

REF 201300 NeuMoDx™ HBV 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 HBV Quant Assay to zautomatyzowany test służący do amplifikacji *in vitro* kwasu nukleinowego przeznaczony do ilościowego oznaczenia DNA wirusa zapalenia wątroby typu B (Hepatitis B Virus, HBV) w próbkach ludzkiego osocza i ludzkiej surowicy u osób zakażonych wirusem HBV o genotypie A–H. W przypadku wykonywania oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay w systemie NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System (system(y) NeuMoDx System) izolacja docelowego kwasu nukleinowego (DNA) z próbki oraz łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (Polymerase Chain Reaction, qPCR), ukierunkowana na wysoce konserwatywne sekwencje w genomie wirusa zapalenia wątroby typu B, zachodzą w sposób zautomatyzowany.

Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay jest przeznaczone do stosowania pomocniczo podczas opieki nad pacjentami z zakażeniami wirusem HBV. Wyniki uzyskane za pomocą oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay należy interpretować w kontekście stanu klinicznego pacjenta i wszystkich istotnych wyników laboratoryjnych. Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay nie jest przeznaczone do użytku jako test przesiewowy z krwi lub produktów krwiopochodnych ani jako narzędzie diagnostyczne do ustalania rozpoznania statusu klinicznego zakażenia wirusem HBV.

PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIE

Ludzka krew pełna pobierana 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. Surowicę należy zbierać do probówek do pobierania surowicy lub probówek do separacji surowicy (Serum Separation Tube, SST). W celu przygotowania próbki do testów osocze lub surowica 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 przypadku każdej próbki porcja osocza lub surowicy jest mieszana z buforem NeuMoDx Lysis Buffer 1, a system NeuMoDx System automatycznie wykonuje wszystkie kroki wymagane do wyizolowania docelowego kwasu nukleinowego, przygotowania wyizolowanego DNA do amplifikacji w reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz amplifikacji i detekcji produktów amplifikacji (docelowych sekwencji genomu wirusa HBV w wysoce konserwatywnym regionie kodującym *białko X1* białko *preC*), jeśli są obecne. Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay zawiera kontrolę przetwarzania próbki (Sample Process Control, SPC1) w postaci DNA, 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.

Wirus zapalenia wątroby typu B (Hepatitis B Virus, HBV) to czynnik chorobotwórczy wywołujący wirusowe zapalenie wątroby typu B na całym świecie. Wirus zapalenia wątroby typu B może wywołać ostre zapalenie wątroby, które może przejść w przewlekłe zapalenie prowadzące do marskości lub raka wątroby. Ryzyko rozwoju zapalenia przewlekłego zależy głównie od wieku; jeśli wirus został przeniesiony na dziecko podczas narodzin, ryzyko rozwoju zapalenia przewlekłego wynosi >90%, natomiast w przypadku zakażenia osoby dorosłej ryzyko to wynosi 2–6%¹. Wirus HBV jest przenoszony przez kontakt z krwią zakażonej osoby, drogą płciową, poprzez skażone igły używane podczas dożylnego przyjmowania narkotyków lub drogą wertykalną, od matki na dziecko w trakcie porodu. Około 850 000 osób w Stanach Zjednoczonych jest zakażonych wirusem HBV. Większość nowych przypadków zakażeń jest spowodowana przeniesieniem wirusa drogą płciową lub podczas dożylnego przyjmowania narkotyków². Szacuje się, że w Afryce i regionie zachodniego Pacyfiku zakażonych jest aż 5% populacji. W 2015 r. zakażenie wirusem HBV było przyczyną 885 000 zgonów na całym świecie; głównie w wyniku marskości wątroby lub raka wątrobowokomórkowego³. Dostępna jest szczepionka przeciwko wirusowi HBV o skuteczności na poziomie 95%, dzięki czemu każdego roku rozpoznawanych jest coraz mniej zakażeń⁴.

Obecnie standardem w leczeniu zakażenia wirusem HBV jest terapia przeciwwirusowa, podczas której wymagane jest stałe monitorowanie miana wirusa w celu zapewnienia, że leczenie przebiega zgodnie z oczekiwaniami. Poprzez monitorowanie terapii przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay lekarze uzyskują informacje niezbędne do prowadzenia leczenia pacjentów zakażonych wirusem HBV.

ZASADY PROCEDURY

Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay łączy zautomatyzowaną izolację, amplifikację i detekcję DNA w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Próbkę krwi pełnej są zbierane do probówek z dodatkiem EDTA, ACD lub probówek PPT przeznaczonych do przygotowania osocza i/lub probówek SST przeznaczonych do przygotowania surowicy. Pierwotna (frakcjonowana) próbka krwi lub porcja osocza/surowicy w zgodnej probówce wtórnej jest oznaczana kodem kreskowym i umieszczana w systemie NeuMoDx System. System NeuMoDx System automatycznie aspiruje porcję osocza/surowicy w celu wymieszania jej z buforem NeuMoDx Lysis Buffer 1 i składnikami zawartymi na płycie NeuMoDx Extraction Plate w celu rozpoczęcia analizy. System NeuMoDx System umożliwia automatyzację i integrację izolacji i zateżania DNA, przygotowania odczynników i amplifikacji/detekcji docelowych sekwencji kwasów nukleinowych przy użyciu reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Zawarta kontrola przetwarzania próbki (Sample Process Control, SPC1) 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 DNA 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 DNA jest eluowane przy użyciu odczynnika NeuMoDx Release Reagent. System NeuMoDx System wykorzystuje eluowane DNA do uwodnienia zastrzeżonych odczynników do amplifikacji NeuDry™, które zawierają wszystkie składniki wymagane do amplifikacji sekwencji docelowych wirusa HBV i kontroli SPC1. Umożliwia to równoczesną amplifikację i detekcję sekwencji DNA docelowego patogenu i kontroli. Po rekonstytucji suchych odczynników do reakcji PCR system NeuMoDx System dozuje przygotowaną mieszaninę gotową do użycia w reakcji PCR do jednej komory do reakcji PCR (na każdą próbkę) w kasecie NeuMoDx Cartridge. W komorze do reakcji PCR zachodzi amplifikacja i detekcja sekwencji docelowych DNA patogenu (jeśli są obecne) i DNA kontroli. Kaseta NeuMoDx Cartridge zaprojektowano w taki sposób, aby po reakcji 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 odczynnikiem 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 Försterowskie rezonansowe przeniesienie energii (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 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 DNA wirusa HBV. Sonda TaqMan przeznaczona do detekcji kontroli SPC1 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 końcowy (POSITIVE (Pozytywny)/NEGATIVE (Negatywny)/INDETERMINATE (Nieokreślony)/UNRESOLVED (Nierozstrzygnięty)/NO RESULT (Brak wyniku)). 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 opakowań jednostkowych na opakowanie zbiorcze	Liczba testów na opakowanie jednostkowe	Liczba testów na opakowanie zbiorcze
201300	Pasek testowy NeuMoDx HBV Quant Test Strip <i>Suche odczynniki do reakcji PCR zawierające sondy TaqMan i startery swoiste dla wirusa HBV i kontroli SPC1</i>	6	16	96

Materiały wymagane, ale niedostarczone (oferowane oddzielnie przez firmę NeuMoDx)

NR REF.	Zawartość
100200	Płytki NeuMoDx Extraction Plate <i>Suche cząstki paramagnetyczne, enzym lityczny i kontrole przetwarzania próbek</i>
800100 lub 800102	Kalibratory NeuMoDx HBV Calibrator <i>Zestawy kalibratorów o wysokim i niskim stężeniu wirusa HBV przeznaczone do walidacji krzywej kalibracyjnej; jednorazowego użytku</i>
900101 lub 900102	Kontrole zewnętrzne NeuMoDx HBV External Control <i>Zestawy kontroli pozytywnych i negatywnych; jednorazowego użytku</i>
400400	Bufor NeuMoDx Lysis Buffer 1
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 HBV Quant Test Strip jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki *in vitro* z wykorzystaniem systemów NeuMoDx 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 przeanalizowanie kalibratorów o wysokim i niskim stężeniu z zestawu kalibratorów NeuMoDx HBV Calibrator).
- Kontrole zewnętrzne NeuMoDx HBV External Control należy analizować co 24 godziny podczas wykonywania testów przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay.
- Minimalna objętość próbki zależy od rozmiaru próbówki, nośnika próbek oraz stosowanej procedury odpowiedniej dla danej objętości próbki, zgodnie z poniższym opisem. Objętość mniejsza niż określona objętość minimalna może doprowadzić do wygenerowania błędu „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.
- Zawsze należy unikać zanieczyszczenia odczynników i materiałów eksploatacyjnych drobnoustrojami i deoksyrybonukleazą (DNaza). W przypadku używania probówek wtórnych zalecane jest stosowanie sterylnych, jednorazowych pipet transferowych wolnych od DNaz. 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 kasyety 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 HBV 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 kasyety NeuMoDx Cartridge, powierzchni paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip i płytki NeuMoDx Extraction Plate pokrytych folią uszczelniającą oraz górnej powierzchni pojemnika z buforem NeuMoDx Lysis Buffer 1; 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)⁵ i w dokumencie M29-A4 instytutu CLSI⁶.
- Usuwać nieużyte odczynniki i odpady zgodnie z przepisami federalnymi i stanowymi lub krajowymi, wojewódzkimi i lokalnymi.
- Nie używać ponownie.

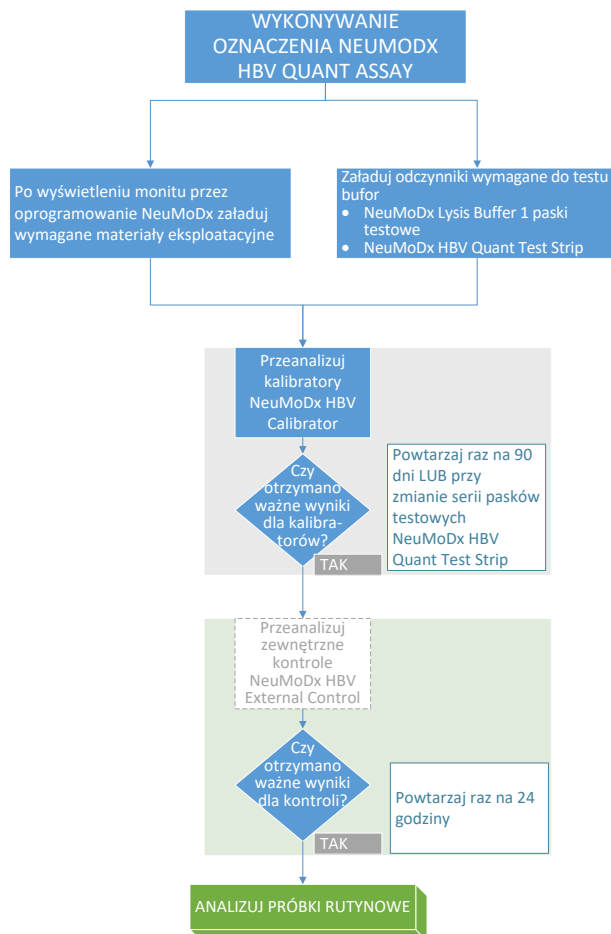
PRZECHOWYWANIE, STABILNOŚĆ I SPOSÓB POSTĘPOWANIA Z PRODUKTEM

- Paski testowe NeuMoDx HBV Quant Test Strip przechowywane w oryginalnym opakowaniu w temperaturze od 4 do 28°C zachowują stabilność do daty ważności podanej na etykiecie produktu.
- 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 HBV Quant Test Strip załadowany do systemu NeuMoDx System może być przechowywany w systemie przez 62 dni. Pozostały okres magazynowania załadowanych pasków testowych jest śledzony przez oprogramowanie i zgłaszany użytkownikowi w czasie rzeczywistym. Po upłynięciu dopuszczalnego okresu magazynowania paska testowego system wyświetlił monit o wyjęciu produktu.

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. W celu przygotowania próbek surowicy krew pełną należy zebrać do probówek SST. Postępować zgodnie z instrukcjami producenta probówek do pobierania próbek dotyczącymi przygotowania i przechowywania próbek.
5. Próbkę można testować w pierwotnych probówkach do pobierania próbek lub w probówkach wtórnych. Zalecenia dotyczące testowania próbek w probówkach pierwotnych:
 - a. Próbkę osocza: probówka BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (nr kat. BD 368589) lub probówka BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (nr kat. BD 362799).
 - b. Próbkę surowicy: probówka BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (nr kat. BD 367820) lub probówka BD Vacutainer SST™ Tube (nr kat. BD 367988).
6. Przygotowane próbki można przechowywać w systemie NeuMoDx System przez maksymalnie 8 godzin (próbki osocza) lub 24 godziny (próbki surowicy) przed ich analizą. Jeśli konieczne jest przechowywanie próbek przez dłuższy czas, zalecane jest rozdzielenie próbek na porcje wtórne i przeniesienie ich do chłodziarki lub zamrażarki.
7. Przed wykonaniem testu przygotowane próbki można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 7 dni lub przez maksymalnie 8 godzin (próbki osocza) i 24 godziny (próbki surowicy) w temperaturze pokojowej.
8. Przygotowane próbki mogą być przechowywane w temperaturze ≤-20°C przez maksymalnie 4 tygodnie (próbki surowicy) lub przez maksymalnie 6 miesięcy (próbki osocza) przed analizą; zamrożonych próbek nie należy poddawać więcej niż 2 cyklom zamrażania-rozmrażania (próbki osocza) i 4 cyklom zamrażania-rozmrażania (próbki surowicy) przed użyciem.
 - 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 24 godzin.
 - c. Zamrażanie osocza/surowicy w pierwotnych probówkach do pobierania próbek nie jest zalecane.
9. Jeśli próbki są przesyłane, należy je zapakować i oznaczyć zgodnie z obowiązującymi przepisami krajowymi i/lub międzynarodowymi.
10. Wyraźnie oznaczyć próbki i wskazać, że są one przeznaczone do testów pod kątem wirusa HBV.
11. Przejść do części *Przygotowanie do wykonania testu*.

Schemat procesu wykonywania oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay przedstawiono poniżej na Ryc. 1.



Ryc. 1: Schemat wykonywania oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay

INSTRUKCJA UŻYCIA

Przygotowanie do wykonania testu

Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay może być wykonywane bezpośrednio na próbkach w pierwotnych probówkach do pobierania krwi lub na porcjach próbek w probówkach wtórnych. Próbkę można analizować, korzystając z jednej z dwóch procedur analizy różniących się objętościami próbki — procedury dla próbek o objętości 550 μ l i procedury dla próbek o objętości 200 μ l. Nakleić etykietę z kodem kreskowym próbki na probówkę zgodną z systemem NeuMoDx System.

1. Nakleić etykietę z kodem kreskowym próbki na probówkę zgodną z systemem NeuMoDx System. Pierwotną probówkę do pobierania krwi można oznaczyć i umieścić bezpośrednio w nośniku na 32 probówki, po odwirowaniu zgodnie z instrukcjami producenta. Alternatywnie, w celu przeanalizowania próbki w systemie NeuMoDx System porcję osocza/surowicy można również przenieść do probówki wtórnej.
2. W przypadku testowania próbki w pierwotnej probówce do pobierania próbki przed załadowaniem probówki do systemu NeuMoDx System należy włożyć probówkę oznaczoną kodem kreskowym do nośnika probówek i upewnić się, że zdjęto zatyczkę probówki. Poniżej określono minimalne objętości próbek **nad** warstwą żelu/kożuskiem leukocytno-płytkowym, które zostaną uzyskane, jeśli próbki będą pobierane i analizowane zgodnie z instrukcjami producenta probówki. Nie można zagwarantować skuteczności w przypadku próbek zbieranych w nieodpowiedni sposób.

Typ próbówki	Minimalna wymagana objętość próbki	
	Procedura: 550 µl	Procedura: 200 µl
SST — 3,5 ml	1550 µl	1200 µl
PPT/SST — 5,0 ml	1800 µl	1450 µl
PPT/SST — 8,5 ml	2500 µl	2200 µl
K ₂ EDTA/Surowica — 4,0 ml	1050 µl	700 µl
K ₂ EDTA/Surowica — 6,0 ml	1250 µl	900 µl
K ₂ EDTA/Surowica — 10,0 ml	1600 µl	1250 µl

3. W przypadku korzystania z próbówki wtórnej przenieść porcję osocza/surowicy do oznaczonej kodem kreskowym próbówki zgodnej z systemem NeuMoDx System, uwzględniając poniższe wytyczne dotyczące objętości:

Nośnik próbek	Rozmiar próbówki	Minimalna wymagana objętość próbki	
		Procedura: 550 µl	Procedura: 200 µl
32-Tube Specimen Tube Carrier (Nośnik na 32 próbówki)	Średnica 11–14 mm, wysokość 60–120 mm	700 µl	400 µl
24-Tube Specimen Tube Carrier (Nośnik na 24 próbówki)	Średnica 14,5–18 mm, wysokość 60–120 mm	1100 µl	800 µl
Low Volume Specimen Tube Carrier (Nośnik na próbówki z próbkami o małej objętości)	Stożkowa próbówka mikrowirówkowa o pojemności 1,5 ml	650 µl	300 µl

Obsługa systemów NeuMoDx System

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

- Załadować zlecenie testu do systemu NeuMoDx System zgodnie z żądaną procedurą analizy odpowiednią do objętości próbki i typu próbówki:
 - Aby przetestować próbkę o objętości 550 µl, należy zdefiniować typ próbki jako „**Plasma**” (Osocze) lub „**Serum**” (Surowica)
 - Aby przetestować próbkę o objętości 200 µl, należy zdefiniować typ próbki jako „**Plasma2**” (Osocze2) lub „**Serum2**” (Surowica2)
 - Jeśli użytkownik nie zdefiniuje tych ustawień w zleceniu testu, domyślnie będzie używany typ próbki **Plasma** (Osocze) w próbówce **Secondary Tube** (Próbówka wtórna)
- Włożyć paski testowe NeuMoDx HBV Quant Test Strip do jednego lub większej liczby nośników pasków testowych systemu NeuMoDx System, a następnie załadować nośniki pasków testowych do systemu NeuMoDx System, korzystając z ekranu dotykowego.
- 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.
- 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.
- W przypadku wyświetlenia monitu przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System przeanalizować kalibratory NeuMoDx HBV Calibrator i/lub kontrole zewnętrzne NeuMoDx HBV External Control. Dalsze informacje dotyczące kalibratorów i kontroli przedstawiono w części *Analiza wyników*.
- Załadować próbówki z próbkami/kalibratorami/kontrolami do nośnika próbek i upewnić się, że zdjęto zatyczki ze wszystkich próbek.
- 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

- Pasek testowy NeuMoDx HBV Quant Test Strip może być używany wyłącznie w systemach NeuMoDx System.
- Skuteczność paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip ustalono dla próbek osocza z dodatkiem antykoagulantu w postaci EDTA/ACD oraz próbek surowicy przygotowanych w probówkach do separacji surowicy. Nie przeprowadzono oceny działania pasków testowych NeuMoDx HBV Quant Test Strip z próbkami z innych źródeł, a parametry skuteczności dla innych typów próbek nie są znane.

3. Skuteczność paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip ustalono dla testów wykonywanych przy użyciu następujących probówek pierwotnych: BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube i BD Vacutainer SST Tube.
4. Podczas wykonywania procedury dla próbek o objętości 200 µl zaobserwowano niewielki wzrost granicy wykrywalności i dolnej granicy oznaczalności oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay.
5. Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay służy wyłącznie do celów monitorowania z wykorzystaniem wyników ilościowych. Oznaczenie nie jest przeznaczone do detekcji jakościowej.
6. Oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay nie wolno wykonywać na próbkach pobranych od osób przyjmujących heparynę.
7. Z uwagi na to, że detekcja wirusa HBV zależy od ilości docelowych cząstek DNA obecnych w próbce, wiarygodność wyników zależy od prawidłowego pobrania próbki, postępowania z próbką i przechowywania próbki.
8. W przypadku wyświetlenia monitu przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System przed rozpoczęciem analizy rutynowych próbek klinicznych należy przeanalizować kalibratory NeuMoDx HBV Calibrator i kontrole zewnętrzne NeuMoDx HBV External Control, zgodnie z zaleceniami zawartymi w ulotkach dołączonych do opakowania.
9. Nieprawidłowe pobranie próbki, postępowanie z próbką, przechowywanie próbki, błąd techniczny lub pomylenie probówek może spowodować otrzymanie błędnych wyników. Jeśli ilość cząstek wirusowych w próbce jest niższa niż granica wykrywalności oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay, może dojść do wygenerowania fałszywie negatywnych wyników.
10. System NeuMoDx System może być obsługiwany wyłącznie przez personel przeszkolony z obsługi tego systemu.
11. Jeśli sekwencje docelowe wirusa HBV i kontroli SPC1 nie zostaną zamplifikowane, zostanie zgłoszony wynik nieważny (Indeterminate (Nieokreślony), No Result (Brak wyniku) lub Unresolved (Nierozstrzygnięty)) i konieczne będzie powtórzenie testu.
12. Jeśli otrzymano wynik Positive (Pozytywny) w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay, ale wartość ilościowa nie mieści się w granicach oznaczalności, system NeuMoDx System zgłosi, czy wykryta ilość wirusa HBV była *poniżej* dolnej granicy oznaczalności (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) czy *powyżej* górnej granicy oznaczalności (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
13. Jeśli wykryta ilość wirusa HBV jest *niższa* niż LLoQ, można powtórzyć oznaczenie (w razie potrzeby), używając innej porcji próbki.
14. Jeśli wykryta ilość wirusa HBV jest *wyższa* niż ULoQ, można powtórzyć oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay, używając rozcieńczonej porcji próbki pierwotnej. Zalecane jest rozcieńczenie próbki w stosunku 1:1000 osoczem negatywnym względem wirusa HBV lub rozcieńczalnikiem Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Stężenie próbki pierwotnej można obliczyć z następującego wzoru:

$$\text{stężenie próbki pierwotnej} = \log_{10}(\text{współczynnik rozcieńczenia}) + \text{zgłoszone stężenie rozcieńczonej próbki}$$
15. 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.
16. Wynik pozytywny nie musi oznaczać obecności żywotnych patogenów. Wynik pozytywny wskazuje jednak, że w próbce przypuszczalnie obecne jest DNA wirusa zapalenia wątroby typu B.
17. Delecje lub mutacje w konserwatywnych regionach, na które ukierunkowane jest oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay, mogą zakłócić detekcję lub doprowadzić do uzyskania błędnego wyniku przy użyciu paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip.
18. Wyniki otrzymane przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay należy traktować jako dane uzupełniające obserwacje kliniczne oraz inne informacje, do których ma dostęp lekarz; oznaczenie nie jest przeznaczone do rozpoznawania zakażenia.
19. 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 HBV Quant Assay, korzystając z algorytmu decyzyjnego oraz parametrów analizy wyników określonych w pliku definicji oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay (HBV ADF). Oprogramowanie może zgłosić następujące wyniki: Negative (Negatywny), Positive (Pozytywny) ze zgłoszonym stężeniem HBV, Positive (Pozytywny) powyżej ULoQ, Positive (Pozytywny) poniżej LLoQ, Indeterminate (Nieokreślony, IND), Unresolved (Nierozstrzygnięty, UNR) lub No Result (Brak wyniku, NR); są one ustalane na podstawie statusu amplifikacji sekwencji docelowej i kontroli przetwarzania próbki. Wyniki są zgłaszane na podstawie algorytmu decyzyjnego ADF, który omówiono poniżej w Tabeli 1.

Tabela 1: Omówienie algorytmu decyzyjnego dla oznaczenia HBV Quant Assay

WYNIK	Sekwencja docelowa wirusa HBV	Kontrola przetwarzania próbki (SPC1)	Interpretacja wyniku
Positive (Pozytywny) ze zgłoszonym stężeniem	Amplified (Amplifikacja) $0,9 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (procedura: 550 μl) $1,4 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (procedura: 200 μl)	Amplified (Amplifikacja) lub Not Amplified (Brak amplifikacji)	DNA wirusa HBV w zakresie ilościowym
Positive, above ULoQ (Pozytywny, powyżej ULoQ)	Amplified (Amplifikacja) $[\text{HBV}] > 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplifikacja) lub Not Amplified (Brak amplifikacji)	DNA wirusa HBV powyżej zakresu ilościowego
Positive, below LLoQ (Pozytywny, poniżej LLoQ)	Amplified (Amplifikacja) $[\text{HBV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (procedura: 550 μl) $[\text{HBV}] < 1,4 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (procedura: 200 μl)	Amplified (Amplifikacja) lub Not Amplified (Brak amplifikacji)	DNA wirusa HBV poniżej zakresu ilościowego
Negative (Negatywny)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Amplified (Amplifikacja)	Nie wykryto DNA wirusa HBV
Indeterminate (Nieokreślony)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Brak amplifikacji, wykryto błąd systemu, ukończono przetwarzanie próbki)		Wszystkie wyniki dla sekwencji docelowych były nieważne; ponownie przetestować próbkę†
No Result (Brak wyniku)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Brak amplifikacji, wykryto błąd systemu, przerwano przetwarzanie próbki)		Analiza próbki została przerwana; ponownie przetestować próbkę†
Unresolved (Nierozstrzygnięty)	Not Amplified, No System Error Detected (Brak amplifikacji, nie wykryto błędu systemu)		Wszystkie wyniki dla sekwencji docelowych były nieważne; ponownie przetestować próbkę†

*Flaga No Result (Brak wyniku) jest zgłaszana tylko w przypadku oprogramowania systemu NeuMoDx System w wersji 1.8 lub wyższej

†System NeuMoDx System wyposażono w automatyczną funkcję Rerun/Repeat (Ponów test/powtór), którą użytkownik końcowy może wybrać, aby zapewnić automatyczną ponowną analizę próbek z wynikami IND/UNR/NR w celu zminimalizowania opóźnień w raportowaniu wyników.

Obliczanie wyników testu

- W przypadku próbek, których wyniki mieszczą się w zakresie ilościowym oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay, stężenie DNA wirusa HBV w próbkach jest obliczane przy użyciu zapisanej krzywej wzorcowej, współczynnika kalibracji oraz objętości próbki.
 - Współczynnik kalibracji jest obliczany na podstawie wyników kalibratorów NeuMoDx HBV Calibrator przeanalizowanych w celu walidacji krzywej wzorcowej dla danej serii pasków testowych NeuMoDx HBV Quant Test Strip w określonym systemie NeuMoDx System.
 - Współczynnik kalibracji jest używany do ostatecznego określenia stężenia DNA wirusa HBV.
 - Podczas określania stężenia DNA wirusa HBV na ml próbki oprogramowanie NeuMoDx uwzględni objętość wejściową próbki.
- Wyniki oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay są zgłaszane jako $\log_{10} \text{ IU/ml}$.
- Otrzymane wyniki ilościowe dla próbek badanych są identyfikowane względem 4. międzynarodowego wzorca WHO dla wirusa HBV.

Kalibracja testu

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

Kalibratory

- Zestaw kalibratorów NeuMoDx HBV Calibrator należy przeanalizować z każdą nową serią pasków testowych NeuMoDx HBV Quant Test Strip, przy przesyłaniu nowego pliku definicji oznaczenia HBV Quant 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.
 - 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 $3,7 \log_{10} \text{ IU/ml}$, a dla kalibratora wysokiego $5,7 \log_{10} \text{ IU/ml}$.

- c) W celu uwzględnienia oczekiwanej zmienności między seriami pasków testowych obliczany jest współczynnik kalibracji. Współczynnik ten jest używany podczas wyznaczania końcowego stężenia wirusa HBV.
4. 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.
5. 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, zatwierzonego systemu do wykonywania testów.

Kontrole zewnętrzne

1. Pozytywne i negatywne kontrole zewnętrzne należy analizować co 24 godziny podczas wykonywania testów przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HBV 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.
2. System NeuMoDx System ocenia ważność kontroli zewnętrznych na podstawie oczekiwanego wyniku. Kontrola pozytywna powinna dać wynik pozytywny względem wirusa HBV, a kontrola negatywna wynik negatywny względem wirusa HBV.
3. 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 próbki.
 - b) Wynik Negative (Negatywny) testu zgłoszony dla pozytywnej próbki kontrolnej może wskazywać na problem związany z odczynnikami lub aparatem.
 - c) W każdym z powyższych przypadków lub w przypadku otrzymania wyniku Indeterminate (Nieokreślony, IND) lub No Result (Brak wyniku, NR) ponownie przeanalizować kontrole zewnętrzne NeuMoDx HBV External Control, używając świeżych fiolek z kontrolami, które nie przeszły testu ważności.
 - d) Jeśli dla pozytywnej kontroli zewnętrznej NeuMoDx HBV External Control ciągle zgłaszany jest wynik Negative (Negatywny), należy skontaktować się z serwisem technicznym NeuMoDx.
 - e) Jeśli dla negatywnej kontroli zewnętrznej NeuMoDx HBV External Control ciągle zgłaszany jest wynik Positive (Pozytywny), przed kontaktem z serwisem technicznym NeuMoDx należy wyeliminować wszystkie źródła potencjalnego zanieczyszczenia, w tym wymienić wszystkie odczynniki.

Kontrole przetwarzania próbki (kontrole wewnętrzne)

Egzogenna kontrola przetwarzania próbki (Sample Process Control, SPC1), zawarta na płytce NeuMoDx Extraction Plate, przechodzi cały proces izolacji kwasów nukleinowych i ich amplifikacji w reakcji PCR w czasie rzeczywistym z każdą próbką. Startery i sonda swoiste dla kontroli SPC1 są również zawarte w każdym pasku testowym NeuMoDx HBV Quant Test Strip, co umożliwia detekcję kontroli SPC1 wraz z docelowym DNA wirusa HBV (jeśli jest obecny) w multiplexowej reakcji PCR. Detekcja amplifikacji kontroli SPC1 umożliwia monitorowanie skuteczności procesów izolacji DNA i amplifikacji kwasów nukleinowych w reakcji PCR przez oprogramowanie systemu NeuMoDx System.

Wyniki nieważne

Jeśli w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanym w systemie NeuMoDx System po ukończeniu analizy próbki nie zostanie uzyskany ważny wynik, wynik zostanie zgłoszony jako Indeterminate (Nieokreślony, IND), No Result (Brak wyniku, NR) 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 DNA wirusa HBV lub kontroli SPC1 (przy braku błędów systemu), co wskazuje na prawdopodobne nieprawidłowe działanie odczynników 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.

Jeśli w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanym w systemie NeuMoDx System nie zostanie uzyskany ważny wynik, a analiza próbki zostanie przerwana przed jej ukończeniem, wynik zostanie zgłoszony jako No Result (Brak wyniku, NR). W przypadku zgłoszenia wyniku NR (Brak wyniku) zalecane jest powtórzenie testu.

PARAMETRY SKUTECZNOŚCI

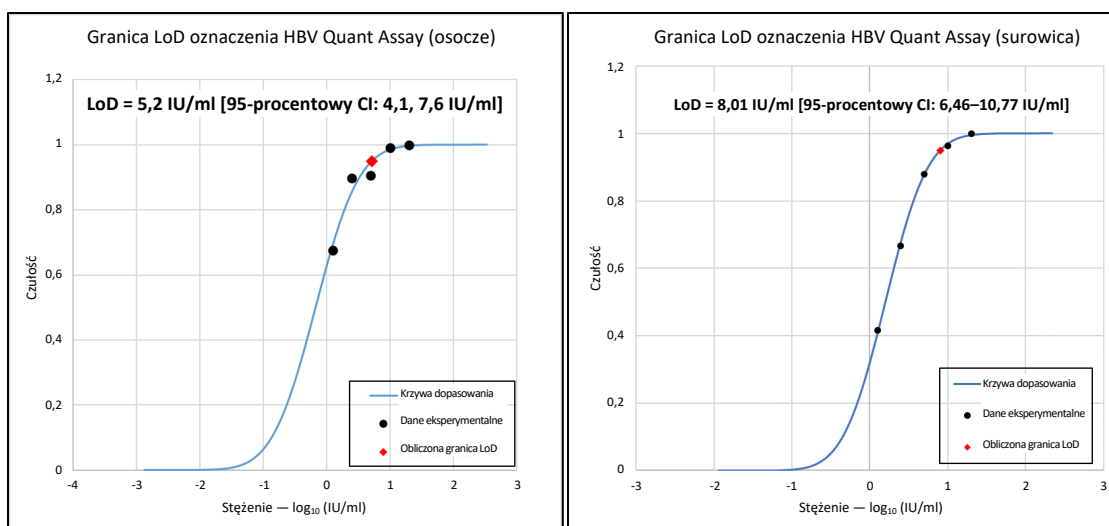
Czułość analityczna — granica wykrywalności wyznaczona przy użyciu wzorca WHO

Czułość analityczną oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay oceniono na podstawie testów próbek negatywnych i serii rozcieńczeń 4. międzynarodowego wzorca WHO w negatywnych próbkach ludzkiego osocza i ludzkiej surowicy 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 95% określoną w analizie probitowej. Badania wykonywano w ciągu 3 dni, w wielu systemach NeuMoDx System i przy użyciu wielu serii odczynników NeuMoDx. Przeprowadzono dodatkowe badanie w celu potwierdzenia wartości granicy LoD oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay podczas stosowania procedury dla próbek o objętości 200 µl. Poziomy detekcji obserwowane w obu badaniach przedstawiono w Tabeli 2.

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

	Stężenie cząstek docelowych [IU/ml]	Stężenie cząstek docelowych [\log_{10} IU/ml]	OSOCZE			SUROWICA		
			Liczba ważnych testów	Liczba wyników pozytywnych	Poziom detekcji	Liczba ważnych testów	Liczba wyników pozytywnych	Poziom detekcji
550 µl	20	1,30	108	108	100%	107	107	100%
	10	1	108	107	99%	108	104	96%
	5	0,70	108	98	91%	108	95	88%
	2,5	0,40	108	97	90%	108	72	67%
	1,25	0,10	108	73	68%	108	44	42%
	NEG	ND.	108	0	0%	107	0	0%
200 µl	25	1,40	43	43	100%	44	44	100%

Granica LoD oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay dla genotypu A wirusa HBV (4. międzynarodowy wzorzec WHO) wyznaczona dla próbek osocza wyniosła 5,2 IU/ml (95-procentowy CI: 4,1–7,6 IU/ml) [(0,72 \log_{10} IU/ml) (95-procentowy CI: 0,61–0,88 \log_{10} IU/ml)] w przypadku stosowania procedury dla próbek o objętości 550 µl (Ryc. 2). Granica LoD oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wyznaczona dla próbek surowicy wyniosła 8,0 IU/ml (95-procentowy CI: 6,5–10,8 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95-procentowy CI: 0,8–1,0 \log_{10} IU/ml)] w przypadku stosowania procedury dla próbek o objętości 550 µl (Ryc. 2).



Ryc. 2: Wykorzystanie analizy probitowej do wyznaczenia granicy LoD oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay dla osocza (po lewej) i surowicy (po prawej)

Czułość analityczna — dolna granica oznaczalności (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) wyznaczona przy użyciu wzorca WHO

Dolna granica oznaczalności (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) jest definiowana jako najniższe stężenie sekwencji docelowej, przy którym osiągnięty poziom detekcji jest >95% ORAZ wartość TAE jest ≤1,0. W celu wyznaczenia granicy LLoQ w ramach obliczeń granicy LoD dla każdego stężenia sekwencji docelowej wirusa HBV, dla której zgłoszono detekcję na poziomie >95%, obliczono całkowity błąd analityczny (Total Analytical Error, TAE). Wartość TAE jest definiowana następująco:

$$\text{TAE} = \text{błąd systematyczny} + 2 \cdot \text{SD} \text{ [statystyka Westgarda]}$$

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

Zbiórcze wyniki dla 5 stężeń wirusa HBV w próbkach wykorzystywanych podczas badania granicy LLoQ, otrzymanych przy użyciu 4. międzynarodowego wzorca WHO przedstawiono w Tabeli 3. Ustalono, że granica LLoQ dla 4. międzynarodowego wzorca WHO w osoczu, podczas analizy przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay (procedura dla próbek o objętości 550 µl) wynosi 5,5 IU/ml (0,74 log₁₀ IU/ml). Wykonano odrębne badanie w celu potwierdzenia granicy LLoQ podczas stosowania procedury dla próbek o objętości 200 µl. Wyniki tego badania wskazują, że granica LLoQ dla tej procedury wynosi 25 IU/ml, co również przedstawiono w Tabeli 3.

Wyznaczono, że granica LLoQ oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay dla próbek surowicy wynosi 6,0 IU/ml w przypadku stosowania procedury dla próbek o objętości 550 µl oraz 25 IU/ml w przypadku stosowania procedury dla próbek o małej objętości (200 µl), co przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3: Granica LLoQ wyznaczona dla oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay, z wartościami błędów systematycznego i TAE

	Stęż. sekwencji docelowej [IU/ml]	Stęż. sekwencji docelowej [log ₁₀ IU/ml]	Osocze					Surowica				
			Stęż. średnie [log ₁₀ IU/ml]	Detekcja (%)	SD	Błąd systematyczny	TAE	Stęż. średnie [log ₁₀ IU/ml]	Detekcja (%)	SD	Błąd systematyczny	TAE
550 µl	20	1,30	1,29	100	0,23	0,16	0,63	1,43	100	0,20	0,13	0,52
	10	1,00	1,07	99	0,25	0,20	0,71	1,21	96	0,24	0,21	0,69
	5	0,70	0,89	91	0,35	0,34	1,04	1,00	88	0,40	0,30	1,09
	2,5	0,40	0,75	90	0,44	0,51	1,39	0,96	67	0,44	0,56	1,46
	1,25	0,10	0,73	68	0,41	0,68	1,50	0,95	42	0,38	0,85	1,61
200 µl	25	1,40	1,61	100	0,35	0,21	0,91	1,81	100	0,18	0,41	0,78

Czułość analityczna — granice LoD i LLoQ dla różnych genotypów wirusa HBV

Granice LoD ustalono najpierw dla genotypu A (4. międzynarodowy wzorzec WHO), a następnie w oparciu o wyznaczoną granicę LoD przeprowadzono dodatkowe testy przy użyciu próbek zawierających 7 pozostałych genotypów. Trzydzieści sześć (36) powtórzeń próbek o stężeniach odpowiadających 2x, 1x i 0,5x wartości górnej granicy 95-procentowego CI granicy LoD (~7 IU/ml) przetestowano przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay. W badaniu wykorzystano próbki osocza i procedurę dla próbek o objętości 550 µl. Obliczone poziomy detekcji wyników pozytywnych dla każdego genotypu w każdym z badanych stężeń zebrano w tabeli i wykorzystano je do obliczenia granic LoD w analizie probitowej.

Obliczono również całkowity błąd analityczny przy tych badanych stężeniach. Za granicę LLoQ dla danego genotypu uznawano najniższe stężenie, przy którym współczynnik detekcji wyników pozytywnych wynosił 95%, a obliczony TAE był ≤1,0. Wyznaczono, że granica wykrywalności oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay dla różnych genotypów obecnych w próbkach osocza testowanych przy użyciu procedury dla próbek o objętości 550 µl wynosi 6,2 IU/ml (0,79 log₁₀ IU/ml), a granica LLoQ wynosi 7,6 IU/ml (0,88 log₁₀ IU/ml), co przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Genotypy wirusa HBV przetestowane w osoczu przy użyciu procedury dla próbek o objętości 550 µl

GENOTYP	LoD [IU/ml]	LLoQ [IU/ml]
Genotyp A	5,2	5,2
Genotyp B	6,2	6,2
Genotyp C	3,5	6,2
Genotyp D	5,2	5,7
Genotyp E	3,5	3,5
Genotyp F	5,1	6,2
Genotyp G	3,5	3,5
Genotyp H	5,2	7,6

W oparciu o wyniki tych badań firma NeuMoDx wyznaczyła granicę LoD i granicę LLoQ równą 25 IU/ml (1,4 log₁₀ IU/ml) dla oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego na próbkach **osocza i surowicy** przy użyciu procedury dla próbek o objętości 200 µl.

Firma NeuMoDx wyznaczyła granicę LoD i granicę LLoQ równą 8,0 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml) dla oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego na próbkach **osocza i surowicy** przy użyciu procedury dla próbek o objętości 550 µl.

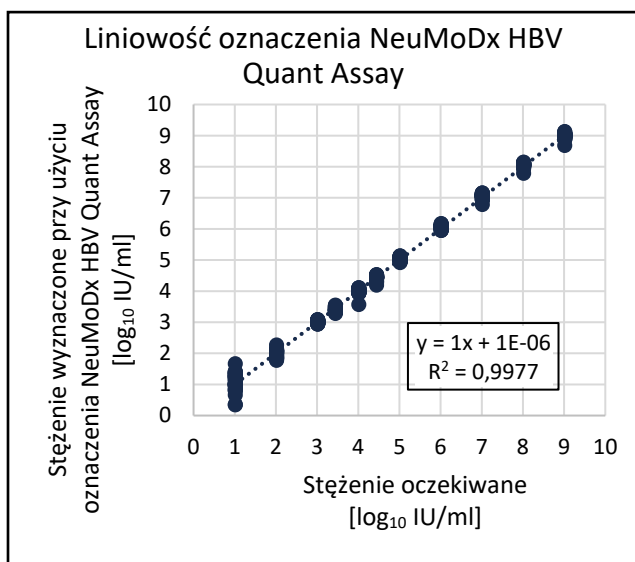
Czułość analityczna — liniowość i wyznaczenie górnej granicy oznaczalności (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Liniowość i górną granicę oznaczalności (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wyznaczono w osoczu, przygotowując szereg rozcieńczeń przy użyciu próbki klinicznej silnie pozytywnej względem wirusa HBV (Access Biologicals, Vista, CA) z ustaloną identyfikowalnością względem 4. międzynarodowego wzorca WHO. Panel testowy złożony z 11 próbek przygotowano przy użyciu zbiorczego osocza negatywnego względem wirusa HBV w taki sposób, aby objąć zakres stężeń 9,02–1,02 log₁₀ IU/ml. Każde stężenie zawarte w panelu testowym analizowano w 6 powtórzeniach w 2 systemach NeuMoDx System i przy użyciu 3 serii kluczowych odczynników. Wykazano, że oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay umożliwia ilościowe oznaczenie wirusa HBV w zakresie liniowym 8 log₁₀ (obejmującym stężenia odpowiadające krytycznym punktom podejmowania decyzji medycznych) z odchyleniem ±0,22 log₁₀ IU/ml. Nie uzyskano znaczących korzyści przy dopasowaniu metodą regresji drugiego i trzeciego rzędu. W oparciu o dane z tego badania wyznaczono, że granica ULoQ wynosi 9,02 log₁₀ IU/ml [Tabela 5 i Ryc. 3].

Tabela 5: Liniowość oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay (oceniana przy użyciu genotypu A)

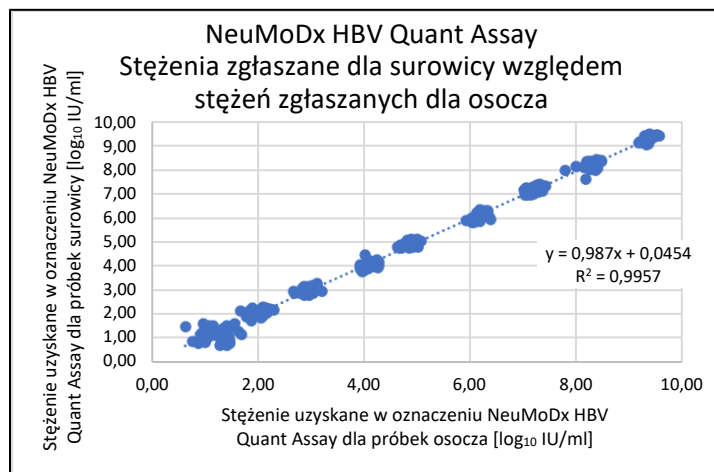
Stęż. sekwencji docelowej (IU/ml)	Stęż. sekwencji docelowej (log ₁₀ IU/ml)	Stęż. średnie (log ₁₀ IU/ml)	Odchylenie standardowe	Błąd systematyczny	Przewidywane dopasowanie liniowe	Odchylenie od dopasowania nieliniowego
1,05E+09	9,02	8,99	0,08	0,06	9,02	-0,04
1,05E+08	8,02	8,05	0,07	0,05	8,02	0,03
1,05E+07	7,02	7,05	0,07	0,06	7,02	0,04
1,05E+06*	6,02	6,05	0,05	0,05	6,02	0,03
1,05E+05	5,02	5,04	0,05	0,04	5,02	0,00
2,82E+04*	4,45	4,43	0,07	0,05	4,45	-0,01
1,05E+04	4,02	3,99	0,09	0,05	4,02	-0,02
2,82E+03*	3,45	3,41	0,07	0,06	3,45	-0,03
1,05E+03	3,02	3,00	0,04	0,04	3,02	-0,03
1,05E+02	2,02	1,99	0,11	0,09	2,02	-0,01
1,05E+01	1,02	1,09	0,29	0,23	1,02	0,06

*Stężenia bliskie punktom podejmowania decyzji medycznych



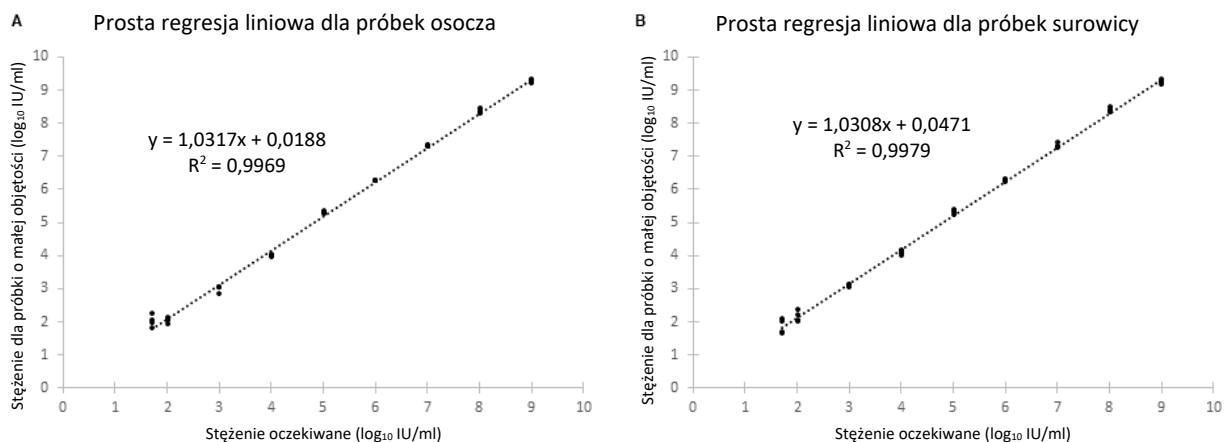
Ryc. 3: Zakres liniowy oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay w osoczu

Przeprowadzono kolejne badanie w celu wykazania równoważności macierzy próbek, a w analizie porównano wyniki ilościowe uzyskane za pomocą oznaczenia NeuMoDx HBV dla próbek przygotowanych w osoczu i surowicy przy użyciu dwóch różnych modeli dopasowanych metodą regresji, w tym narzędzia regresji w programie MS Excel i analizy Passinga-Babloka. Wyniki wykazały silną korelację reprezentowaną przez wartości nachylenia i punktu przecięcia bliskie odpowiednio 1,00 i 0,00 oraz wartość R² równą 0,99 (narzędzie regresji w programie MS Excel) lub wartość p równą 0,270 (analiza Passinga-Babloka). Stężenia wirusa HBV w oznaczeniu HBV Quant zgłaszane przez system NeuMoDx System dla macierzy próbek osocza w porównaniu z odpowiadającymi im macierzami próbek surowicy przedstawiono na Ryc. 4.



Ryc. 4: Zakres liniowy oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay między różnymi macierzami próbek

Następnie potwierdzono liniowość i granicę ULoQ dla procedury dla próbek o objętości 200 μ l w zakresie 9,31–1,71 \log_{10} IU/ml. Dokonano porównań równoważności między stężeniami zgłaszanymi przez oprogramowanie NeuMoDx w procedurach dla próbek o objętości 200 μ l i 550 μ l. W analizie regresji Deminga i Passinga-Babloka wykazano znakomitą korelację i nachylenie bliskie 1 oraz minimalne wartości punktów przecięcia (błąd systematyczny) zgłoszonych stężeń zarówno dla próbek osocza, jak i surowicy w całym zakresie liniowym. Porównanie metodą Blanda i Altmana stężenia zgłaszanego w procedurze dla próbek o objętości 200 μ l ze średnim stężeniem zgłaszanym w procedurach dla próbek o objętości 200 μ l i 550 μ l wykazało minimalny błąd systematyczny, co wskazuje na dokładność algorytmu zastosowanego do generowania wyników w procedurze dla próbek o objętości 200 μ l. Ponadto metodą prostej regresji liniowej porównano oczekiwane stężenie ze stężeniem zgłaszanym w procedurze dla próbek o objętości 200 μ l i otrzymano nachylenie bliskie 1, co wskazuje na znakomitą korelację [Ryc. 5]. Podsumowując, wyniki tych porównań wskazują dokładność oznaczenia ilościowego wirusa HBV w całym zakresie liniowym oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego przy użyciu procedury dla próbek o objętości 200 μ l.



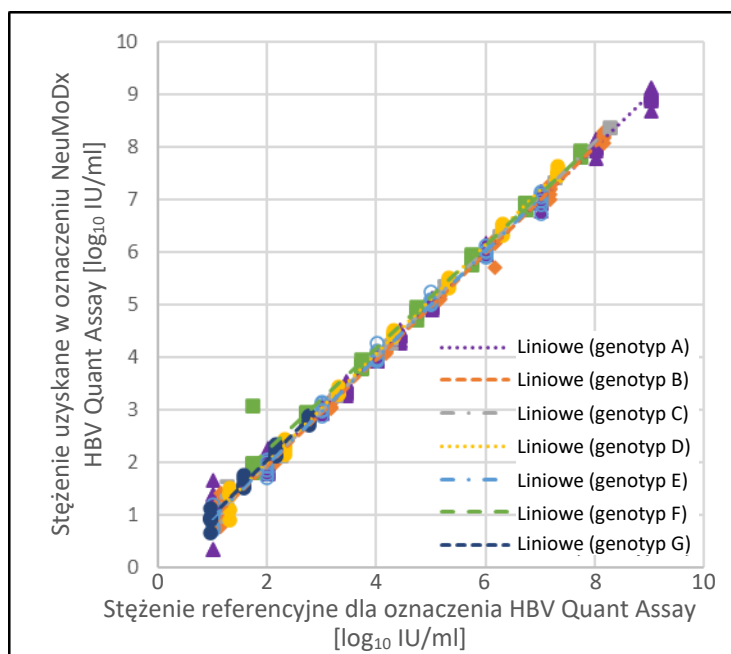
Ryc. 5: Zależność liniowa między stężeniami oczekiwanymi a stężeniami zgłaszanymi przez system NeuMoDx (procedura: 200 μ l) dla próbek a) osocza i b) surowicy

Liniowość w przypadku różnych genotypów

Liniowość oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay w próbkach osocza dla różnych genotypów wirusa HBV scharakteryzowano poprzez przetestowanie co najmniej czterech (4) różnych stężeń każdego genotypu wirusa HBV przygotowanych w zbiorczym osoczu negatywnym względem wirusa HBV. Testowane w tym badaniu stężenia sekwencji docelowych wirusa HBV były zależne od stężenia próbki źródłowej, a zatem różniły się w zależności od genotypu. W badaniu każde stężenie danego genotypu testowano w 6 powtórzeniach. Liniowość w przypadku różnych genotypów wirusa HBV przedstawiono w Tabeli 6 i na Ryc. 6.

Tabela 6: Liniowość oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay w przypadku różnych genotypów

Genotyp	Równanie liniowe y = wynik ilościowy oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay x = oczekiwany wynik ilościowy	R ²
A	$y = 1x + 1E-06$	0,9977
B	$y = 1,0129x - 0,0964$	0,9975
C	$y = 1,0250x - 0,0898$	0,998
D	$y = 1,0379x - 0,0896$	0,9975
E	$y = 1,0182x - 0,096$	0,9956
F	$y = 0,9736x + 0,276$	0,9906
G	$y = 1,0547x - 0,0835$	0,9813


Ryc. 6: Liniowość oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay w przypadku różnych genotypów

Swoistość analityczna i reaktywność krzyżowa

Swoistość analityczną udowodniono, wykonując badania przesiewowe pod kątem reaktywności krzyżowej z 32 mikroorganizmami/wirusami często obecnymi w próbkach krwi/osocza oraz gatunkami zbliżonymi filogenetycznie do wirusa HBV. Przygotowano pulę po 4 lub 6 mikroorganizmów/wirusów i testowano je w wysokich stężeniach. Przetestowane mikroorganizmy/wirusy wymieniono w Tabeli 7. Nie zaobserwowano reaktywności krzyżowej z żadnym z przetestowanych mikroorganizmów/wirusów potwierdzając swoistość analityczną oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay na poziomie 100%.

Tabela 7: Patogeny użyte do wykazania swoistości analitycznej — reaktywność krzyżowa

Adenowirus typu 2	Wirus dengi typu 1	Wirus zapalenia wątroby typu A	HPV 16	Wirus Ilheus (ILHV)	Wirus żółtej gorączki
Adenowirus typu 5	Wirus dengi typu 2	Wirus zapalenia wątroby typu C	HPV 18	Wirus grypy A	Wirus Zika
Wirus Banzi	Wirus dengi typu 3	Ludzki herpeswirus typu 6a	HSV1	Parwowirus B19	
Wirus BK	Wirus dengi typu 4	Ludzki herpeswirus typu 8	HSV 2	Wirus różyczki	
Cytomegalowirus	Wirus Epsteina-Barr	HIV 1	HTLV 1	Wirus zapalenia mózgu St. Louis	
VZV	Wirus krowianki	HIV 2	HTLV 2	Wirus Zachodniego Nilu	

Substancje zakłócające — komensale

Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay oceniono pod kątem zakłóceń spowodowanych obecnością mikroorganizmów/wirusów innych niż patogen docelowy, przy użyciu tych samych puli mikroorganizmów/wirusów, które przygotowano do badań swoistości analitycznej. Mikroorganizmy/wirusy testowano pojedynczo lub w pulach po 4–6 mikroorganizmów/wirusów w osoczu negatywnym względem wirusa HBV, do którego dodano kontrole w postaci materiału wirusa HBV w stężeniu $3,7 \log_{10}$ IU/ml. Nie zaobserwowano istotnych zakłóceń powodowanych przez komensale na co wskazują minimalne odchylenia wyników ilościowych w porównaniu do wyników otrzymanych dla próbek kontrolnych bez czynnika zakłócającego [Tabela 8].

Tabela 8: Badanie zakłóceń — komensale

Mikroorganizmy/wirusy inne niż patogen docelowy	Stęż. średnie (\log_{10} IU/ml)	Błąd systematyczny (\log_{10} IU/ml)
Grupa 1 [wirus BK, cytomegalowirus, wirus Epsteina-Barr, ludzki herpeswirus typu 6a, ludzki herpeswirus typu 8]	3,51	0,10
Grupa 2 [adenowirus 2, adenowirus typu 5, wirus dengi typu 2, wirus dengi typu 3, wirus dengi typu 4]	3,38	0,22
Grupa 3 [parwowirus B19, HTLV 1, HTLV 2, wirus Ilheus (ILHV), wirus żółtej gorączki, wirus Zika]	3,62	0,06
Grupa 4 [HPV 16, HPV 18, HSV 1, HSV 2, wirus dengi typu 1]	3,57	0,04
Grupa 5 [wirus zapalenia mózgu St. Louis, VZV, wirus krowianki, wirus Zachodniego Nilu]	3,57	0,03
HAV	3,58	0,05
Wirus Banzi	3,41	0,19
HIV-1	3,47	0,15
HIV-2	3,56	0,05
Wirus różyczki	3,16	0,44
Wirus grypy A	3,60	0,03
HCV	3,58	0,04

Substancje zakłócające — substancje endogenne i egzogenne

Skuteczność paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip oceniono w obecności typowych zakłócających substancji egzogennych i endogennych, które mogą być obecne w klinicznych próbkach osocza, badanych pod kątem wirusa HBV. Substancje te obejmowały nieprawidłowo wysokie stężenia składników moczu, a także powszechnie stosowane leki przeciwwirusowe, sklasyfikowane w *Tabeli 9*. Każdą z substancji endogennych i egzogennych wymienionych poniżej w *Tabeli 10* dodano do ludzkiego osocza ujemnego względem wirusa HBV, do którego dodano materiał wirusa HBV w stężeniu $3,7 \log_{10}$ IU/ml. Dane uzyskane dla próbek oceniono pod kątem zakłóceń. Dodatkowo pod kątem potencjalnych zakłóceń przebadano również osocze pobrane od osoby z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B.

Tabela 9: Badanie zakłóceń — czynniki egzogenne (klasyfikacja leków)

Pula	Lek	Klasyfikacja
1	Zydowudyna (ZDV)	Inhibitor odwrotnej transkryptazy
	Sakwinawir	Inhibitor proteazy wirusa HIV
	Rytonawir	Inhibitor proteazy wirusa HIV
	Klarytromycyna	Antybiotyk
	Interferon alfa-2a	Immunomodulator
	Interferon alfa-2b	Immunomodulator
2	Siarczan abakawiru	Inhibitor odwrotnej transkryptazy
	Amprenawir	Inhibitor proteazy
	Rybawiryna	Immunomodulator
	Entekawir	Lek przeciwwirusowy działający przeciwko wirusowi HBV
	Fluoksetyna	Lek antydepresyjny (SSRI)
	Chlorowodorek walacyklowiru	Lek przeciwwirusowy
3	Dizoproksyl tenofowiru	Lek przeciwwirusowy działający przeciwko wirusowi HBV/HIV
	Lamiwudyna	Lek przeciwwirusowy działający przeciwko wirusowi HBV/HIV
	Gancyklowir	Lek przeciwwirusowy działający przeciwko wirusowi CMV
	Walgancyklowir	Lek przeciwwirusowy działający przeciwko wirusowi CMV
	Newirapina	Inhibitor odwrotnej transkryptazy
4	Efawirenz	Inhibitor odwrotnej transkryptazy
	Lopinawir	Inhibitor proteazy
	Enfuwirtyd	Inhibitor fuzji wirusa HIV z komórką
	Cyprofloksacyna	Antybiotyk
	Paroksetyna	Lek antydepresyjny (SSRI)
5	Adefowir (dipiwoxyl)	Lek przeciwwirusowy
	Azytromycyna	Antybiotyk
	Siarczan indynawiru	Inhibitor proteazy wirusa HIV
	Sertralina	Lek antydepresyjny (SSRI)

Tabela 10: Badanie zakłóceń — czynniki egzogenne i endogenne

Czynnik endogenny	Stęż. średnie (log ₁₀ IU/ml)	Błąd systematyczny (log ₁₀ IU/ml)
Hemoglobina	3,50	0,20
Trójglicerydy	3,51	0,09
Bilirubina	3,56	0,13
Albumina	3,51	0,17
Czynnik egzogenny (leki)	Stęż. średnie (log ₁₀ IU/ml)	Błąd systematyczny (log ₁₀ IU/ml)
Pula 1: zydowudyna (ZDV), sakwinawir, rytonawir, klarytromycyna, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b	3,58	0,08
Pula 2: siarczan abakawiru, amprenawir, rybawiryna, entekawir, fluoksetyna, chlorowoderek walacyklowiru	3,56	0,04
Pula 3: dizoproksyl tenofowiru, lamiwudyna, gancyklowir, walgancyklowir, newirapina	3,59	0,06
Pula 4: efawirenz, lopinawir, enfuwirtdy, cyprofloksacyna, paroksetyna	3,60	0,07
Pula 5: adefowir (dipiwoxyl), azytromycyna, siarczan indynawiru, sertralina	3,56	0,19
Stan chorobowy	Stęż. średnie (log ₁₀ IU/ml)	Błąd systematyczny (log ₁₀ IU/ml)
Przeciwciała przeciwjądrowe (Antinuclear Antibody, ANA)	3,61	0,10
Toczeń rumieniowaty układowy (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,63	0,10
Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS)	3,57	0,09
Przeciwciała przeciwko wirusowi HCV	3,58	0,07
Przeciwciała przeciwko wirusowi HBV	3,64	0,11
Alkoholowa marskość wątroby	3,68	0,15
Czynnik reumatoidalny (Rheumatoid Factor, RF)	3,63	0,10
Niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	3,49	0,06

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

Precyzję paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip wyznaczono, wykonując testy panelu złożonego z 8 próbek zawierających wirusa HBV (genotypy A i C) przy użyciu trzech systemów NeuMoDx System w ciągu 12 dni. Oceniono precyzję w ramach oznaczenia, w ramach dnia i w ramach systemu; ogólne odchylenie standardowe wyniosło $\leq 0,22 \log_{10}$ IU/ml. Nie oceniano precyzji pomiędzy operatorami, gdyż operator nie odgrywa istotnej roli w analizie próbek przy użyciu systemu NeuMoDx System. Wyniki badania precyzji wewnątrzlaboratoryjnej zawiera *Tabela 11*.

Tabela 11: Wyniki badania precyzji wewnątrzlaboratoryjnej

PRÓBKA PANELU	STĘŻ. SEKWENCJI DOCELOWEJ [log ₁₀ IU/ml]	STĘŻ. ŚREDNIE [log ₁₀ IU/ml]	N	Błąd systematyczny	SD w ramach oznaczenia	SD w ramach dnia	SD w ramach systemu	SD ogólne
Genotyp A	7,75	7,89	36	0,14	0,06	0,07	0,07	0,07
	5,75	5,83	36	0,11	0,07	0,10	0,10	0,10
	3,75	3,70	36	0,11	0,11	0,13	0,15	0,15
	1,75	1,54	36	0,23	0,16	0,22	0,22	0,22
Genotyp C	6,27	6,23	36	0,10	0,08	0,09	0,10	0,10
	4,27	4,18	36	0,08	0,08	0,10	0,10	0,10
	3,27	3,14	36	0,09	0,08	0,12	0,12	0,12
	2,27	2,08	36	0,12	0,12	0,15	0,16	0,16

Odtwarzalność między seriami

Odtwarzalność między seriami paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip wyznaczono przy użyciu trzech różnych serii kluczowych odczynników — buforu NeuMoDx Lysis Buffer 1, płytki NeuMoDx Extraction Plate i pasków testowych NeuMoDx HBV Quant Test Strip. W celu oceny skuteczności wykorzystano panel złożony z 8 próbek zawierających genotypy A i C wirusa HBV. Testy wykonywano przy użyciu trzech serii odczynników w trzech systemach NeuMoDx System w ciągu 6 dni. Przeanalizowano zmienność w ramach serii oraz między seriami. Maksymalny ogólny błąd systematyczny wyniósł 0,12 log₁₀ IU/ml, a maksymalne ogólne SD wyniosło 0,24 log₁₀ 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. Wyniki badania odtwarzalności między seriami zawiera poniższa *Tabela 12*.

Tabela 12: Wyniki badania odtwarzalności między seriami

PRÓBKA PANELU	STĘŻ. SEKWENCJI DOCELOWEJ [log ₁₀ IU/ml]	STĘŻ. ŚREDNIE [log ₁₀ IU/ml]	N	Błąd systematyczny	W ramach serii: SD	Między seriami: SD	Ogółem SD
Genotyp A	8,02	7,99	36	0,03	0,15	0,09	0,17
	6,02	5,96	36	0,06	0,17	0,06	0,18
	4,02	3,90	36	0,12	0,14	0,09	0,17
	2,02	1,92	36	0,10	0,21	0,12	0,24
Genotyp C	6,27	6,32	36	0,05	0,06	0,08	0,10
	4,27	4,31	36	0,04	0,22	0,09	0,24
	3,27	3,30	36	0,03	0,20	0,07	0,21
	2,27	2,32	36	0,05	0,13	0,13	0,18

Skuteczność kontroli

Skuteczność kontroli SPC1 zawartej w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay pod względem zgłaszania niepowodzenia dowolnego kroku analizy lub informowania o inhibicji wpływającej na skuteczność oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay oceniono przy użyciu dwóch powszechnie występujących genotypów wirusa HBV (genotypy A i C). Warunki, w których wykonywano testy, były reprezentatywne dla kluczowych niepowodzeń w krokach analizy, które potencjalnie mogą wystąpić podczas analizy próbki i pozostać niewykryte przez czujniki monitorujące skuteczność systemu NeuMoDx System. Skuteczność kontroli SPC1 oceniono poprzez symulację takich warunków powodujących niepowodzenie analizy. Niewydolność procesu, która miała negatywny wpływ na wykrywanie/oznaczenie ilościowe wirusa HBV, została odzwierciedlona w skuteczności wykrywania sekwencji docelowej kontroli SPC1 (obecność inhibitora i brak etapu płukania). W przypadku warunków, które nie wpłynęły negatywnie na amplifikację kontroli SPC1, sekwencja docelowa wirusa HBV również ulegała amplifikacji, a wynik ilościowy mieścił się w zgłoszonym zakresie 0,2 log₁₀ IU/ml próbek kontrolnych.

Tabela 13: Skuteczność kontroli przetwarzania próbki

Badane warunki powodujące niepowodzenie kroków analizy	Status amplifikacji kontroli przetwarzania próbki	Status amplifikacji sekwencji docelowej wirusa HBV	Wynik oznaczenia
Presence of inhibitor (Obecność inhibitora)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Unresolved (Nierozstrzygnięty)
No Wash Delivered (Brak odczynnika płuczającego)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Not Amplified (Brak amplifikacji)	Unresolved (Nierozstrzygnięty)
No Wash Blowout (Brak usunięcia odczynnika płuczającego)	Amplified (Amplifikacja)	Amplified (Amplifikacja)	Positive (Pozytywny) z wynikiem ilościowym w zakresie 0,2 log ₁₀ IU/ml kontroli

Zanieczyszczenie krzyżowe

Częstość zanieczyszczeń krzyżowych dla oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wyznaczono poprzez testy trzech zestawów próbek wirusa HBV zawierających ułożone naprzemiennie próbki silnie pozytywne i negatywne. Łącznie przetestowano 144 powtórzenia prawidłowych ludzkich próbek osocza z EDTA negatywnych względem wirusa HBV i 144 powtórzenia próbek o wysokim mianie wirusa HBV równym 8,0 log₁₀ IU/ml. Dla wszystkich 144 powtórzeń próbki negatywnej 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 wyników otrzymanych dla próbek osocza zbieranych do probówek do pobierania próbek z dodatkiem kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) lub kwaśnego cytrynianu dekstrozy (Acid Citrate-Dextrose, ACD). Dodatkowo przeprowadzono testy w celu wykazania równoważności próbek świeżych i mrożonych. Do probówek do pobierania próbek z dodatkiem EDTA i ACD zebrano po czterdzieści próbek od indywidualnych dawców (źródło: firma BioIVT). Do świeżych próbek dodano materiał wirusa HBV (genotyp A lub C) w czterech różnych stężeniach, a otrzymane próbki przetestowano pod kątem równoważności. Następnie próbki zamrożono na co najmniej 24 godziny, rozmrożono i przetestowano ponownie. Wyniki analizy regresji wskazują na znakomitą równoważność próbek mrożonych i świeżych oraz próbek z EDTA i ACD.

Tabela 14: Wyniki badania równoważności próbek — analiza regresji

Parametr [kryterium akceptacji]	Próbki świeże a próbki mrożone	ACD a K2EDTA
Nachylenie [0,9–1,1]	1,002	0,996
Punkt przecięcia [<0,5]	-0,031	0,018
Współczynnik determinacji [$R^2 > 0,95$]	0,995	0,993

Przeprowadzono dodatkowe testy w celu wykazania równoważnej skuteczności oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego na próbkach w probówkach pierwotnych i probówkach wtórnych. Panele złożone z próbek pobranych od dawców negatywnych pod względem wirusa HBV, do których dodano sekwencje docelowe wirusa HBV (AccuPlex™ HBV Control), analizowano najpierw w probówkach pierwotnych. Pozostałe osocze reprezentatywne dla każdej próbki rozdzielono na porcje do probówek wtórnych i przeanalizowano ponownie. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wynikach zgłaszanych dla próbek w probówkach pierwotnych i wtórnych.

Przeprowadzono również ocenę równoważności skuteczności oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego na świeżych i mrożonych próbkach surowicy. Do badania wykorzystano panel złożony ze świeżych próbek surowicy pobranych od indywidualnych dawców. Do próbek dodano materiał wirusa HBV w takich stężeniach, aby objąć zakres liniowy oznaczenia. Po przeanalizowaniu świeżych próbek surowicy próbki zamrożono na co najmniej 24 godziny w temperaturze -20°C . Po upływie tego czasu próbki rozmrożono i przetestowano ponownie. Równoważność liniową między identycznymi próbkami świeżymi i mrożonymi oceniono, wykonując analizę regresji Passinga-Babloka i Deminga. Wartość p regresji Passinga-Babloka była równa 0,329 (większa niż 0,05), a współczynnik korelacji regresji Deminga był równy 0,989, co wskazuje na znakomitą równoważność analizy próbek świeżych i mrożonych. Błąd systematyczny między próbkami w stanie świeżym i mrożonym obliczono metodą Blanda-Altmana i otrzymano wartość pomijalną, $-0,002 \log_{10}$ IU/ml, co dodatkowo potwierdza równoważność analizy próbek świeżych i mrożonych. Dodatkowo dla próbek świeżych i mrożonych wyznaczono korelację między stężeniami materiału wirusa HBV zgłaszanymi przez system i stężeniami oczekiwanymi metodą prostej regresji liniowej i otrzymano wartości R^2 odpowiednio 0,991 i 0,985.

Stabilność próbek

Do próbek osocza i surowicy z dodatkiem EDTA negatywnych względem wirusa HBV dodano materiał wirusa HBV w stężeniu $3,7 \log_{10}$ IU/ml. Próbkę przechowywano w systemie NeuMoDx System i badano w różnych punktach czasowych — tuż po przygotowaniu próbek (T0) oraz po 4 godzinach, 8 godzinach i 24 godzinach przechowywania. Nie zaobserwowano istotnych różnic w skuteczności oznaczenia wykonywanego w różnych punktach czasowych, co wskazuje na to, że próbkę można przechowywać w systemie NeuMoDx System do 24 godzin.

Wykonano również podobne badanie: próbki osocza i surowicy przechowywano w chłodziarce laboratoryjnej (temperatura od 2 do 8°C) przez maksymalnie 7 dni przed wykonaniem testu. Nie zaobserwowano istotnych różnic w skuteczności oznaczenia.

W ramach ostatniego badania stabilności próbki przechowywano w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 6 miesięcy (osocze) i maksymalnie 4 miesiące (surowica) przed wykonaniem testu. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wynikach względem wyników uzyskanych dla próbek świeżych. Wykonano dodatkowe cykle zamrażania-rozmrażania i ponownie przetestowano próbki. Nie zaobserwowano żadnej zmiany w skuteczności oznaczenia po 2 cyklach zamrażania-rozmrażania (osocze) lub 4 cyklach zamrażania-rozmrażania (surowica).

Korelacja metod

Próbki osocza

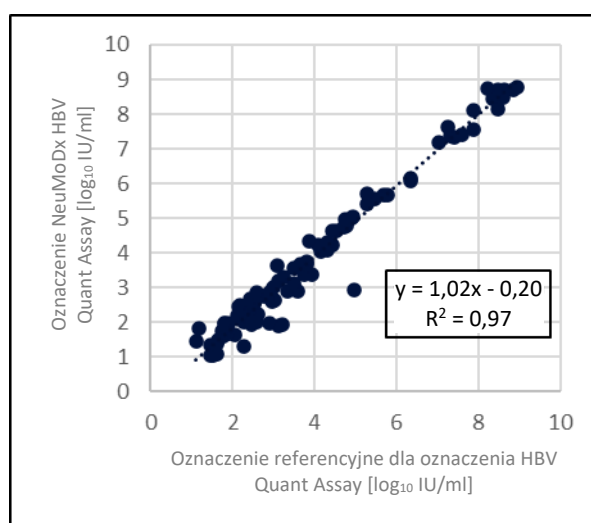
Skuteczność jakościową i ilościową oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay oceniono względem oznaczeń porównawczych zatwierdzonych przez agencję FDA/posiadających znak CE. Testy wykonywano na nierozcieńczonych klinicznych próbkach osocza pobranych od pacjentów zakażonych wirusem HBV. Testy przeprowadzono wewnątrz, w firmie NeuMoDx, w ramach pojedynczo zaślepionego badania przy użyciu próbek klinicznych otrzymanych z trzech zewnętrznych laboratoriów referencyjnych. Wyniki uzyskane dla (łącznie) 308 próbek pozytywnych i negatywnych względem wirusa HBV zebrano do analizy jakościowej w celu obliczenia czułości i swoistości klinicznej oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay. Analizę jakościową wykonano, uwzględniając i wykluczając próbki pozytywne poniżej granicy LLoQ, gdyż klasyfikacja takich próbek o niskim stężeniu może różnić się w zależności od testu. W celu zdefiniowania skuteczności ilościowej do wyznaczenia regresji liniowej wykorzystano łącznie 97 klinicznych próbek pozytywnych względem wirusa HBV, których wyniki mieściły się w zakresie liniowym obu testów. Wykazano, że oznaczenie wykonywane przy użyciu paska testowego NeuMoDx HBV Quant Test Strip nie tylko charakteryzuje się znakomitą czułością i swoistością, ale także umożliwia uzyskanie wyników ilościowych, które bardzo dobrze korelują z wynikami oznaczenia porównawczego. W oparciu o te wyniki oszacowano, że oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay charakteryzuje się czułością na poziomie 100% (CI: 96,4%–100%) i swoistością na poziomie 95,6% (CI: 91,9%–97,7%). Te 95-procentowe przedziały ufności obliczono przy użyciu metody oceny 95-procentowych przedziałów ufności zgodnie z wytyczną EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance, Approved Guideline, Vol 28, No 3^o.

Tabela 15: Miary czułości i swoistości klinicznej oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego na próbkach osocza w systemie NeuMoDx 288 Molecular System

	Oznaczenie porównawcze (POZ)	Oznaczenie porównawcze (NEG)	ŁĄCZNIE
Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ)	103	9	112
Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
ŁĄCZNIE	103	205	308
CZUŁOŚĆ = 100%; 95-procentowy CI (96,4–100%) SWOISTOŚĆ = 95,6%; 95-procentowy CI (91,9–97,7%)			

Tabela 16: Miary czułości i swoistości klinicznej oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego w systemie NeuMoDx 288 Molecular System; wykluczono wyniki dla próbek osocza <LLOQ

	Oznaczenie porównawcze (POZ)	Oznaczenie porównawcze (NEG)	ŁĄCZNIE
Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ)	99	5	104
Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
ŁĄCZNIE	99	201	300
CZUŁOŚĆ = 100%; 95-procentowy CI (96,3–100%) SWOISTOŚĆ = 97,5%; 95-procentowy CI (94,3–98,9%)			



Ryc. 7: Badanie korelacji wyników uzyskanych za pomocą metod ilościowych wykonywane przy użyciu oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay

Przeprowadzono dodatkowe testy w systemie NeuMoDx 96 Molecular System przy użyciu pozostałych objętości 159 klinicznych próbek osocza. Podobnie jak w przypadku poprzednich testów wykonywanych w systemie NeuMoDx 288 System, wyniki uzyskane przy użyciu systemu NeuMoDx 96 System porównano z wynikami oznaczeń porównawczych zatwierdzonych przez agencję FDA/posiadających znak CE, które są wykonywane w laboratoriach źródłowych w ramach standardu opieki. Wyniki przedstawione w formie tablicy prawdy wraz z czułością i swoistością kliniczną z 95-procentowym CI zawiera *Tabela 17*.

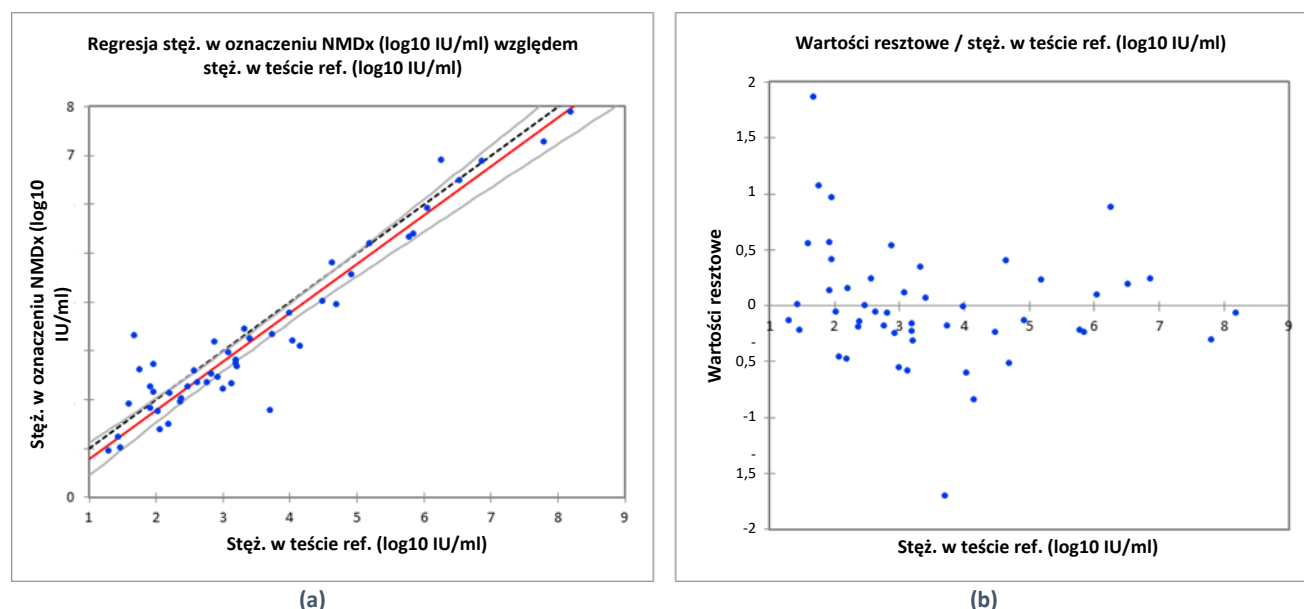
Tabela 17: Podsumowanie skuteczności klinicznej — oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywane w systemie NeuMoDx 96 Molecular System

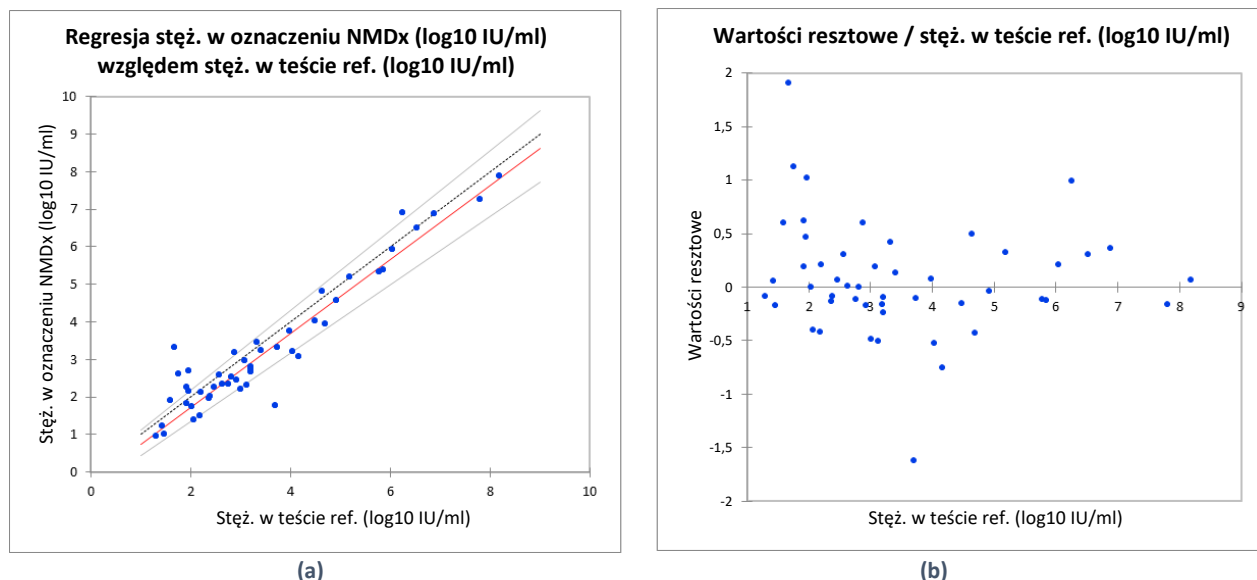
	Oznaczenie porównawcze (POZ)	Oznaczenie porównawcze (NEG)	ŁĄCZNIE
Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ)	60	2	62
Oznaczenie NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	1	95	96
ŁĄCZNIE	61	97	158
CZUŁOŚĆ = 98%; 95-procentowy CI (90–100%) SWOISTOŚĆ = 98%; 95-procentowy CI (92–100%)			

Próbki surowicy

Skuteczność ilościową oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay oceniono względem oznaczeń porównawczych zatwierdzonych przez agencję FDA/posiadających znak CE. Testy wykonywano przy użyciu pozostałych objętości klinicznych próbek surowicy pozytywnych względem wirusa HBV pobranych od pacjentów zakażonych wirusem HBV. Oznaczenia identyfikujące poszczególne próbki zostały usunięte. Łącznie za pomocą oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay przetestowano 66 klinicznych próbek surowicy o znanym wyniku pozytywnym względem wirusa HBV otrzymanych od dwóch niezależnych laboratoriów referencyjnych. Testy przeprowadzono wewnątrz, w firmie NeuMoDx. Spośród wszystkich klinicznych próbek surowicy o znanym wyniku pozytywnym dla 58 próbek otrzymano wyniki pozytywne, z których dziewięć (9) było poniżej granicy LLoQ i powyżej granicy ULoQ oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay i/lub testu referencyjnego. W celu zdefiniowania skuteczności ilościowej do analizy regresji wykorzystano łącznie 49 klinicznych próbek pozytywnych względem wirusa HBV, których wyniki mieściły się w zakresie liniowym obu testów.

W celu wykazania korelacji między wartościami stężeń zgłoszonymi w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay a wartościami zgłoszonymi w teście referencyjnym dla wszystkich badanych próbek wygenerowano wykresy równoważności i wartości resztowych, wykonując analizę regresji Deminga i Passinga-Babloka. Wykresy przedstawiono na Ryc. 8 i 9. Jakość dopasowania metodą regresji Deminga jest obrazowana przez współczynnik nachylenia równy 0,99 z 95-procentowym CI (0,93; 1,07) i punkt przecięcia (błąd systematyczny) równy -0,22 z 95-procentowym CI (-0,56; 0,12), co wskazuje na wysoką korelację wartości stężeń uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay i w testach referencyjnych przy akceptowalnym błędzie systematycznym. Jakość dopasowania liniowego metodą Passinga-Babloka jest obrazowana przez współczynnik nachylenia równy 0,99 z 95-procentowym CI (0,91; 1,06) i punkt przecięcia (błąd systematyczny) równy -0,25 z 95-procentowym CI (-0,48; 0,06), co wskazuje na wysoką korelację wartości stężeń uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay i w testach referencyjnych przy akceptowalnym błędzie systematycznym, patrz *Tabela 18*.


Ryc. 8: Wykres równoważności (a) i wykres wartości resztowych (b) — analiza zbiorcza wyników uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HBV w porównaniu z wynikami uzyskanymi w testach referencyjnych — analiza Deminga



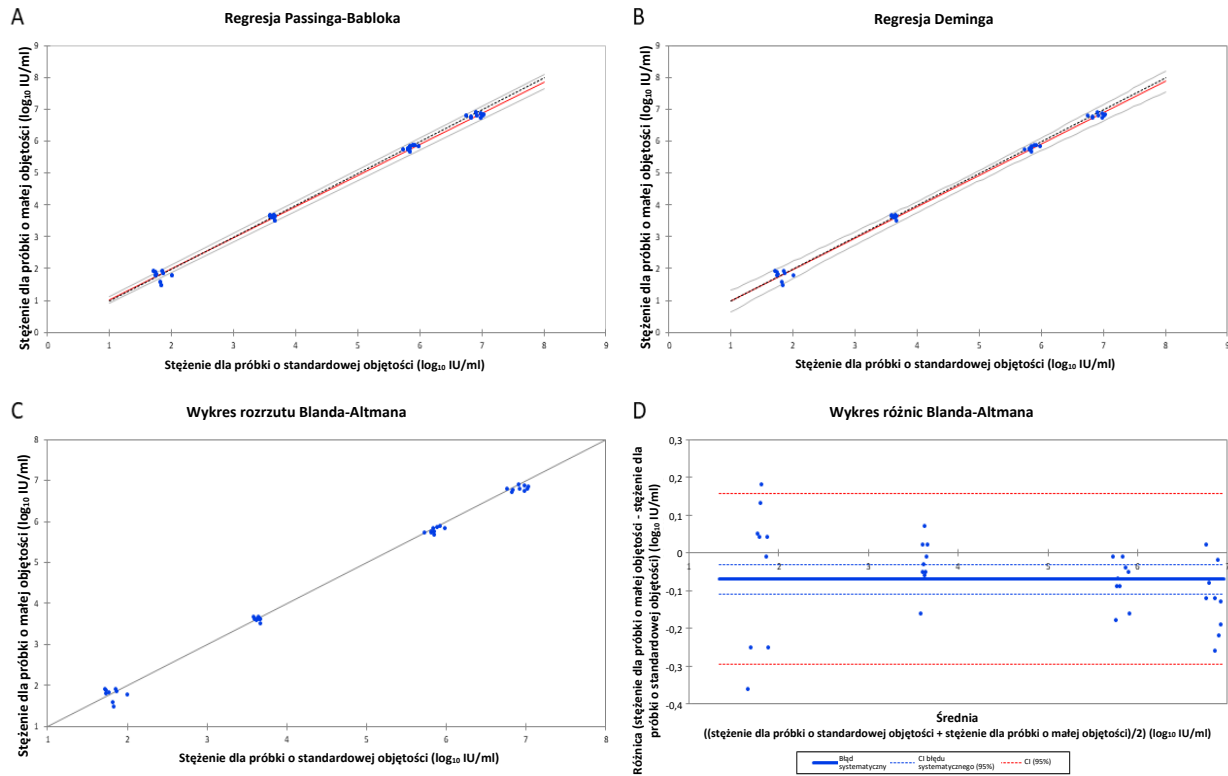
Ryc. 9: Wykres równoważności (a) i wykres wartości resztowych (b) — analiza zbiorcza wyników uzyskanych w oznaczeniu NeuMoDx HBV Quant Assay w porównaniu z wynikami uzyskanymi w testach referencyjnych — analiza Passinga-Babloka

Tabela 18. Podsumowanie analizy metodą liniowej regresji Deminga i Passinga-Babloka dla próbek surowicy

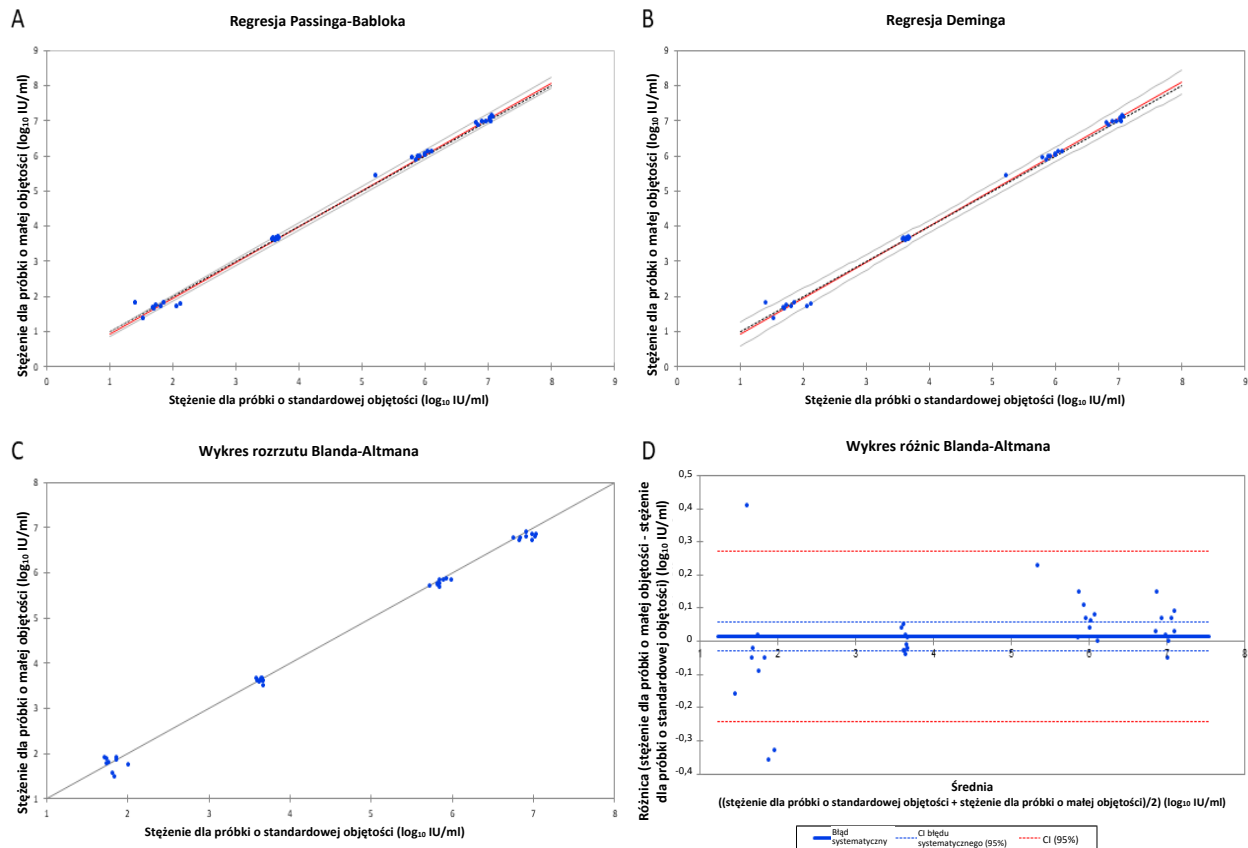
Analiza metodą Deminga			Analiza metodą Passinga-Babloka		
Punkt przecięcia	Współczynnik nachylenia	R2	Punkt przecięcia	Współczynnik nachylenia	Wartość p
-0,22 95-procentowy CI (-0,56; 0,12)	0,99 95-procentowy CI (0,93; 1,07)	0,95	-0,25 95-procentowy CI (-0,48; 0,06)	0,99 95-procentowy CI (0,91; 1,06)	0,89

Wykonywanie testów na otrzymanych sztucznie próbkach — procedura dla próbek o objętości 200 µl

Korelację wyników ilościowych między procedurą dla próbek o objętości 200 µl i procedurą dla próbek o objętości 550 µl potwierdzono przy użyciu panelu złożonego z odrębnych próbek osocza i surowicy negatywnych względem wirusa HBV, do których dodano materiał kontrolny wirusa HBV w czterech znanych stężeniach. Materiał ten jest identyfikowalny względem 4. międzynarodowego wzorca WHO dla DNA wirusa HBV do testów opartych na kwasach nukleinowych. Te odrębne próbki osocza i surowicy analizowano przy użyciu procedur dla próbek o objętości 550 µl i 200 µl. Wykonano łącznie 288 testów. Porównania równoważności między stężeniami zgłaszanymi dla utworzonych sztucznie próbek zawartych w panelu przez oprogramowanie NeuMoDx w procedurach dla próbek o objętości 200 µl i 550 µl przeprowadzono dla poszczególnych próbek. W analizie regresji Deminga i Passinga-Babloka otrzymano wartości nachylenia 0,985 i 0,998 z punktami przecięcia -0,001 i 0,053 dla osocza oraz 1,024 i 1,018 z punktami przecięcia 0,095 i 0,070 dla surowicy, wykazując znakomitą zgodność oznaczenia ilościowego wirusa HBV między dwoma procedurami różniącymi się objętością próbek. Porównanie metodą Blanda i Altmana wykazało minimalny błąd systematyczny między tymi dwoma procedurami. Ponadto w prostych analizach regresji liniowej stężeń oczekiwanych i stężeń zgłaszanych dla procedury 200 µl otrzymano wartość nachylenia 1,047 i współczynnik korelacji 0,998 (osocze) oraz 1,113 i 0,992 (surowica), co dodatkowo potwierdza znakomitą skuteczność oznaczenia NeuMoDx HBV Quant Assay wykonywanego przy użyciu procedury dla próbek o objętości 200 µl. Wyniki tych badań podsumowano poniżej na Ryc. 10 i Ryc. 11.



Ryc. 10: Porównanie wykresów równoważności stężeń zgłoszonych w procedurze dla próbek o małej objętości i stężeń zgłoszonych w procedurze dla próbek o standardowej objętości. A) Regresja Passinga-Babloka. B) Regresja Deminga. C) Wykres rozrzutu Blanda-Altmana D) Wykres różnic Blanda-Altmana — próbki osocza



Ryc. 11: Porównanie wykresów równoważności stężeń zgłoszonych w procedurze dla próbek o małej objętości i stężeń zgłoszonych w procedurze dla próbek o standardowej objętości. A) Regresja Passinga-Babloka. B) Regresja Deminga. C) Wykres rozrzutu Blanda-Altmana D) Wykres różnic Blanda-Altmana — próbki surowicy

LITERATURA














1. Mother-to-child transmission of hepatitis B virus in sub-Saharan Africa: time to act. Andersson, Monique I et al. The Lancet Global Health, Volume 3, Issue 7, e358 - e359
2. Schillie S, Vellozzi C, Reingold A, et al. Prevention of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. MMWR Recomm Rep 2018;67(No. RR-1):1–31. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6701a1>.
3. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet. April 2017. <http://www.who.int> (last accessed 20 November 2017)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
5. 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.

ZNAKI TOWAROWE

NeuMoDx™ jest znakiem towarowym firmy NeuMoDx Molecular, Inc.
 NeuDry™ jest znakiem towarowym firmy NeuMoDx Molecular, Inc.
 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.

LEGENDA SYMBOLI

R only	Wyłącznie na receptę		Zakres temperatur
	Producent		Nie używać ponownie
	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>		Zawiera materiały wystarczające do przeprowadzenia <n> testów
	Upoważniony przedstawiciel na terytorium Unii Europejskiej		Zapoznać się z instrukcją użycia
	Numer katalogowy		Przeostroga
	Kod partii		Zagrożenie biologiczne
	Data ważności		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

 2797

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

Patent: www.neumodx.com/patents