

REF 300500 NeuMoDx™ HIV-1 Quant Test Strip

R only

PRZESTROGA: Wyłącznie do eksportu poza Stany Zjednoczone

IVD Do diagnostyki *in vitro* z wykorzystaniem systemów NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System

 Aktualne wersje ulotek informacyjnych można znaleźć pod adresem: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Szczegółowe instrukcje zawiera dokument NeuMoDx 288 Molecular System — podręcznik użytkownika; nr części: 40600108

Szczegółowe instrukcje zawiera dokument NeuMoDx 96 Molecular System — podręcznik użytkownika; nr części: 40600317

PRZEZNACZENIE

Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wykonywane w systemie NeuMoDx 96 Molecular System i systemie NeuMoDx 288 Molecular System (system(y) NeuMoDx System) to zautomatyzowany diagnostyczny test ilościowy i jakościowy służący do amplifikacji *in vitro* kwasu nukleinowego, przeznaczony do oznaczania ilościowego i wykrywania RNA ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 (Human Immunodeficiency Virus Type 1, HIV-1) w ludzkim osoczu.

Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, w połączeniu z danymi dotyczącymi stanu klinicznego i innych markerów laboratoryjnych służących do określania rokowania choroby, może być wykorzystywane pomocniczo podczas opieki klinicznej nad pacjentami zakażonymi wirusem HIV-1 i do monitorowania odpowiedzi na leczenie antyretrowirusowe mierzonej poprzez zmiany stężenia RNA wirusa HIV-1 w osoczu. Oznaczenie umożliwia ilościowe oznaczenie RNA wirusa HIV-1 w zakresie od 34,2 do 5,0 x 10⁷ IU/ml (1,5–7,7 log₁₀ IU/ml). Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay zostało zwalidowane do oznaczania ilościowego RNA wirusa HIV-1 z grupy M (podtypy A, B, C, D, F, G, H, K, CRF01_AE, CRF02_AG) N, O i P.

Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay jest przeznaczone do stosowania pomocniczo podczas ustalania rozpoznania zakażenia wirusem HIV-1, w tym zakażenia ostrego lub pierwotnego. Obecność RNA wirusa HIV-1 w osoczu pacjentów przy braku obecności przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi HIV-1 wskazuje na występowanie ostrego lub pierwotnego zakażenia wirusem HIV-1. Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay może być wykorzystywane jako test uzupełniający do badania próbek, dla których w zatwierdzonych testach immunologicznych wykrywających wirusa HIV generowane są powtarzalnie wyniki reaktywne, oraz jako test potwierdzający zakażenie wirusem HIV-1.

Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay nie jest przeznaczone do użytku jako test przesiewowy wykonywany pod kątem wirusa HIV-1 u dawców krwi w celu stwierdzenia obecności wirusa HIV-1 w krwi lub produktach krwiopochodnych.

PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIE

Ludzka krew pełna zbierana do sterylnych probówek do pobierania krwi zawierających antykoagulant w postaci kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) lub kwaśnego cytrynianu dekstrozy (Acid Citrate-Dextrose, ACD) lub do probówek do przygotowywania osocza (Plasma Preparation Tube, PPT) może być używana do przygotowania osocza. W celu przygotowania próbki do testów osocze w probówce wtórnej lub frakcjonowana krew w probówce pierwotnej zgodnej z systemem NeuMoDx System są ładowane do systemu NeuMoDx System przy użyciu dedykowanego nośnika probówek w celu rozpoczęcia analizy. W przypadku każdej próbki osocza porcja o objętości 600 µl jest mieszana z buforem NeuMoDx Lysis Buffer 3, a system NeuMoDx System automatycznie wykonuje wszystkie kroki wymagane do wyizolowania docelowego kwasu nukleinowego, przygotowania wyizolowanego RNA do łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) w czasie rzeczywistym oraz amplifikacji i detekcji produktów amplifikacji (części konserwatywnych regionów genomu wirusa HIV-1), jeśli są obecne. Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay zawiera kontrolę przetwarzania próbki (Sample Process Control, SPC2) w postaci RNA, ułatwiającą monitorowanie pod kątem obecności potencjalnych inhibitorów oraz wykrycie nieprawidłowości w działaniu systemu NeuMoDx System lub odczynników, które mogą wystąpić podczas procesów izolacji i amplifikacji.

Ludzki wirus niedoboru odporności (Human Immunodeficiency Virus, HIV) to czynnik etiologiczny zespołu nabytego upośledzenia odporności (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS). Wyróżniane są dwa typy tego wirusa, z których najczęściej występującym i najbardziej patogennym jest wirus HIV typu 1 (HIV-1). Wirus HIV-1 może przenosić się drogą płciową, przez kontakt z krwią lub produktami krwiopochodnymi pochodzącymi od zakażonej osoby lub z zakażonej matki na płód¹⁻⁴. Ostre zakażenie wirusem HIV-1, podczas którego występują objawy podobne do grypy, rozwija się od 3 do 5 tygodni od pierwotnego zakażenia wirusem i charakteryzuje się wysokim poziomem wirēmii. Odpowiedź układu immunologicznego swoista dla wirusa HIV-1 jest wykrywalna w ciągu od 4 do 6 tygodni po wystąpieniu objawów⁵⁻⁹.

Po serokonwersji większość pacjentów wchodzi w fazę bezobjawowego zakażenia, która może trwać wiele lat. Metoda ilościowego pomiaru stężenia RNA wirusa HIV-1 we krwi obwodowej w znacznym stopniu przyczyniła się do zrozumienia patogenezы zakażenia wirusem HIV-1, a wyniki takich pomiarów okazały się istotnym parametrem podczas określenia rokowania i opieki nad pacjentami zakażonymi wirusem HIV-1¹⁰⁻¹¹. Decyzje odnośnie do wdrożenia terapii antyretrowirusowej lub wprowadzenia zmian w takiej terapii są podejmowane w oparciu o dane uzyskane podczas monitorowania stężenia RNA wirusa HIV-1 w osoczu (miano wirusa), liczby limfocytów T CD4+ oraz stanu klinicznego pacjenta¹²⁻¹⁷. Celem terapii antyretrowirusowej jest zahamowanie replikacji wirusa HIV-1 do poziomu niewykrywalnego przez obecnie dostępne na rynku testy określające miano wirusa. Stężenie wirusa we krwi obwodowej można oznaczyć ilościowo, wykonując pomiar antygenu p24 wirusa HIV w surowicy, zakładając hodowlę i wykonując oznaczenie ilościowe wirusa HIV w osoczu lub wykonując bezpośredni pomiar wirusowego RNA w osoczu metodami amplifikacji kwasu nukleinowego lub amplifikacji sygnału⁹⁻¹¹. Metody molekularne, takie jak łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją, są szeroko stosowane do amplifikacji kwasów nukleinowych¹¹. W oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wykorzystywana jest technika RT-PCR z homogeną detekcją fluorescencji w czasie rzeczywistym. W oznaczeniu wykorzystywana jest amplifikacja i detekcja dwóch sekwencji docelowych, gdyż jest ono ukierunkowane na dwa odrębne regiony genomu wirusa HIV-1. Ponadto obecne w oznaczeniu startery zdegenerowane umożliwiają wykrywanie zróżnicowanych podtypów z grupy M (A, B, C, D, F, G, H, K), w tym krążących form rekombinowanych i izolatów z grupy N, O i P. Wyniki oznaczenia są zgłaszane w jednostkach międzynarodowych na ml (International Units per mL, IU/ml).

ZASADY PROCEDURY

Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay łączy zautomatyzowaną izolację RNA oraz amplifikację/detekcję produktów amplifikacji w reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym. Próbkę krwi pełnej są zbierane do probówek z dodatkiem EDTA, ACD lub probówek PPT przeznaczonych do przygotowania osocza. Pierwotna (frakcjonowana) próbka krwi lub porcja osocza w zgodnej probówce wtórnej jest oznaczana kodem kreskowym i umieszczana w systemie NeuMoDx System. System NeuMoDx System automatycznie zasysa porcję osocza w celu wymieszania jej z buforem NeuMoDx Lysis Buffer 3 i składnikami zawartymi na płytce NeuMoDx Extraction Plate w celu rozpoczęcia analizy. System NeuMoDx System umożliwia automatyzację i integrację izolacji i zateżania RNA, przygotowania odczynników i amplifikacji/detekcji docelowych sekwencji kwasów nukleinowych przy użyciu reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym. Zawarta kontrola przetwarzania próbki (Sample Process Control, SPC2) ułatwia monitorowanie pod kątem obecności inhibitorów oraz wykrycie nieprawidłowości związanych z systemem, procesem lub odczynnikami. Po załadowaniu próbki do systemu NeuMoDx System operator nie musi wykonywać żadnych działań.

W celu przeprowadzenia lizy, izolacji RNA oraz usunięcia inhibitorów w zautomatyzowany sposób w systemie NeuMoDx System stosowane są wysoka temperatura, enzym lityczny i odczynniki do izolacji. Uwolnione kwasy nukleinowe są wychwytywane przez cząstki paramagnetyczne. Cząstki te, wraz ze związanymi kwasami nukleinowymi, są następnie ładowane do kasety NeuMoDx Cartridge, w której niezwiązane składniki są wymywane przy użyciu odczynnika NeuMoDx Wash Reagent. Związane RNA jest eluowane przy użyciu odczynnika NeuMoDx Release Reagent. System NeuMoDx System wykorzystuje eluowane RNA do uwodnienia zastrzeżonych odczynników do amplifikacji NeuDry™, które zawierają wszystkie składniki wymagane do amplifikacji sekwencji docelowych wirusa HIV-1 i kontroli SPC2. Umożliwia to równoczesną amplifikację i detekcję docelowych sekwencji RNA i kontroli. Po rekonstytucji suchych odczynników do reakcji RT-PCR system NeuMoDx System dozuje przygotowaną mieszaninę gotową do użycia w reakcji RT-PCR do jednej komory do reakcji PCR (na każdą próbkę) w kasecie NeuMoDx Cartridge. W komorze do reakcji PCR zachodzi odwrotna transkrypcja, amplifikacja i detekcja sekwencji docelowych (jeśli są obecne) i kontroli. Kasetę NeuMoDx Cartridge zaprojektowano w taki sposób, aby po reakcji RT-PCR amplikony pozostawały w jej wnętrzu, co praktycznie eliminuje ryzyko zanieczyszczenia po amplifikacji.

Detekcja zamplifikowanych sekwencji docelowych przebiega w czasie rzeczywistym przy użyciu sond hydrolitycznych (nazywanych powszechnie odczynnikami TaqMan®), cząsteczek oligonukleotydowych sond fluorogenicznych swoistych względem amplikonów odpowiednich sekwencji docelowych. Sondy TaqMan składają się z fluoroforu kowalencyjnie związanego z końcem 5' oligonukleotydowej sondy oraz wygaszacza związanego z końcem 3'. Jeśli sonda jest nienaruszona, bliskość fluoroforu i wygaszacza powoduje, że wygaszcz tłumi emitowaną przez fluorofor fluorescencję poprzez Försterowskie rezonansowe przeniesienie energii (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Sondy TaqMan hybrydują do regionu DNA amplifikowanego przez swoisty zestaw starterów. Podczas gdy polimeraza DNA Taq wydłuża starter i syntezuje nić potomną, aktywność egzonukleazy 5'–3' polimerazy DNA Taq powoduje rozkład sondy zhybrydowanej z matrycą. Rozkład sondy prowadzi do uwolnienia fluoroforu i oddalenia go od wygaszacza, znosząc tym samym efekt wytłumienia spowodowany przez FRET i umożliwiając detekcję fluoroforu. Siła otrzymanego w ten sposób sygnału fluorescencyjnego wykrywanego w termocyklerze systemu NeuMoDx System podczas ilościowej reakcji RT-PCR jest wprost proporcjonalna do ilości uwolnionego fluoroforu i można ją skorelować z ilością obecnej sekwencji docelowej.

Sonda TaqMan znakowana fluoroforem (wzbudzenie: 490 nm; emisja: 521 nm) na końcu 5' i ciemnym wygaszczem na końcu 3' jest przeznaczona do detekcji RNA wirusa HIV-1. Sonda TaqMan przeznaczona do detekcji kontroli SPC2 jest znakowana innym barwnikiem fluorescencyjnym (wzbudzenie: 535 nm; emisja: 556 nm) na końcu 5' i ciemnym wygaszczem na końcu 3'. Oprogramowanie systemu NeuMoDx System monitoruje sygnał fluorescencyjny emitowany przez sondy TaqMan pod koniec każdego cyklu amplifikacji. Po ukończeniu amplifikacji oprogramowanie systemu NeuMoDx System analizuje dane i zgłasza wynik (POSITIVE (Pozytywny)/NEGATIVE (Negatywny)/INDETERMINATE (Nieokreślony)/UNRESOLVED (Nierozstrzygnięty)). Jeśli otrzymano wynik pozytywny, a obliczone stężenie mieści się w granicach oznaczalności, oprogramowanie systemu NeuMoDx System podaje również wartość ilościową powiązaną z próbką.

ODCZYNNIKI/MATERIAŁY EKSPLOATACYJNE

Dostarczony materiał

NR REF.	Zawartość	Liczba testów na opakowanie jednostkowe	Liczba testów na opakowanie zbiorcze
300500	Pasek testowy NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip <i>Suche odczynniki do reakcji RT-PCR zawierające sondy TaqMan i startery swoiste dla wirusa HIV-1 i kontroli SPC2</i>	16	96

Dodatkowe wymagane materiały (oferowane oddzielnie)

NR REF.	Zawartość
100200	Płytki NeuMoDx Extraction Plate <i>Suche cząstki paramagnetyczne, enzym lityczny i kontrole przetwarzania próbek</i>
800304	Kalibratory NeuMoDx HIV-1 Calibrator <i>Zestawy kalibratorów o wysokim i niskim stężeniu wirusa HIV-1 przeznaczone do walidacji krzywej wzorcowej; jednorazowego użytku</i>
900301	Kontrole zewnętrzne NeuMoDx HIV-1 External Control <i>Zestawy kontroli pozytywnych i negatywnych pod względem wirusa HIV-1; jednorazowego użytku</i>
400600	Bufor NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	Odczynnik NeuMoDx Wash Reagent
400200	Odczynnik NeuMoDx Release Reagent
100100	Kaseta NeuMoDx Cartridge
235903	Końcówki Hamilton CO-RE/CO-RE II (300 µl) z filtrami
235905	Końcówki Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µl) z filtrami

Wymagany sprzęt

System NeuMoDx 288 Molecular System [NR REF. 500100] lub system NeuMoDx 96 Molecular System [NR REF. 500200]


OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Pasek testowy NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki *in vitro* z wykorzystaniem systemów NeuMoDx Molecular System.
- Nie używać odczynników ani materiałów eksploatacyjnych po upływie wskazanej daty ważności.
- Nie używać żadnych odczynników, jeśli plomba zabezpieczająca jest naruszona lub dostarczone opakowanie jest uszkodzone.
- Nie używać materiałów eksploatacyjnych ani odczynników, jeśli dostarczona torebka ochronna jest otwarta lub uszkodzona.
- Przed wygenerowaniem wyników testów dla próbek klinicznych musi zostać wykonana ważna kalibracja testu (należy ją przeprowadzić poprzez analizę kalibratorów o wysokim i niskim stężeniu wirusa z zestawu kalibratorów NeuMoDx HIV-1 Calibrators [NR REF. 800304]).
- Kontrole zewnętrzne (z zestawu kontroli NeuMoDx HIV-1 External Controls [NR REF. 900301]) należy analizować co 24 godziny podczas wykonywania testów przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.
- Minimalna objętość próbki dla porcji wtórnych zależy od rozmiaru probówki/nośnika próbek, zgodnie z poniższym opisem. Objętość mniejsza niż określona objętość minimalna może doprowadzić do wygenerowania błędów „Quantity Not Sufficient” (Niewystarczająca ilość).
- Użycie próbek przechowywanych w nieodpowiedniej temperaturze lub po upłynięciu określonego okresu przechowywania może doprowadzić do otrzymania nieważnych lub błędnych wyników.
- Należy unikać zanieczyszczenia odczynników i materiałów eksploatacyjnych drobnoustrojami i rybonukleazą (RNaza). W przypadku używania próbek wtórnych zalecane jest stosowanie sterylnych, jednorazowych pipet transferowych wolnych od RNaz. Dla każdej próbki należy używać nowej pipety.
- Aby uniknąć zanieczyszczenia, po amplifikacji nie należy przenosić kaset NeuMoDx Cartridge ani rozkładać ich na części. Pod żadnym pozorem nie należy wyjmować kaset NeuMoDx Cartridge z pojemnika na odpady stwarzające zagrożenie biologiczne (NeuMoDx 288 Molecular System) ani z kosza na odpady stwarzające zagrożenie biologiczne (NeuMoDx 96 Molecular System). Konstrukcja kasety NeuMoDx Cartridge minimalizuje ryzyko zanieczyszczenia.
- Jeśli w laboratorium wykonywane są również testy PCR w otwartych probówkach, należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia paska testowego NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip, dodatkowych materiałów eksploatacyjnych i odczynników wymaganych do przeprowadzenia testu, środków ochrony indywidualnej, takich jak rękawiczki i fartuchy laboratoryjne, oraz systemu NeuMoDx System.
- Podczas pracy z odczynnikami i materiałami eksploatacyjnymi NeuMoDx należy nosić czyste, bezpudrowe rękawiczki nitrylowe. Należy unikać dotykania górnej powierzchni kasety NeuMoDx Cartridge, powierzchni paska testowego NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip i płytki NeuMoDx Extraction Plate pokrytych folią uszczelniającą oraz górnej powierzchni pojemnika z buforem NeuMoDx Lysis Buffer 3; podczas pracy należy dotykać wyłącznie bocznych powierzchni materiałów eksploatacyjnych oraz pojemników z odczynnikami.
- Dla każdego odczynnika (w stosownych przypadkach) dostępne są odpowiednie karty charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) — można je znaleźć pod adresem www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Po wykonaniu testu dokładnie umyć ręce.



- Nie pipetować ustami. Nie palić i nie spożywać pokarmów ani płynów w miejscach przeznaczonych do pracy z próbkami lub odczynnikami.
- Z próbkami należy zawsze postępować w taki sposób, jak z materiałami potencjalnie zakaźnymi, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa laboratoryjnego, które opisano w publikacjach takich jak *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bezpieczeństwo w laboratoriach mikrobiologicznych i biomedycznych)*¹⁸ i w dokumencie M29-A4 instytutu CLSI¹⁹.
- Usuwać nieużyte odczynniki i odpady zgodnie z przepisami federalnymi i stanowymi lub krajowymi, wojewódzkimi i lokalnymi.

PRZECHOWYWANIE, STABILNOŚĆ I SPOSÓB POSTĘPOWANIA Z PRODUKTEM

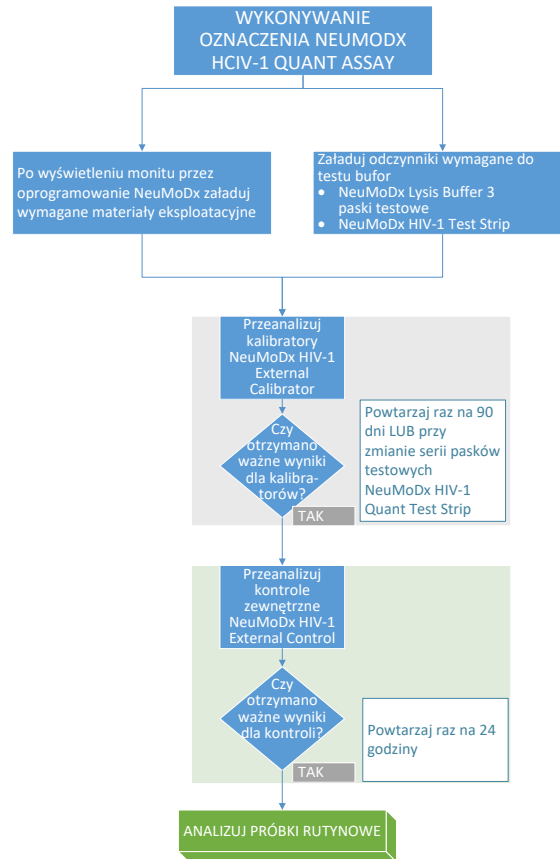
- Paski testowe NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip przechowywane w oryginalnym opakowaniu w temperaturze 15–23°C zachowują stabilność do daty ważności podanej na etykiecie produktu.
- Paski testowe NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip są transportowane w termoizolowanym pojemniku z żelowymi wkładami chłodzącymi.
- Nie używać materiałów eksploatacyjnych ani odczynników po upływie podanej daty ważności.
- Nie używać żadnego produktu przeznaczonego do wykonywania testu, jeśli oryginalne lub pośrednie opakowanie produktu jest wyraźnie uszkodzone.
- Nie ładować ponownie żadnych produktów przeznaczonych do wykonywania testu, które załadowano uprzednio do innego systemu NeuMoDx System.
- Pasek testowy NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip załadowany do systemu NeuMoDx System może być przechowywany w systemie przez siedem (7) dni. Pozostały okres magazynowania załadowanych pasków testowych jest śledzony przez oprogramowanie i zgłaszany użytkownikowi w czasie rzeczywistym. Po upływie dopuszczalnego okresu magazynowania paska testowego system wyświetli monit o wyjęciu produktu.
- Mimo że kalibratory i kontrole zewnętrzne firmy NeuMoDx nie są zakaźne, po ich użyciu należy usuwać je w taki sam sposób jak odpady stwarzające zagrożenie biologiczne w celu ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia zawartymi w nich docelowymi sekwencjami kwasów nukleinowych.



POBIERANIE, TRANSPORT I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

1. Z próbkami, kalibratorami i kontrolami należy postępować tak, jak z materiałami potencjalnie zakaźnymi.
2. Nie zamrażać krwi pełnej ani żadnych innych próbek przechowywanych w probówkach pierwotnych.
3. W celu przygotowania próbek osocza krew pełną należy zebrać do sterylnych probówek zawierających antykoagulant w postaci EDTA lub ACD. Postępować zgodnie z instrukcjami producenta probówek do pobierania próbek dotyczącymi przygotowania i przechowywania próbek.
4. Próbkę można testować w pierwotnych probówkach do pobierania próbek lub w probówkach wtórnych. Zalecenia dotyczące testowania próbek w probówkach pierwotnych: probówka BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (nr kat. BD 368589) lub probówka BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (nr kat. BD 362799).
5. Przygotowane próbki osocza można przechowywać w systemie NeuMoDx System przez maksymalnie 8 godzin przed ich analizą. Jeśli konieczne jest przechowywanie próbek przez dłuższy czas, zalecane jest rozdzielenie próbek na wtórne porcje osocza i przeniesienie ich do chłodziarki lub zamrażarki.
6. Przed wykonaniem testu przygotowane próbki osocza można przechowywać w temperaturze od 2 do 8°C przez maksymalnie 7 dni lub przez maksymalnie 8 godzin w temperaturze pokojowej.
7. Przygotowane próbki osocza można przechowywać w temperaturze ≤-20°C przez maksymalnie 8 tygodni przed wykonaniem testu.
 - a. Jeśli próbki są zamrożone, pozostawić je do całkowitego rozmrożenia w temperaturze pokojowej (15–30°C); wytrząsać, aby otrzymać jednorodną próbkę.
 - b. Po rozmrożeniu próbek testy należy wykonać w ciągu 8 godzin.
 - c. Próbek osocza nie należy poddawać więcej niż 4 cyklom zamrażania-rozmrażania przed użyciem.
8. Jeśli próbki są przesyłane, należy je zapakować i oznaczyć zgodnie z obowiązującymi przepisami krajowymi i/lub międzynarodowymi.
9. Wyraźnie oznaczyć próbki i wskazać, że są one przeznaczone do testów pod kątem wirusa HIV-1.
10. Przejdź do części *Przygotowanie do wykonania testu*.

Schemat procesu wykonywania oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Assay przedstawiono poniżej na Ryc. 1.



Ryc. 1: Schemat wykonywania oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

INSTRUKCJA UŻYCIA

Przygotowanie do wykonania testu

1. Nakleić etykietę z kodem kreskowym próbki na próbkę zgodną z systemem NeuMoDx System. Pierwotną próbkę do pobierania krwi można oznaczyć i umieścić bezpośrednio w nośniku na 24 lub 32 próbki, po odwirowaniu zgodnie z instrukcjami producenta. Alternatywnie, w celu analizy próbki w pierwotnej próbce do pobierania próbki przed załadowaniem próbki do systemu NeuMoDx System należy włożyć próbkę oznaczoną kodem kreskowym do nośnika próbek i upewnić się, że zdjęto zatyczkę próbki.
2. W przypadku testowania próbki w pierwotnej próbce do pobierania próbki przed załadowaniem próbki do systemu NeuMoDx System należy włożyć próbkę oznaczoną kodem kreskowym do nośnika próbek i upewnić się, że zdjęto zatyczkę próbki.
3. W przypadku korzystania z próbki wtórnej przenieść porcję osocza do oznaczonej kodem kreskowym próbki zgodnej z systemem NeuMoDx System, uwzględniając poniższe wytyczne dotyczące objętości:
 - Nośnik próbek (na 32 próbki): średnica 11–14 mm; wysokość 60–120 mm; minimalna objętość napełnienia $\geq 750 \mu\text{l}$
 - Nośnik próbek (na 24 próbki): średnica 14,5–18 mm; wysokość 60–120 mm; minimalna objętość napełnienia $\geq 1200 \mu\text{l}$
 - Nośnik na próbki z próbkami o małej objętości (na 32 próbki): stożkowa próbka mikrowirówkowa o pojemności 1,5 ml; minimalna objętość napełnienia $\geq 700 \mu\text{l}$

Obsługa systemu NeuMoDx System

Szczegółowe instrukcje przedstawiono w podręcznikach użytkownika systemów NeuMoDx 288 i 96 Molecular System (nr części: 40600108 i 40600317)

1. Włożyć paski testowe NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip do jednego lub większej liczby nośników pasków testowych NeuMoDx Test Strip, a następnie załadować nośniki pasków testowych do systemu NeuMoDx System, korzystając z ekranu dotykowego.
2. W przypadku wyświetlenia monitu przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System włożyć wymagane materiały eksploatacyjne do nośników materiałów eksploatacyjnych systemu NeuMoDx System, a następnie załadować nośniki do systemu NeuMoDx System, korzystając z ekranu dotykowego.

3. W przypadku wyświetlenia monitu przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System wymienić odczynniki NeuMoDx Wash Reagent, NeuMoDx Release Reagent, opróżnić butelkę na odpady płynne, pojemnik na odpady stwarzające zagrożenie biologiczne (wyłącznie system NeuMoDx 288 Molecular System), kosz na zużyte końcówki (wyłącznie system NeuMoDx 96 Molecular System) lub kosz na odpady stwarzające zagrożenie biologiczne (wyłącznie system NeuMoDx 96 Molecular System), odpowiednio do potrzeb.
4. W przypadku wyświetlenia monitu przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System przeanalizować kalibratory NeuMoDx HIV-1 Calibrator [NR REF. 800304] i/lub kontrole zewnętrzne NeuMoDx HIV-1 External Control [NR REF. 900301]. Dalsze informacje dotyczące kalibratorów i kontroli przedstawiono w części *Analiza wyników*.
5. Załadować próbki z próbkami/kalibratorami/kontrolami do nośnika próbek i upewnić się, że zdjęto zatyczki ze wszystkich próbek.
6. Umieścić nośniki próbek w szufladzie podajnika automatycznego, a następnie załadować je do systemu NeuMoDx System, korzystając z ekranu dotykowego. Spowoduje to rozpoczęcie analizy załadowanych próbek w celu wykonania określonych testów, pod warunkiem że w systemie dostępne jest ważne zlecenie testu.

OGRANICZENIA

1. Pasek testowy NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip może być używany wyłącznie w systemach NeuMoDx Molecular System.
2. Skuteczność pasków testowych NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip ustalono dla próbek osocza przygotowanych z krwi pełnej, zebranych do próbki zawierającej EDTA/ACD jako antykoagulant. Nie przeprowadzono oceny działania pasków testowych NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip z próbkami z innych źródeł, a parametry skuteczności dla innych typów próbek nie są znane.
3. Skuteczność paska testowego NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip ustalono dla testów wykonywanych przy użyciu następujących próbek pierwotnych: BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube i BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube.
4. Oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay nie wolno wykonywać na próbkach pobranych od osób przyjmujących heparynę.
5. Z uwagi na to, że detekcja wirusa HIV-1 zależy od ilości cząstek wirusowych obecnych w próbce, wiarygodność wyników zależy od prawidłowego pobrania próbki, postępowania z próbką i przechowywania próbki.
6. W przypadku wyświetlenia monitu przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System przed rozpoczęciem analizy rutynowych próbek klinicznych należy przeanalizować kalibratory NeuMoDx HIV-1 Calibrator i kontrole zewnętrzne NeuMoDx HIV-1 External Control, zgodnie z zaleceniami zawartymi w ulotkach dołączonych do opakowania.
7. Nieprawidłowe pobranie próbki, postępowanie z próbką lub przechowywanie próbki, błąd techniczny albo pomylenie próbek może spowodować otrzymanie błędnych wyników. Jeśli ilość cząstek wirusowych w próbce jest niższa niż granica wykrywalności oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, może dojść do wygenerowania fałszywie negatywnych wyników.
8. System NeuMoDx System może być obsługiwany wyłącznie przez personel przeszkolony z obsługi tego systemu.
9. Jeśli sekwencje docelowe wirusa HIV-1 i sekwencja docelowa kontroli SPC2 nie zostaną zamplifikowane, zostanie zgłoszony wynik nieważny (Indeterminate (Nieokreślony) lub Unresolved (Nierozstrzygnięty)) i konieczne będzie powtórzenie testu.
10. Jeśli otrzymano wynik Positive (Pozytywny) w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, ale wartość ilościowa nie mieści się w granicach oznaczalności, system NeuMoDx System zgłosi, czy wykryta ilość wirusa HIV-1 była poniżej dolnej granicy oznaczalności (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) czy powyżej górnej granicy oznaczalności (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
11. Jeśli wykryta ilość wirusa HIV-1 jest niższa niż LLoQ, można powtórzyć oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay (w razie potrzeby), używając innej porcji próbki.
12. Jeśli wykryta ilość wirusa HIV-1 jest wyższa niż ULoQ, można powtórzyć oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, używając rozcieńczonej porcji próbki pierwotnej. Zalecane jest rozcieńczenie próbki w stosunku 1:100 lub 1:1000 osoczem negatywnym względem wirusa HIV-1 lub rozcieńczalnikiem Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Stężenie próbki pierwotnej można obliczyć z następującego wzoru:

$$\text{stężenie próbki pierwotnej} = \log_{10}(\text{współczynnik rozcieńczenia}) + \text{zgłoszone stężenie rozcieńczonej próbki}$$
13. Sporadyczna obecność inhibitorów reakcji PCR w osoczu może spowodować błąd oznaczenia ilościowego wykonywanego w systemie. W takiej sytuacji zalecane jest powtórzenie testu przy użyciu tej samej próbki rozcieńczonej rozcieńczalnikiem Basematrix w stosunku 1:10 lub 1:100.
14. Wynik pozytywny nie musi oznaczać obecności żywego wirusa HIV-1. Wynik pozytywny wskazuje jednak, że w próbce przypuszczalnie obecne jest RNA wirusa HIV-1.
15. Delecje lub mutacje w regionach konserwatywnych, na które ukierunkowane jest oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, mogą zakłócić detekcję lub doprowadzić do uzyskania błędnego wyniku.
16. Wyniki otrzymane przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay należy traktować jako dane uzupełniające obserwacje kliniczne oraz inne informacje, do których ma dostęp lekarz.
17. Aby uniknąć zanieczyszczenia, należy przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, w tym zmieniać rękawiczki między próbkami pacjentów.

ANALIZA WYNIKÓW

Dostępne wyniki można przeglądać i drukować z karty „Results” (Wyniki) w oknie Results (Wyniki) na ekranie dotykowym systemu NeuMoDx System. Oprogramowanie systemu NeuMoDx System automatycznie generuje wyniki oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, korzystając z algorytmu decyzyjnego oraz parametrów analizy wyników określonych w pliku definicji oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Assay (HIV-1 ADF). Oprogramowanie może zgłosić następujące wyniki oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay: Negative (Negatywny), Positive (Pozytywny) ze zgłoszonym stężeniem wirusa HIV-1, Positive above ULoQ (Pozytywny powyżej ULoQ), Positive below LLoQ (Pozytywny poniżej LLoQ), Indeterminate (Nieokreślony) lub Unresolved (Nierozstrzygnięty); są one ustalane na podstawie statusu amplifikacji sekwencji docelowych i kontroli przetwarzania próbek. Wyniki są zgłaszane na podstawie algorytmu decyzyjnego ADF, który omówiono poniżej w Tabeli 1.

Tabela 1: Omówienie algorytmu decyzyjnego dla oznaczenia HIV-1 Quant Assay

WYNIK*	Sekwencje docelowe wirusa HIV-1	Kontrola przetwarzania próbek (SPC2)
Positive (Pozytywny) ze zgłoszonym stężeniem	Amplified (Amplifikacja), $1,5 \leq [\text{HIV-1}] \leq 7,7 \log_{10} \text{IU/ml}$	Amplified (Amplifikacja) lub Not Amplified (Brak amplifikacji)
Positive, above ULoQ (Pozytywny, powyżej ULoQ)	Amplified (Amplifikacja), $[\text{HIV-1}] > 7,7 \log_{10} \text{IU/ml}$	Amplified (Amplifikacja) lub Not Amplified (Brak amplifikacji)
Positive, below LLoQ (Pozytywny, poniżej LLoQ)	Amplified (Amplifikacja), $[\text{HIV-1}] < 1,5 \log_{10} \text{IU/ml}$	Amplified (Amplifikacja) lub Not Amplified (Brak amplifikacji)
Negative (Negatywny)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Amplified (Amplifikacja)
Indeterminate (Nieokreślony)	Not Amplified, System Error Detected (Brak amplifikacji, wykryto błąd systemu)	
Unresolved (Nierozstrzygnięty)	Not Amplified, No System Error Detected (Brak amplifikacji, nie wykryto błędu systemu)	

*Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay umożliwia pomiar ilościowy w zakresie od 1,5 do 7,7 \log_{10} IU/ml. Wynik POSITIVE (Pozytywny) wskazuje, że wykryto RNA wirusa HIV-1. Wynik taki można wykorzystać pomocniczo do ustalania rozpoznania zakażenia wirusem HIV-1. Wynik NEGATIVE (Negatywny) oznacza brak RNA wirusa HIV-1 lub miano wirusa poniżej granicy wykrywalności. Nieprawidłowe pobranie lub przechowywanie próbki może doprowadzić do wygenerowania fałszywie negatywnego lub fałszywie niskiego miana wirusa. Wyniki należy interpretować w kontekście odnośnych wyników klinicznych i laboratoryjnych.

Obliczanie wyników testu

- W przypadku próbek, których wyniki mieszczą się w zakresie ilościowym oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, stężenie RNA wirusa HIV-1 w próbkach jest obliczane przy użyciu zapisanej krzywej wzorcowej i współczynnika kalibracji.
 - Współczynnik kalibracji jest obliczany na podstawie wyników kalibratorów NeuMoDx HIV-1 Calibrator przeanalizowanych w celu walidacji krzywej wzorcowej dla danej serii pasków testowych NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip w określonym systemie NeuMoDx System.
 - Współczynnik kalibracji jest używany do ostatecznego określenia stężenia RNA wirusa HIV-1.
- Wyniki oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay są zgłaszane jako \log_{10} IU/ml. Przelicznik dla oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wynosi 0,75 kopii/IU.
- Otrzymane wyniki ilościowe dla próbek badanych są identyfikowane względem skalibrowanego materiału referencyjnego uzyskanego z amerykańskiego Narodowego Instytutu Wzorców Biologicznych i Kontroli (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC).

Kalibracja testu

W celu ilościowego oznaczenia RNA wirusa HIV-1 w próbkach wymagana jest ważna kalibracja testu na podstawie krzywej wzorcowej. W celu wygenerowania ważnych wyników należy skalibrować test przy użyciu kalibratorów dostarczonych przez firmę NeuMoDx Molecular, Inc.

Kalibratory

- Kalibratory NeuMoDx HIV-1 Calibrator [NR REF. 800304] zawierają niezakaźne cząstki docelowe wirusa HIV-1 zamknięte w otoczce i przygotowane w rozcieńczalniku Basematrix.
- Zestaw kalibratorów dla wirusa HIV-1 należy przeanalizować z każdą nową serią pasków testowych NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip, przy przesyłaniu nowego pliku definicji oznaczenia HIV-1 Assay do systemu NeuMoDx System, po upływie okresu ważności bieżącego zestawu kalibratorów (obecne ustawienie to 90 dni) lub po wprowadzeniu zmian w oprogramowaniu systemu NeuMoDx System.
- Oprogramowanie systemu NeuMoDx System powiadomi użytkownika o konieczności przeanalizowania kalibratorów. Nowa seria pasków testowych nie może być użyta do testów, dopóki kalibratory nie zostaną pomyślnie przeanalizowane.
- Ważność kalibracji jest ustalana w następujący sposób:
 - W celu ustalenia ważności należy poddać analizie zestaw dwóch kalibratorów — jeden (1) kalibrator wysoki i jeden (1) niski.

- b) Co najmniej dwa (2) z trzech (3) powtórzeń muszą dać wyniki mieszczące się we wstępnie zdefiniowanych parametrach. Nominalne stężenie cząsteczki docelowej dla kalibratora niskiego wynosi $3 \log_{10}$ IU/ml, a dla kalibratora wysokiego $5 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) W celu uwzględnienia oczekiwanej zmienności między seriami pasków testowych obliczany jest współczynnik kalibracji. Współczynnik ten jest używany podczas wyznaczania końcowego stężenia wirusa HIV-1.
5. Jeśli jeden z kalibratorów lub oba kalibratory nie przejdą kontroli ważności, należy ponownie przeanalizować kalibratory, których kontrola zakończyła się niepowodzeniem, korzystając z nowych fiolek. W przypadku gdy jeden z kalibratorów nie przejdzie kontroli ważności, możliwe jest przeanalizowanie tylko jednego kalibratora, ponieważ system nie wymaga od użytkownika ponownej analizy obu kalibratorów.
 6. Jeśli kolejne kontrole ważności kalibratorów kończą się niepowodzeniem, należy skontaktować się z firmą NeuMoDx Molecular, Inc.

Kontrola jakości

Lokalne przepisy zazwyczaj określają, że laboratorium jest odpowiedzialne za realizowanie procedur kontrolnych przeznaczonych do monitorowania dokładności i precyzji całego procesu analitycznego oraz ustalenie liczby, rodzaju i częstotliwości badań materiałów kontrolnych na podstawie zweryfikowanych specyfikacji dotyczących skuteczności dla niezmodyfikowanego, zatwierdzonego systemu do wykonywania testów.

Kontrole zewnętrzne

1. Kontrole zewnętrzne NeuMoDx HIV-1 External Control [NR REF. 900301] to kontrole pozytywne w postaci niezakaźnych cząstek docelowych wirusa HIV-1 zamkniętych w otoczce i przygotowanych w rozcieńczalniku Basematrix i kontrole negatywne w postaci samego rozcieńczalnika Basematrix.
2. Pozytywne i negatywne kontrole zewnętrzne należy analizować co 24 godziny podczas wykonywania testów przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay. Jeśli nie jest dostępny zestaw ważnych wyników kontroli zewnętrznych, system NeuMoDx System wyświetli monit o przeanalizowanie kontroli, zanim będzie możliwe zgłaszanie wyników dla próbek.
3. System NeuMoDx System ocenia ważność kontroli zewnętrznych na podstawie oczekiwanego wyniku. Kontrola pozytywna powinna dać wynik pozytywny względem wirusa HIV-1, a kontrola negatywna wynik negatywny względem wirusa HIV-1.
4. W przypadku uzyskania rozbieżnych wyników dla kontroli zewnętrznych należy postępować w następujący sposób:
 - a) Wynik Positive (Pozytywny) testu zgłoszony dla negatywnej próbki kontrolnej wskazuje na problem związany z zanieczyszczeniem próbek.
 - b) Wynik Negative (Negatywny) testu zgłoszony dla pozytywnej próbki kontrolnej może wskazywać na problem związany z odczytnikiem lub aparatem.
 - c) W każdym z powyższych przypadków lub w przypadku otrzymania wyniku nieokreślonego (IND) ponownie przeanalizować kontrole zewnętrzne NeuMoDx HIV-1 External Control, używając świeżych fiolek z kontrolami, które nie przeszły testu ważności.
 - d) Jeśli dla pozytywnej kontroli zewnętrznej NeuMoDx HIV-1 External Control ciągle zgłaszany jest wynik Negative (Negatywny), należy skontaktować się z serwisem technicznym firmy NeuMoDx.
 - e) Jeśli dla negatywnej kontroli zewnętrznej NeuMoDx HIV-1 External Control ciągle zgłaszany jest wynik Positive (Pozytywny), przed kontaktem z serwisem technicznym NeuMoDx należy wyeliminować wszystkie źródła potencjalnego zanieczyszczenia, w tym wymienić wszystkie odczytniki.

Kontrole przetwarzania próbki (kontrole wewnętrzne)

Egzogenna kontrola przetwarzania próbki (Sample Process Control, SPC2), zawarta na płytce NeuMoDx Extraction Plate, przechodzi cały proces izolacji kwasów nukleinowych i ich amplifikacji w reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym z każdą próbką. Startery i sonda swoiste dla kontroli SPC2 są również zawarte w każdym pasku testowym NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip, co umożliwia detekcję kontroli SPC2 wraz z docelowym RNA wirusa HIV-1 (jeśli jest obecny) w multipleksowej reakcji RT-PCR. Detekcja amplifikacji kontroli SPC2 umożliwia monitorowanie wydajności procesów izolacji RNA i amplifikacji w reakcji RT-PCR przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System.

Wyniki nieważne

Jeśli w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wykonywanym w systemie NeuMoDx System nie zostanie uzyskany ważny wynik, wynik ten zostanie zgłoszony jako Indeterminate (Nieokreślony, IND) lub Unresolved (Nierozstrzygnięty, UNR), odpowiednio do typu napotkanego błędu.

Wynik IND zostanie zgłoszony, jeśli podczas analizy próbki zostanie wykryty błąd systemu NeuMoDx System. W przypadku zgłoszenia wyniku IND zalecane jest powtórzenie testu.

Wynik UNR zostanie zgłoszony, jeśli nie zostanie wykryta ważna amplifikacja RNA wirusa HIV-1 lub kontroli SPC2, co wskazuje na prawdopodobne nieprawidłowe działanie odczytników lub obecność inhibitorów. Jeśli zgłoszony zostanie wynik UNR, jako pierwszy krok zalecane jest powtórzenie testu. W przypadku niepowodzenia powtórzenia testu można rozcieńczyć próbkę w celu złagodzenia wpływu inhibitorów obecnych w próbce.

PARAMETRY SKUTECZNOŚCI

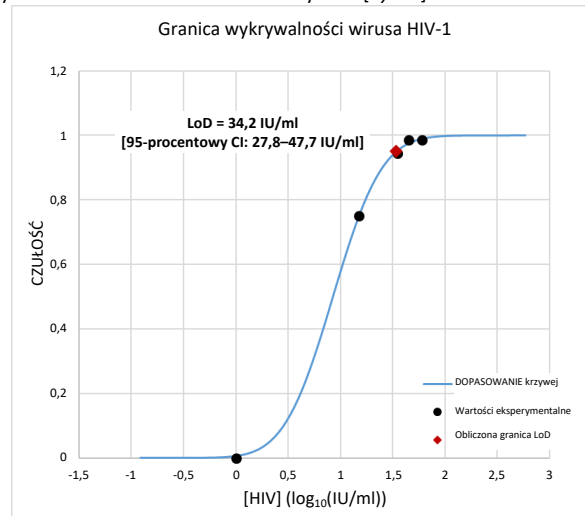
Czułość analityczna — granica wykrywalności

Czułość analityczną oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay oceniono na podstawie testów szeregu rozcieńczeń 3. międzynarodowego wzorca WHO dla wirusa HIV-1 w próbkach osocza z EDTA negatywnych względem RNA wirusa HIV-1 w celu wyznaczenia granicy wykrywalności (Limit of Detection, LoD) w przypadku wykonywania oznaczenia w systemach NeuMoDx System. Granicę LoD zdefiniowano jako najniższy poziom sekwencji docelowej wykrywany z częstością $\geq 95\%$ określoną w analizie probitowej. Badania wykonywało wielu operatorów w ciągu trzech (3) dni, w wielu systemach i przy użyciu wielu serii odczytników oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay. W każdym systemie każdego dnia analizowano po 12 powtórzeń dla każdego poziomu rozcieńczenia. Poziomy detekcji przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2: Poziomy detekcji wyników pozytywnych określone w celu wyznaczenia granicy LoD oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Stężenie cząstek docelowych (IU/ml)	Stężenie cząstek docelowych (log ₁₀ IU/ml)	Liczba ważnych testów	Liczba wyników pozytywnych	Poziom detekcji (%)
60	1,78	72	71	98,6%
45	1,65	72	71	98,6%
35	1,54	72	68	94,4%
15	1,18	72	54	75,0%
0	-	72	0	0%

Przy użyciu analizy probitowej wyznaczono, że granica LoD oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay w osoczu dla wszystkich genotypów wirusa wynosi **34,2 IU/ml (1,5 log₁₀ IU/ml)** przy 95-procentowym przedziale ufności (Confidence Interval, CI) od 27,8 do 47,7 IU/ml (1,4–1,7 log₁₀ IU/ml) w przypadku wykonywania testów w systemie NeuMoDx 288 Molecular System [Ryc. 2].


Ryc. 2: Analiza probitowa wykonywana w celu wyznaczenia granicy wykrywalności oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Czułość analityczna — dolna granica oznaczalności

Dolna granica oznaczalności (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) jest definiowana jako najniższe stężenie sekwencji docelowej, przy którym osiągnięty poziom detekcji jest >95%, a całkowity błąd analityczny jest ≤1. W celu wyznaczenia granicy LLOQ w ramach obliczeń granicy LoD dla każdego stężenia sekwencji docelowej wirusa HIV-1 obliczono całkowity błąd analityczny (Total Analytical Error, TAE). Wartość TAE jest definiowana następująco:

$$\text{TAE} = \text{błąd systematyczny} + 2 \cdot \text{SD} \quad (\text{statystyka Westgarda})$$

gdzie

błąd systematyczny to bezwzględna różnica między średnim obliczonym stężeniem a oczekiwanym stężeniem
SD odnosi się do odchylenia standardowego wartości ilościowego oznaczenia próbki

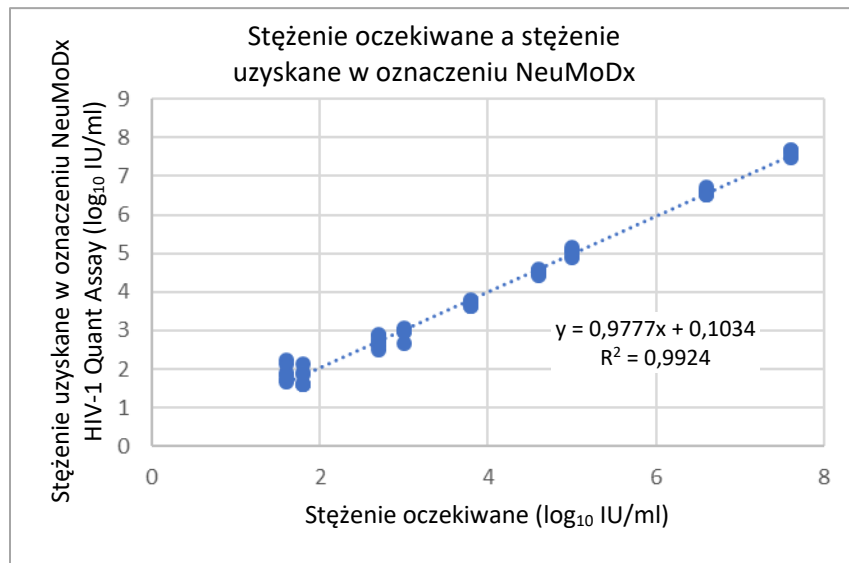
Zbiorcze wyniki dla czterech (4) stężeń wirusa HIV-1 w próbkach osocza wykorzystywanych podczas badania granicy LLOQ przy użyciu podtypu B wirusa przedstawiono w Tabeli 3. Ze względu na to, że obliczona wartość TAE była ≤1 przy stężeniach wirusa HIV-1 poniżej granicy LoD, dolna granica oznaczalności oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay jest równa granicy wykrywalności: **34,2 IU/ml** (95-procentowy CI: 27,8–47,7 IU/ml) lub **1,5 log₁₀ IU/ml** (95-procentowy CI 1,4–1,7 log₁₀ IU/ml).

Tabela 3: Granica LLOQ wyznaczona dla oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, z wartościami błędów systematycznego i TAE

Stęż. sekwencji docelowej (IU/ml)	Stęż. sekwencji docelowej (log ₁₀ IU/ml)	Stęż. średnie (log ₁₀ IU/ml)	Detekcja (%)	SD	Błąd systematyczny	TAE
60	1,78	1,76	99	0,28	0,02	0,59
45	1,65	1,82	99	0,30	0,17	0,78
35	1,54	1,69	94	0,39	0,15	0,93
15	1,18	1,52	75	0,54	0,34	1,44

Czułość analityczna — liniowość i wyznaczenie górnej granicy oznaczalności

Liniowość i górną granicę oznaczalności (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wyznaczono, przygotowując szereg rozcieńczeń materiału wirusa HIV-1 pochodzącego z programu EQAPOL (External Quality Assurance Program Oversight Laboratory, Duke University, NC, USA), materiału AccuPlex™ Recombinant HIV/HCV Control (Seracare, MA, USA) i materiału HIV-1 RNA Working Reagent 2 for NAT Assays (NIBSC). Panel złożony z dziewięciu próbek przygotowano przy użyciu zbiorczego osocza z EDTA negatywnego względem RNA wirusa HIV-1 w taki sposób, aby objąć zakres stężeń 7,70–1,70 log₁₀ IU/ml. Wykazano, że oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay umożliwia otrzymanie ilościowego wyniku dla wirusa HIV-1 w zakresie liniowym 6 log₁₀ z dokładnością ±0,33 log₁₀ IU/ml w oparciu o błąd standardowy obliczony dla 95-procentowego przedziału ufności. Nie uzyskano znaczących korzyści przy dopasowaniu metodą regresji drugiego lub trzeciego rzędu. W oparciu o dane z tego badania wyznaczono, że granica ULoQ wynosi **7,7 log₁₀ IU/ml**. Stężenia wirusa HIV-1 w oznaczeniu zgłaszane przez system NeuMoDx System w porównaniu z wartościami oczekiwanymi przedstawiono na Ryc. 3.



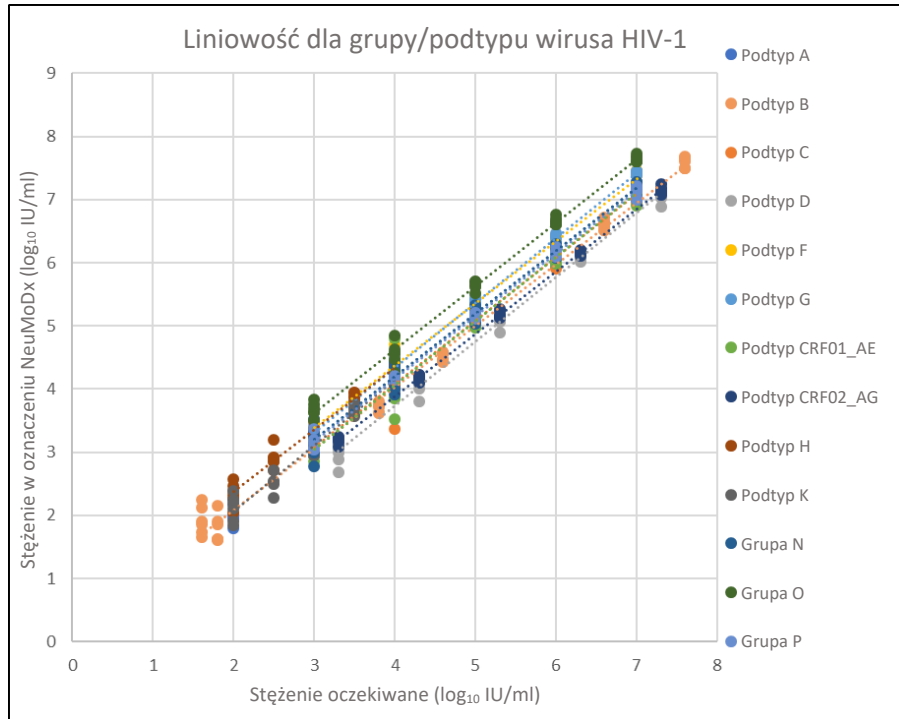
Ryc. 3: Zakres liniowy oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Czułość analityczna — liniowość dla różnych genotypów

Liniowość oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay dla wirusa HIV-1 z grupy M (podtypy A, B, C, D, F, G, H, K, CRF01_AE, CRF02_AG) N, O i P scharakteryzowano poprzez przetestowanie co najmniej pięciu (5) różnych stężeń każdej grupy/podtypu wirusa HIV-1 przygotowanych w zbiorczym osoczu z EDTA negatywnym względem RNA wirusa HIV-1. Stężenia sekwencji docelowych wirusa HIV-1 testowanych w tym badaniu były zależne od stężenia próbki źródłowej, a zatem różniły się między grupami/podtypami. W badaniu każde stężenie danej grupy/podtypu testowano w sześciu (6) powtórzeniach. Wykazano liniowość oznaczenia w badanych zakresach, co przedstawiono w Tabeli 4 i na Ryc. 4.

Tabela 4: Liniowość oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay w przypadku grup M, N, O i P

Grupa	Podtyp	Równanie liniowe $y = \text{wynik ilościowy w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay (log}_{10} \text{ IU/ml)}$ $x = \text{oczekiwany wynik ilościowy (log}_{10} \text{ IU/ml)}$	R ²
M	A	$y = 1,0217x - 0,008$	0,9953
	B	$y = 0,9715x + 0,1442$	0,9933
	C	$y = 1,0055x + 0,0658$	0,9879
	D	$y = 1,0203x - 0,3554$	0,9941
	F	$y = 0,9872x + 0,4278$	0,9955
	G	$y = 1,0282x + 0,2223$	0,9970
	CRF01_AE	$y = 1,0163x - 0,0053$	0,9824
	CRF02_AG	$y = 0,99x - 0,0783$	0,9989
	H	$y = 0,9803x + 0,4187$	0,9730
	K	$y = 1,0441x - 0,0223$	0,9684
N		$y = 0,996x + 0,2117$	0,9876
O		$y = 1,0043x + 0,6167$	0,9942
P		$y = 0,9927x + 0,1903$	0,9974



Ryc. 4: Liniowość oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay w przypadku różnych podtypów

Swoistość analityczna — zanieczyszczenie drobnoustrojami potencjalnie zakłócającymi

Swoistość analityczną oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay oceniono, wykonując testy pod kątem reaktywności krzyżowej na panelu mikroorganizmów/wirusów (Tabela 5) przygotowanych w dużych stężeniach w zbiorczym osoczu z EDTA negatywnym względem RNA wirusa HIV-1. Potencjalne zakłócenia oznaczenia oceniono przy użyciu tego samego panelu mikroorganizmów/wirusów przygotowanych w osoczu z EDTA, do którego dodano materiał wirusa HIV-1 w stężeniu 2,02 log₁₀ IU/ml. Nie zaobserwowano reaktywności krzyżowej — wszystkie próbki z drobnoustrojami negatywnymi względem wirusa HIV-1 dały wyniki negatywne. Dla wszystkich próbek z drobnoustrojami pozytywnymi względem wirusa HIV-1 otrzymano wyniki pozytywne; nie zaobserwowano istotnych zakłóceń w tych próbkach, na co wskazuje minimalne odchylenie wyników ilościowych wirusa HIV-1 od wyników uzyskanych dla próbek kontrolnych bez dodatku mikroorganizmów/wirusów potencjalnie zakłócających. W ramach dalszych badań pod kątem potencjalnej reaktywności krzyżowej porównano docelowe sekwencje nukleotydów wykrywane przez oznaczenie NeuMoDx HIV Quant Assay z pełnymi genomami 26 dodatkowych mikroorganizmów/wirusów (Tabela 6) przy użyciu narzędzia BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) udostępnianego przez centrum NCBI (National Center for Biotechnology Information). Analiza porównawcza sekwencji nie wykazała analogii między sekwencjami docelowymi i badanymi genomami.

Tabela 5: Patogeny testowane w ramach badania swoistości analitycznej

Mikroorganizm/wirus potencjalnie zakłócający
Wirus zapalenia wątroby typu A
Wirus zapalenia wątroby typu B
Wirus zapalenia wątroby typu C
Wirus ludzkiej białaczki z komórek T typu 1 (HTLV-1)
Wirus ludzkiej białaczki z komórek T typu 2 (HTLV-2)
Ludzki wirus niedoboru odporności typu 2 (HIV-2)
Małpi wirus niedoboru odporności (SIV)
Wirus Epsteina-Barr

Tabela 6: Mikroorganizmy/wirusy uwzględnione w analizie dopasowania sekwencji przy użyciu narzędzia BLASTn

Mikroorganizm/wirus	Numer(y) dostępu	Mikroorganizm/wirus	Numer(y) dostępu
Adenowirus typu 12	X73487.1	Ludzki herpeswirus typu 5	GQ221974.1 KR534211.1 GQ221975.1 NC_006273.2
Poliomawirus BK	AB369101.1 NC_001538.1 AB369092.1	Ludzki herpeswirus typu 7	AF037218.1 NC_001716.2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CP018052.1 CP017731.1	Ludzki herpeswirus typu 8	NC_009333.1
<i>Cutibacterium acnes</i>	NZ_CP006032.1	Wirus brodawczaka ludzkiego typu 18	NC_001357.1 MF288723.1
Wirus dengi	KR919821.1 KR052012.1	Wirus brodawczaka ludzkiego typu 16	KY549222.1 KY549321.1
Wirus opryszczki pospolitej typu 2	Z86099.2	Ludzki parwowirus B19	KX752821.1 MH201456.1
Ludzki adenowirus typu 2	J01917.1 AC_000007.1	Wirus grypy A (wszystkie segmenty)	MN253846.1 MH797924.1 MH842686.1 MN037420.1
Ludzki adenowirus typu 5	KX868466.2 AC_000008.1 AY601635.1	Wirus JC	J02226.1 AB081030.1
Ludzki adenowirus typu C	AY339865.1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CP034022.1 CP041586.1
Ludzki betaherpeswirus typu 6A	NC_001664.4 X83413.2	<i>Propionibacterium acnes C1</i>	CP003877.1
Ludzki herpeswirus typu 1	X14112.1 JQ780693.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	AP017922.1
Ludzki herpeswirus typu 2	LT797626.1 JN561323.2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	AP008934.1
Ludzki herpeswirus typu 3	DQ479962.1 KC847290.1	Wirus Zachodniego Nilu	M12294.2 MF797870.1

Swoistość analityczna — endogenne i egzogenne substancje potencjalnie zakłócające

Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay oceniono pod kątem wrażliwości na zakłócenia wywołane przez leki często przepisywane osobom zakażonym wirusem HIV-1, podwyższone stężenia substancji endogennych oraz choroby autoimmunologiczne. Do osocza z EDTA ujemnego względem RNA wirusa HIV-1 dodano materiał wirusa HIV-1 w stężeniu $3 \log_{10}$ IU/ml oraz albuminę (120 mg/ml), bilirubinę (0,03 mg/ml), hemoglobinę (3,5 mg/ml), trójglicerydy (5,3 mg/ml) i leki (Tabela 7) w stężeniu równym trzykrotności stężenia maksymalnego ($C_{maks.}$). Do osocza ujemnego pobranego od osób chorych na toczeń rumieniowaty układowy (Systemic Lupus Erythematosus, SLE), reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) lub osób, u których wykryto przeciwciała przeciwjądrowe (Antinuclear Antibody, ANA), dodano materiał wirusa HIV-1 w stężeniu $3 \log_{10}$ IU/ml. Nie zaobserwowano istotnych zakłóceń. Wyniki tego badania podsumowano w Tabeli 8.

Tabela 7: Leki testowane pod kątem zakłóceń

Klasyfikacja leku	Nazwa leku
Immunomodulator	Interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, rybawiryna
Antagonista receptora CCR5	Marawirok
Środek nasilający właściwości farmakokinetyczne	Kobicystat
Nienukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI)	Dorawiryna, efawirenz, newirapina, ryliwiryryna
Inhibitor proteazy (Protease Inhibitor, PI)	Darunawir, amprenawir, rytonawir, sakwinawir, symeprewir
Nukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI) lub inhibitor polimerazy DNA	Cydofowir, lamiwudyna, gancyklowir, dizoproksyl tenofowiru, zydowudyna, walgancyklowir, siarczan abakawiru, emtrycytabina, entekawir, foskarnet, sofosbuwir
Inhibitor integrazy	Raltegrawir, dolutegrawir
Inhibitor fuzji	Enfuwirtyd
Leczenie zakażeń oportunistycznych	Azytromycyna, klarytromycyna, flukonazol, sulfametoksazol, trimetoprym

Tabela 8: Podsumowanie badania zakłóceń — czynniki egzogenne i endogenne

Czynnik endogenny	Średnie stężenie [HIV-1] (\log_{10} IU/ml)	Błąd systematyczny (\log_{10} IU/ml)
Albumina	3,03	-0,11
Bilirubina	3,04	-0,09
Hemoglobina	3,04	-0,09
Trójglicerydy	3,14	0,01
Czynnik egzogenny (leki)	Średnie stężenie [HIV-1] (\log_{10} IU/ml)	Błąd systematyczny (\log_{10} IU/ml)
Pula 1: Interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, rybawiryna, marawirok, kobicystat	3,06	-0,07
Pula 2: Raltegrawir, dolutegrawir, efawirenz, newirapina, ryliwiryryna	3,04	-0,09
Pula 3: Dorawiryna, darunawir, amprenawir, rytonawir, sakwinawir	3,11	-0,02
Pula 4: Symeprewir, enfuwirtyd, siarczan abakawiru, emtrycytabina, entekawir, foskarnet	3,12	-0,01
Pula 5: Cydofowir, lamiwudyna, gancyklowir, dizoproksyl tenofowiru, zydowudyna, walgancyklowir	3,14	0,01
Pula 6: Sofosbuwir, azytromycyna, klarytromycyna, flukonazol, sulfametoksazol, trimetoprym	3,13	0
Stan chorobowy	Średnie stężenie [HIV-1] (\log_{10} IU/ml)	Błąd systematyczny (\log_{10} IU/ml)
Toczeń rumieniowaty układowy (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,00	-0,13
Przeciwciała przeciwjądrowe (Antinuclear Antibody, ANA)	3,10	-0,03
Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS)	3,25	0,12

Precyzja

Precyzję oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wyznaczono, wykonując testy panelu złożonego z czterech próbek zawierających materiał wirusa HIV-1 przygotowanych w osoczu negatywnym względem wirusa HIV-1 (przy użyciu podtypu B i grupy O wirusa HIV-1 pochodzącego z programu EQAPOL, Duke University) w trzech (3) systemach NeuMoDx System w ciągu sześciu (6) dni. W każdym systemie przeprowadzono po 12 analiz dla każdego stężenia próbki, uzyskując 216 powtórzeń na stężenie. Oceniono precyzję w ramach oznaczenia, w ramach dnia i w ramach systemu; ogólne odchylenie standardowe wyniosło $\leq 0,15 \log_{10}$ IU/ml. Nie zaobserwowano istotnych różnic w skuteczności oznaczenia między systemami, dniami lub cyklami oznaczeń, co przedstawiono w Tabeli 9. Nie oceniano precyzji pomiędzy operatorami, gdyż operator nie odgrywa istotnej roli w analizie próbek przy użyciu systemu NeuMoDx System.

Tabela 9: Precyzja wewnątrzlaboratoryjna — oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wykonywane w systemach NeuMoDx System

	Stęż. sekwencji docelowej (\log_{10} IU/ml)	Stęż. średnie (\log_{10} IU/ml)	SD w ramach systemu	SD w ramach dnia	SD w ramach oznaczenia	SD wewnątrzlaboratoryjne (ogólne)
Podtyp B	5,7	5,62	0,09	0,09	0,09	0,10
	3,7	3,62	0,10	0,10	0,10	0,13
Grupa O	4,7	4,65	0,09	0,09	0,09	0,12
	2,7	2,66	0,13	0,13	0,12	0,15

Zmienność między seriami

Zmienność między seriami oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay zweryfikowano, przeprowadzając retrospektywną analizę jakości danych uzyskanych przy użyciu trzech (3) różnych serii kluczowych odczynników. Dane te otrzymano podczas testów funkcjonalności odczynników wykonywanych przy użyciu panelu złożonego z trzech próbek zawierających docelowy materiał wirusa HIV (AccuPlex Recombinant HIV/HCV Control) w osoczu negatywnym względem RNA wirusa HIV-1 oraz próbek osocza negatywnego. Na każdą serię pasków testowych NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip wykonano łącznie 18 powtórzeń próbek pozytywnych i 14 powtórzeń próbek negatywnych. Przeanalizowano zmienność w ramach serii oraz między seriami, a wyniki przedstawiono w Tabeli 10. Ogólny bezwzględny błąd systematyczny nie przekraczał $0,14 \log_{10}$ IU/ml, a ogólne odchylenie standardowe było niższe niż $0,25 \log_{10}$ IU/ml. Nie zaobserwowano istotnych różnic w skuteczności między seriami, ponieważ wyniki ilościowego oznaczenia wszystkich próbek zawartych w panelu mieściły się w określonych granicach tolerancji.

Tabela 10: Odtwarzalność między seriami — oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Stęż. sekwencji docelowej (\log_{10} IU/ml)	Stęż. średnie ogółem (\log_{10} IU/ml)	Liczba ważnych testów	Błąd systematyczny (\log_{10} IU/ml)	SD między seriami	SD w ramach serii	SD ogólne
5,00	4,96	18	0,04	0,08	0,08	0,12
3,00	2,86	17	0,14	0,12	0,18	0,22
2,00	1,92	18	0,08	0,17	0,14	0,22

Skuteczność kontroli

Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay zawiera kontrolę przetwarzania próbki (Sample Process Control, SPC2), która umożliwia monitorowanie nieprawidłowości występujących podczas procesu i/lub amplifikacji. Skuteczność tej kontroli wewnętrznej testowano w analogicznym oznaczeniu NeuMoDx HCV Quant Assay w warunkach reprezentatywnych dla kluczowych niepowodzeń w krokach analizy, które potencjalnie mogą wystąpić podczas analizy próbki i pozostać niewykryte przez czujniki monitorujące skuteczność systemu NeuMoDx System. W celu oceny skuteczności kontroli wewnętrznej w obecności inhibitorów reakcji, przy braku dozowania odczynnika NeuMoDx Wash Reagent i braku usunięcia odczynnika płuczącego przetestowano próbki umiarkowanie pozytywne i próbki negatywne. Warunki, które miały negatywny wpływ na detekcję sekwencji docelowych, wpływały również negatywnie na detekcję kontroli SPC2, co podsumowano poniżej w Tabeli 11. We wszystkich warunkach wykazano, że kontrola przetwarzania próbki umożliwia monitorowanie niepowodzeń, lub udowodniono, że niewykryte niepowodzenia nie wpływają w istotnym stopniu na detekcję i ilościowe oznaczenie sekwencji docelowych.

Tabela 11: Podsumowanie badania skuteczności kontroli przetwarzania próbki

Warunek symulowanego niepowodzenia	Status amplifikacji kontroli SPC2	Status amplifikacji sekwencji docelowej	Wynik oznaczenia
Presence of Inhibitor (Obecność inhibitora)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Unresolved (Nierozstrzygnięty)
Brak dozowania odczynnika Wash	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Unresolved (Nierozstrzygnięty)
No Wash Blowout (Brak usunięcia odczynnika płuczającego)	Amplified (Amplifikacja)	Amplified (Amplifikacja)	Positive (Pozytywny), $\pm 0,3 \log_{10}$ IU/ml kontroli

Zanieczyszczenie krzyżowe

Częstość zanieczyszczeń krzyżowych dla oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wyznaczono, wykonując sześć (6) analiz ułożonych naprzemiennie próbek silnie pozytywnych i negatywnych względem wirusa HIV-1. W „konfiguracji szachownicy” przetestowano łącznie 36 powtórzeń próbek negatywnych i 36 próbek o wysokim mianie wirusa HIV-1 ($6,0 \log_{10}$ IU/ml). Dla wszystkich powtórzeń próbek negatywnych zgłoszono wynik negatywny, co wskazuje, że nie doszło do zanieczyszczenia krzyżowego podczas analizy próbek w systemie NeuMoDx System.

Równoważność macierzy próbek

Przeprowadzono testy w celu wykazania równoważności macierzy próbek między próbkami krwi pełnej zebranymi do probówek do pobierania krwi z EDTA a próbkami krwi pełnej zebranymi do probówek do pobierania krwi z ACD w celu przygotowania osocza. Przeprowadzono testy w celu wykazania równoważności świeżych i mrożonych próbek osocza (zebranych do dwóch typów probówek). Świeże próbki przechowywano w temperaturze 2–4°C do momentu dodania do nich wirusa HIV-1 w czterech różnych stężeniach (w tym stężenie zerowe, negatywne) obejmujących zakres ilościowy oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay i przetestowania ich pod kątem równoważności. Następnie próbki przenoszono do zamrażarki do temperatury $\leq -20^\circ\text{C}$ na co najmniej 24 godziny. Po tym okresie przechowywania w zamrażarce próbki rozmrażano i testowano ponownie. Wyniki otrzymane dla próbek z dodatkiem EDTA lub ACD oraz świeżych lub mrożonych próbek osocza porównano pod kątem równoważności, wykonując analizę regresji. Wyniki analizy danych regresji liniowej nie wykazały istotnych różnic w raportowanych wartościach pomiędzy próbkami z dodatkiem EDTA a próbkami z dodatkiem ACD lub pomiędzy świeżymi a mrożonymi próbkami osocza testowanymi przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.

Przeprowadzono dodatkowe testy w celu wykazania równoważnej skuteczności oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay wykonywanego na próbkach pierwotnych i próbkach wtórnych. Panele złożone z próbek pobranych od dawców negatywnych pod względem wirusa HIV-1, do których dodano sekwencje docelowe wirusa HIV-1 (AccuPlex Recombinant HIV/HCV Control), i próbek pobranych od dawców pozytywnych względem wirusa HIV-1 analizowano najpierw w probówkach pierwotnych. Po przeanalizowaniu próbek w probówkach pierwotnych pozostałe osocze rozdzielono na porcje do probówek wtórnych i przeanalizowano ponownie. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wynikach zgłaszanych dla próbek osocza w probówkach pierwotnych i wtórnych.

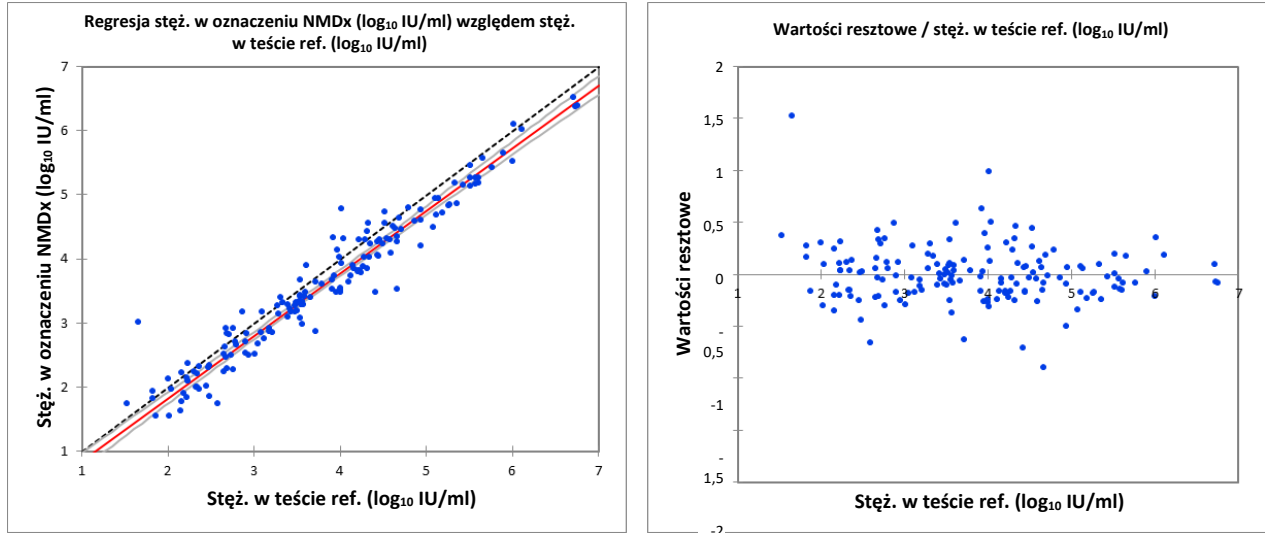
Porównanie metod klinicznych

Jakościową i ilościową skuteczność oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay porównano z wynikami otrzymanymi za pomocą oznaczenia porównawczego dopuszczonego przez agencję FDA/posiadającego certyfikat CE-IVD. Testy przeprowadzono wewnętrznie, w ramach pojedynczo zaślepionego badania pozostałości próbek osocza otrzymanych od dostawcy zarejestrowanego w agencji FDA. Dane identyfikacyjne próbek zostały usunięte. Przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay przeanalizowano łącznie 723 próbki osocza w różnych systemach NeuMoDx System. Wszystkie próbki, dla których początkowo otrzymano nieważny wynik, pomyślnie przeanalizowano ponownie, dzięki czemu uzyskano ważne wyniki dla wszystkich badanych próbek.

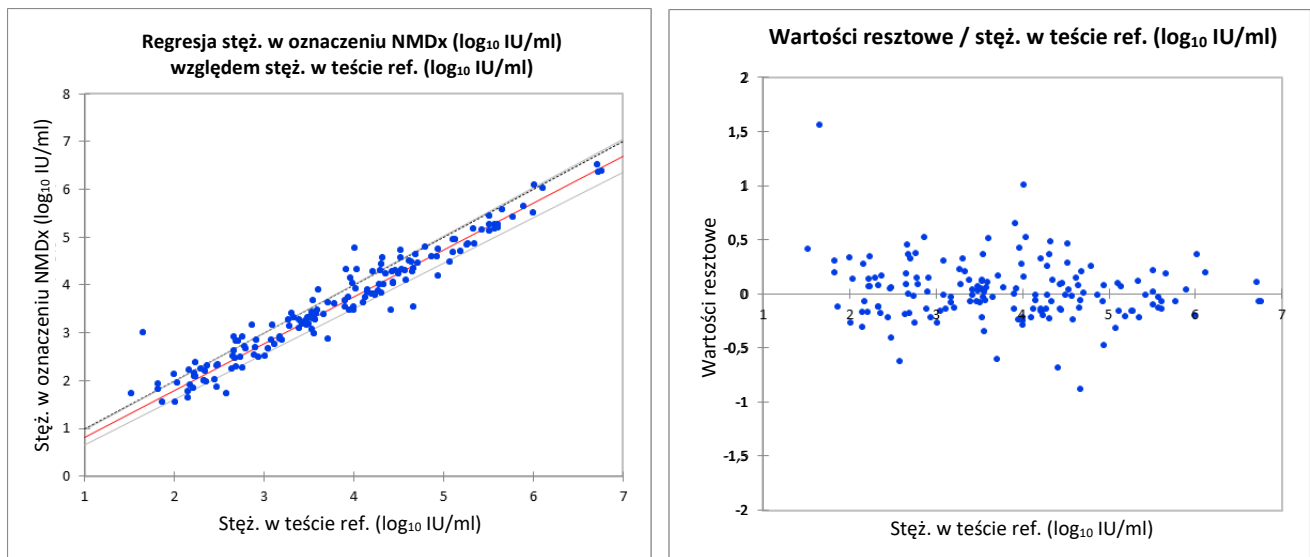
Błędy analizy i błędy systemu napotymane podczas testów były minimalne i mieściły się w kryteriach akceptacji. Uzyskano łącznie dwanaście (12) wyników Indeterminate (Nieokreślony, IND) i siedem (7) wyników Unresolved (Nierozstrzygnięty, UNR), co daje odsetek wyników nieokreślonych na poziomie 1,48% (95-procentowy CI: 0,85–2,57%) i odsetek wyników nierozstrzygniętych na poziomie 0,86% (95-procentowy CI: 0,42–1,77%). Ogólny odsetek ważnych wyników wynosił 97,7% (95-procentowy CI: 96,4–98,5%).

Spośród 723 ważnych wyników 165 zostało zgłoszonych w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay jako wyniki pozytywne wraz z odpowiednimi wartościami stężeń przypisanymi w teście referencyjnym. W celu obliczenia korelacji między wartościami stężeń zgłoszonymi w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay a wartościami zgłoszonymi w teście referencyjnym przeprowadzono analizy regresji Deminga i Passinga-Babloka.

W celu wykazania korelacji między wartościami stężeń zgłoszonymi w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay a wartościami zgłoszonymi w teście referencyjnym dla wszystkich badanych próbek z przypisanymi stężeniami wygenerowano wykresy regresji i wartości resztowych. Wykresy wygenerowane w analizie metodą Deminga i metodą Passinga-Babloka przedstawiono odpowiednio na Ryc. 5 i 6. Jakość dopasowania metodą regresji Deminga jest obrazowana przez współczynnik nachylenia równy 0,975 (95-procentowy CI: 0,939; 1,011) i punkt przecięcia (błąd systematyczny) równy -0,121 (95-procentowy CI: -0,276; 0,033), co wskazuje na wysoką korelację wyników uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay i w testach referencyjnych przy akceptowalnym błędzie systematycznym. Jakość dopasowania liniowego metodą Passinga-Babloka jest obrazowana przez współczynnik nachylenia równy 0,981 (95-procentowy CI: 0,950; 1,012) i punkt przecięcia (błąd systematyczny) równy -0,167 (95-procentowy CI: -0,288; -0,036), co również wskazuje na wysoką korelację wyników uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay i w testach referencyjnych przy akceptowalnym błędzie systematycznym. Wyniki analiz metodą Deminga i metodą Passinga-Babloka podsumowano poniżej w Tabeli 12.



Ryc. 5: Wykres równoważności (po lewej) i wykres wartości resztowych (po prawej) — analiza zbiorcza wyników uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay w porównaniu z wynikami uzyskanymi w testach referencyjnych — analiza Deminga



Ryc. 6: Wykres równoważności (po lewej) i wykres wartości resztowych (po prawej) — analiza zbiorcza wyników uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay w porównaniu z wynikami uzyskanymi w testach referencyjnych — analiza Passinga-Babloka

Tabela 12: Podsumowanie analiz metodą liniowej regresji Deminga i Passinga-Babloka

Analiza metodą Deminga		Analiza metodą Passinga-Babloka	
Punkt przecięcia	Współczynnik nachylenia	Punkt przecięcia	Współczynnik nachylenia
-0,121	0,975	-0,167	0,981
95-procentowy CI (-0,276; 0,033)	95-procentowy CI (0,939; 1,011)	95-procentowy CI (-0,288; -0,036)	95-procentowy CI (0,950; 1,012)

Na 723 ważnych wyników uzyskanych przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay w testach referencyjnych zgłoszono 171 wyników pozytywnych i 552 wyniki negatywne. Czułość i swoistość oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay obliczono względem wyników testów referencyjnych. Wyniki podsumowano poniżej w Tabeli 13. Spośród 171 przebadanych próbek pozytywnych dla 165 próbek zgłoszono wynik pozytywny w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, co wskazuje na czułość na poziomie 96,5% (95-procentowy CI: 92,6–98,4%). Spośród 552 przebadanych próbek z wynikiem negatywnym dla 551 próbek zgłoszono wynik negatywny w oznaczeniu NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, co wskazuje na czułość na poziomie 99,8% (95-procentowy CI: 99,0–100%).

Tabela 13: Wyniki jakościowego porównania metod: porównanie oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay względem testów referencyjnych

		Test referencyjny			
		HIV-1	Positive (Pozytywny)	Negative (Negatywny)	łącznie
NeuMoDx	Positive (Pozytywny)		165	1	166
	Negative (Negatywny)		6	551	557
	łącznie		171	552	723
		Czułość = 96,5% (95-procentowy CI: 92,6–98,4%)			
		Swoistość = 99,8% (95-procentowy CI: 99,0–100%)			

Ponadto w celu wykazania możliwości wykrywania RNA wirusa HIV-1 przed wykryciem przeciwciał/antygenów przy użyciu dostępnych na rynku testów, przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay przeanalizowano łącznie 12 komercyjnych paneli serokonwersji, w tym 75 indywidualnych próbek osocza. Do analizy włączono próbki charakterystyczne dla okresu przed serokonwersją, wczesnej serokonwersji oraz serokonwersji. Przeprowadzono analizę w celu porównania pierwszej pobranej próbki krwi, w której wykryto RNA wirusa HIV-1 przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, względem pierwszej pobranej próbki krwi, dla której otrzymano pozytywny wynik pod kątem przeciwciał/antygenów (Ab/Ag) charakterystycznych dla wirusa HIV-1, przy użyciu komercyjnie dostępnych testów z krwi dopuszczonych przez agencję FDA/posiadających certyfikat CE-IVD. Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay umożliwiała wykrycie RNA wirusa HIV-1 we wszystkich próbkach testowanych paneli o co najmniej jeden dzień wcześniej w porównaniu do testów z krwi wykrywających przeciwciała/antygeny. Wyniki podsumowano w Tabeli 14.

Tabela 14: Porównanie paneli serokonwersji — oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay i test z krwi pod kątem przeciwciał/antygenów charakterystycznych dla wirusa HIV-1

Id. panelu	Dzień pobrania krwi, w którym otrzymano pierwszy pozytywny wynik	
	NeuMoDx HIV-1 Quant Assay	Test z krwi pod kątem Ab/Ag HIV-1
PRB969	4	7
PRB968	5	7
0600-0230	2	4
0600-0270	2	3
0600-0258	2	3
0600-0244 (PRB962)	3	5
0600-0272	3	4
PRB967	2	4
PRB964	3	6
PRB963	4	6
0600-0263	5	7
PRB956	2	4

Przeprowadzono dodatkowe analizy w celu porównania pierwszej pobranej próbki krwi, w której wykryto RNA wirusa HIV-1 przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, względem pierwszej pobranej próbki krwi, w której wykryto RNA wirusa HIV-1 przy użyciu komercyjnie dostępnych testów NAT dopuszczonych przez agencję FDA/posiadających certyfikat CE-IVD. Oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay umożliwiała wykrycie RNA wirusa HIV-1 we wszystkich próbkach testowanych paneli w tym samym dniu, co inne testy NAT wykrywające RNA wirusa HIV-1. W przypadku dwóch paneli oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay umożliwiała wykrycie RNA wirusa HIV-1 o jeden dzień wcześniej niż inne testy NAT. Wyniki podsumowano w Tabeli 15.

Tabela 15: Porównanie paneli serokonwersji — oznaczenie NeuMoDx HIV-1 Quant Assay i testy NAT pod kątem RNA wirusa HIV-1

Id. panelu	Dzień pobrania krwi, w którym otrzymano pierwszy pozytywny wynik	
	NeuMoDx HIV-1 Quant Assay	Referencyjny test NAT
PRB969	4	4
PRB968	5	5
0600-0230	2	2
0600-0270	2	2
0600-0258	2	2
0600-0244 (PRB962)	3	3
0600-0272	3	3
PRB967	2	2
PRB964	3	4
PRB963	4	5
0600-0263	5	5
PRB956	2	2

LITERATURA

- Barré-sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(12):877-83.
- Piot P, Plummer FA, Mhalu FS, Lamboray JL, Chin J, Mann JM. AIDS: an international perspective. *Science.* 1988;239(4840):573-9.
- Acheson ED. AIDS: a challenge for the public health. *Lancet.* 1986;1(8482):662-6.
- De Cock KM, Jaffe HW, Curran JW. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS.* 2012;26(10):1205-13.
- Gaines H, Von sydow MA, Von stedingk LV, et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS.* 1990;4(10):995-9.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1993;328(5):327-35.
- Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324(14):961-4.
- Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324(14):954-60.
- Coombs RW, Collier AC, Allain JP, et al. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1989;321(24):1626-31.
- Horsburgh CR, Ou CY, Jason J, et al. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet.* 1989;2(8664):637-40.
- Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 1993;259(5102):1749-54.
- Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA.* 2007;297(21):2349-50.
- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Department of Health and Human Services. Available at <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Updated December 18, 2019.
- Cohen MS, Chen YQ, Mccauley M, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493-505.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):123-6.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):117-22.
- Dimitrov DS, Martin MA. HIV results in the frame. CD4+ cell turnover. *Nature.* 1995;375(6528):194-5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

ZNAKI TOWAROWE

NeuMoDx™ i NeuDry™ są znakami towarowymi firmy NeuMoDx Molecular, Inc.

AccuPlex™ jest znakiem towarowym firmy SeraCare Life Sciences, Inc.










BD Vacutainer® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Becton, Dickinson and Company

BD i PPT™ są znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company

TaqMan® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Roche Molecular Systems, Inc.

Wszystkie inne nazwy produktów, znaki towarowe i zastrzeżone znaki towarowe, które mogą pojawiać się w tym dokumencie, są własnością ich odpowiednich właścicieli.

SYMBOLE

SYMBOL	ZNACZENIE
R only	Wyłącznie na receptę
	Producent
IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
EC REP	Upoważniony przedstawiciel na terytorium Unii Europejskiej
REF	Numer katalogowy
LOT	Kod partii
	Data ważności
	Zakres temperatur
	Zakres wilgotności
	Nie używać ponownie
	Zawiera materiały wystarczające do przeprowadzenia $<n>$ testów
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Przeostroga
	Zagrozenie biologiczne
CE	Oznaczenie CE



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

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



Emergo Europe B.V.
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
Holandia



Wsparcie techniczne / zgłaszanie danych dotyczących nadzoru nad produktem (vigilance): support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents