

**Testovací proužek NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip 201500****R only**

UPOZORNĚNÍ: Pouze pro export do USA

**Pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System***Chcete-li vložit aktualizace, přejděte na internetové stránky: www.qiagen.com/neumodx-ifu**Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 288 Molecular System, výr. č. 40600108.**Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 96 Molecular System, výr. č. 40600317.***ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ**

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay je automatizovaný, amplifikační test nukleové kyseliny *in vitro* pro stanovitelnost DNA lidského viru Epstein-Barrové (Epstein-Barr Virus, EBV) v plazmě. Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay prováděná na molekulárních soustavách NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System (soustava/soustavy NeuMoDx System) zahrnuje automatizovanou extrakci DNA k izolování cílové nukleové kyseliny z plazmy a polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (Polymerase Chain Reaction, PCR) k zacílení na dvě vysoce konzervované oblasti v genomu viru Epstein-Barrové.

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay je určena ke stanovitelnosti DNA viru Epstein-Barrové (Epstein-Barr Virus, EBV) *in vitro* u čerstvých a zmrazených vzorků lidské plazmy za použití molekulárních soustav NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System. Účelem analýzy NeuMoDx EBV Assay je využití při diagnostice a monitoringu infekcí způsobených virem EBV. Analýzu lze využít k měření hladin DNA EBV za účelem posouzení reakce na antivirovou léčbu. Tato analýza je určena k použití ve spojení s klinickou přítomností a jinými laboratorními markery postupujícího onemocnění pro klinické řízení a monitoring EBV infekce. Analýza není určena k použití jako vyšetřovací test na přítomnost EBV v krvi nebo přípravcích z krve.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

K přípravě plazmy lze použít plnou lidskou krev odebranou do sterilních zkumavek pro odběr krve s obsahem EDTA jako antikoagulantem. Pro zahájení testování se plazma ve zkumavce se vzorkem kompatibilní se soustavou NeuMoDx System umístí do k tomu určeného stojanu na zkumavky se vzorky a položí na pracovní stůl soustavy NeuMoDx System. U každého vzorku se alikvotní podíl 250 µl vzorku plazmy smíchá s lýzovým pufrům NeuMoDx Lysis Buffer 5 a soustava NeuMoDx System automaticky provede všechny kroky nezbytné k získání cílové nukleové kyseliny, přípravě izolované DNA pro amplifikaci pomocí PCR v reálném čase a, pokud jsou přítomny, k amplifikaci a detekci produktů amplifikace (dvou vysoce konzervovaných oblastí v genomu EBV). Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay obsahuje kontrolu zpracování vzorků DNA (Sample Process Control, SPC1), která pomáhá sledovat přítomnost možných inhibičních látek a také selhání soustavy NeuMoDx System nebo reagentie, ke kterému může dojít během extrakce a amplifikace.

EBV je běžný virus s dvoušroubovicovou DNA, jenž patří do čeledi lidských herpesvirů, které infikují lidi v každém věku. Odhaduje se, že po celém světě je nebo bylo virem EBV nakaženo > 90 % jedinců.¹ EBV se šíří tělesnými tekutinami, jako jsou sliny, krev a sperma, a transplantací orgánů. Mnoho lidí se virem EBV nakazí v dětství. Tito jedinci jsou při nakažení EBV obvykle asymptomatictí. U imunokompromitovaných osob se z EBV infekce mohou rozvinout závažnější příznaky a komplikace. Latentní EBV infekce představuje pro pacienty po transplantaci větší riziko. Součástí posttransplantačních lymfoproliferativních chorob (post-transplant lymphoproliferative disorders, PTLDS) je tvorba nádorů navozená EBV u B-buněk kvůli účinku imunosupresiv na imunitní kontrolní mechanismy EBV, jedné z nejvýznamnějších příčin nemocnosti a úmrtnosti pacientů, kteří podstupují transplantaci některého orgánu.²

Využití monitoringu zátěže virem EBV usnadňuje diagnostiku a řízení PTLD související s EBV. Avšak detekce nukleové kyseliny EBV v krvi k diagnostice PTLD související s EBV nestačí. Test nukleové kyseliny (Nucleic Acid Testing, NAT) by se měl používat pouze ve spojení s klinickou přítomností a jinými laboratorními markery postupujícího onemocnění pro klinické řízení a monitoring EBV infekčních pacientů. Zatímco současné směrnice pro řízení a léčbu EBV infekcí u imunokompromitovaných jedinců nejsou jednoznačné, pokud jde o to, *kdy* s antivirovou léčbou začít, všechny po zahájení antivirové léčby vyžadují nepřetržitý monitoring virové zátěže, což by mělo pomoci se snížením vážných vedlejších účinků léků u takové populace.^{3,4}

PRINCIPY POSTUPU

K vlastnímu provedení analýzy využívá analýza NeuMoDx EBV Quant Assay na soustavě NeuMoDx System testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip, kalibrátory NeuMoDx EBV Calibrator, externí kontroly NeuMoDx EBV External Control, lýzový pufr NeuMoDx Lysis Buffer 5 a obecně použitelné reagentie NeuMoDx. Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay kombinuje automatizovanou extrakci DNA, amplifikaci a detekci pomocí PCR v reálném čase. K přípravě plazmy se odebírají vzorky plné krve do zkumavek s obsahem EDTA. Vzorek plazmy ve zkumavce kompatibilní se soustavou NeuMoDx System je umístěn do stojanu na zkumavky se vzorkem, který je pak položen na pracovní stůl systému NeuMoDx System ke zpracování. Žádný další zásah obsluhy není nutný.

Soustavy NeuMoDx System k automatickému provedení buněčné lýzy, extrakce DNA a odstranění inhibitorů využívají kombinace zahřívání, lytických enzymů a extrakčních reagentií. Uvolněné nukleové kyseliny jsou zachyceny paramagnetickými částicemi. Částice s navázanými nukleovými kyselinami jsou vloženy do zásobníku NeuMoDx Cartridge, kde jsou nenavázané komponenty neobsahující DNA dále spláchnuty promývací reagentií NeuMoDx Wash Reagent a navázaná DNA je eluována za použití uvolňovací reagentie NeuMoDx Release Reagent. Soustavy NeuMoDx System potom eluovanou DNA využijí k rehydrataci proprietárních amplifikačních reagentií NeuDry™, které obsahují všechny prvky nezbytné k amplifikaci s PCR EBV specifického cíle a SPC1. Po rekonstituci reagentií PCR NeuDry nadává soustava NeuMoDx System připravenou, PCR-ready směs do kazety NeuMoDx Cartridge. K amplifikaci a detekci kontrolní a cílové (pokud je přítomna) sekvence DNA dochází v PCR komoře kazety NeuMoDx Cartridge. Kazeta NeuMoDx Cartridge je určena také k tomu, aby v ní následně po PCR v reálném čase byl amplikon, čímž je po amplifikaci podstatně eliminováno riziko kontaminace.

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay cílí na dva vysoce konzervované úseky, BALF5 a BXFL1, v genomu EBV. Vzor s dvojitým zacílením snižuje riziko falešně negativních výsledků v případě mutace, čímž zvyšuje robustnost analýzy. Amplifikované cíle jsou detekovány v reálném čase pomocí chemizmu hydrolyzační sondy (běžně označované jako chemizmus TaqMan®) za použití fluorogenních oligonukleotidových molekul sondy, specifických pro amplicony pro jejich příslušné cíle.

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

Sondy TaqMan jsou určeny k reasociaci DNA v úseku amplifikovaném specifickou sadou primerů. Jak polymeráza Taq DNA prodlužuje primer a syntetizuje nové vlákno, 5' až 3' exonukleázová aktivita polymerázy Taq DNA degraduje sondu, která reasociovala na templát. Degradací sondy se uvolňuje fluorofor a rozbíjí těsnou blízkost ke zhášedlu, takže účinek zhášení způsobený FRET je překonán a je možná detekce fluoroforu fluorescencí. Výsledný detekovaný fluorescenční signál je přímo úměrný uvolněnému fluoroforu a může souviset s množstvím přítomné cílové DNA.

K detekci DNA EBV se používá sonda TaqMan značená fluoroforem (490/521 nm) na 5' konci a tmavým zhášedlem na 3' konci. K detekci SPC1 je sonda TaqMan označena alternativním fluorescenčním barvivem (535/556 nm) na 5' konci a tmavým zhášedlem na 3' konci. Software soustavy NeuMoDx System monitoruje fluorescenční signál vydávaný sondami TaqMan na konci každého amplifikačního cyklu. Když je amplifikace hotova, software soustavy NeuMoDx System údaje analyzuje a podá zprávu o výsledku (POSITIVE (POZITIVNÍ) / NEGATIVE (NEGATIVNÍ) / INDETERMINATE (NEURČITÝ) / UNRESOLVED (NEROZLIŠENO)). Pokud je výsledek POSITIVE (POZITIVNÍ), software soustavy NeuMoDx System dodá také kvantitativní hodnotu přidruženou ke vzorku nebo oznámí, zda je vypočítaná koncentrace mimo meze stanovitelnosti.

REAGENCIE / SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Dodaný materiál

REF.	Obsah	Počet testů na jednotku	Počet testů v balení
201500	Testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip <i>Suché reagensie PCR obsahující sondu TaqMan a primery specifické pro EBV a SPC1.</i>	16	96

Požadované, ale nedodávané další materiály (k dispozici samostatně od společnosti NeuMoDx)

REF.	Obsah
100200	Extrakční destička NeuMoDx Extraction Plate <i>Suché paramagnetické částice, lytický enzym a kontroly zpracování vzorků</i>
800500	Kalibrátory NeuMoDx EBV Calibrator <i>Jednorázové sady kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot EBV pro stanovení validity standardní křivky</i>
900501	Externí kontroly NeuMoDx EBV External Control <i>Jednorázové sady pozitivních a negativních kontrol EBV pro stanovení každodenní validity analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay</i>
400900	Pufr NeuMoDx Lysis Buffer 5
400100	Promývací reagensie NeuMoDx Wash Reagent
400200	Uvolňovací reagensie NeuMoDx Release Reagent
100100	Zásobník NeuMoDx Cartridge
235903	Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (300 µl) s filtry
235905	Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (1 000 µl) s filtry

Potřebné přístrojové vybavení

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

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay je určena pouze pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx System.
- Se vzorky je třeba vždy zacházet tak, jako by byly infekční, a v souladu s bezpečnými laboratorními postupy, například těmi popsány v Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁵ a v dokumentu M29-A4 institutu CLSI.⁶
- Pozitivní výsledek indikuje přítomnost DNA viru EBV.
- Provádění analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay je omezeno na použití pracovníky vyškolenými v používání soustavy NeuMoDx System a v manipulaci s infekčními materiály.
- Spotřební materiál ani reagensie po uvedené době expirace nepoužívejte.
- Nepoužívejte žádné reagensie, pokud je bezpečnostní těsnění rozbito nebo je při dodání poškozen obal.

- Spotřební materiál nebo reagentie nepoužívejte, pokud je ochranný váček při dodání otevřený nebo rozbitý.
- K dispozici musí být platná kalibrace testování (generovaná zpracováním kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot z kalibrátorů NeuMoDx EBV Calibrator (REF 800500)) předtím, než lze výsledky testu generovat pro klinické vzorky.
- Externí kontroly NeuMoDx EBV External Control [REF 900501] musí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay zpracovány každých 24 hodin.
- Minimální objem vzorku sekundárních alikvotních podílů závisí na velikosti zkumavky / stojanu na zkumavky se vzorkem tak, jak je definováno níže. Objem menší, než je specifikované minimum, může vést k chybě „Quantity Not Sufficient“ (Nedostatečné množství).
- Použití vzorků skladovaných při nesprávných teplotách nebo po uplynutí specifikovaných dob skladování může vést k neplatným nebo chybným výsledkům.
- Vždy u všech reagentií a spotřebního materiálu zabraňte mikrobiální a deoxyribonukleázové (DNázové) kontaminaci. Doporučujeme použití sterilních jednorázových přenosových pipet bez obsahu DNázy. Na každý vzorek použijte novou pipetu.
- Abyste předešli kontaminaci, s kazetou NeuMoDx Cartridge po amplifikaci nemanipulujte ani ji nerozebírejte. Za žádných okolností nevyjímajte kazety NeuMoDx Cartridge z nádoby na biologicky nebezpečný odpad (NeuMoDx 288 Molecular System) nebo z koše na nebezpečný biologický odpad (NeuMoDx 96 Molecular System). Zásobník NeuMoDx Cartridge je zkonstruován tak, aby kontaminaci zabránil.
- V případě, že laboratoř provádí také testy PCR s otevřenými zkumavkami, musí být zajištěno, že testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip, přídatný spotřební materiál a reagentie nezbytné k testování, ochranné osobní prostředky, jako například rukavice a laboratorní pláště, a soustava NeuMoDx System nejsou kontaminovány.
- Při manipulaci s reagentiemi a spotřebním materiálem NeuMoDx byste měli nosit čisté nitrilové rukavice bez obsahu pudru. Měli byste dávat pozor, abyste se nedotýkali vrchního povrchu zásobníku NeuMoDx Cartridge, fóliového těsnění testovacího proužku NeuMoDx EBV Quant Test Strip nebo extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate ani horního povrchu nádoby s lýzovým pufrem NeuMoDx Lysis Buffer 5; při manipulaci se spotřebním materiálem a reagentiemi byste se měli dotýkat pouze bočních stran.
- Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na vyžádání.
- Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy. Nekuřte, nepijte ani nejzte v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo reagentiemi.
- Nepoužité reagentie a odpad likvidujte podle státních, federálních, oblastních a místních předpisů.

UCHOVÁVÁNÍ, MANIPULACE A STABILITA PRODUKTU

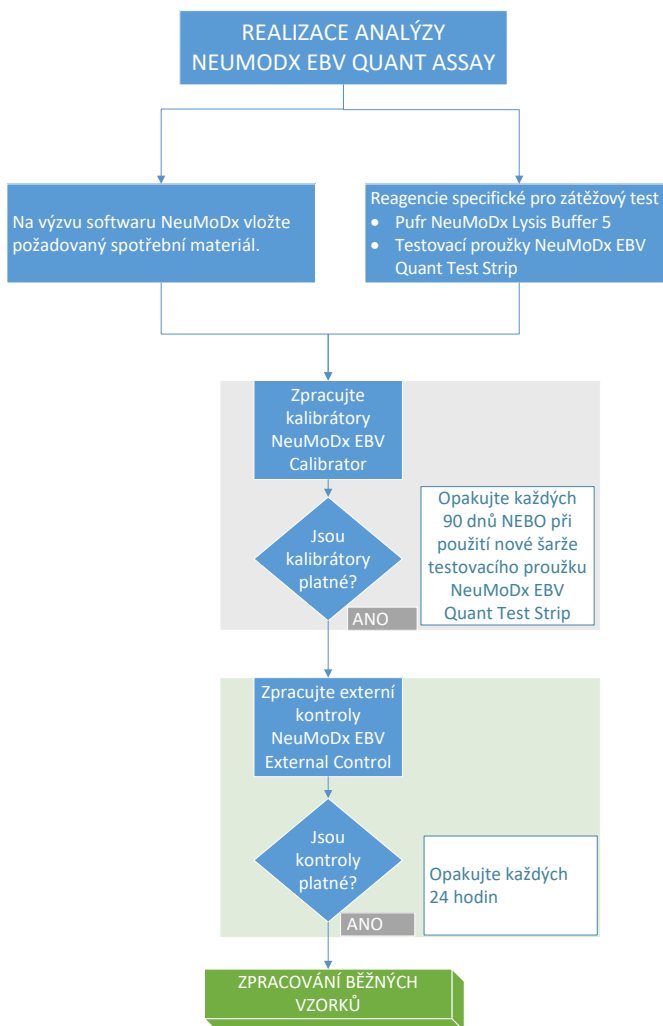
- Testovací proužky NeuMoDx EBV Quant Test Strip jsou stabilní v primárním obalu po dobu expirace, která je uvedena na štítku produktu, při uchovávání při teplotě mezi 18–23 °C.
- Po uplynutí uvedeného data expirace spotřební materiály ani reagentie nepoužívejte.
- Nepoužívejte žádný testovací produkt, pokud byl primární či sekundární obal viditelně narušen.
- Nevkládejte žádný produkt testu, který byl již dříve vložen do jiné soustavy NeuMoDx System.
- Testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip může po vložení zůstat v přístroji soustavy NeuMoDx System po dobu 14 dnů. Zbývající životnost vložených testovacích proužků je sledována pomocí softwaru a hlášena uživateli v reálném čase. Soustava vyzve k vyjmutí testovacího proužku, který byl používán po uplynutí povolené doby.
- Ačkoli kalibrátory NeuMoDx EBV Calibrator a externí kontroly NeuMoDx EBV External Control nejsou infekční, měly by být po použití v laboratoři zlikvidovány jako laboratorní biologicky nebezpečný odpad, aby se snížilo riziko kontaminace obsaženou cílovou nukleovou kyselinou.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

Se všemi vzorky manipulujte, jako kdyby byly schopné přenosu infekčních agens.

- Plnou krev nebo jakékoli vzorky skladované v původních zkumavkách nezmrazujte.
- Pro přípravu vzorků plazmy by měla být plná krev odebrána do sterilních zkumavek za použití EDTA jako antikoagulantu. Postupujte podle pokynů výrobce zkumavek pro odběr vzorků.
- Plná krev odebraná v zařízeních vyjmenovaných výše může být před přípravou plazmy skladována a/nebo přepravována až po dobu 24 hodin při 2 °C až 25 °C. Příprava plazmy by měla být prováděna podle pokynů výrobce.
- Připravené vzorky plazmy mohou před zpracováním zůstat na soustavě NeuMoDx System až po dobu 8 hodin. Pokud je třeba delší doby skladování, doporučujeme vzorky buď zchladit nebo zmrazit.
- Připravené vzorky plazmy by při 2 až 8 °C neměly být před testováním skladovány déle než 7 dnů a maximálně 8 hodin při pokojové teplotě.
- Připravené vzorky plazmy mohou být před zpracováním skladovány při < -20 °C po dobu až 8 týdnů; vzorky plazmy by před použitím neměly být vystaveny více než 2 cyklům zmrazení/rozmrazení.
 - Pokud jsou vzorky zmrazené, nechte je úplně rozmrazit při pokojové teplotě (15–30 °C); pro vytvoření rovnoměrně rozloženého vzorku vzorek zviřte.
 - Jakmile jsou zmrazené vzorky rozmrazeny, testování by mělo proběhnout do 8 hodin.
- Pokud jsou vzorky přepravovány, měly by být zabaleny a označeny v souladu s platnými předpisy země a/nebo mezinárodními předpisy.
- Zřetelně vzorky označte a uveďte, že se jedná o vzorky k testování EBV.
- Přejděte k části Příprava testu.

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



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

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava testu

1. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky.
2. Přeneste alikvotní podíl plazmy do zkumavky se vzorkem s čárovým kódem, která je kompatibilní se soustavou NeuMoDx System podle objemů definovaných níže:
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (32 zkumavek): průměr 11–14 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem ≥ 400 ml
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (24 zkumavek): průměr 14,5–18 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem ≥ 850 ml

Provoz soustavy NeuMoDx System

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

1. Osadte jeden nebo více stojanů na testovací proužky NeuMoDx System testovacím proužkem (proužky) NeuMoDx EBV Quant Test Strip a k založení stojanu (stojanů) na testovací proužky do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
2. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, přidejte potřebné spotřební materiály ke stojanům na spotřební materiál soustavy NeuMoDx System nezbytný spotřební materiál a a pomocí dotykové obrazovky vložte stojany do soustavy NeuMoDx System.

3. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, vyměňte promývací činidlo NeuMoDx Wash Reagent, uvolňovací činidlo NeuMoDx Release Reagent, vhodným způsobem vyprázdněte nádobu na základní a biologicky nebezpečný odpad.
4. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, zpracujte dle nutnosti kalibrátory Calibrators (REF 800500) a/nebo kontroly External Controls (REF 900501). Další informace týkající se kalibrátorů a kontrol lze najít v části *Zpracování výsledků*.
5. Zkumavku (zkumavky) se vzorky/kalibrátory/kontrolami vložte do běžného 32zkumavkového nosiče a ujistěte se, že ze všech zkumavek se vzorky jsou odstraněna víčka.
6. Nosič na zkumavky se vzorky umístěte do jakékoli otevřené pozice na přihrádku automatického podavače a k založení nosiče do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku. Takto bude zahájeno zpracování založených vzorků pro daný test(y).

OMEZENÍ

- Testovací pásek **NeuMoDx EBV Quant Test Strip** lze použít pouze na soustavách NeuMoDx System.
- Účinnost testovacího proužku NeuMoDx EBV Quant Test Strip byla stanovena u vzorků plazmy připravených z plné krve odebrané s EDTA jako antikoagulantem. Použití testovacího pásku NeuMoDx EBV Quant Test Strip nebylo u jiných typů klinických vzorků vyhodnoceno a funkční vlastnosti tohoto testu jsou u jiných typů vzorků neznámé.
- Protože detekce EBV závisí na množství přítomných virů ve vzorku, závisí spolehlivost výsledků na správném odběru vzorků, manipulaci s nimi a jejich skladování.
- Kalibrátory a externí kontroly musí být zpracovány podle doporučení vložených do balení a pokud zpracování běžných klinických vzorků předchází výzva softwaru soustavy NeuMoDx System.
- K chybným výsledkům testů může dojít kvůli nesprávnému odběru vzorků, manipulaci s nimi, skladování, technické chybě nebo nesprávné identifikaci zkumavek se vzorky. Kromě toho by se mohly objevit falešně negativní výsledky kvůli tomu, že množství virových částic ve vzorku je pod mezí detekce analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay.
- Obsluha soustavy NeuMoDx System je omezena pouze na personál vyškolený v používání soustavy NeuMoDx System.
- Pokud se ani cílový EBV, ani cílová SPC1 neamplifikují, bude ohlášen neplatný výsledek (Indeterminate (Neurčitý) nebo Unresolved (Nerozlišeno)) a test by měl být zopakován.
- Pokud je výsledek analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay Positive (Pozitivní), ale hodnota stanovitelnosti je mimo meze stanovitelnosti, soustava NeuMoDx System oznámí, zda byl detekovaný EBV *pod* dolní mezí stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) nebo *nad* horní mezí stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- V případě, že detekovaný EBV byl pod hodnotou LLoQ, může být analýza NeuMoDx EBV Quant Assay zopakována (podle přání) s jinou částí vzorku.
- V případě, že detekovaný EBV byl nad hodnotou ULoQ, může být analýza NeuMoDx EBV Quant Assay zopakována se zředěnou částí původního vzorku. Doporučujeme ředění 1:100 nebo 1:1 000 v EBV negativní plazmě nebo diluentu Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare, Milford, Massachusetts). Soustava automaticky spočítá koncentraci původního vzorku takto: Původní koncentrace vzorku = \log_{10} (faktor ředění) + oznámená koncentrace zředěného vzorku, pokud je před opakováním v softwaru řádně zvolen faktor ředění.
- Důsledkem občasné přítomnosti PCR inhibitorů v plazmě může být chyba stanovitelnosti v soustavě; pokud k tomu dojde, doporučujeme test zopakovat se stejným vzorkem zředěným v diluentu Basematrix v poměru 1 : 10 nebo 1 : 100.
- Pozitivní výsledek testu nemusí nutně znamenat přítomnost aktivní virové infekce. Pozitivní výsledek je pro přítomnost DNA viru Epstein-Barr spíše presumptivní.
- Ačkoli je ta možnost velmi málo pravděpodobná, delece mutací v obou konzervovaných úsecích zacílených analýzou NeuMoDx EBV Quant Assay na genom EBV může za použití testovacího proužku NeuMoDx EBV Quant Test Strip ovlivnit detekci nebo vést k chybnému výsledku.
- Výsledky z analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay by měly být použity jako doplněk klinických vyšetření a dalších informací, které má lékař k dispozici; test není určen k diagnostice infekce.
- Aby nedošlo ke kontaminaci, doporučujeme správnou laboratorní praxi, včetně výměny rukavic mezi manipulacemi s patientskými vzorky.

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

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

Výsledky analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay automaticky generuje software soustavy NeuMoDx System používající algoritmus rozhodování a parametry zpracování výsledků popsané v souboru definic analýzy NeuMoDx EBV (EBV Assay Definition File, EBV ADF). Výsledek analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay může být ohlášen jako Negative (Negativní), Positive (Pozitivní) s ohlášením koncentrace EBV, Positive (Pozitivní) nad ULoQ, Positive (Pozitivní) pod LLoQ, Indeterminate (Neurčitý) nebo Unresolved (Nerozlišeno) na základě stavu amplifikace cíle a kontroly zpracování vzorku. Výsledky jsou oznamovány na základě rozhodovacího algoritmu uvedeného v *tabulce 1*.

Tabulka 1: Algoritmus rozhodování analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay

Výsledek	EBV	Kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Pozitivní)	$[2 \leq Ct \leq 9 \text{ AND } EPR > 2 \text{ AND } EP \geq 1500]$ NEBO $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND } (A) EP \geq 1500]$	N/A
Positive (Pozitivní), nad horní mezi stanovitelnosti [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (\log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONC.) $> 8,0 \log_{10}$ IU/ml, NO QUANT (NENÍ STANOV.)	N/A
Positive (Pozitivní), pod dolní mezi stanovitelnosti [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (\log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONC.) $< 2,3 \log_{10}$ IU/ml, NO QUANT (NENÍ STANOV.)	N/A
Negative (Negativní)	N/A OR (NEBO) $[2 \leq Ct < 9 \text{ AND } (A) EPR \leq 2]$ NEBO $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND } (A) EP < 1500]$ OR (NEBO) Ct > 38	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) ($29 \leq Ct \leq 35$) and (a) EP ≥ 2000
Indeterminate (Neurčitý)	NOT AMPLIFIED/ Systems Errors Noted (NEAMPLIFIKOVÁNO/ Zaznamenány systémové chyby)	
Unresolved (Nerozlišeno)	NOT AMPLIFIED/ No System Errors Noted (NEAMPLIFIKOVÁNO / Žádné systémové chyby nebyly zaznamenány)	

EP = End Point Fluorescence (Hraniční fluorescence) (Po korekci výchozí hodnoty); EPR = End Point Fluorescence Ratio (Poměr hraniční fluorescence); Ct = Cycling Threshold (Prahová hodnota cyklování);

Quant (Stanov.) = vypočtené množství přítomného EBV vyjádřené v \log_{10} IU/ml. Viz Výpočet testu níže.

Výpočet testu

- U vzorků v mezích stanovitelnosti analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay, se koncentrace DNA EBV ve vzorcích počítá za pomoci uložené standardní křivky ve spojení s koeficientem kalibrace.
 - „Koeficient kalibrace“ se vypočítá na základě výsledků kalibrátorů NeuMoDx EBV Calibrators zpracovaných tak, aby byla zajištěna validita standardní křivky pro každou šarži testovacího pásku NeuMoDx EBV Quant Test Strip na konkrétní soustavě NeuMoDx System.
 - Koeficient kalibrace je do konečného stanovení koncentrace DNA EBV soustavou automaticky zahrnutý.
- Výsledky analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay se udávají jako \log_{10} IU/ml.
- Výsledná stanovitelnost u neznámých vzorků je výsledovatelná k 1. mezinárodnímu standardu organizace WHO pro techniku amplifikace nukleové kyseliny u viru Epstein-Barr.

Kalibrace testu

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

Kalibrátory

- Kalibrátory NeuMoDx EBV Calibrator jsou dodávány v soupravě [REF 800500] a obsahují cílový neinfekční opouzdřený virus EBV připravený v diluentu Basematrix.
- Sada EBV kalibrátorů musí být zpracována s každou novou šarží testovacích proužků NeuMoDx EBV Quant Test Strip, pokud je do soustavy NeuMoDx System nahrán nový soubor definic analýzy EBV, pokud je aktuální sada kalibrátorů za dobou platnosti (nastavenou na 90 dnů) nebo pokud je software soustavy NeuMoDx System upraven.
- Software soustavy NeuMoDx System uživatele uvědomí, kdy je třeba kalibrátory zpracovat; novou šarží testovacích proužků nelze k testování použít, dokud nebyly kalibrátory úspěšně zpracovány.

4. Validita kalibrace je zajištěna následovně:
 - a) Pro zajištění validity je třeba zpracovat sadu se dvěma kalibrátory – pro vysokou a nízkou hodnotu.
 - b) Pro získání platných výsledků je nutné mít výsledky nejméně 2 ze 3 replikátů v mezích předem stanovených parametrů. Nominální cíl kalibrátoru pro nízkou hladinu je $4 \text{ Log}_{10} \text{ IU/ml}$ a nominální cíl kalibrátoru pro vysokou hladinu je $6 \text{ Log}_{10} \text{ IU/ml}$.
 - c) Koeficient kalibrace se vypočítá tak, aby zohledňoval očekávanou variaci mezi šaržemi testovacích pásků; tento koeficient kalibrace se používá ke stanovení finální koncentrace EBV.
5. Pokud jeden nebo oba kalibrátory kontrolou validity neprojdou, zpracování neúspěšného kalibrátoru (kalibrátorů) zopakujte za použití nové ampule. V případě, že validitou neprojde jeden kalibrátor, je možné zopakovat pouze neúspěšný kalibrátor, jelikož soustava nevyžaduje, aby uživatel znovu kontroloval oba kalibrátory.
6. Pokud kalibrátor (kalibrátory) neprojdou kontrolou validity podruhé za sebou, kontaktujte společnost NeuMoDx Molecular, Inc.

Kontrola kvality

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

Externí kontroly

1. Externí kontrolní materiály, které pro pozitivní kontroly obsahují cílový neinfekční opouzdřený virus EBV v diluentu Basematrix, dodává společnost NeuMoDx Molecular, Inc. v soupravě obsahující externí kontroly NeuMoDx EBV External Controls (REF 900501).
2. Pozitivní a negativní externí kontroly je třeba provést jednou za 24 hodin. Pokud sada validních externích kontrol neexistuje, software soustavy NeuMoDx System vyzve uživatele k provedení těchto kontrol dřív, než budou moci být ohlášeny výsledky vzorků.
3. Pokud jsou externí kontroly třeba, vytáhněte sadu externích kontrol z mrazáku a nechte ampule roztát při pokojové teplotě (15-30 °C). Pro zajištění homogenity je jemně zviřte.
4. Za použití dotykové obrazovky a nosiče zkumavek se vzorky umístěného na přihrádce automatického podavače vložte ampule pozitivní a negativní kontroly do soustavy NeuMoDx System. Soustava NeuMoDx System rozpozná čárový kód a začne zpracovávat zkumavky se vzorky, pokud reagentie a tavidla nezbytná k testování nejsou k dispozici.
5. Validita externích kontrol bude vyhodnocena soustavou NeuMoDx System na základě očekávaného výsledku. Pozitivní kontrola by měla přinést EBV Positive (Pozitivní) výsledek a negativní kontrola by měla přinést EBV Negative (Negativní) výsledek.
6. S neshodným výsledkem externích kontrol by mělo být zacházeno následovně:
 - a) Pozitivní výsledek testu ohlášený u negativní kontroly vzorku ukazuje na problém s kontaminací vzorku.
 - b) Výsledek Negative (Negativní) testu u pozitivního kontrolního vzorku může naznačovat problém související s reagentií nebo přístrojem.
 - c) V obou případech neúspěšnou externí kontrolu (kontroly) NeuMoDx EBV External Control zopakujte s čerstvě rozmrazenou ampulkou kontroly (kontrol), která neprošla testem validity.
 - d) Pokud pozitivní externí kontrola NeuMoDx EBV External Control nepřestává hlásit Negative (Negativní) výsledek, kontaktujte zákaznický servis společnosti NeuMoDx.
 - e) Pokud negativní externí kontrola NeuMoDx EBV External Control nepřestává hlásit Positive (Pozitivní) výsledek, pokuste se eliminovat všechny zdroje možné kontaminace, včetně výměny VŠECH reagentií a spotřebního materiálu dřív, než kontaktujete zákaznický servis společnosti NeuMoDx.

Kontroly (interní) zpracování vzorků

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

Pokud se analýze NeuMoDx EBV Quant Assay prováděné na soustavě NeuMoDx System nepodaří vyprodukovat platný výsledek, bude oznámen buď jako Indeterminate (IND, neurčitý) nebo Unresolved (UNR, nerozlišeno) na základě typu chyby, ke které došlo.

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

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

VÝKONOVÁ CHARAKTERISTIKA

Analytická citlivost – mez detekce za použití standardu WHO

Analytická citlivost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay byla potvrzena testováním EBV negativních vzorků plazmy obohacených o roztok s nízkou hladinou podle 1. mezinárodního standardu WHO pro techniku amplifikace nukleové kyseliny u EBV. Tento ověřovací test byl proveden za očekávané meze detekce (Limit of Detection, LoD) analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay na soustavách NeuMoDx System při 200 IU/ml. LoD byla definována jako nejnižší detekovaná cílová hladina při poměru $\geq 95\%$. Měření bylo prováděno napříč několika soustavami s kvalifikovanými šaržemi reagentie NeuMoDx. Míry detekce jsou uvedeny v *tabulce 2*.

Tabulka 2: Stanovení LoD analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay; pozitivní míra detekce u vzorků plazmy

Cílová koncentrace [IU/ml]	PLAZMA		
	Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
200	120	117	97,5%
0	60	0	0%

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

Nejnižší cílová hladina, při které je dosaženo detekce $>95\%$ a celkové analytické chyby (Total Analytical Error, TAE) $\leq 1,0$, je definována jako dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ). Pro potvrzení 200 IU/ml jako LoD i LLoQ u analýzy EBV Quant Assay, byly ke stanovení TAE použity výsledky měření metodou hit-rate. Takto vypočítaná TAE byla definována:

$$\text{TAE} = \text{odchylka} + 2 \times \text{SD (Westgardova pravidla)}$$

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

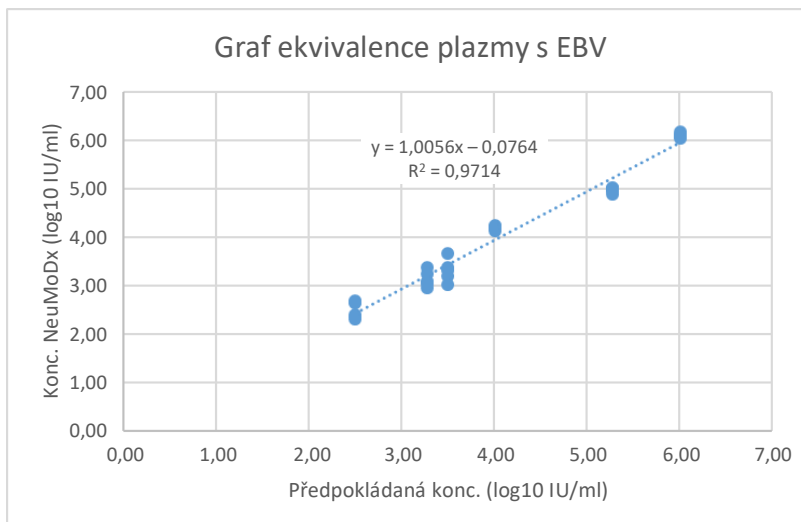
Tabulka 3: LLoQ analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay, s odchylkou a TAE

Cílová konc. [IU/ml]	Cílová konc. (Log_{10} IU/ml)	Plazma				
		Průměrná konc. (Log_{10} IU/ml)	Detekce (%)	SD	Odc hylk a	TAE
200	2,30	2,35	97,5	0,28	0,05	0,61

Na základě výstupů těchto měření byly LoD i LLoQ analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay stanoveny jako 200,0 IU/ml [2,30 log_{10} IU/ml].

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

Linearita a horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay u plazmy byly stanoveny přípravou série ředění za použití zapouzdřeného cílového EBV NeuMoDx a dle Exact EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, Texas) se zajištěním návaznosti k 1. mezinárodnímu standardu WHO pro EBV. Ve smíšené EBV negativní plazmě byl připraven 10prvkový panel za účelem vytvořit panel, který by pokryl rozsah koncentrací 2,0–8,0 log_{10} IU/ml. ULoQ analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay byla stanovena jako 8,0 log_{10} IU/ml. K hodnocení linearity standardní křivky byl připraven konfirmační panel a koncentrace analýzy EBV ohlášené soustavou NeuMoDx System ve srovnání s očekávanými hodnotami jsou uvedeny na *obrázku 2*.


Obrázek 2: Linearita analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay

Analytická specifčnost – zkřížená reaktivita

Analytická specifčnost byla prokázána screeningem zkřížené reaktivity 35 organismů, které se mohou nacházet ve vzorcích krve/plazmy, a také druhů, které se EBV fylogeneticky podobají. Organismy byly připraveny ve směsích po 5 až 6 organismech při vysoké koncentraci. Testované organismy jsou uvedeny v *tabulce 4*. U žádného z testovaných organismů nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita, což potvrzuje 100% analytickou specifčnost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay.

Tabulka 4: Patogeny použité k prokázání analytické specifčnosti

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

Analytická specifčnost – interferující látky, komenzální organismy

Interference u analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay byla vyhodnocena za přítomnosti necílových organismů, a to za použití stejných směsí organismů, jaké byly připraveny pro testování zkřížené reaktivity, uvedených výše v *tabulce 4*. Negativní EBV plazma byla obohacena o organismy smíšené do skupin po 4–7; tyto směsi byly potom obohaceny o cílový virus EBV při koncentraci 3 log₁₀ IU/ml. Jak naznačila minimální odchylka stanovitelnosti z kontrolních vzorků, které neobsahovaly žádný interferující přípravek, nebyla za přítomnosti těchto organismů pozorována žádná významná interference.

Analytická specifčnost – interferující látky, endogenní a exogenní látky

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay byla hodnocena za přítomnosti typických exogenních a endogenních interferujících látek, které se v klinických EBV vzorcích plazmy objevily. Mezi tyto látky patřily neobvykle vysoké hladiny krevních složek a také běžné antivirové léky a imunosupresanty, které jsou zařazeny do *tabulky 5*. Každá látka byla přidána k vyšetřené EBV negativní krevní lidské plazmě obohacené o 3 log₁₀ IU/ml EBV a u vzorků byla zkoumána interference. Kromě toho byla na možnou interferenci testována i plazma ve stavu při běžném onemocnění souvisejícím s infekcí virem EBV. Průměrná koncentrace a odchylka u všech testovaných látek ve srovnání s kontrolními vzorky uměle obohacenými o stejnou hladinu EBV jsou uvedeny v *tabulce 6*. Žádná z exogenních a endogenních látek specifčnost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay neovlivnila.

Tabulka 5: Testování interference – exogenní přípravky (klasifikace léků)

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

Tabulka 6: Testování interference – exogenní a endogenní přípravky

Endogenní	Průměrná konc.	Odchylka
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Hemoglobin	3,20	0,23
Triglyceridy	3,15	0,28
Bilirubin	3,48	-0,05
Albumin	3,2	0,22
Exogenní (medikace)	Průměrná konc.	Odchylka
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Směs 1: Azathioprin, Cyklosporin, Foscarnet, Ganciclovir, Valganciklovir hydrochlorid	3,30	0,13
Směs 2: Prednison, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxime, Flukonazol	3,22	0,21
Směs 3: Mycophenolate mofetil, Mycophenolate sodium, Piperacillin, Sirolimus/Rapamycin, Tazobactam	3,36	0,07
Směs 4: Trimethoprim, Vankomycin, Takrolimus, Everolimus, Klavulanát draselný	3,32	0,11
Směs 5: Famotidin, Sulfamethoxazol, Letermovir, Valaciclovir, Ticarcillin disodium, Leflunomid	3,47	-0,10
Stav onemocnění	Průměrná konc.	Odchylka
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Systémový lupus erythematoses (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,23	0,20
Antinukleární protilátka (Antinuclear Antibody, ANA)	3,33	0,10
Revmatoidní artritida (Rheumatoid Arthritis, RA)	3,19	0,24

Vnitrolaboratorní preciznost

Preciznost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay byla stanovena testováním 3 replikátů 4prvkového panelu se vzorky EBV připravených s EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, Texas) třikrát denně za použití dvou soustav NeuMoDx 288 System a jedné soustavy NeuMoDx 96 System po dobu dvou dnů. Preciznost byla charakterizována v rámci jednoho cyklu, jednoho dne a jedné soustavy a celková směrodatná odchylka byla stanovena jako $\leq 0,33 \log_{10}$ IU/ml. Napříč systémy, dny nebo cykly byla prokázána vynikající preciznost, jak je uvedeno v *tabulce 7*. Preciznost mezi pracovníky obsluhy charakterizována nebyla, jelikož obsluha při zpracování vzorků za použití soustavy NeuMoDx System nehraje žádnou významnou roli.

Tabulka 7: Vnitrolaboratorní preciznost – analýza NeuMoDx EBV Quant Assay na soustavách NeuMoDx System

Konc. cílového EBV (\log_{10} IU/ml)	Průměrná konc. EBV (\log_{10} IU/ml)	SD v rámci soustavy	SD v rámci dne	SD v rámci cyklu	Celková SD (v rámci laboratoře)
5,2	5,30	0,27	0,25	0,25	0,27
4,2	4,25	0,21	0,21	0,12	0,21
3,2	3,38	0,22	0,20	0,20	0,22
2,7	3,03	0,30	0,30	0,30	0,33

Reprodukovatelnost mezi šaržemi

Reprodukovatelnost mezi šaržemi u analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay byla stanovena vyhodnocením tří šarží klíčových reagentů – testovacích pásek NeuMoDx EBV Quant Test Strips, lýzového pufru 5 - jako části kvalitativního testu (Qualification Testing, QT). K hodnocení účinnosti byl použit 4prvkový panel EBV pozitivní plazmy (*tabulka 8*). Byla zkoumána variace v rámci jedné šarže a mezi šaržemi a výsledky jsou prezentovány v *tabulkách 8–9*. Celková maximální odchylka u testovacích proužků analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay byla $0,03 \log_{10}$ IU/ml a celková maximální SD byla $0,20 \log_{10}$ IU/ml. Celková maximální odchylka u lýzového pufru NeuMoDx Lysis Buffer 5 byla $0,12 \log_{10}$ IU/ml a celková maximální SD byla $0,41 \log_{10}$ IU/ml. Provedený ekvivalent byl prokázán napříč šaržemi, jelikož stanovitelnost všech prvků panelu byla v mezích stanovené tolerance.

Tabulka 8: Reprodukovatelnost mezi šaržemi – analýza NeuMoDx EBV Quant Assay, Test Strip

Konc. cílového EBV [IU/ml]	Průměrná konc. EBV (\log_{10} IU/ml)	N (Platné výsledky pro šarži)	Odchylka	SD mezi šaržemi	SD v rámci jedné šarže	Celková SD
5,0	4,98	18	0,02	0,06	0,08	0,10
4,0	3,98	18	0,02	0,08	0,09	0,12
3,0	3,02	18	0,02	0,06	0,10	0,12
2,0	2,03	18	0,03	0,05	0,20	0,20

Tabulka 9: Reprodukovatelnost mezi šaržemi – analýza NeuMoDx EBV Quant Assay, Lysis Buffer 5

Konc. cílového EBV (\log_{10} IU/ml)	Průměrná konc. EBV (\log_{10} IU/ml)	N (Platné výsledky pro šarži)	Odchylka	SD mezi šaržemi	SD v rámci jedné šarže	Celková SD
5,0	4,97	5	0,03	0,05	0,03	0,06
4,0	3,96	5	0,04	0,22	0,10	0,24
3,0	3,03	5	0,03	0,09	0,11	0,15
2,0	2,12	5	0,12	0,39	0,13	0,41

Účinnost kontroly zpracování vzorků

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay obsahuje kontrolu zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1), která má ohlásit selhání jakéhokoli kroku zpracování nebo inhibici ovlivňující výkon analýzy. Za použití analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay jako vzoru byla účinnost SPC1 u vzorků plazmy testována za podmínek reprezentativních pro kritická selhání zpracování, ke kterým by během zpracování vzorku mohlo teoreticky dojít a která by *nemusela být odhalena* čidly, která výkon soustavy NeuMoDx System monitorují. Vzorky pozitivní na cytomegaloviry (při $3 \log_{10}$ IU/ml) a negativní vzorky se musely vypořádat s následujícími podmínkami: přítomností inhibitoru, absencí nedodaného promývacího činidla a absencí propláchnutí. Neúčinnost procesu, která měla na detekci/stanovitelnost virového cíle nepříznivý vliv, se odrazila v účinnosti cílové SPC1, jak ukazuje *tabulka 10*. Ve všech testovaných případech bylo prokázáno, že buď kontrola zpracování vzorků dostatečně monitorovala neúčinnost procesu a přítomnost inhibitorů, nebo nepříznivý vliv předpokládané neúčinnosti procesu na detekci SPC1 ani na detekci a stanovitelnost virového cíle, nebyl významný. Tudíž efektivní monitoring účinnosti analýzy na soustavě NeuMoDx System kontrolou SPC1 byl s úspěchem prokázán.

Tabulka 10: Účinnost kontroly zpracování vzorků u virové DNA v plazmě*

Testovaná selhání kroků zpracování	Stav amplifikace kontroly zpracování vzorků 1	Stav amplifikace cílového CMV	Výsledek analýzy
Presence of Inhibitor (Přítomnost inhibitoru)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Delivered (Promytí nebylo dodáno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Blowout (Bez pročištění)	Amplified (Amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	Positive with Quantitation within 0.3 Log ₁₀ IU/mL of Control (Pozitivní se stanovitelností do 0,3 log ₁₀ IU/ml kontroly)

*K hodnocení účinnosti kontroly zpracování vzorků byl jako modelová soustava použit cytomegalovirus (CMV) ve vzorcích plazmy.

Křížová kontaminace

Míra křížové kontaminace u vzorků plazmy byla stanovena zpracováním vzorků, kde se střídaly vzorky vysoce pozitivní a negativní s DNA podobného, krví přenášeného viru, cytomegaloviru (CMV). Byly provedeny tři sady takového mozaikového testu celkem se 108 replikáty CMV negativní plazmy a 108 replikáty CMV plazmy obohacené při 6,0 log₁₀ IU/ml. Všechny 108 replikátů negativního vzorku bylo hlášeno jako negativních, což je důkazem, že během zpracování vzorku plazmy na soustavě NeuMoDx System k žádné zkřížené kontaminaci nedošlo.

Ekvivalence matrice vzorků

Bylo provedeno testování k prokázání ekvivalence mezi čerstvými a zmrazenými vzorky plazmy za použití podobného viru přenášeného krví, CMV, jako vzoru. Čerstvé vzorky byly uchovávány při 4 °C, dokud nebyly obohaceny třemi hladinami CMV a otestovány na ekvivalenci. Vzorky byly dále zmrazeny při -20 °C po dobu minimálně 24 hodin. Po této době skladování v mrazu byly vzorky rozmrazeny a znovu testovány. Regresní analýzou byla u výsledků mezi čerstvými a zmrazenými vzorky plazmy porovnána ekvivalence. Tyto údaje vykazaly vynikající ekvivalenci mezi čerstvými a zmrazenými vzorky plazmy se směrnici 1,0 a velmi nízkou odchylkou (průsečíkem), jak je uvedeno níže v *tabulce 11*.

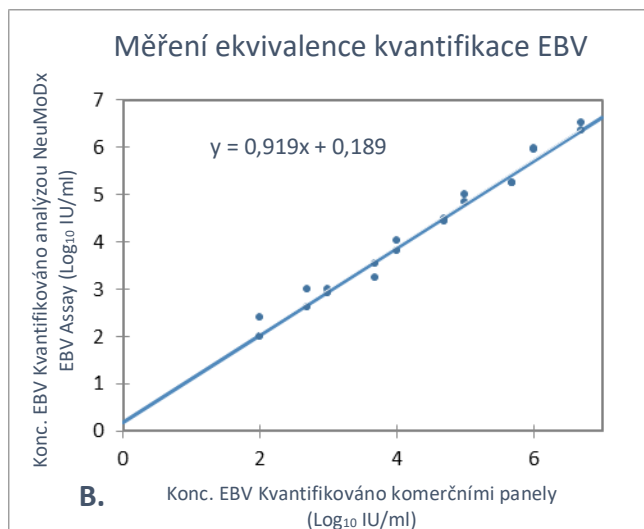
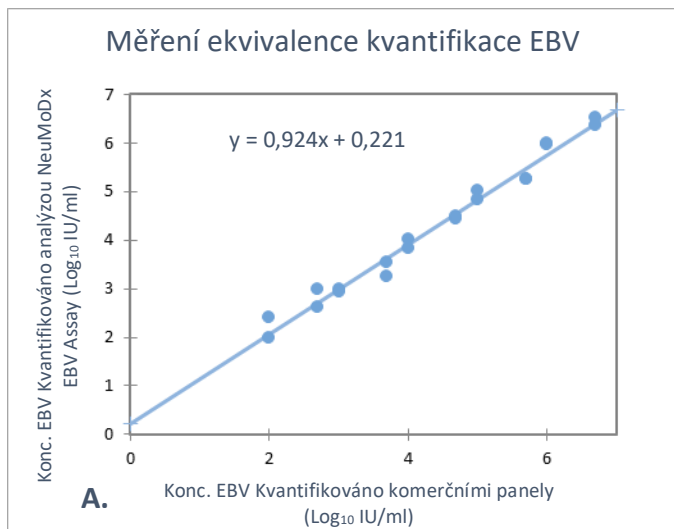
Tabulka 11: Ekvivalence matrice vzorků

Požadavek na parametry	Čerstvé EDTA vzorky ve srovnání se zmrazenými
Směrnice (0,9-1,1)	1,000
Průsečík <0,5 log ₁₀ IU/ml	0,020
p-hodnota > 0,05	0,631

Charakterizace účinnosti stanovitelnosti

Kvantitativní účinnost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay byla charakterizována zpracováním dvou komerčních verifikačních panelů EBV od společnosti AcroMetrix a Exact Diagnostics (vysledovatelných k 1. mezinárodnímu standardu WHO pro EBV) na soustavách NeuMoDx Molecular Systems.

Mezi analýzou NeuMoDx EBV Quant Assay a dvěma komerčními verifikačními panely EBV (*obrázek 3*) bylo buď regresní analýzou podle Deminga (*obrázek 3A*) nebo Passingovou-Bablokovou metodou (*obrázek 3B*) dosaženo vynikající korelace.



Obrazek 3. Graf ekvivalence mezi verifikačními panely AcroMetrix a Exact Diagnostics a analýzou NeuMoDx EBV Quant Assay. A. Lineární regresní analýza metodou Deming. B. Lineární regresní analýza metodou Passing-Bablok.

Kvalita regresní metody Deming je znázorněna celkovým koeficientem směrnice 0,92 a průsečíkem (odchylkou) 0,22, což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx EBV Quant Assay a verifikačními panely EBV jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou. Lineární metoda Passing-Bablok také podporuje význam korelace mezi výsledky získanými z analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay a verifikačních panelů EBV s celkovým koeficientem směrnice 0,92 a průsečíkem (odchylkou) 0,19. *p*-hodnota analýzy metodou podle Passinga-Babloka byla vypočítána jako 0,40.

Tabulka 12: Shrnutí lineární regresní analýzy Demingovou a Passingovou-Bablokovou metodou

Analýza Demingovou metodou		Analýza metodou Passing-Bablok	
Průsečík	Koeficient směrnice	Průsečík	Koeficient směrnice
0,22	0,92	0,19	0,92
CI 95 % (-0,11, 0,55)	CI 95 % (0,86, 0,99)	CI 95 % (-0,08, 0,41)	CI 95 % (0,87, 0,99)

REFERENCE

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

OCHRANNÉ ZNÁMKY















NeuMoDx[™] je ochranná známka společnosti NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry[™] je ochranná známka společnosti NeuMoDx Molecular, Inc.

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

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

SYMBOLY

SYMBOL	VÝZNAM
R only	Pouze na lékařský předpis
	Výrobce
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku <i>in vitro</i>
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Datum spotřeby
	Omezení teploty
	Omezení vlhkosti
	Nepoužívejte opakovaně
	Obsahuje dostatečné množství pro $<n>$ testů
	Prostudujte si návod k použití
	Upozornění
	Biologická rizika
	Značka CE



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

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



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



Technická podpora / vigilanční hlášení: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents