigkeitsprüfung nicht besteht/bestehen, ist die Verarbeitung für den/die fehlgeschlagenen Kalibrator(en) mit einem neuen Fläschchen zu wiederholen. Sollte einer der Kalibratoren die Gültigkeitsprüfung nicht bestehen, reicht es aus, nur die Verarbeitung des fehlgeschlagenen Kalibrators zu wiederholen; das System erfordert nicht, dass beide Kalibratoren erneut verarbeitet werden.
6. Wenn der/die Kalibrator(en) die Gültigkeitsprüfung zweimal in Folge nicht besteht/bestehen, NeuMoDx Molecular, Inc. kontaktieren.

Qualitätskontrolle

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

Externe Kontrollen

1. Externe Kontrollmaterialien, die nicht infektiöse verkapselte CMV-Ziele in Basematrix als Positivkontrollen enthalten, werden von NeuMoDx Molecular, Inc. in einem Kit angeboten, das die NeuMoDx CMV External Controls enthält [REF 900401].
2. Externe Positiv- und Negativkontrollen müssen alle 24 Stunden verarbeitet werden. Wenn kein Satz gültiger externer Kontrollen vorhanden ist, fordert das NeuMoDx System den Benutzer dazu auf, diese Kontrollen zu verarbeiten, bevor Probenergebnisse ausgegeben werden können.
3. Wenn externe Kontrollen benötigt werden, das Set externer Kontrollen aus dem Gefrierschrank entnehmen und die Fläschchen bei Raumtemperatur (15–30 °C) stehen lassen, bis sie vollständig aufgetaut sind. Vorsichtig vortexen, um die Homogenität zu gewährleisten.
4. Die Positiv- und Negativkontrollfläschchen in einen auf dem Autolader-Regal platzierten Probenröhrchenträger setzen und über den Touchscreen in das NeuMoDx System laden. Das NeuMoDx System erkennt den Barcode und beginnt die Verarbeitung der Probenröhrchen, sofern die für die Tests erforderlichen Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien verfügbar sind.
5. Die Gültigkeit der externen Kontrollen wird auf Grundlage des erwarteten Ergebnisses durch das NeuMoDx System bewertet. Die Positivkontrolle sollte das Ergebnis „Positive“ (Positiv) und die Negativkontrolle das Ergebnis „Negative“ (Negativ) für CMV ergeben.
6. Diskrepanze Ergebnisse für die externen Kontrollen sind wie folgt zu behandeln:
 - a) Ein für eine Negativkontrollprobe gemeldetes Testergebnis „Positive“ (Positiv) weist auf ein Probenkontaminationsproblem hin.
 - b) Ein für eine Positivkontrollprobe gemeldetes Testergebnis „Negative“ (Negativ) kann darauf hinweisen, dass ein Problem mit dem Reagenz oder dem Instrument besteht.
 - c) In jedem der oben beschriebenen Fälle die Verarbeitung der fehlgeschlagenen NeuMoDx CMV External Control(s) mit einem frisch aufgetauten Fläschchen der Kontrolle(n), die den Gültigkeitstest nicht bestanden hat/haben, wiederholen.
 - d) Wenn die positive NeuMoDx CMV External Control weiterhin das Ergebnis „Negative“ (Negativ) ergibt, den Kundenservice von NeuMoDx kontaktieren.
 - e) Wenn die negative NeuMoDx CMV External Control weiterhin das Ergebnis „Positive“ (Positiv) ergibt, vor dem Kontaktieren des Kundenservice von NeuMoDx möglichst ALLE in Frage kommenden Kontaminationsquellen eliminieren, was den Austausch aller Reagenzien einschließt.

(Interne) Probenprozesskontrollen

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

Ungültige Ergebnisse

Wenn ein auf dem NeuMoDx System ausgeführter NeuMoDx CMV Quant Assay kein gültiges Ergebnis liefert, wird das Ergebnis basierend auf der aufgetretenen Fehlerart entweder als „Indeterminate“ (IND) (Unbestimmt) oder „Unresolved“ (UNR) (Offen) gemeldet.

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

Das Ergebnis UNR (Offen) wird gemeldet, wenn keine gültige Amplifikation von CMV-DNA oder SPC1 nachweisbar ist, was auf einen möglichen Reagenzfehler oder das Vorliegen von Inhibitoren hinweist. Falls das Ergebnis UNR (Offen) gemeldet wird, kann als erster Schritt ein erneuter Test durchgeführt werden. Wenn der Wiederholungstest fehlschlägt, kann eine Probenverdünnung verwendet werden, um die Effekte einer möglichen Probeninhibition abzumildern.

LEISTUNGSMERKMALE

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

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

Tabelle 2: Positiv-Nachweisraten für die LoD-Bestimmung des NeuMoDx CMV Quant Assay

Zielkonzentration [IU/ml]	Zielkonzentration [log ₁₀ IU/ml]	PLASMA		
		Anzahl gültiger Tests	Anzahl positiver Ergebnisse	Nachweisrate
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 %

Die LoD des NeuMoDx CMV Quant Assay in Plasma für die Variante gB1 wurde als 17,7 IU/ml (1,25 log₁₀ IU/ml) mit einem 95%-Konfidenzintervall (KI) von 13,8–21,0 IU/ml, (1,14–1,32 log₁₀ IU/ml) bestimmt [*Abbildung 2*]. Die mittels Trefferquotenanalyse ermittelte LoD über Genotypen hinweg beträgt 20,0 IU/ml (1,30 log₁₀ IU/ml).

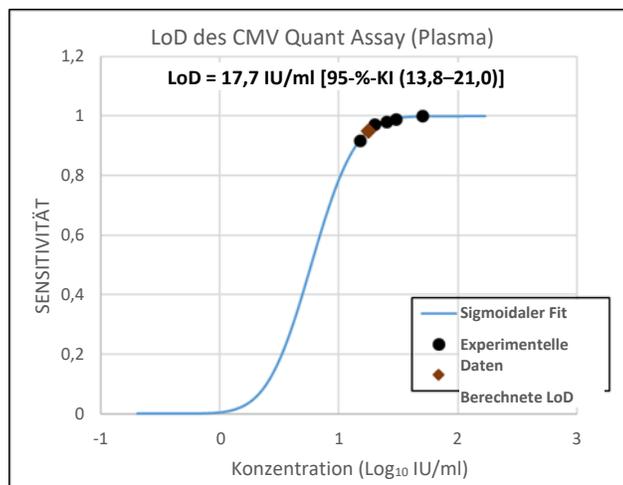


Abbildung 2: Probit-Analyse zur Bestimmung der LoD des NeuMoDx CMV Quant Assay in Plasmaproben

Analytische Sensitivität – Quantifizierungsgrenze – untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

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

$$\text{TAE} = \text{Bias} + 2 \cdot \text{SD} \text{ (Westgard Statistic)}$$

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

Die zusammengestellten Ergebnisse für die 5 Konzentrationen der CMV-Plasmaproben (Variante gB1), die in der LLOQ-Studie verwendet wurden, sind in *Tabelle 3* dargestellt. Anhand dieser Daten und der zuvor bestimmten LoD wurde die LLOQ als 20,0 IU/ml (1,30 log₁₀ IU/ml) ermittelt und über Genotypen hinweg bestätigt.

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

Target Conc. (Ziel-Konz) [IU/ml]	Target Conc. (Ziel-Konz) [log ₁₀ IU/ml]	Plasma				
		Konz.- Durchschnitt [log ₁₀ IU/ml]	Nachweis (%)	SD	Bias	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

Basierend auf dem Ergebnis dieser Studien wurden die LoD und die LLoQ des NeuMoDx CMV Quant Assay beide als 20,0 IU/ml [1,30 log₁₀ IU/ml] bestimmt.

Linearität und Bestimmung der oberen Bestimmungsgrenze (ULoQ)

Linearität und obere Bestimmungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) des NeuMoDx CMV Quant Assay wurden in Plasma anhand einer Verdünnungsreihe

mit dem verkapselten CMV-Ziel von NeuMoDx und der Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) mit etablierter Rückführbarkeit auf den 1. internationalen Standard der WHO ermittelt. In gepooltem CMV Plasma wurde ein Panel mit 9 Proben vorbereitet, das einen Konzentrationsbereich von 8–1,7 log₁₀ IU/ml abdeckt. Die ULoQ des NeuMoDx CMV Quant Assay wurde als 8,0 log₁₀ IU/ml bestimmt. Die vom NeuMoDx System ausgegebenen Konzentrationen für den CMV-Assay im Vergleich mit den Erwartungswerten sind in *Abbildung 3* dargestellt.

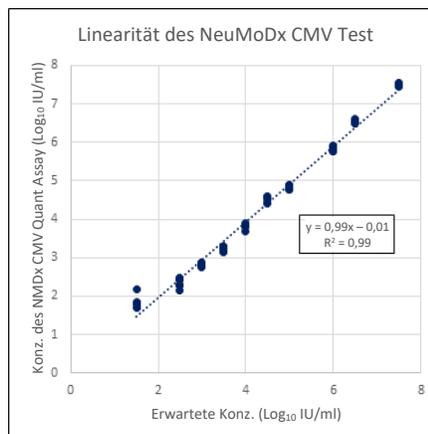


Abbildung 3: Linearität des NeuMoDx CMV Quant Assay

Linearität über Genotypen hinweg

Die Linearität des NeuMoDx CMV Quant Assay über vier CMV-Genotypen (gB1, gB2, gB3 und gB4) hinweg wurde durch Testen von fünf verschiedenen Konzentrationen für jeden CMV-Genotyp, hergestellt in gepoolten CMV-negativem Plasma, charakterisiert. Die Konzentrationen der in dieser Studie getesteten CMV-Ziele waren abhängig von der jeweiligen Konzentration der ursprünglichen Probe, weshalb sie sich für die verschiedenen Genotypen unterscheiden. Für die Studie wurden 6 Replikate jedes der 4 Genotypen in 5 Konzentrationen getestet. Die Linearität über vier CMV-Genotypen hinweg ist in *Tabelle 4* und *Abbildung 4* dargestellt.

Tabelle 4: Linearität des NeuMoDx CMV Quant Assay über Genotypen hinweg

Genotyp	Linearitätsgleichung y = NeuMoDx CMV Assay Quantifizierung x = erwartete Bestimmung	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

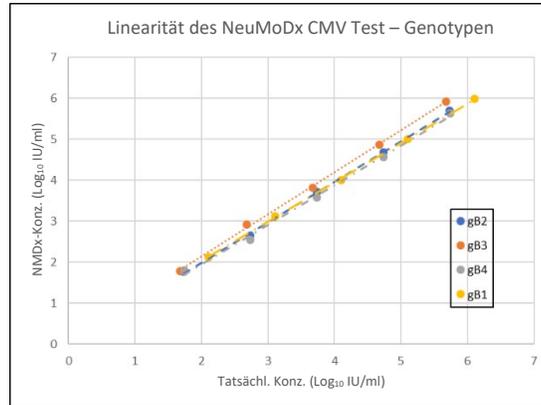


Abbildung 4: Linearität des NeuMoDx CMV Quant Assay über Genotypen hinweg

Analytische Spezifität – Kreuzreaktivität

Die analytische Spezifität wurde demonstriert, indem 35 häufig in Blut-/Plasmaproben vorkommende Organismen sowie Spezies, die phylogenetisch mit CMV verwandt sind, auf Kreuzreaktivität gescreent wurden. Die Organismen wurden in Pools mit jeweils 5–6 Organismen vorbereitet und bei hoher Konzentration getestet. Die getesteten Organismen sind in *Tabelle 5* dargestellt. Mit keinem der getesteten Organismen wurde eine Kreuzreaktivität beobachtet, was eine analytische Spezifität von 100 % für den NeuMoDx CMV Quant Assay bestätigt.

Tabelle 5: Zur Demonstration der analytischen Spezifität verwendete Pathogene

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

Analytische Spezifität – Störende Stoffe, kommensale Organismen

Der NeuMoDx CMV Quant Assay wurde auf Störungen in Gegenwart von Nicht-Zielorganismen untersucht. Dafür wurden dieselben Organismen eingesetzt wie für die Tests auf Kreuzreaktivität, die oben in *Tabelle 5* aufgeführt sind. CMV-negatives Plasma wurde mit den in Gruppen zu 4–7 gepoolten Organismen sowie mit CMV-Ziel in einer Konzentration von $3 \log^{10}$ IU/ml versetzt. Es wurde keine signifikante Störung in Gegenwart dieser kommensalen Organismen beobachtet, was aus der minimalen Abweichung der Quantifizierung von Kontrollproben ohne störende Agenzien hervorgeht.

Analytische Spezifität – störende Stoffe, endogene und exogene Stoffe

Die Leistung des NeuMoDx CMV Quant Assay wurde in Gegenwart typischer exogener und endogener Störstoffe, die in klinischen CMV-Plasmaproben vorkommen, bewertet. Diese umfassten ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Blutkomponenten sowie häufige antivirale Medikamente, welche in *Tabelle 6* klassifiziert sind. Jeder Stoff wurde einem gescreenten CMV-negativen Humanplasma zugesetzt, das mit $3 \log^{10}$ IU/ml CMV versetzt war, und die Proben wurden auf Störungen analysiert. Zusätzlich wurde auch für den mit einer CMV-Infektion verbundenen Krankheitszustand repräsentatives Plasma auf potenzielle Störungen getestet. Die durchschnittlichen Konzentrationen sowie das Bias aller getesteten Stoffe verglichen mit den mit der gleichen CMV-Konzentration versetzten Kontrollproben sind in *Tabelle 7* angegeben. Keine der exogenen und endogenen Stoffe beeinflusste die Spezifität des NeuMoDx CMV Quant Assay.

Tabelle 6: Störungstests – exogene Agenzien (Medikamenten-Klassifizierungen)

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

Tabelle 7: Störungstests – exogene und endogene Agenzien

Endogen	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Hämoglobin	2,97	0,07
Triglyceride	3,03	0,13
Bilirubin	3,01	0,11
Albumin	2,88	-0,02
Exogen (Medikamente)	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Pool 1: Azathioprin, Cyclosporin, Foscarnet, Ganciclovir, Valganciclovirhydrochlorid	2,88	-0,02
Pool 2: Prednison, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxim, Fluconazol	2,91	0,01
Pool 3: Mycophenolat-Mofetil, Mycophenolat-Natrium, Piperacillin, Sirolimus/Rapamycin, Tazobactam	2,98	0,08
Pool 4: Trimethoprim, Vancomycin, Tacrolimus, Everolimus, Clavulanat-Kalium	3,05	0,15
Pool 5: Famotidin, Sulfamethoxazol, Letermovir, Valacyclovir, Ticarcillin-Dinatrium, Leflunomid	2,87	-0,03
Krankheitszustand	Konz.-Durchschnitt	Bias
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Antinukleäre Antikörper (ANA)	2,90	0,00
Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)	3,04	0,14
Rheumatoide Arthritis	2,99	0,09

Laborinterne Präzision

Die Präzision des NeuMoDx CMV Quant Assay wurde durch Testen von 3 Replikaten eines 4-teiligen Panels aus CMV-Proben bestimmt, die mit Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) hergestellt wurden. Die Tests wurden zweimal pro Tag und unter Einsatz von zwei NeuMoDx 288 Systemen und einem NeuMoDx 96 System über 12 Tage durchgeführt. Die Intra-Lauf-, Intra-Tag- und Intra-System-Präzision wurden charakterisiert und die Gesamt-Standardabweichung wurde als $\leq 0,15 \log_{10}$ IU/ml bestimmt. Über alle Systeme, Tage oder Läufe hinweg wurde eine ausgezeichnete Präzision demonstriert, wie in *Tabelle 8* zu sehen ist. Die Präzision von Bediener zu Bediener wurde nicht charakterisiert, da der Bediener bei der Verarbeitung von Proben mit dem NeuMoDx System keine wesentliche Rolle spielt.

Tabelle 8: Laborinterne Präzision – NeuMoDx CMV Quant Assay auf NeuMoDx Systemen

Target (Ziel) CMV-Konz. [log ₁₀ IU/ml]	CMV-Durchschnittskonz. [log ₁₀ IU/ml]	Intra-System-SD	Intra-Tag-SD	Intra-Lauf-SD	Gesamt-SD (laborintern)
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

Interchargen-Reproduzierbarkeit

Die Interchargen-Reproduzierbarkeit des NeuMoDx CMV Quant Test Strip wurde unter Verwendung von je drei verschiedenen Chargen der wesentlichen Reagenzien – NeuMoDx Lysis Buffer 1, NeuMoDx Extraction Plates und NeuMoDx CMV Quant Test Strips – bestimmt. Zur Bewertung der Leistung wurde ein mit Exact CMV Control hergestelltes 4-Proben-Panel eingesetzt. Die Tests wurden mit je drei verschiedenen Reagenzchargen auf drei Systemen über 6 Tage durchgeführt. Die Variation innerhalb der und zwischen den Chargen wurde analysiert und die Ergebnisse sind in *Tabelle 9* aufgeführt. Das maximale Gesamt-Bias lag bei $0,12 \log_{10}$ IU/ml und die maximale Gesamt-SD bei $0,39 \log_{10}$ IU/ml. Es wurde eine über alle Chargen hinweg gleichbleibende Leistung demonstriert, da die Quantifizierung aller Panel-Mitglieder innerhalb der Toleranzanforderungen lag.

Tabelle 9: Interchargen-Reproduzierbarkeit – NeuMoDx CMV Quant Assay

Target (Ziel) CMV-Konz. [log ₁₀ IU/ml]	CMV- Durchschnittskonz- Konz. [log ₁₀ IU/ml]	N (Gültige Ergebnisse pro Charge)	Bias	Interchargen- SD	Intrachargen- SD	Gesamt-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

Wirksamkeit der Kontrolle

Die SPC1 ist im NeuMoDx CMV Quant Assay enthalten, um Prozessschrittfehler oder Inhibition nachzuweisen, die die Leistung des Assays beeinträchtigen könnten. Die Effizienz wurde unter Bedingungen getestet, die repräsentativ für kritische Fehlschläge von Prozessschritten sind, welche potenziell bei der Probenverarbeitung auftreten und von den Sensoren des NeuMoDx System zur Leistungsüberwachung *möglicherweise nicht erkannt* werden. Positive (bei 3 log₁₀ IU/ml) und negative Proben wurden in Anwesenheit einer Kontrolle unter folgenden Bedingungen getestet: Vorliegen eines Inhibitors, keine Wash Solution abgegeben, kein Wash Blow out. Prozessschwächen, die sich nachteilig auf den Nachweis/die Quantifizierung von CMV auswirkten, spiegelten sich in der Leistung des SPC1-Ziels wider, wie in *Tabelle 10* dargestellt. In allen getesteten Fällen zeigte sich, dass entweder die Probenprozesskontrolle Prozessschwächen und das Vorliegen von Inhibitoren korrekt überwachte oder die erwarteten Prozessschwächen keine signifikanten negativen Auswirkungen auf SPC1-Nachweis und CMV-Nachweis und -Quantifizierung hatten. Daher erwies sich die SPC1 als erfolgreich bei der Überwachung der Assayleistung auf dem NeuMoDx System.

Tabelle 10: Wirksamkeit der Probenprozesskontrolle

Getesteter Prozessschrittfehler	Amplifikationsstatus Probenprozesskontrolle 1	Status der CMV- Zielamplifikation	Assayergebnis
Presence of Inhibitor (Vorhandensein von Inhibitor)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Delivered (Keine Waschlösung abgegeben)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Not Amplified (Nicht amplifiziert)	Unresolved (Offen)
No Wash Blowout (Kein Wasch-Blowout)	Amplified (Amplifiziert)	Amplified (Amplifiziert)	Positive (Positiv) mit Quantifizierung innerhalb von 0,3 log ₁₀ IU/ml der Kontrolle

Rate gültiger Ergebnisse

Eine retrospektive Analyse der Daten, die während der Leistungsbewertung des NeuMoDx CMV Assay auf den NeuMoDx-Systemen erhalten wurden, wurde zur Bestimmung des Prozentsatzes der gültigen Ergebnisse verwendet. Gültige Testergebnisse werden als „Positive“ (Positiv) oder „Negative“ (Negativ) berichtet. Ungültige Testergebnisse können entweder als „Indeterminate“ (IND) (Unbestimmt) oder „Unresolved“ (UNR) (Offen) berichtet werden, basierend auf dem Amplifikationszustand des Ziels und der Probenprozesskontrolle. Ein IND-Ergebnis wird typischerweise durch einen Fehler am Instrument verursacht, der dazu führt, dass die Amplifikation des Ziels und/oder der internen Prozesskontrolle fehlschlägt. Ein UNR-Ergebnis wird Proben zugewiesen, wenn eine Amplifikation weder beim Ziel noch bei der internen Prozesskontrolle erfolgte, ohne dass ein Fehler am Instrument erkannt wurde. In die retrospektive Analyse wurden 1100 einzelne NeuMoDx CMV Quant Assay-Ergebnisse einbezogen, die sowohl mit dem NeuMoDx 288 als auch mit dem NeuMoDx 96 System gewonnene Daten umfassten. Die UNR-Rate wurde mit 0,91 % (10/1100) und die IND-Rate mit 0,36 % (4/1100) bestimmt. Diese Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien der Analyse. Daraus wurde geschlossen, dass die Rate gültiger Ergebnisse des NeuMoDx CMV Assay über die NeuMoDx Systems hinweg 98,7 % mit 95%-KI (97,9–99,2) beträgt.

Kreuzkontamination

Zur Bestimmung der Kreuzkontaminationsrate des NeuMoDx CMV Quant Assay wurden drei Sätze von CMV-Proben aus abwechselnd stark positiven und stark negativen Proben analysiert. Insgesamt wurden dabei 108 Replikate von CMV-negativem Plasma und 108 Replikate eines versetzten CMV-Plasmas bei 6,0 log₁₀ IU/ml getestet. Alle 108 Replikate der negativen Probe wurden als negativ berichtet, was zeigt, dass während der Probenverarbeitung im NeuMoDx System keine Kreuzkontamination aufgetreten ist.

Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Tests wurden durchgeführt, um die Gleichwertigkeit der Probenmatrizes für Vollblut zur Gewinnung von Plasma zu demonstrieren, das in Entnahmeröhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Acid-Citrate-Dextrose (ACD) entnommen wurde. Zusätzliche Tests wurden durchgeführt, um die Gleichwertigkeit von frischen und gefrorenen Plasmaproben (entnommen in den zwei Röhrchentypen) zu bestimmen. Die frischen Proben wurden bei 4 °C aufbewahrt, bis sie mit drei Konzentrationen von CMV versetzt und auf Gleichwertigkeit getestet wurden. Als Nächstes wurden die Proben mindestens 24 Stunden lang bei -20 °C eingefroren. Nach diesem Zeitraum der gefrorenen Lagerung wurden die Proben aufgetaut und erneut getestet. Die Ergebnisse für frisches vs. gefrorenes Plasma sowie EDTA- vs. ACD-Plasmaproben wurden mittels Regressionsanalyse auf ihre Gleichwertigkeit untersucht. Die Daten ergaben eine ausgezeichnete Gleichwertigkeit zwischen EDTA- und ACD-Plasmaproben sowie frischen und gefrorenen Plasmaproben, mit Steigungen innerhalb von 0,02 und 1,0 und einem sehr geringen Bias (Achsenabschnitt), wie in *Tabelle 11* unten dargestellt.

Tabelle 11: Gleichwertigkeit der Probenmatrix

Parameteranforderung	ACD vs K2EDTA		Frisch vs. gefroren	
	Frisch	Gefroren	ACD	EDTA
Steigung [0,9–1,1]	1,000	0,982	1,014	1,000
Achsenabschnitt [$< 0,5 \log_{10}$ IU/ml]	-0,050	0,018	-0,061	0,020
p -Wert $> 0,05$	0,848	0,644	0,895	0,631

Klinischer Methodenvergleich

Die quantitative Leistung des NeuMoDx CMV Quant Assay wurde im Vergleich mit FDA-/CE-zugelassenen Assays bewertet. Dazu wurden unverdünnte klinische Proben von CMV-infizierten Patienten getestet. Die Tests wurden in Form einer Einfachblindstudie intern bei NeuMoDx mit anonymisierten klinischen Restproben durchgeführt, die von vier externen Referenzlaboren bezogen wurden. Insgesamt wurden 284 Plasmaproben mit dem NeuMoDx CMV Quant Assay in (einfach) verblindeter Weise auf mehreren NeuMoDx Molecular Systems verarbeitet.

Die Verarbeitungs- und Systemfehler, die auf den NeuMoDx Molecular Systems auftraten, waren minimal und erfüllten die Kriterien. Für die Proben wurden insgesamt 3 Ergebnisse des Typs „Indeterminate“ (IND) (Unbestimmt) erhalten, wodurch sich eine anfängliche IND-Gesamtrate von 1 % mit 95%-KI (0,27–3,32 %) ergab. Das Volumen war nicht ausreichend, um diese 3 Proben mit dem normalen Workflow erneut zu verarbeiten. Anfänglich wurden 10 Ergebnisse des Typs „Unresolved“ (UNR) (Offen) erhalten, aber nach Befolgen des für den CMV Quant Assay empfohlenen Verfahrens für eine 1:10-Verdünnung in Basematrix bei UNR-Ergebnissen wurden beim Wiederholungstest für alle 10 ordnungsgemäß verdünnten UNR-Proben gültige Ergebnisse erhalten. Demnach betrug die Gesamtverarbeitungsfehlerrate 1,06 % mit 95%-KI (0,27 %–3,3 %) aufgrund der unbestimmten Ergebnisse, für die wegen des nicht ausreichenden Volumens kein Wiederholungstest möglich war.

Für 4 Proben wurde die Markierung „Quantitation Error“ (Quantifizierungsfehler) generiert. Bei 3 dieser 4 Proben konnte ein Wiederholungstest gemäß dem empfohlenen Verfahren mit 1:10-Verdünnung der Probe in Basematrix durchgeführt werden, um ein gültiges quantitatives Ergebnis zu erhalten. Von den 283 in der Studie erhaltenen gültigen Ergebnissen wurden 129 Proben vom NeuMoDx CMV Assay als positiv gemeldet. Die entsprechenden Konzentrationswerte wurden mit den Referenztests bestimmt. Für sechs dieser Proben wurden im Referenztest fünf Ergebnisse unterhalb der LLoQ und ein Ergebnis oberhalb der ULoQ berichtet. Damit wiesen insgesamt 123 Proben durch NeuMoDx CMV Quant Assay und die CE-IVD-Referenztests zugewiesene übereinstimmende Konzentrationswerte auf und konnten für die quantitative Korrelationsanalyse eingesetzt werden. Deming- und Passing-Bablok-Regressionsanalysen wurden zur Korrelation der Konzentrationswerte des NeuMoDx CMV Assay mit den im Referenztest erhaltenen Werte verwendet.

Gleichwertigkeitsplots wurden generiert, um für alle getesteten Proben die mittels Deming- und Passing-Bablok-Regressionsanalyse ermittelte Korrelation zwischen den Konzentrationswerten des NeuMoDx CMV Quant Assay und den Konzentrationswerten des Referenztests darzustellen. Diese sind in *Abbildung 5* zu sehen.

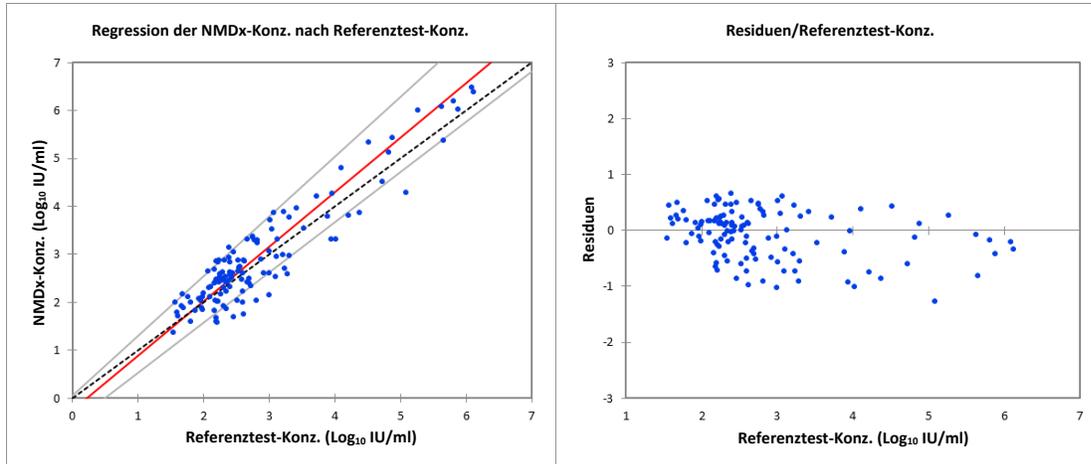


Abbildung 5: Gleichwertigkeits- (*links*) und Residuen-Plot (*rechts*) – Kumulative Analyse (für beide NeuMoDx Systems) der NeuMoDx CMV Quant Assay-Ergebnisse im Vergleich zu den Referenztest-Ergebnissen für ALLE Proben auf Grundlage einer Passing-Bablok-Regressionsanalyse.

Die Qualität der Anpassung der Deming-Regression wird durch einen Steigungskoeffizienten von 1,1 mit 95%-KI (1,0, 1,2) und einen Achsenabschnitt (Bias) von -0,18 mit 95%-KI (-0,39, 0,03) illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx CMV Quant Assay und Referenztests erhaltenen Konzentrationsergebnisse hochkorreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen. Die Qualität der linearen Anpassung nach Passing-Bablok wird durch einen Steigungskoeffizienten von 1,1 mit 95%-KI (1,0, 1,2) und einen Achsenabschnitt (Bias) von -0,24 mit 95%-KI (-0,51, 0,06) illustriert, welche demonstrieren, dass die mit dem NeuMoDx CMV Quant Assay und Referenztests erhaltenen Konzentrationsergebnisse hochkorreliert sind und ein akzeptables Bias aufweisen, wie in *Tabelle 12* gezeigt.

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

Deming-Analyse		Passing-Bablok-Analyse	
Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient	Achsenabschnitt	Steigungskoeffizient
-0,18	1,1	-0,24	1,1
95%-KI (-0,39, 0,03)	95%-KI (1,0, 1,2)	95%-KI (-0,51, 0,06)	95%-KI (1,0, 1,2)

LITERATUR

- Centers for Disease Control (CDC). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. (2018). Retrieved from <https://www.cdc.gov/cm/clinical/features.html>
- 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.
- 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.
- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6th edition. HHS Publication HHS Publication No. (CDC) 300859, Revised June 2020
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARKEN

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

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

SYMBOLLE

Die folgenden Symbole können in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Etikettierung zu sehen sein.

SYMBOL	BEDEUTUNG
R only	Nur zur Verwendung durch Fachpersonal
	Hersteller
IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
EC REP	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
REF	Katalognummer
LOT	Chargenbezeichnung
	Verwendbar bis
	Temperaturgrenzwert
	Luftfeuchtigkeitsbegrenzung
	Nicht wiederverwenden
	Ausreichend für $<n>$ Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vorsicht
	Biologische Risiken
CE	CE-Kennzeichnung
	Gesundheitsgefahr
	Gefahr



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

Technischer Support/Vigilanzberichterstattung: support.qiagen.com
Patent: www.neumodx.com/patents



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

