

REF 300300 NeuMoDx™ HCV Quant Test Strip
R only

ETTEVAATUST. Ainult USA ekspordiks

IVD Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas koos seadmetega NeuMoDx 288 ja NeuMoDx 96 Molecular System

 Värskenduste sisestamiseks minge aadressile: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Üksikasjalike juhiste saamiseks lugege seadme NeuMoDx 288 Molecular System käsiraamatut; tootekood 40600108

Üksikasjalike juhiste saamiseks lugege seadme NeuMoDx 96 Molecular System käsiraamatut; tootekood 40600317

SIHTOTSTARVE

Analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay on automatiseeritud, *in vitro* nukleiinhappe amplifitseerimise analüüs C-hepatiidi viiruse (Hepatitis C Virus, HCV) RNA kvantifitseerimiseks inimese plasma ja seerumi proovides HCV antikeha positiivsete genotüüpidega 1 kuni 6 HCV-infektsiooniga isikutel. Kasutatuna seadmel NeuMoDx 288 Molecular System või NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System(s)) võimaldab analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay automatiseeritud RNA ekstraheerimist proovidest sihtnukleiinhappe isoleerimiseks ja reaallaja pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsiooni (RT-PCR) abil C-hepatiidi viiruse genoomis olevate väga kõrgelt konserveerunud sihtmärkjärjestuste amplifitseerimist.

Analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay on mõeldud kasutamiseks HCV-infektsiooniga patsientide ravi jälgimise abivahendina. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemusi tuleb tõlgendada kõigi asjakohaste kliiniliste ja laboratoorsete leidude kontekstis. Analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay ei ole ette nähtud kasutamiseks vere või veretoodete skriinimise ega HCV infektsiooni kliinilise seisundi diagnoosimise vahendina.

KOKKUVÕTE JA SELGITUSED

Plasmaproovide ettevalmistamiseks võib kasutada inimese täisverd, mis on kogutud steriilsetesse vere kogumise katsutitesse, milles on antikoagulandina kas etüleendiamiintetraäädikhape (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) või happeline tsitraatdekstroos (Acid Citrate-Dextrose, ACD), või plasma ettevalmistamise katsutitesse (Plasma Preparation Tubes, PPT), samas kui seerum tuleb koguda seerumi kogumise või eraldamise katsutitesse (Serum Separator Tubes, SST). Testimiseks ettevalmistamiseks laaditakse seadmega NeuMoDx System ühilduvas sekundaarses proovikatsutis olev plasma või seerum või esmases proovikatsutis olev verefraktsioon seadmesse NeuMoDx System selleks ettenähtud proovikatsuti kandja abil. Kõikide proovide korral segatakse omavahel plasma-/seerumiproovi alikvoot ja lüüsimispuhver NeuMoDx Lysis Buffer 3 ning seade NeuMoDx System teeb automaatselt kõik vajalikud etapid sihtnukleiinhappe ekstraheerimiseks, isoleeritud RNA reaallaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) ettevalmistamiseks ning sihtmärgi olemasolu korral amplifitseerib ja tuvastab amplifikatsiooniproduktid. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay sihtmärgid asuvad kahes kõrgelt konserveerunud HCV genoomipiirkonnas, mis on vajalik analüüsi stabiilsuse suurendamiseks. Analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay sisaldab ka RNA proovi töötlemise kontrolli (Sample Process Control, SPC2), et aidata jälgida nii võimalike inhibeervate ainete olemasolu kui ka süsteemi NeuMoDx System või reaktiivi tõrgete esinemist, mis võivad ekstraheerimise ja amplifitseerimisprotsessi käigus tekkida.

HCV on üksikahelaline, positiivse ahelaga RNA viirus, mis võib põhjustab nii akuutset kui ka kroonilist infektsiooni.¹ C-hepatiidi vaktsiini praegu pole. Kuigi akuutne infektsioon on tavaliselt asümptomaatiline ja on väga harva seotud eluohtliku haiguse tekkega, võib enam kui pooltel HCV infektsiooniga isikutel kujuneda välja krooniline infektsioon. Kroonilise HCV infektsiooniga isikutel on maksatsirroosi tekkerisk ligikaudu 15–30% 20 aasta jooksul. Maailmas kahtlustatakse ligikaudu 71 miljonil inimesel kroonilise HCV infektsiooni esinemist ja suurel osal nakatunutest võib välja kujuneda maksatsirroos või maksavähk.^{2–4} Kuna HCV on vere kaudu leviv viirus, siis toimub viiruse ülekannet peamiselt nakatunud vere või veretoodete kaudu. Vere skriinimistestide rohke kasutamine on märkimisväärselt vähendanud doonorverega üle kantud infektsioonide hulka.¹

HCV antikehade tuvastamine ei erista aktiivse ja juba taandunud infektsiooni esinemist. Seetõttu on C-hepatiidi diagnostika algoritmide järgi vajalik C-hepatiidi viiruse antikehadega isikutel teha kindlaks aktiivse HCV infektsiooni esinemine HCV RNA tuvastamise kaudu plasmas või seerumis enne ravi alustamist (vajaduse korral). C-hepatiidi ravi määramiseks ja selle jälgimiseks kasutatakse praegu rutiinselt HCV RNA kvantifitseerimist (viiruskoormuse jälgimiseks).

Kehtiva C-hepatiidi käsitluse ja ravi juhiste järgi on soovitatav enne viirusvastase ravi alustamist teha kvantitatiivsed HCV RNA testid viiruskoormuse alusjoone määramiseks ning seejärel seda korrata 12 nädala pärast või hiljem, pärast ravi lõppu. Mõnel juhul on soovitatav lisada täiendavaid analüüsime ajapunkte. C-hepatiidi ravi eesmärk on püsiv viroloogiline ravivastus (sustained viral response, SVR) ja see on määratletud kui HCV RNA tuvastamise puudumine (kasutades analüüsi, mille avastamispiir on < 25 IU/ml) pärast ravi lõpetamist.^{5–7} Hiljutised Ameerika maksauuringute assotsiatsiooni (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) juhised soovivad HCV RNA olemasolu testida mitte üksnes ravi alguses, vaid ka perioodiliselt ravi jooksul (nt 4. nädalal) ja 12 nädalat pärast ravi lõpetamist. Aktiivse HCV infektsiooni diagnostikas kasutatakse HCV RNA tuvastamise teste kombinatsioonis seroloogiliste uuringutega.⁶

PROTSEDUURI PÕHIMÕTTED

Analüüsis NeuMoDx HCV Quant Assay on ühendatud automatiseeritud RNA ekstraheerimine, amplifitseerimine ja tuvastamise reaallaja RT-PCR-i abil. Täisvere proovid kogutakse plasma ettevalmistamiseks EDTA-, ACD- või PPT-katsutitesse ja/või seerumi ettevalmistamiseks SST katsutitesse. Primaarne vereproov (verefraktsioon) või ühilduvas sekundaarses proovikatsutis plasma-/seerumialikvoot märgistatakse vöötкодiga ja pannakse seadmesse NeuMoDx System. Töötlemise alustamiseks aspireerib seade NeuMoDx System automaatselt plasma-/seerumialikvoodi, et segada see lüüsimispuhvriga NeuMoDx Lysis Buffer 3 ja ekstraheerimisplaadil NeuMoDx Extraction Plate sisalduvate reaktiividega. Seade NeuMoDx System automatiseerib ja integreerib RNA ekstraheerimise ja kontsentreerimise, reaktiivide ettevalmistamise ning nukleiinhappe amplifitseerimise ja sihtjärjestuste tuvastamise reaallaja RT-PCR-i abil. Komplekti kuuluv proovi töötlemise kontroll (Sample Process Control, SPC2) aitab jälgida inhibeervate ainete esinemist ja süsteemi, protsessi või reaktiivi tõrkeid. Kui proov on laaditud seadmesse NeuMoDx System, pole kasutaja sekkumine vajalik.

Seade NeuMoDx System kasutab lüüsimise, RNA ekstraheerimise ja inhibiitorite eemaldamise automaatseks teostamiseks kuumutamise, lüütilise ensüümi ja ekstraheerimisreaktiivide kombinatsiooni. Vabanenud nukleiinhapped püütakse kinni paramagnetiliste osakeste abil. Need osakesed,

mis on seondunud nukleiinhapetega, laaditakse kassetti NeuMoDx Cartridge, kus mitteseondunud elemendid pestakse minema pesemisreaktiiviga NeuMoDx Wash Reagent. Seejärel elueeritakse seondunud RNA vabastusreaktiivi NeuMoDx Release Reagent abil. Seade The NeuMoDx System kasutab elueeritud RNA-d, et reühdreerida patenditud NeuDry™ amplifikatsioonireaktiivid, mis sisaldavad kõiki HCV ja SPC2 sihtmärkide amplifitseerimiseks vajalikke elemente. See võimaldab nii siht- kui ka kontroll-RNA järjestuste samaaegset amplifikatsiooni ja tuvastamist. Pärast kuivanud RT-PCR-i reaktiivide taastamist jaotab seade NeuMoDx System ettevalmistatud RT-PCR-iks valmis segu kasseti NeuMoDx Cartridge ühte PCR-i kambrisse (proovi kohta). Kontroll- ja sihtjärjestuste (kui on olemas) pöördtranskriptsioon, amplifitseerimine ja tuvastamine toimub PCR-i kambris. NeuMoDx Cartridge on loodud sisaldama PCR-i järgselt amplikoni, mis põhimõtteliselt kõrvaldab amplifitseerimisjärgse saastumise riski.

Võimendatud sihtmärgid tuvastatakse reaajajas hüdrolüüsionide keemia abil (tavaliselt nimetatakse seda TaqMan®-i keemiaks), kasutades fluorogeensete oligonukleotiidide sondimolekule, mis on spetsiifilised amplikonidele nende vastavate sihtmärkide jaoks. Sondid TaqMan koosnevad fluorofoorist, mis on kovalentselt seotud oligonukleotiidi sondi 5'-otsaga, ja kustutist 3'-otsas. Kui sond on intaktne, on fluorofoor ja kustuti läheduses, mis võimaldab kustuti-molekulil supresseerida fluorestsentsi, mille fluorofoor eraldab Försteri resonantsenergia ülekande (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) kaudu.

TaqMan sondid on sellise kujundusega, et need tugevnevad praimerite kindla komplektiga võimendatud DNA piirkonnas. Kui Taq DNA polümeraas pikendab praimerit ja sünteesib uue ahela, siis Taq DNA polümeraasi 5' kuni 3' eksonukleaasi aktiivsus lagundab matriitsiga kokkusulanud sondi. Sondide lagundamine vabastab fluorofoori ja katkestab läheduse kustutiga, vältides sellega FRET-ist tulenevat kustutusmõju ja võimaldades fluorofoori tuvastada. Tulemuseks saadav fluorestsentsisignaal, mille tuvastab seadme NeuMoDx System kvantitatiivne RT-PCR termotsükler on otseselt proportsionaalne vabastatud fluorofooriga ja seda saab viia korrelatsiooni olemasoleva sihtmärgi kogusega.

TaqMan-i sondi, mis on märgistatud fluorofooriga (stimuleerimine: lainepikkusel 490 nm ja kiirgus: lainepikkusel 521 nm) 5'-otsas ja tumedat kustutit 3'-otsas kasutatakse HCV RNA tuvastamiseks. SPC2 tuvastamiseks märgistatakse TaqMan-i sond alternatiivse fluorestsentsvärviga (stimuleerimine: lainepikkusel 535 nm ja kiirgus: lainepikkusel 556) 5'-otsas ja kasutatakse tumedat kustutit 3'-otsas. Seadme NeuMoDx System tarkvara jälgib iga amplifitseerimistsükli lõpus TaqMani sondide poolt emiteeritud fluorestsentsisignaali. Kui amplifikatsioon on lõpule jõudnud, analüüsib seadme NeuMoDx System tarkvara andmeid ja esitab lõpptulemuse (POSITIVE (POSITIIVNE) / NEGATIVE (NEGATIIVNE) / INDETERMINATE (MÄÄRAMATU) / UNRESOLVED (LAHENDAMATA) / NO RESULT (TULEMUS PUUDUB)). Kui tulemus on positiivne ja arvatud kontsentratsioon on kvantiteedi määramise piires, annab seadme NeuMoDx System tarkvara ka prooviga seostatud kvantitatiivse väärtuse.

REAKTIIVID/KULUKAUBAD

Kaasasolevad materjalid

REF	Sisukord	Ühikuid pakis	Teste ühikus	Teste pakis
300300	NeuMoDx HCV Quant Test Strip <i>Kuivatatud RT-PCR-reaktiivid, mis sisaldavad HCV ja SPC2 spetsiifilisi TaqMani sonde ja praimereid</i>	6	16	96

Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid (saadaval eraldi ettevõttelt NeuMoDx)

REF	Sisukord
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Kuivatatud paramagnetilised osakesed, lüütiline ensüüm ja proovi töötlemise kontrollid</i>
800200 või 800202	NeuMoDx HCV Calibrators <i>HCV kõrgete ja madalate kalibraatorite ühekordsed komplektid kalibreerimiskõvera kehtivuse määramiseks</i>
900201 või 900202	NeuMoDx HCV External Controls <i>HCV positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide ühekordsed komplektid</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Filtriga otsakud Hamilton CO-RE/CO-RE II (300 µl)
235905	Filtriga otsakud Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µl)

Vajalikud mõõteseadmed

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] või NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]

HOIATUSED JA ETTEVAATUSABINÕUD

- Testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip on kasutamiseks *in vitro* diagnostikas ainult seadmetega NeuMoDx Systems.
- Ärge kasutage reaktiive või kulukaupa pärast märgitud kõlblikuskuuapäeva.
- Ärge kasutage ühtegi reaktiivi, kui turvasulgur on katki või kui pakend on saabumisel kahjustatud.

- Ärge kasutage kulukaupu ega reaktiive, kui kaitsekott on saabumisel avatud või katki.
- Enne kui testi tulemusi saab kliinilistele proovidele kohaldada, peab olema olemas kehtiv testi kalibreerimine (selle saamiseks töödeldakse kalibraatorite NeuMoDx HCV Calibrators kõrgeid ja madalaid kalibraatoreid).
- Väliseid kontrolle NeuMoDx HCV External Controls tuleb töödelda iga 24 tunni tagant kogu analüüsiga NeuMoDx HCV Quant Assay testimise jooksul.
- Proovi väiksem maht sekundaarsete alikvootide korral sõltub katsuti suuruselt, proovikatsuti kandjast ning proovimahu töötlemisest, nagu see on määratletud allpool. Kindlaksmääratud miinimumist väiksem maht võib põhjustada tõrke „Quantity Not Sufficient“ (kogus pole piisav).
- Valel temperatuuril või üle kindlaksmääratud säilitusajaga proovide kasutamine võib põhjustada kehtetuid või ekslikke tulemusi.
- Vältida tuleb alati kõigi reaktiivide ja kulukaupade saastumist mikroobide ja ribonukleasiga (RNAas). Sekundaarsete proovikatsutite korral on soovitatav kasutada steriilseid RNAasivabu ühekordseid ülekandepipette. Kasutage iga proovi jaoks uut pipetti.
- Saastumise vältimiseks ärge käsitage ega eraldage pärast amplifikatsiooni ühtegi kassetti NeuMoDx Cartridge. Ärge mingil juhul võtke kassette NeuMoDx Cartridges bioohtlike jäätmete mahutist (NeuMoDx 288 Molecular System) ega bioohtlike jäätmete nõust (NeuMoDx 96 Molecular System). Kassett NeuMoDx Cartridge on loodud saastumise vältimiseks.
- Juhtudel, kui laboris analüüsitakse ka avatud katsuti PCR-teste, tuleb hoolitseda selle eest, et testribad NeuMoDx HCV Quant Test Strip, testimiseks vajalikud täiendavad kulukaubad ning reaktiivid, isikukaitsevahendid, nt kindad ja laborikitlid, ja seade NeuMoDx System ei saastuks.
- NeuMoDx reaktiivide ja kulukaupade käsitlemisel tuleb kanda puhtaid, pulbrivabu nitrilkindaid. Ärge puudutage kassetti NeuMoDx Cartridge ülemist pinda, testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip või ekstraheerimisplaadi NeuMoDx Extraction Plate fooliumtihendi pinda ega lüüsimispuhvri NeuMoDx Lysis Buffer 3 ülemist pinda; kulukaupade ja reaktiivide käsitlemine peaks toimuma ainult külgpindu puudutades.
- Iga reaktiivi kohta on vastavalt vajadusele esitatud ohutuskaardid (Safety Data Sheets, SDS) aadressil www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Pärast testi tegemist peske hoolikalt käsi.
- Ärge pipeteerige suu abil. Ärge suitsetage, jooge ega sööge kohtades, kus käideldakse proove või reaktiive.
- Käideldel proove alati nakkusohtlikena ja vastavalt ohututele laboriprotseduuridele, mida on kirjeldatud sellistes väljaannetes nagu *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁸ ja CLSI dokumendis M29-A4.⁹
- Utliseerige kasutamata reaktiivid ja jäätmed vastavalt riigi, föderaal-, provintsi, osariigi ja kohalikele seadustele.
- Mitte korduskasutada.



TOOTE SÄILITAMINE, KÄSITSEMINE JA STABIILSUS

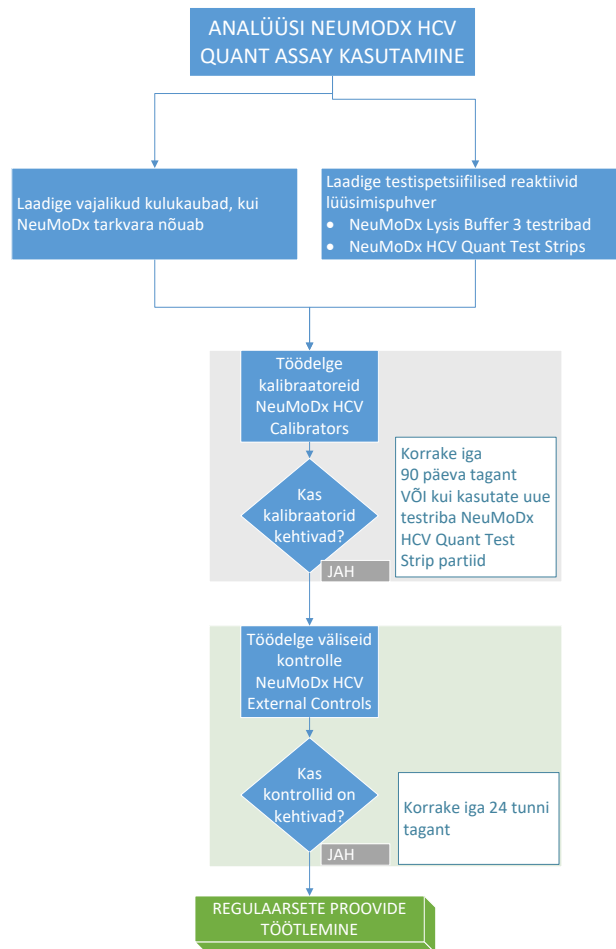
- Testribad NeuMoDx HCV Quant Test Strips on esimeses pakendis stabiilsed temperatuuril 4–28 °C kuni toote vahetel etiketil märgitud kõlblikkusaja lõpuni.
- Ärge kasutage kulukaupu ega reaktiive pärast märgitud kõlblikkuskuupäeva.
- Ärge kasutage ühtegi analüüsitoodet, kui visuaalsel vaatlusel on leitud esmase või sekundaarse pakendi kahjustusi.
- Ärge laadige uuesti ühtegi testitavat toodet, mis on varem laaditud teise seadmesse NeuMoDx System.
- Pärast laadimist võib testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip jääda süsteemi NeuMoDx System kuni 14 päevaks. Laaditud testribade allesjäänud säilivusaega jälgib tarkvara ja teatab kasutajale reaajas. Süsteem soovib testriba eemaldamist, mis on olnud kasutuses pärast selle lubatud perioodi.

PROOVI KOGUMINE, TRANSPORTIMINE JA SÄILITAMINE

1. Käsitlege kõiki proove, kalibraatoreid ja kontrolle, nagu need oleks võimelised edasi kandma nakkustekitajaid.
2. Ärge külmutage täisverd ega primaarsetes katsutites hoiatud proove.
3. Plasmaproovide ettevalmistamiseks tuleks täisverd koguda steriilsetesse katsutitesse, kasutades antikoagulantidena EDTA-d ja ACD-d või plasma ettevalmistamise katsutitesse (Plasma Preparation Tubes, PPT). Järgige proovide kogumiskatsutite tootjapoolseid juhiseid ettevalmistamise ja hoiustamise kohta.
4. Seerumiproovide ettevalmistamiseks tuleb täisveri koguda seerumi- või SST katsutitesse. Järgige proovide kogumiskatsutite tootjapoolseid juhiseid ettevalmistamise ja hoiustamise kohta.
5. Proove võib testida primaarsetes kogumiskatsutites või sekundaarsetes proovikatsutites. Soovituslik primaarse katsutiga testimisel:
 - a. Plasmaproovid: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD #368589) või BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
 - b. Seerumiproovid: BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) või BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
6. Ettevalmistatud proove võib enne töötlemist hoiustada seadmes NeuMoDx System kuni 8 tundi. Kui pikem hoiustamine on vajalik, siis on soovitatav proovid enne jahutada või külmutada sekundaarsete alikvootidena.
7. Ettevalmistatud proove tuleb hoida temperatuuril 2–8 °C mitte kauem kui 7 päeva enne testimist ja kuni 8 tundi toatemperatuuril.

8. Ettevalmistatud sekundaarsetes katsutites olevaid proove võib enne töötlemist hoida temperatuuril $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuni 24 nädalat, külmutatud proovid ei tohi enne kasutamist läbida rohkem kui kaks (2) külmutamis-/sulatamistsükli.
 - a. Külmutatud plasmaproove, mis on läbinud ühe (1) külmutamis-/sulatamistsükli, võib säilitada seadmes 8 tundi kauem.
 - b. Külmutatud plasmaproove, mis on läbinud kaks (2) külmutamis-/sulatamistsükli, ei tohi seadmes säilitada kauem kui 4 tundi.
 - c. Külmutatud seerumiproove, mis on läbinud ühe (1) või kaks (2) külmutamis-/sulatamistsükli tuleb kasutada kohe pärast sulatamist.
 - d. Kui proovid külmutada, laske proovidel toatemperatuuril ($15\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$) täielikult üles sulada; keerutage lähtemahutis, et saada ühtlaselt jaotunud proov.
 - e. Plasmata/seerumit ei ole soovitatav külmutada esmases kogumiskatsutis.
9. Proovide tarnimisel tuleb need pakendada ja märgistada vastavalt kehtivatele riiklikele ja/või rahvusvahelistele eeskirjadele.
10. Sildistage proovid selgelt ja viidake, et proovid on mõeldud HCV testimiseks.
11. Minge edasi jaotisesse *Testi ettevalmistamine*.

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay kasutamise üldine protsess on kokku võetud allpool *joonisel 1*.



Joonis 1. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay kasutamise töövoog

KASUTUSJUHEND

Testi ettevalmistamine

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay saab kasutada otse esmaste vere kogumiskatsutitega või sekundaarsetes katsutites olevate proovi alikvootidega. Töödelda saab, kasutades ühte kahest proovimahu töötlemise töövoost – 550 μ proovimahu töövoog või 200 μ l proovimahu töövoog.

1. Kandke proovikatsutile, mis ühildub seadmega NeuMoDx System, proovi võõtkoodisilt. Primaarse vere kogumiskatsuti võib märgistada ja asetada otse 32-pesalisse proovikatsutikandjasse pärast tsentrifugimist vastavalt tootja juhiste. Alternatiivina võib plasmaalikkoodi viia sekundaarsesse katsutisse, et töödelda seadmes NeuMoDx System.

2. Proovi testimisel esimeses kogumiskatsutis asetage võotkoodiga katsuti proovikatsuti kandjasse ja veenduge, et kork eemaldataks enne seadmesse NeuMoDx System laadimist. Väikseimad mahud **ülalpool** trombotsüütide-leukotsüütide kihti (buffy coat) on määratletud allpool ja nende järgimine on tagatud kui kogute ja töötlete proove katsuti tootja juhiste järgi. Ebaõigesti kogutud proovide korral ei ole toimivus tagatud.

Katsuti tüüp	Proovi väikseim maht	
	550 µl töövoog	200 µl töövoog
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/seerum – 4,0 ml	1050 µl	700 µl
K ₂ EDTA/seerum – 6,0 ml	1250 µl	900 µl
K ₂ EDTA/seerum – 10,0 ml	1600 µl	1250 µl

3. Sekundaarse katsuti kasutamisel:

- a. Vorteksige proovi õrnalt, et tagada ühtlane jaotumine
- b. Kasutades iga proovi jaoks uut ülekandepipetti, viige plasma või seerumi alikvoot seadmega NeuMoDx System ühilduvasse võotkoodiga proovikatsutisse allpool määratletud mahtude järgi.

Proovikatsutikandja	Katsuti suurus	Proovi väikseim maht	
		550 µl töövoog	200 µl töövoog
32-Tube Specimen Tube Carrier (32-kohaline proovikatsutikandja)	diameetriga 11–14 mm kõrgusega 60–120 mm	700 µl	400 µl
24-Tube Specimen Tube Carrier (24-kohaline proovikatsutikandja)	diameetriga 14,5–18 mm kõrgusega 60–120 mm	1100 µl	800 µl
Low Volume Specimen Tube Carrier (Väikese mahuga proovikatsutikandja)	1,5 ml koonuselise põhjaga mikrotsentrifuugi katsuti	650 µl	300 µl

- c. Jälgige hoolega, et proovis leiduvaid hüübeid ei kantaks üle proovikatsutisse.

Seadme NeuMoDx System kasutamine

Üksikasjalike juhiste saamiseks lugege seadmete NeuMoDx 288 ja 96 Molecular Systems käsiraamatuid; (tootekood 40600108 ja 40600317)

- Laadige testi tellimus seadmesse NeuMoDx System vastavalt soovitud proovimahu töövoole ja proovikatsuti tüübile.
 - 550 µl proovimaht testitakse, määrates proovi tüübiks kas „Plasma” või „Serum” (Seerum)
 - 200 µl proovimaht testitakse, määrates proovi tüübiks kas „Plasma2” või „Serum2” (Seerum2)
 - Kui testi tellimuses ei ole tüüp määratletud, kasutatakse katsutis **Secondary Tube** (Sekundaarne katsuti) vaikimisi proovitüüpi **Plasma**.
- Täitke üks või enam süsteemi NeuMoDx System testribakandjat testriba(de)ga NeuMoDx HCV Quant Test Strip ja kasutage puutekraani, et laadida testribakandja(d) süsteemi NeuMoDx System.
- Kui seadme NeuMoDx System tarkvara seda soovib, lisage vajalikud kulukaubad seadme NeuMoDx System tarbitavatele kandjatele ja kasutage puutetundlikku ekraani kandja(te) laadimiseks seadmesse NeuMoDx System.
- Kui seadme NeuMoDx System tarkvara seda soovib, vahetage välja pesemisreaktiiv NeuMoDx Wash Reagent, vabastusreaktiiv NeuMoDx Release Reagent, tühjendage praimingujäätmed, biohtlike jäätmete mahuti (ainult NeuMoDx 288 Molecular System), otsikute jäätmemahuti (ainult NeuMoDx 96 Molecular System) või biohtlike jäätmete nõu (ainult NeuMoDx 96 Molecular System), vastavalt vajadusele.
- Kui seadme NeuMoDx System tarkvara seda vajab, töödelge kalibraatoreid NeuMoDx HCV Calibrators ja/või väliseid kontrollid NeuMoDx HCV External Controls. Rohkem teavet kalibraatorite ja kontrollide kohta leiab jaotisest *Tulemuste töötlemine*.
- Laadige proovi-/kalibraator-/kontrollkatsuti(d) proovikatsuti kandjasse ja veenduge, et kõigilt katsutitelt on korgid eemaldatud.
- Asetage proovikatsuti kandja(d) automaatladija riulile ja kasutage puutetundlikku ekraani kandja(te) laadimiseks seadmesse NeuMoDx System. Sellega käivitatakse tuvastatavate testide jaoks laaditud proovide töötlemine, eeldusel, et süsteemis on kehtiv testitellimus.

PIIRANGUD

1. Testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip tohib kasutada ainult seadmetega NeuMoDx Systems.
2. Testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip toimivus on kindlaks tehtud plasmaproovidega, mis valmistati antikoagulandiga EDTA/ACD või seerumiproovidega, mis valmistati seerumi eraldamise katsutitega. Testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip kasutamist muude proovituüpidega ei ole hinnatud ja toimivusnäitajad on muud tüüpi proovide korral teadmata.
3. Testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip on kinnitatud primaarsete katsutite testimise korral, kasutades katsuteid BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube ja BD Vacutainer SST Tube.
4. Proovide käitlemine, eirates säilitustingimusi, võib negatiivselt mõjutada analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay kvantitatiivset mõõtetäpsust, kuid selle mõju kvalitatiivsele tuvastamismäärale Positive/Negative (positiivne/negatiivne) on vähetähtseline.
5. Seerumiproovide säilitamine seadmes pärast pikaajalist külmutamist ja kahte külmutamis-/sulatamistsükli ilma kohese testimiseta võib negatiivselt mõjutada analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay kvantitatiivset mõõtetäpsust.
6. Kui kasutada 200 µl proovimahuga töövoogu, on täheldatud analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay avastamiskiirust ja kvantitatiivset alampiiri vähest tõusu.
7. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay ei tohi kasutada proovide korral, mis on kogutud inimestelt, kellele on manustatud hepariini.
8. Kuna HCV tuvastamine sõltub proovis olevate sihtmärki RNA-d sisaldavate viiruseosakeste arvust, sõltub usaldusväärsete tulemuste saamine proovide nõuetekohasest kogumisest, käitlemisest ja säilitamisest.
9. Kalibraatorid NeuMoDx HCV Calibrators ja välised kontrollid NeuMoDx HCV External Controls tuleb töödelda pakendi infolehtede soovitude järgi, kui seda soovitab seadme NeuMoDx System tarkvara enne tavapärase kliiniliste proovide töötlemist.
10. Proovide ebaõige kogumise, käitlemise, säilitamise, tehniliste vigade või proovikatsuti segiajamise korral võivad tekkida segased tulemused. Lisaks võivad tekkida valenegatiivsed tulemused, kuna proovides leiduvate viiruseosakeste arv on väiksem kui analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tuvastuspiir.
11. Süsteemi NeuMoDx System tohib kasutada ainult süsteemi NeuMoDx System kasutamise väljaõppe saanud personal.
12. Kui ei toimu HCV ega SPC2 sihtmärki amplifikatsiooni, saadakse kehtetu tulemus (Indeterminate (määramatu), No Result (tulemus puudub) või Unresolved (lahendamata)) ja testi tuleb korrata.
13. Kui analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemus on Positive (positiivne), kuid kvantitatiivne väärtus on alla kvantitatiivse määramispiiri, teavitab seade NeuMoDx System, kas tuvastatud HCV väärtus oli *allpool* kvantitatiivset alampiiri (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) või *ülalpool* kvantitatiivset ülempiiri (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
14. Kui tuvastatud HCV on *allpool* LLoQ-d, võib analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay korrata (soovi korral) proovi teise alikvoodiga.
15. Kui tuvastatud HCV on *ülalpool* ULoQ-d, võib analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay korrata algse proovi lahjendatud alikvoodiga. Soovituslik lahjendamise suhe on 1 : 100 või 1 : 1000 HCV negatiivse plasma või lahjendajaga Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Algse proovi kontsentratsioon arvutatakse järgmiselt:
$$\text{algse proovi kontsentratsioon} = \log_{10}(\text{lahjendustegur}) + \text{lahjendatud proovi esitatud kontsentratsioon}$$
16. PCR-i inhibiitorite juhuslik esinemine plasmas või seerumis võib tekitada süsteemi kvantitatiivseid vigu. Sellisel juhul on soovitatav, et testi korratakse sama prooviga, mida on lahjendatud lahustiga Basematrix suhte juures 1:10 või 1:100.
17. Positiivne tulemus ei tähenda tingimata elujõuliste organismide esinemist. Ent positiivset tulemust käsitletakse kui C-hepatiidi viiruse RNA olemasolu.
18. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay sihtmärki olevates konserveerunud piirkondades esinevad deletsioonid või mutatsioonid võivad mõjutada testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip abil RNA tuvastamist või viia ekslike tulemusteni.
19. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemusi tuleb kasutada kliiniliste jälgimise ja muu arstile kättesaadava teabe täiendava vahendina; test ei ole mõeldud HCV infektsiooni diagnoosimiseks.
20. Saastumise vältimiseks on soovitatav hea laboritava, sealhulgas kinnaste vahetamine erinevate patsiendiproovide käitlemise vahel.

TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Kättesaadavaid tulemusi saab vaadata või printida seadme NeuMoDx System puutekraani akna Results (Tulemused) vahekaardilt „Results“ (Tulemused). Seadme NeuMoDx System tarkvara genereerib analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemused automaatselt, kasutades otsustusalgoritmi ja tulemuste töötlemise parameetreid, mis on esitatud NeuMoDx HCV analüüsi definitsiooni failis (HCV ADF). Tulemus võib olla esitatud kui Negative (negatiivne), Positive (positiivne) koos HCV kontsentratsiooniga, Positive (positiivne) ülalpool ULoQ-d, Positive (positiivne) allpool LLoQ-d, Indeterminate (IND) (määramatu) või Unresolved (UNR) (lahendamata) või No Result (NR) (tulemus puudub), sihtmärgi ja proovi töötlemise kontrolli amplifikatsiooni seisu järgi. Tulemused esitatakse ADF-i otsuse algoritmi põhjal, mis on kokku võetud allpool tabelis 1.

Tabel 1. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay otsustusalgoritmi kokkuvõte

TULEMUS	HCV sihtmärk	Proovi töötlemise kontroll (Sample Process Control, SPC2)	Tulemuse tõlgendus
Positive (Positiivne) esitatud kontsentratsiooniga	Amplified (Amplifitseeritud) $0,9 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (550 μl töövoog) $1,5 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (200 μl töövoog)	Amplified (Amplifitseeritud) või Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Määramisvahemikus tuvastatud HCV RNA
Positive (Positiivne) ülalpool ULoQ-d	Amplified (Amplifitseeritud) $[\text{HCV}] > 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplifitseeritud) või Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Ülalpool kvantitatiivset vahemikku tuvastatud HCV RNA
Positive (Positiivne) allpool LLoQ-d	Amplified (Amplifitseeritud) $[\text{HCV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (550 μl töövoog) $[\text{HCV}] < 1,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (200 μl töövoog)	Amplified (Amplifitseeritud) või Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Allpool määramisvahemikku tuvastatud HCV RNA
Negative (Negatiivne)	Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Amplified (Amplifitseeritud)	HCV RNA-d ei tuvastatud
Indeterminate (Määramatu)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Mitteamplifitseeritud, Tuvastatud süsteemiviga, Proovi töötlemine lõpetatud)		Kõik sihtmärktulemused olid kehtetud; testige proovi uuesti [†]
No Result (Tulemus puudub)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Mitteamplifitseeritud, Tuvastatud süsteemiviga, Proovi töötlemine katkestatud)		Proovi töötlemine katkestati; testige proovi uuesti [†]
Unresolved (Lahendamata)	Not Amplified, No System Error Detected (Mitteamplifitseeritud, Süsteemiviga pole tuvastatud)		Kõik sihtmärktulemused olid kehtetud; testige proovi uuesti [†]

* Hoiatusteatis No Result (tulemus puudub) esitatakse ainult seadme NeuMoDx System tarkvara versioonides 1.8 või uuem.

† NeuMoDx System on varustatud automaatse Rerun (Uuesti käitamine) / Repeat (Kordamine) võimekusega, mida lõppkasutaja saab valida, et tagada tulemuse IND/UNR/NR automaatne uuesti töötlemine, et minimeerida tulemuse esitamise viibimist.

Testi arvutamine

- Proovide korral, mis jäävad analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay kvantitatiivsesse määramisvahemikku, arvutatakse proovide HCV RNA kontsentratsioon, kasutades salvestatud standardkõverat koos kalibreerimiskoeffitsiendi ja proovimahuga.
 - Kalibreerimiskoeffitsient arvutatakse töödeldud kalibraatorite NeuMoDx HCV Calibrators tulemuste põhjal, et tagada standardkõvera kehtivus testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip antud partiile spetsiifilises seadmes NeuMoDx System.
 - Kalibreerimiskoeffitsient on osa HCV RNA kontsentratsiooni lõplikust määramisest.
 - NeuMoDx tarkvara arvestab proovi sisendmahtu HCV RNA kontsentratsiooni määramisel proovi ml kohta.
- Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemused esitatakse ühikutes $\log_{10} \text{ IU/ml}$.
- Tundmatute proovide kvantifitseerimise tulemus on jälgitav WHO 5. HCV rahvusvahelise standardini.

Testi kalibreerimine

HCV RNA kvantifitseerimiseks proovides on vajalik kehtiva kalibreerimise olemasolu standardkõvera alusel. Kehtivate tulemuste saamiseks peab olema tehtud proovikalibreerimine, kasutades selleks ettevõtte NeuMoDx Molecular, Inc. väliseid kalibraatoreid.

Kalibraatorid

- Kalibraatorite NeuMoDx HCV Calibrators komplekti töötlemine on vajalik iga uue testribade NeuMoDx HCV Quant Test Strips partii korral, uue HCV analüüsi definitsiooni fail laadimisel seadmesse NeuMoDx System, parajasti kasutusel olete kalibraatorite komplekti kehtivusaja lõppemisel (hetkel seatud 90 päevale) või kui seadme NeuMoDx System tarkvara muudetakse.
- Seadme NeuMoDx System tarkvara teavitab kasutajat, kui kalibraatoreid tuleb töödelda. Testribade uut partii ei saa testimiseks kasutada, kuni kalibraatoreid on edukalt töödeldud.

3. Kalibraatorite kehtivus määratakse järgnevalt.
 - a) Kahe kalibraatori komplekt – üks (1) kõrge ja üks (1) madal – tuleb kehtivuse määramiseks töödelda.
 - b) Vähemalt kaks (2) kolmest (3) kordustestist peavad andma eelnevalt määratletud parameetrite vahemikus. Madala kalibraatori nominaalne sihtmärk on 3 log₁₀ IU/ml ja kõrge kalibraatori nominaalne sihtmärk on 5 log₁₀ IU/ml.
 - c) Kalibreerimiskoeffitsient arvutatakse, et võtta arvesse testribade partiide vahelised eeldatavad erinevused. Seda kalibreerimiskoeffitsienti kasutatakse lõpliku HCV kontsentratsiooni määramiseks.
4. Kui ühe või mõlema kalibraatori kehtivuse kontroll ebaõnnestub, siis töödelge ebaõnnestunud kalibraatorit/kalibraatoreid uuesti, kasutades uut vialit. Juhul kui ühe kalibraatori kehtivuse kontroll ebaõnnestub, saab korrata ainult ebaõnnestunud kalibraatori kontrolli, kuna süsteem ei nõua kasutajalt mõlema kalibraatori uuesti kasutamist.
5. Kui kalibraator(ite) kehtivuse kontroll ebaõnnestub järjestikku, võtke ühendust ettevõttega NeuMoDx Molecular, Inc.

Kvaliteedikontroll

Kohalikud eeskirjad määravad tavaliselt, et labor vastutab kontrolliprotseduuride eest, millega jälgitakse kogu analüüsiprotsessi täpsust ja kordustäpsust, ning peab määrama kontrollmaterjalide testimise arvu, tüübi ja sageduse, kasutades kontrollitud toimivusspetsifikatsioone modifitseerimata, heakskiidetud testsüsteemi jaoks.

Välised kontrollid

1. Positiivseid ja negatiivseid väliseid kontrolle tuleb töödelda iga 24 tunni tagant kogu analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay testimise vältel. Kui kehtivad välised kontrollitulemused puuduvad, nõuab seade NeuMoDx System tarkvara kasutajalt kontrollide töötlemist, et tulemusi saaks esitada.
2. Seade NeuMoDx System hindab väliste kontrollide kehtivust eeldatava tulemuse põhjal. Positiivne kontrolliproov peab andma HCV tulemuse Positive (positiivne) ja negatiivne kontrolliproov peab andma HCV tulemuse Negative (negatiivne).
3. Väliste kontrollide vastukäivaid tulemusi tuleks käsitleda järgnevalt.
 - a) Negatiivse kontrolliproovi katsetulem Positive (Positiivne) näitab proovi saastumise probleemi.
 - b) Positiivse kontrolliproovi katsetulem Negative (Negatiivne) võib osutada reaktiiviga või instrumendiga seotud probleemile.
 - c) Kummalgi ülaltoodud juhul või Indeterminate (IND) (määramatu) või No Result (NR) (tulemus puudub) tulemuse korral töödelge uuesti väliseid kontrolle NeuMoDx HCV External Controls, kasutades ebaõnnestunud kehtivuskontrolliga kontrolli(de) värsked vialid.
 - d) Kui positiivne väline kontroll NeuMoDx HCV External Control annab uuesti tulemuse Negative (negatiivne), võtke ühendust NeuMoDx-i tehnilise toega.
 - e) Kui negatiivne väline kontroll NeuMoDx HCV External Control annab jätkuvalt tulemuse Positive (positiivne), proovige kõrvaldada kõik võimalikud saastumise allikad, sh asendage kõik reaktiivid, enne NeuMoDx-i tehnilise toega ühenduse võtmist.

Prooviprotsessi (sisemised) kontrollid

Eraldusplaati NeuMoDx Extraction Plate on kätetud eksogeenne proovi töötlemise kontroll (Sample Process Control, SPC2) ning see läbib iga prooviga kogu nukleiinhappe ekstraheerimise ja reaalaaja RT-PCR amplifikatsiooni protsessi. Iga testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip sisaldab ka primereid ja SPC2-spetsiifilist sondi, mis võimaldavad mitmekordse RT-PCR-i kaudu tuvastada SPC2 ja sihtmärgiks oleva HCV RNA-d (olemasolu korral). SPC2 amplifikatsiooni tuvastamine võimaldab seadme NeuMoDx System tarkvaral jälgida RNA ekstraheerimise ja RT-PCR-i amplifikatsiooniprotsesside tõhusust.

Kehtetud tulemused

Kui seadme NeuMoDx System abil läbiviidud analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay ei anna kehtivat tulemust pärast proovi töötlemist, esitatakse tulemus Indeterminate (IND) (määramatu), No Result (NR) (tulemus puudub) või Unresolved (UNR) (lahendamata) olenevalt tekkinud vea tüübist.

Kui proovi töötlemisel tuvastatakse seadme NeuMoDx System tõrge, esitatakse tulemus IND. Kui esitatakse tulemus IND, on soovitatav teha kordusanalüüs.

UNR-i tulemus esitatakse, kui süsteemivigade puudumisel ei tuvastata HCV RNA või SPC2 kehtivat amplifikatsiooni, mis viitab võimalikule reaktiiviga seotud tõrkele või inhibiitorite olemasolule. UNR-i tulemuse saamise korral on esimese sammuna soovitatav teha kordusanalüüs. Kui kordustest ebaõnnestub, võib proovi mistahes inhibiitorite mõjude vähendamiseks kasutada lahjendatud proovi.

Kui seadmel NeuMoDx System läbi viidud analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay ei anna kehtivat tulemust ja proovi töötlemine katkestatakse enne analüüsi lõppu, esitatakse tulemus No Result (NR) (tulemus puudub). Kui esitatakse tulemus NR, on soovitatav teha kordusanalüüs.

TOIMIVUSNÄITAJAD

Analüütiline sensitiivsus – tuvastuspiir WHO standardi abil

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay analüütiline sensitiivsus määrati analüüsides negatiivseid proove ja WHO 5. rahvusvahelise standardi (genotüüp 1) lahjendatud proovide seeriat kinnitatud negatiivses inimese plasmas ja seerumis, et määrata kindlaks avastamispiir (Limit of Detection, LoD) seadmetes NeuMoDx Systems. LoD defineeriti kui madalaim sihttase, mis tuvastati probit-analüüsiga 95% juhtudel. Uuring viidi läbi 3 päeva jooksul mitmete süsteemide abil, kasutades eri NeuMoDx reaktiivide partiidid. Mõlema seadme (N288 ja N96) abil töödeldi päevas 18 kordust kõikide lahjenduse tasemetega. Tuvastamismäärad on kujutatud tabelis 2. Lisaks viidi läbi uuring, et teha kindlaks analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD 200 µl proovimahuga töövoos korral, mille tulemused on näidatud tabelis 3.

Tabel 2. Positiivsed tuvastusmäärad analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD määramisel – 550 µl töövoog

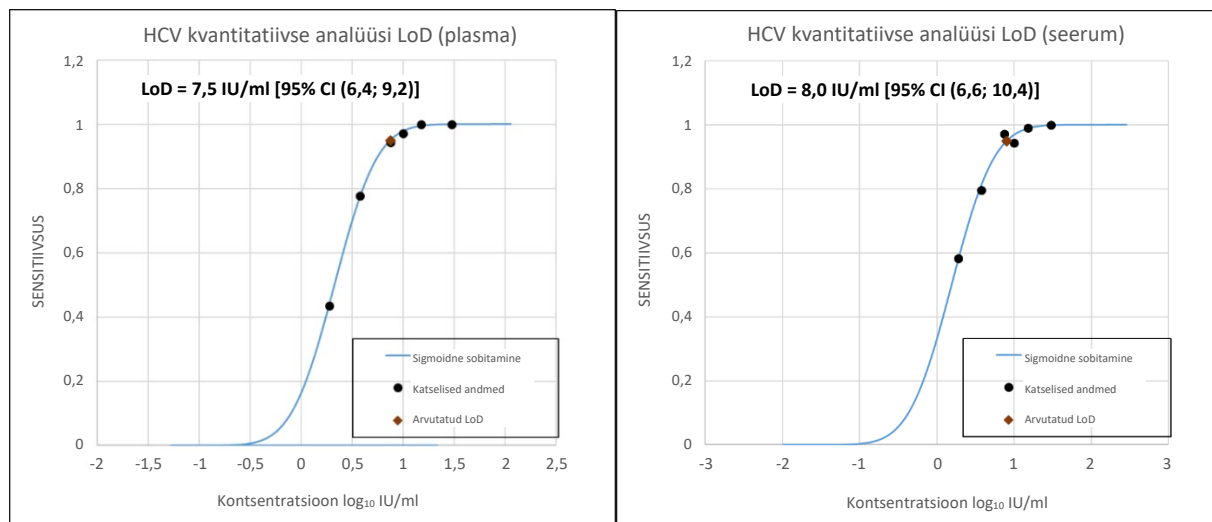
Sihtkontsentratsioon [IU/ml]	Sihtkontsentratsioon [\log_{10} IU/ml]	PLASMA			SEERUM		
		Kehtivate testide arv	Positiivsete arv	Tuvastamismäär	Kehtivate testide arv	Positiivsete arv	Tuvastamismäär
30	1,48	108	108	100%	108	108	100%
15	1,18	108	108	100%	108	107	99%
10	1,00	108	105	97%	108	102	94%
7,5	0,88	108	102	94%	108	105	97%
3,75	0,57	108	84	78%	108	86	80%
1,875	0,27	108	47	44%	108	63	58%
NEG	0	108	0	0%	107	1	0,93%

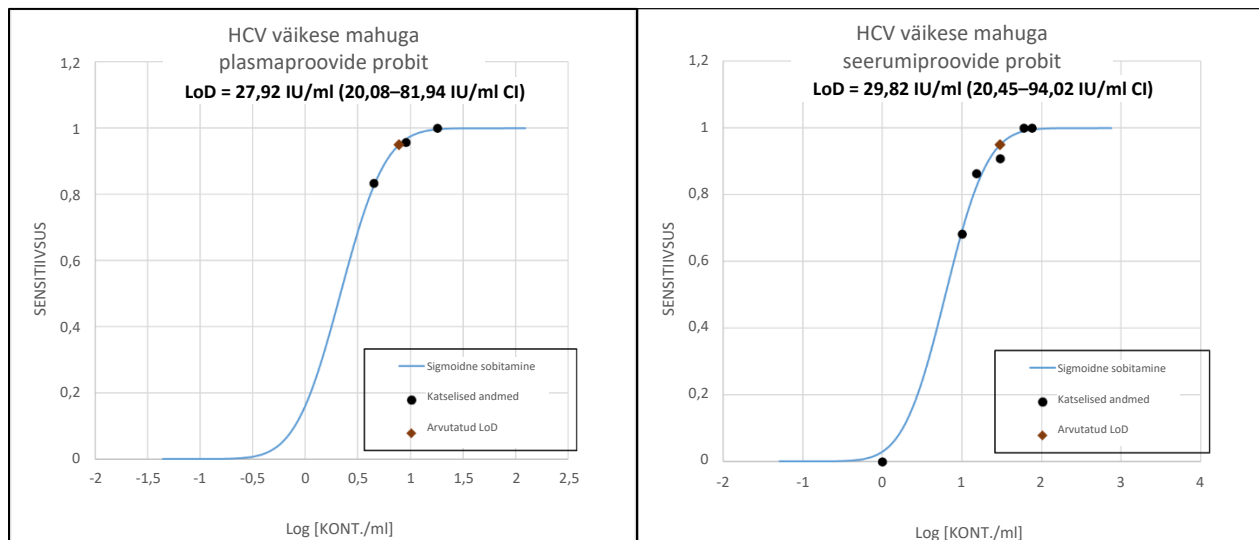
Tabel 3. Positiivsed tuvastusmäärad analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD määramisel – 200 µl töövoog

Sihtkontsentratsioon [IU/ml]	Sihtkontsentratsioon [\log_{10} IU/ml]	PLASMA			SEERUM		
		Kehtivate testide arv	Positiivsete arv	Tuvastamismäär	Kehtivate testide arv	Positiivsete arv	Tuvastamismäär
75	1,88	Pole kohaldatav	Pole kohaldatav	Pole kohaldatav	22	22	100%
60	1,78	22	22	100%	22	22	100%
30	1,48	22	21	95,5%	22	20	90,9%
15	1,18	22	17	77,3%	22	19	86,4%
10	1,00	22	13	59,1%	22	15	68,2%
NEG	0	22	0	0%	22	0	0%

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD plasmats kõikide genotüüpide korral oli 7,5 IU/ml (95% CI 6,4–9,2 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95% CI 0,8–1,0 \log_{10} IU/ml)], kasutades 550 µl proovimahuga töövoogu seadmes NeuMoDx 288 Molecular System (*joonis 2*). Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD oli seerumiproovide korral 8,0 IU/ml (95% CI 6,6–10,4 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95% CI 0,8–1,0 \log_{10} IU/ml)], kasutades 550 µl proovimahuga töövoogu (*joonis 2*); nõue mõlema proovitüübi korral, kasutades 550 µl proovimahuga töövoogu on **8,0 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)**.

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD kasutades 200 µl proovimahuga töövoogu oli 27,9 IU/ml (95% CI 20,1–81,9) plasmaproovides ja 29,8 IU/ml (95% CI 20,5–94,0) seerumiproovides (*joonis 3*); the LoD nõue mõlema proovitüübi korral, kasutades 200 µl proovimahuga töövoogu, on **30,0 IU/ml (1,5 \log_{10} IU/ml)**.


Joonis 2. Probit-tüüpi analüüs, mida kasutati analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD kindlaksmääramisel; plasma (vasakul) ja seerum (paremal) – 550 µl töövoog



Joonis 3. Probit-tüüpi analüüs, mida kasutati analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD kindlaksmääramisel; plasma (vasakul) ja seerum (paremal) – 200 µl töövoog

Analüütiline sensitiivsus – Kvantitatiivne määramispiir – Kvantitatiivne alampiir (LLOQ, Lower Limit of Quantitation), kasutades WHO standardit
 Kvantitatiivne alampiir (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) on defineeritud alumise sihttasemena, mille juures saavutatakse tuvastus > 95% juhtudel JA analüütiline koguviga (Total Analytical Error, TAE) on ≤ 1,0. LLOQ määramiseks arvutati LoD arvutuse osana analüütiline koguviga (Total Analytical Error, TAE) iga HCV sihttaseme kohta, mille korral oli tuvastus > 95%. TAE on defineeritud järgnevalt.

$$TAE = \text{nihe} + 2 \cdot SD \quad [\text{Westgardi statistika}]$$

Nihe on keskmise arvatud kontsentratsiooni ja eeldatava kontsentratsiooni erinevuse absoluutväärtus. SD on proovi määratud kvantitatiivse väärtuse standardhälve.

LLOQ-uuringus analüüsitud 6 eri tasemega HCV plasma- ja seerumiproovide koondtulemused, mis saadi, kasutades genotüüpi 1 550 µl proovimahuga töövoog korral, on näidatud tabelis 4. Lisatestimise tulemused, mis on saadud 200 µl proovimahuga töövoogu kasutades, on näidatud tabelis 5.

Tabel 4. NeuMoDx HCV Quant Assay LLOQ, koos nihke ja TAE-ga – 550 µl töövoog

Sihtkont. [IU/ml]	Sihtkont. [\log_{10} IU/ml]	Plasma					Seerum				
		Keskmine kont. [\log_{10} IU/ml]	Tuvastus (%)	SD	Nihe	TAE	Keskmine kont. [\log_{10} IU/ml]	Tuvastus (%)	SD	Nihe	TAE
30,00	1,48	1,41	100	0,32	0,07	0,71	1,39	100	0,30	0,08	0,69
15,00	1,18	1,24	100	0,36	0,06	0,79	1,23	99	0,32	0,06	0,70
10,00	1,00	1,07	97	0,35	0,07	0,77	1,14	94	0,36	0,14	0,85
7,50	0,88	1,01	94	0,44	0,13	1,02	1,12	97	0,25	0,25	1,09
3,75	0,57	1,08	78	0,43	0,51	1,38	1,17	80	0,58	0,59	1,76
1,88	0,27	1,11	44	0,36	0,83	1,55	1,11	58	0,69	0,84	2,22

Tabel 5. NeuMoDx HCV Quant Assay LLOQ, koos nihke ja TAE-ga – 200 µl töövoog

Sihtkont. [IU/ml]	Sihtkont. [\log_{10} IU/ml]	Plasma					Seerum				
		Keskmine kont. [\log_{10} IU/ml]	Tuvastus (%)	SD	Nihe	TAE	Keskmine kont. [\log_{10} IU/ml]	Tuvastus (%)	SD	Nihe	TAE
75	1,88	Pole kohaldatav	Pole kohaldatav	Pole kohaldatav	Pole kohaldatav	Pole kohaldatav	1,56	100	0,23	0,32	0,78
60	1,78	1,93	100	0,39	0,15	0,93	1,56	100	0,27	0,22	0,76
30	1,48	1,35	96	0,44	0,11	0,99	1,45	91	0,41	0,03	0,85
15	1,18	1,37	77	0,42	0,18	1,03	1,36	86	0,53	0,18	1,25
10	1,00	1,26	59	0,56	0,25	1,36	1,15	68	0,53	0,15	1,21

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LLoQ-ks määrati 7,7 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml) plasma- ja 8,4 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml) seerumiproovide korral, kasutades 550 µl proovimahuga töövoogu; nii plasma- kui ka seerumiproovide LLoQ oli 8,4 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml), kasutades 550 µl proovimahuga töövoogu. **8.4 IU/ml (0.9 log₁₀ IU/ml)** kasutades 550 µl proovimahuga töövoogu.

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LLoQ oli WHO standardit kasutades 30,0 IU/ml (1,5 log₁₀ IU/ml) plasmas ja 29,8 IU/ml (1,37 log₁₀ IU/ml) seerumis, kasutades 200 µl proovimahuga töövoogu; nii plasma- kui ka seerumiproovide LLoQ oli **30,0 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml)**, kasutades 200 µl proovimahuga töövoogu.

Analüütiline sensitiivsus – eri HCV genotüüpide LoD ja LLoQ

Esmalt määrati LoD genotüübile 1 (5. WHO rahvusvaheline standard), pärast mida viidi läbi täiendavad analüüsid määratud LoD lähedal, kasutades kõiki ülejäänud 5 genotüüpi. Kasutades plasma 550 µl proovimahuga töövoogu, testiti analüüsiga NeuMoDx HCV Quant Assay kolmkümmend kuut (36) kordust tasemetel, mis vastasid 2-kordselt, 1-kordselt ja 0,5-kordselt LoD 95% CI ülempiirile. Iga analüüsitud taseme iga genotüübi positiivne protsendimäär esitati tabeli kujul ja LoD arvutati selle alusel, kasutades probit-analüüsi.

Samuti arvutati välja nende analüüsitud tasemete analüütiline koguviga. Genotüübi LLoQ-ks loeti taas madalaim tase, mille positiivne tuvastusmäär oli 95% ja arvutatud TAE ≤ 1,0. Need tulemused näitavad, et analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tuvastamissuutlikkus oli väga hea ja samaväärne kõigi kuue genotüübi korral, vahemikus 4,5–7,5 IU/ml, sh 5. WHO rahvusvahelise standardprooviga (genotüüp 1) saadud tulemused. Kokkuvõttes leiti, et analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LoD oli genotüüpide lõikes 7,5 IU/ml (0,88 log₁₀ IU/ml) ja LLoQ väärtuseks määrati suurim väärtus, mis on 7,7 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml), mis leiti 5. WHO rahvusvahelise standardi (genotüüp 1) korral. *Tabelis 6* on näidatud LoD ja LLoQ tulemused, mis on saadud eri HCV genotüüpide testimisel plasmas.

Tabel 6. Plasmas analüüsitud HCV genotüübid, kasutades 550 µl proovimahuga töövoogu

GENOTÜÜP	LoD [IU/ml]	LLoQ [IU/ml]
1	7,5	7,7
2	4,5	5,2
3	7,5	7,5
4	6,0	6,0
5	4,8	5,5
6	4,5	6,7

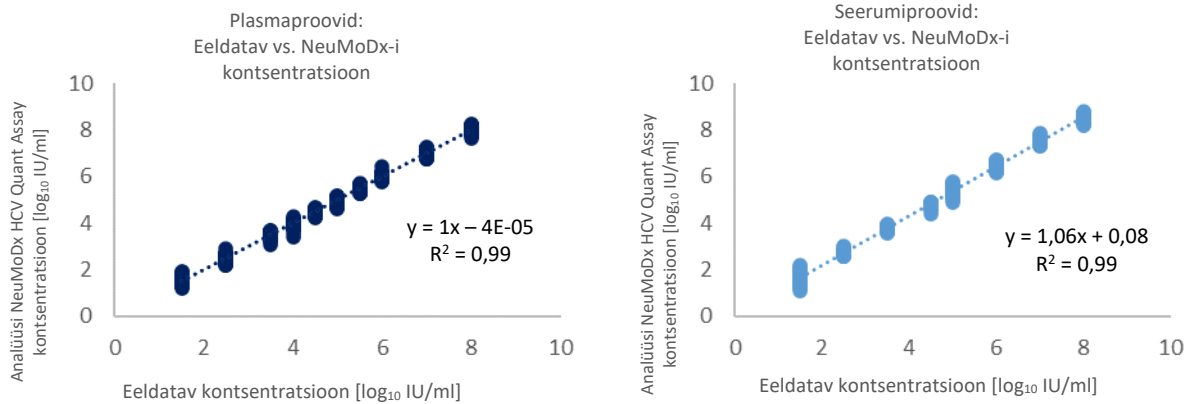
Eespool viidatud uuringutulemuste alusel võimaldab NeuMoDx LoD **8,0 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml)** ja LLoQ **8,4 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml)** tuvastamist analüüsiga NeuMoDx HCV Quant Assay **plasmas ja seerumis**, kasutades **550 µl proovimahuga töövoogu**.

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay esitatud LoD ja LLoQ **mõlema proovitüübi jaoks (plasma ja seerum)**, kasutades **200 µl proovimahuga töövoogu, on 30,0 IU/ml (1,5 log₁₀ IU/ml)**.

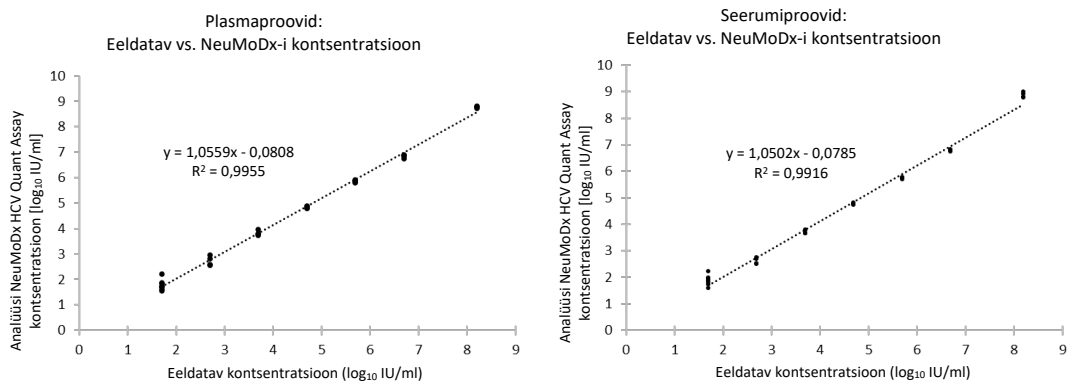
Analüütiline sensitiivsus – kvantitatiivse ülempiiri (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) lineaarsus ja määratlemine

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay lineaarsus ja kvantitatiivne ülempiir (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) määratleti plasmas, valmistades HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX) ja AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) abil lahuseeriad, mis on jälgitavad WHO 5. rahvusvahelise standardini. Mitme HCV-negatiivse plasma liitproovi abil valmistati 11-liikmeline paneel, et luua testimispaneel kontsentratsioonivahemikus 8,2–1,5 log₁₀ IU/ml. Test NeuMoDx HCV Quant Assay näitas võimekust kvantifitseerida HCV kogu 8 log₁₀ lineaarse vahemiku ulatuses täpsusega ± 0,3 log₁₀ IU/ml, võttes aluseks 95% usaldusintervalli abil arvutatud standardse vea. Olulist kasu ei saadud, kasutades 2. ja 3. järgu regressiooni. Määratud ULoQ plasmas oli 8,2 log₁₀ IU/ml. T Lisaks tehti uuring, et näidata maatriksi samaväärsust ning analüüsis võrreldi NeuMoDx HCV kvantitatiivseid plasmas ja seerumis valmistatud proovide tulemusi, kasutades kahte erinevat regressioonimudelit, sh MS Exceli regressioonitööriist ja Passing-Bablok. Tulemused näitasid tugevat korrelatsiooni, mida näitab tõus ja lõikepunkti väärtused, mis on vastavalt kas 1,00 või 0,00 lähedal, ning R2 väärtus 0,99 (MS Excel regressioonitööriist) või p-väärtus 0,600 (Passing-Bablok). Seadme NeuMoDx System esitatud HCV analüüsi kontsentratsioonide võrdlus ootuspäraste väärtustega on esitatud *joonisel 4*.

Seejärel hinnati lineaarsust ja ULoQ-i 200 µl proovimahuga töövoogu korral. Ekvivalentsuse võrdlusi teostati kontsentratsioonide vahel, mille NeuMoDx tarkvara esitas 200 µl ja 550 µl töövoogude kohta. Demingi ja Passing-Babloki regressioonanalüüs näitas lineaarse vahemiku lõikes esitatud kontsentratsioonide korral suurepärase korrelatsiooni, 1-le lähedast tõusu ja minimaalselt lõikepunkte (nihe) nii plasma- kui ka seerumiproovide kohta. 200 µl proovimahuga töövoogu korral esitatud kontsentratsiooni Blandi ja Altmani võrdlus 200 µl ja 550 µl proovimahuga töövoogu korral esitatud keskmise kontsentratsiooniga näitas minimaalset nihet, omistades täpsuse 200 µl töövoogu põhjal tulemustes genereeritud algoritmidele. Lisaks oli lihtsal lineaarsel regressioonil, mis võrdles 200 µl töövoogu eeldatavat kontsentratsiooni esitatud kontsentratsiooniga, 1-le lähedane tõus, mis näitab suurepärase korrelatsiooni (*joonis 5*). Kokkuvõttes näitavad tehtud võrdlused HCV täpset kvantifitseerimist analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay abil 200 µl proovimahuga töövoogu lineaarse vahemiku ulatuses.



Joonis 4. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay lineaarne vahemik plasmats (vasakul) ja seerumis (paremal) – 550 µl töövoog



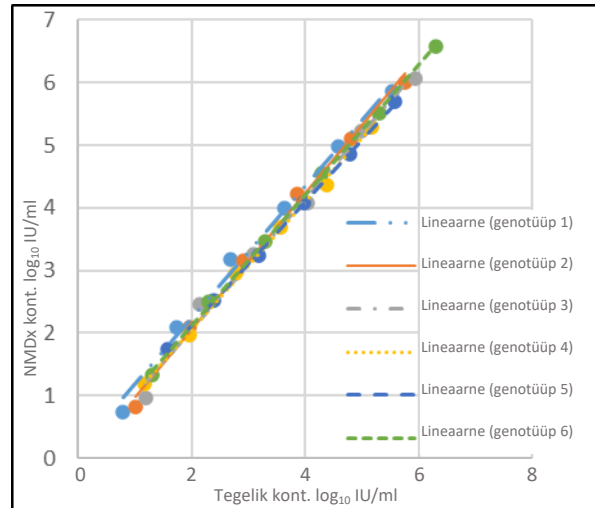
Joonis 5. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay lineaarne vahemik plasmats (vasakul) ja seerumis (paremal) – 200 µl töövoog

Analüütiline sensitiivsus – lineaarsus genotüüpide lõikes

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay lineaarsus kuue HCV genotüübi kasutamisel määrati, analüüsidest iga HCV-negatiivses plasmakogumis ettevalmistatud HCV genotüübi vähemalt nelja (4) erinevat kontsentratsiooni. Selles uuringus analüüsitud HCV sihtmärkide kontsentratsioonid sõltusid algproovi kontsentratsioonist ja seega erinesid genotüüpide lõikes. Uuring viidi läbi iga genotüübiga, kasutades iga taseme 6 kordust. Kuue HCV genotüübi lineaarsus on esitatud tabelis 7 ja joonisel 6.

Tabel 7. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay lineaarsus genotüüpide lõikes

Genotüüp	Lineaarsuse võrrand y = NeuMoDx HCV Quant Assay kvantitatiivne väärtus x = Eeldatav kvantitatiivne väärtus	R ²
1	y = 1,054x + 0,1325	0,979
2	y = 1,0792x - 0,0748	0,985
3	y = 1,0423x - 0,0439	0,981
4	y = 1,0158x + 0,0292	0,973
5	y = 0,9873x + 0,1524	0,994
6	y = 1,0393x + 0,0396	0,997



Joonis 6. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay lineaarsus genotüüpide lõikes

Analüütiline spetsiifilisus – ristreaktiivsus

Analüütilist spetsiifilisust näidati, sõeludes 33 organismi, mida levinult leiab vere-/plasmaproovidest, ja liigi suhtes, mis on fülogeneetiliselt sarnased HCV ristreaktiivsusele. Organismid valmistati ette 4–6 organismi kogumites ja neid testiti kõrge kontsentratsiooni juures. Testitud organismid on näidatud tabelis 8. Ühegi testitud organismi korral ei esinenud ristreaktiivsust, mis kinnitab analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay 100% analüütilist spetsiifilisust.

Tabel 8. Patogeenid, mida kasutatakse analüütilise spetsiifilisuse tõendamiseks

Mittesihtorganismid						
Adenovirus 2	Dengue V1	A-hepatiit	Inimese immuunpuudulikkuse viirus 2	Inimese T-lümfotroopne viirus 1	Propionibacterium acnes	Lääne-Niiluse viirus
Adenovirus 5	Dengue V2	B-hepatiidi viirus	Inimese papilloomiviirus 16	Inimese T-lümfotroopne viirus 2	Rubella	Kollapalavik
Candida albicans	Dengue V3	Herpes simplex viirus (HSV) 1	Inimese papilloomiviirus 18	A-gripp	St. Louise entsefaliit	Zika viirus
Chlamydia trachomatis	Dengue V4	Herpes simplex viirus (HSV) 2	Inimese herpesviirus 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Tsütomegaloviirus	Epstein-Barri viirus	Inimese immuunpuudulikkuse viirus-1	Inimese herpesviirus 8	Parvoviirus B19	Staphylococcus epidermidis	

Analüütiline spetsiifilisus – segava mõjuga ained, kommensaalsed organismid

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay toimivust segava mõju esinemisel hinnati sihtmärgiks mitteolevate organismide lisamisega, milleks kasutati sama organismide ühendatud proove nagu ristreaktiivsuse analüüsimisel, mis on loetletud ülalolevas tabelis 8. HCV negatiivset plasmaproovi rikastati 4–6 kaupa segatud organismirühmaga ja rikastati ka HCV positiivse kontrollprooviga, mille kontsentratsioon oli 1,4 log₁₀ IU/ml. Olulist segavat mõju ei täheldatud nende kommensaalsete organismide esinemisel, mida näitas minimaalne kvantitatiivne hälve kontrollproovidest, mis ei sisaldanud segavaid aineid.

Analüütiline spetsiifilisus – Segava mõjuga ained, endogeensed ja eksogeensed ained

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay toimivust hinnati HCV kliinilistes plasmaproovides levinud eksogeensete ja endogeensete segavate ainete esinemisel. Nende hulka kuulusid nii verekomponentide liiga kõrged tasemed kui ka levinud viirusevastased ravimid, mis klassifitseeriti tabelis 9. Igat ainet lisati kinnitatud HCV-negatiivsesse inimese plasmasse, mida oli rikastatud 1,7 log₁₀ IU/ml HCV-ga ja proove analüüsiti segava mõju suhtes. Lisaks testiti võimaliku interferentsi suhtes tavapäraselt haigusseisundis plasmat, mida seostatakse C-hepatiidi infektsiooniga. Kõikide testitud ainete korral saadud keskmine kontsentratsioon ja nihe on näidatud tabelis 10. Mitte ükski eksogeenne ega endogeenne aine ei mõjutanud analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay spetsiifilisust.

Tabel 9. Interferentsi testimine – eksogeensed ained (ravimiklass)

	Ravim	Klassifikatsioon		Ravim	Klassifikatsioon
Kogum 1	Sofosbuviir	Otsese toimega HCV-vastased ravimid	Kogum 2	Paritapreviir	HCV NS3/4A proteaasi inhibiitorid
	Ledipasviir	HCV inhibiitor		Ombitasviir	HCV viirusvastane
	Velpatasviir	HCV NS5A inhibiitor		Ritonaviir	HIV proteaasiinhibiitor
	Klaritromütsiin	Antibiootikum		Abakaviirsulfaat	Pöördtranskriptaasi inhibiitor
	Interferoon alfa-2a	Immunomodulaator		Ribaviriin	Immunomodulaator
Kogum 3	Grasopreviir	HCV NS3/4A proteaasi inhibiitorid	Kogum 4	Efavirens	Pöördtranskriptaasi inhibiitor
	Elbasviir	HCV NS5A inhibiitor		Lopinaviir	Proteaasiinhibiitor
	Tenofoviirdisoproksiil	HBV/HIV viirusevastane		Asitromütsiin	Antibiootikum
	Lamivudiin	HBV/HIV viirusevastane		Dolutegraviir	HIV viirusvastane ravim
	Valgantsükloviir	CMV viirusevastane		Simepreviir	HCV NS3/4A proteaasi inhibiitorid
Kogum 5	Emtritsitabiin	HIV viirusvastane ravim			
	Raltegraviir	HIV viirusvastane ravim			
	Amoksitsilliin	Antibiootikum			
	Rilpiviriin	HIV viirusvastane ravim			
	Dasabuviir	Otsese toimega HCV-vastased ravim			
	Glekapreviir	HCV NS3/4A proteaasi inhibiitorid			

Tabel 10. Interferentsi testimine – eksogeensed ja endogeensed ained

Endogeenne	Keskmine kont. log ₁₀ IU/ml	Nihe log ₁₀ IU/ml
Hemoglobiin	1,61	0,28
Triglütseriidid	1,31	-0,02
Bilirubiin	1,47	0,14
Albumiin	1,47	0,14
Eksogeensed (ravimid)	Keskmine kont. log ₁₀ IU/ml	Nihe log ₁₀ IU/ml
Kogum 1: Zidovudiin (ZDV), sakvinaaviir, ritonaviir, klaritromütsiin, interferoon alfa-2a, interferoon alfa-2b	1,48	0,15
Kogum 2: Abakaviirsulfaat, amprenaviir, ribaviriin, entekaviir, fluoksetiin, valatsükloviirvesinikloriid	1,40	0,07
Kogum 3: Tenofoviirdisoproksiil, lamivudiin, gantsükloviir, valgantsükloviir, nevirapiin	1,40	0,07
Kogum 4: Efavirens, lopinaviir, enfuvirtiid, tsiprofloksatsiin, paroksetiin	1,51	0,18
Kogum 5: adefoviir (dipivoksiil), asitromütsiin, indinaviirsulfaat, sertraliin	1,40	0,07
Haigusseisund	Keskmine kont. log ₁₀ IU/ml	Nihe log ₁₀ IU/ml
Tuumavastane antikeha (Antinuclear Antibody, ANA)	1,53	0,18
Süsteemne erütematoosne luupus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	1,29	-0,06
Reumatoidartriit	1,39	0,04
HBV antikehad	1,45	0,10
Alkoholne tsirroos	1,43	0,08
Reumatoidfaktor	1,43	0,08
Mittealkohoolne steatoos (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	1,32	-0,03

Laborisisene täpsus

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay täpsus määrati kindlaks valmistatud 7-liikmelise HCV proovipaneeli analüüsimise kaudu (sisaldas nii HCV Armored RNA kui ka AcroMetrix HCV Control proove) kolmel seadmel NeuMoDx Systems 12 päeva jooksul. Määrati sarjasisene, päevasisene ja süsteemisene täpsus ja üldiseks standardseks hälbeks määrati $\leq 0,26 \log_{10}$ IU/ml. Süsteemide, päevade või testide vahel ei täheldatud olulist erinevusi, nagu on näidatud *tabelis 11*. Kasutajate vahel ei määratud täpsust, kuna kasutaja ei ole proovide töötlemisel süsteemiga NeuMoDx System määrava tähtsusega.

Tabel 11. Laborisisene täpsus – analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay seadmete NeuMoDx Systems abil

	Sihtkont. [log ₁₀ IU/ml]	Kesk. kont. [log ₁₀ IU/ml]	Süsteemisene SD	Päevasisene SD	Sarjasisene SD	Laborisisene (üldine) SD
ARMORED	6	5,95	0,17	0,13	0,10	0,17
	5	4,87	0,20	0,14	0,12	0,20
	3	2,89	0,19	0,17	0,17	0,19
ACROMETRIX	4,4	4,45	0,12	0,10	0,08	0,13
	3,4	3,45	0,12	0,12	0,11	0,13
	2,4	2,41	0,17	0,15	0,15	0,17
	1,4	1,40	0,26	0,25	0,25	0,24

Partiidevaheline reprodutseeritavus

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay partiidevahelist korratavust hinnati, kasutades põhireaktiivide (lüüsimispuhver NeuMoDx Lysis Buffer 3, ekstraheerimisplaadid NeuMoDx Extraction Plates ja testriba NeuMoDx HCV Quant Test Strip) kolme eri partiid. Toimivuse hindamiseks kasutati 7-liikmelist HCV paneeli (sisaldas nii HCV Armored RNA kui ka AcroMetrix HCV Control proove). Testimisel kasutati kolme reaktiivide partiid, mida analüüsiti kolme seadme abil 6 päeva vältel. Analüüsiti partiide siseseid ja vahelisi varieeruvusi ja need tulemused on esitatud *tabelis 12*. Maksimaalne üldine nihe oli $0,24 \log_{10}$ IU/ml ja maksimaalne üldine SD oli $0,33 \log_{10}$ IU/ml. Partiide lõikes ei olnud toimivuses olulist erinevust, kuna kõikide paneeli liikmete kvantifitseerimise väärtused olid tolerantsi määra piires.

Tabel 12. Partiidevaheline korratavus – analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay

	Sihtkont. [log ₁₀ IU/ml]	Kesk. kont. ÜLDINE [log ₁₀ IU/ml]	n (kehtivad tulemused partii kohta)	ABS KALLUTATUS	Partiidevaheline SD	Partiisisene SD	Üldine SD
ARMORED	6	5,76	36	0,24	0,35	0,13	0,37
	5	4,84	36	0,16	0,16	0,22	0,27
	3	2,81	36	0,19	0,31	0,16	0,35
ACROMETRIX	4,4	4,35	36	0,05	0,21	0,11	0,24
	3,4	3,31	36	0,09	0,17	0,11	0,20
	2,4	2,33	36	0,07	0,24	0,13	0,27
	1,4	1,38	36	0,02	0,23	0,13	0,33

Kontrolli tõhusus

Analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay sisaldab SPC2, mis annab teavet protsessi ebaõnnestumise või analüüsi toimimist mõjutava pärssiva toime kohta. Efektiivsust testiti kriitilisi töötusetappide tõrkeid esindavates tingimustes, mis võivad tekkida proovide töötlemise ajal ja mida seadme NeuMoDx System toimimist kontrollivad sensorid *võivad jätta tuvastamata*. Positiivseid ($3 \log_{10}$ IU/ml) ja negatiivseid proove pandi proovile kontrolli olemasolul järgmistes tingimustes: inhibiitori olemasolu, pesureaktiivi kättesaadavuse piiramine ja pesureaktiivi eemaldamata jätmine. Töötusetappide tõrkeid, mis mõjutasid negatiivselt HCV tuvastamist/kvantifitseerimist, peegeldas SPC2 sihtmärk, nagu on näidatud *tabelis 13*. Kõigil testitud juhtudel näidati, et prooviprotsessi kontrolli jälgendas protsessi ebaefektiivsust ja inhibiitorite olemasolu adekvaatselt või eeldatav protsessi ebaefektiivsus ei avaldanud olulist negatiivset mõju SPC2 ega HCV tuvastamisele ja kvantifitseerimisele. Seega, SPC2 abil näidati analüüsi toimimise efektiivset jälgimist seadmes NeuMoDx System.

Tabel 13. Proovi töötlemise kontrolli tõhusus

Testitud töötlemisetapi tõrge	Proovi töötlemise kontrolli amplifikatsioonistaatus	HCV sihtmärgi amplifikatsiooni staatus	Analüüsi tulemus
Presence of Inhibitor (Inhibiitori sisaldus)	Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Unresolved (Lahendamata)
No Wash Delivered (Pesemisreaktiivi ei ole)	Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Not Amplified (Mitteamplifitseeritud)	Unresolved (Lahendamata)
No Wash Blowout (Pesemisreaktiivi väljauhtumist ei toimu)	Amplified (Amplifitseeritud)	Amplified (Amplifitseeritud)	Positive (Positiivne) kvantifitseerimine kontrolli 0,3 log ₁₀ IU/ml ulatuses

Kehtivate tulemuste määr

Kehtivate tulemuste protsendi määramiseks kasutati retrospektiivse analüüsi andmeid, mis saadi seadmete NeuMoDx Systems abil saadud analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay toimimise tulemuste hindamise käigus. Kehtivaid analüüsitulemusi kuvatakse olekutes Positive (positiivne) või Negative (negatiivne); kehtetuid tulemusi võidakse kuvada olekutes Indeterminate (IND) (määramatu) või Unresolved (UNR) (lahendamata) vastavalt sihtmärgi ja proovi protsessi kontrolli amplifikatsiooni olekule. Kuva IND on tavaliselt põhjustatud seadme veast, mille tagajärjel sihtmärgi ja/või protsessisese kontrolli amplifitseerimine ebaõnnestub. Kuva UNR antakse proovidele juhul, kui nii sihtmärgi kui ka protsessisese kontrolli amplifitseerimine ebaõnnestub seadme tõrke tuvastamise puudumisel. Retrospektiivsesse analüüsi kaasati 1962 individuaalse analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemused, mis sisaldasid nii seerumi- kui ka plasmaproovidega saadud andmeid nii seadmega NeuMoDx 288 kui ka NeuMoDx 96 Systems. Tulemuste UNR ja IND tuvastamise määr oli vastavalt 0,61% (12/1962) ja 0,41% (8/1962), mis on vastavuses analüüsi nõuetekohasuse tingimustega. Seega oli analüüsi NeuMoDx HCV Assay kehtivate tulemuste määr eri kliiniliste matriitside ja seadmete NeuMoDx Systems kasutamise korral 95% CI (98,4–99,3) puhul 99,0%.

Ristsaastumine

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay ristsaastumise määr tehti kindlaks HCV proovide kolme partii analüüsimise käigus, milles kõrged positiivsed proovid paigutati vaheldumisi negatiivsete proovidega. Kokku analüüsiti korduses 144 HCV-negatiivset inimese proovi ja korduses 144 kõrge HCV viiruskoormusega 8,2 log₁₀ IU/ml proovi. Kõikide korduses analüüsitud 144 negatiivse proovi tulemused olid negatiivsed, mis näitab, et proovide töötlemise käigus ei tekkinud süsteemis NeuMoDx System ristsaastumist.

Proovimatriksi ekvivalentsus

Proovimatriksi samaväärsuse demonstreerimiseks kasutati etüleendiamiintetraäädikhape (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) kui ka happelise tsitraatdeksotriisi (acid citrate dextrose, ACD) kogumiskatsutitesse plasma valmistamiseks kogutud täisverd. Lisaks tehti analüüsid, et teha kindlaks samaväärsus nii värskete ja külmutatud plasmaproovide (kogutud kahte tüüpi katsutisse) kui ka värskete ja külmutatud seerumiproovide vahel. Värskeid proove säilitati 4 °C juures, kuni neid rikastati nelja eri HCV tasemega ja analüüsiti samaväärsuse suhtes. Seejärel proovid külmutati vähemalt 24 tundi –20 °C juures. Pärast külmutamisperioodi, sulatati proovid üles ja analüüsiti uuesti. Värskeid vs. külmutatud seerumi- ja plasmaproovide kui ka EDTA vs. ACD proovide tulemusi võrreldi samaväärsuse osas regressioonanalüüsi abil. Andmed kinnitasid EDTA ja ACD plasmaproovide, värskete ja külmutatud plasmaproovide ning värskete ja külmutatud seerumiproovide suurepäraselt samaväärsust.

Teostati täiendav test, et näidata analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay toime ekvivalentsust primaarsete proovide ja sekundaarsete proovide vahel. Esmastest proovikatsutitest töödeldi esimesena paneelid HCV negatiivse doonori proovidega, mis olid rikastatud HCV sihtmärgiga (AccuPlex™ Recombinant HIV/HCV Control), ja HCV positiivsete proovidega. Pärast primaarsete katsutite töötlemist alikvoolditi igast proovist järelejäänud plasma või seerum sekundaarsesse proovikatsutisse ja töödeldi uuesti. Esitatud tulemustes ei leitud esmase ja sekundaarse proovikatsuti töötlemise vahel olulisi erinevusi.

Kliinilise meetodi võrdlus

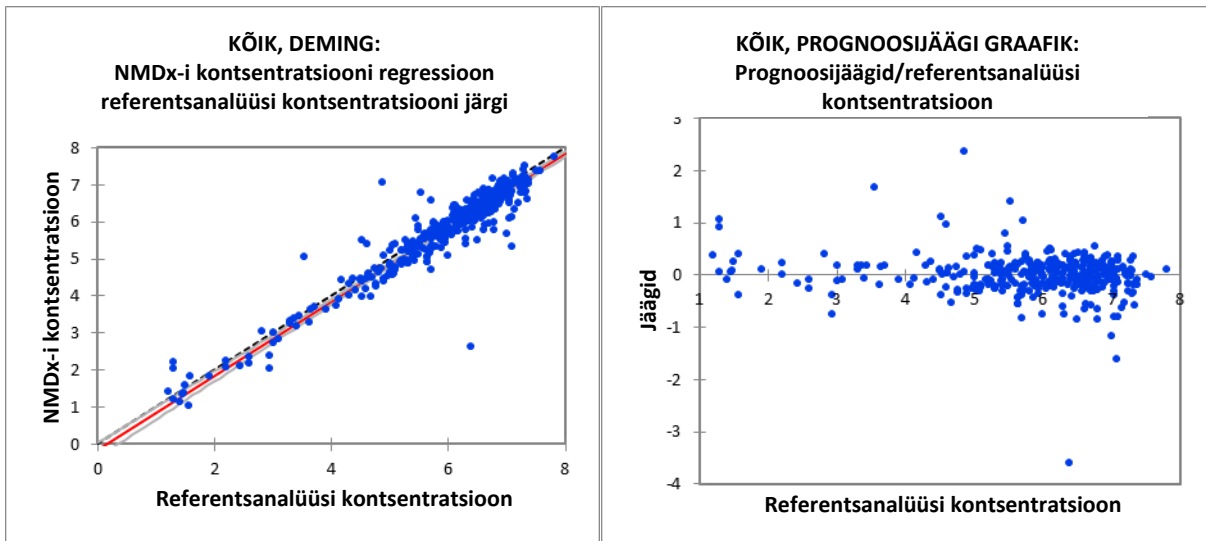
Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay kvalitatiivset ja kvantitatiivset toimivust hinnati FDA/CE-heakskiidetud võrdlusanalüüsides suhtes, testides HBV infektsiooniga patsientide lahendamata plasma kliinilisi proove. Testimine viidi läbi NeuMoDx-i siseselt ühepoolselt pimedas uuringus, kasutades kuult väliselt võrdlusalaborilt saadud kliinilisi proove. Kokku töödeldi analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay abil 323 plasma- ja 336 seerumiproovi (ühepoolselt) pimendatud viisil, kasutades eri seadmeid NeuMoDx Molecular Systems. Nendest proovidest töödeldi 35 plasma- ja 13 seerumiproovi MÖLEMA NeuMoDx 288 ja 96 Molecular Systems seadmega. Mõnda proovi, mis andsid INVALID (KEHTETU) tulemuse, ei saanud uuesti analüüsida vajaliku koguse proovi puudumise tõttu.

Töötlemis- ja süsteemivigu, mis tekkisid eri seadmetega NeuMoDx Molecular Systems esines minimaalselt ja need vastasid kriteeriumitele. Esialgu saadi 4 Indeterminate (IND) (määramatu) tulemust plasma- ja 4 IND tulemust seerumiproovide kohta, mis annab üldiseks algseks IND määraks 1% (95% CI 0,5%–3%) plasmas ja 1% (95% CI 0,4%–3%) seerumis. Algselt saadi 3 UNRESOLVED (UNR) (LAHENDAMATA) tulemust plasma- ja 5 UNR tulemust seerumiproovide kohta, mis annavad üldiseks esinemise määraks 1% (95% CI 0,2%–3%) plasmas ning 1% (95% CI 0,6%–4%) seerumis.

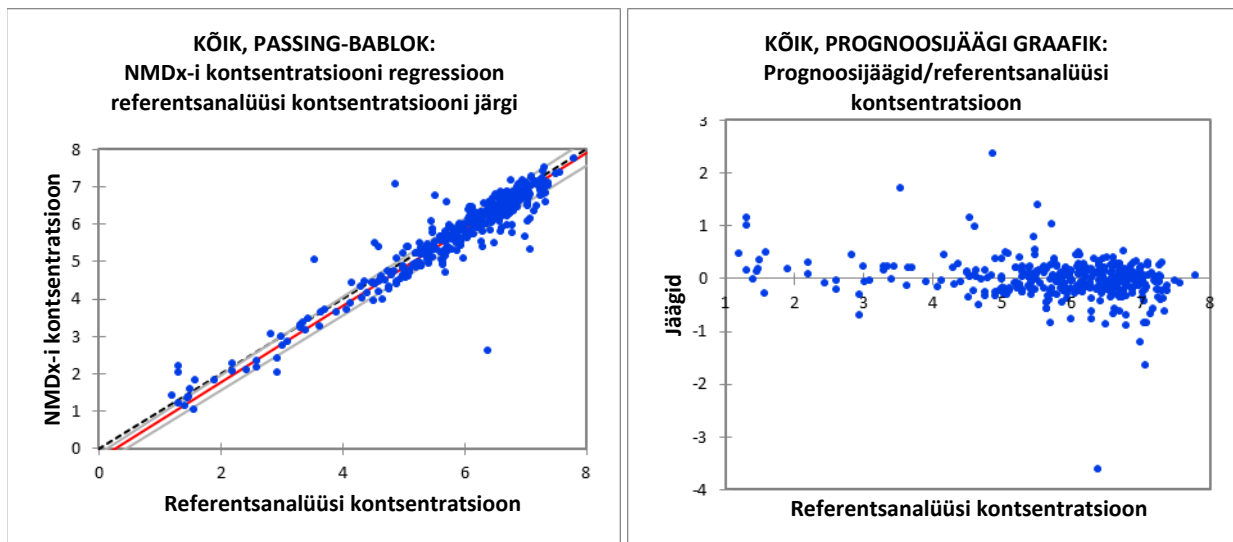
Kehtetute analüüsitud tulemuste (IND/UNR) või „Quantitation Error“ (kvantifitseerimisviga) saamisel analüüsiti proove piisava proovikoguse olemasolu korral uuesti, mõningaid proove lahjendati kehtivate tulemuste saamiseks. Kordusanalüüsimiseks piisavas koguses olnud 13 proovist (lahjendatud VÕI lahendamata) andsid kõik kehtiva tulemuse.

Plasmaproovide 321 kehtivast tulemusest ja seerumiproovide 334 kehtivast tulemusest andsid 206 plasma- ja 154 seerumiproovi tulemuse POSITIVE (positiivne) analüüsiga NeuMoDx HCV Quant Assay vastavate referentsanalüüside poolt määratud kontsentratsiooni väärtustega. Analüüsil NeuMoDx HCV Quant Assay saadud kontsentratsiooniväärtuste ja referentsanalüüside väärtuste korreleerimiseks nii plasma- kui ka seerumiproovides kasutati Demingi ja Passing-Babloki regressioonanalüüse.

Koostati samavääruse diagrammid, et näidata kõigi analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay abil testitud proovide kontsentratsioonide ja võrdlusanalüüsi kontsentratsiooni väärtuste vahelist korrelatsiooni Demingi ja Passing-Babloki regressioonanalüüsi kaudu, mis on esitatud *joonisel 7* ja *joonisel 8*. Demingi regressiooni sobivust näitab tõusu koefitsient 1,00 usaldusvahemikuga 95% (0,97; 1,03) ja lõikepunkt (nihe) -0,16 usaldusvahemikuga 95% (-0,37; 0,06), mis näitab, et analüüsiga NeuMoDx HCV Quant Assay ja võrdlustestidega saadud kontsentratsiooniväärtused on tugevas korrelatsioonis ja sobiva nihkega. Passing-Babloki lineaarset sobivust näitab tõusu koefitsient 1,02 usaldusvahemikuga 95% (0,99; 1,05) ja lõikepunkt (nihe) -0,28 usaldusvahemikuga 95% (-0,43; -0,14), mis näitab, et analüüsiga NeuMoDx HCV Quant Assay ja võrdlustestidega saadud kontsentratsiooniväärtused on tugevas korrelatsioonis ja sobiva nihkega, nagu on näidatud *tabelis 14*.



Joonis 7. Samaväärsus (vasakul) ja prognoosijäägid (paremal) diagrammid – kumulatiivne analüüs (mõlema seadmega NeuMoDx Systems) analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemuste võrdlus referentsanalüüsi tulemustega, KÕIK proovid Demingi regressioonanalüüsi alusel.



Joonis 8. Samaväärsuse (vasakul) ja prognoosijäägi (paremal) diagrammid – kumulatiivne analüüs (mõlema seadmega NeuMoDx Systems) analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay tulemused võrreldes referentsanalüüsi tulemustega, KÕIK proovid Passing-Babloki regressioonanalüüsi alusel.

Tabel 14. Demingi ja Passing-Babloki lineaarse regressiooni analüüside kokkuvõte

	Demingi analüüs		Passing-Babloki analüüs	
	Lõikepunkt	Tõusu koefitsient	Lõikepunkt	Tõusu koefitsient
KUMULATIIVNE (kogu plasma + seerum)	-0,16 95% CI (-0,37; 0,06)	1,00 95% CI (0,97; 1,03)	-0,28 95% CI (-0,43; -0,14)	1,02 95% CI (0,99; 1,05)

Analüüsiga NeuMoDx HCV Quant Assay saadud 655 kehtivast tulemusest 361 esitati võrdlustestidega positiivsena ja 294 negatiivsena. Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay sensitiivsus ja spetsiifilisus arutati kõigi kehtivate kliiniliste proovide andmete abil võrreldes referentsanalüüsiga ja see esitatud tabelis 15. Testitud 361 positiivsest proovist esitas analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay 360 positiivsena, andes sensitiivsuseks 99,7% usaldusvahemikus 95% (98,2–100%). Testitud 294 negatiivsest proovist esitas analüüs NeuMoDx HCV Quant Assay 271 negatiivsena, andes spetsiifilisuseks 92,2% usaldusvahemikus 95% (88,3–94,9%)

Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay samaväärsust demonstreeriti heas korrelatsioonivahel olevate analüüsi toimimise tulemuste põhjal seadme NeuMoDx 288 Molecular System, seadme NeuMoDx 96 Molecular System ja võrdlusanalüüsi nii plasma- kui ka seerumiproovide tulemuste vahel.

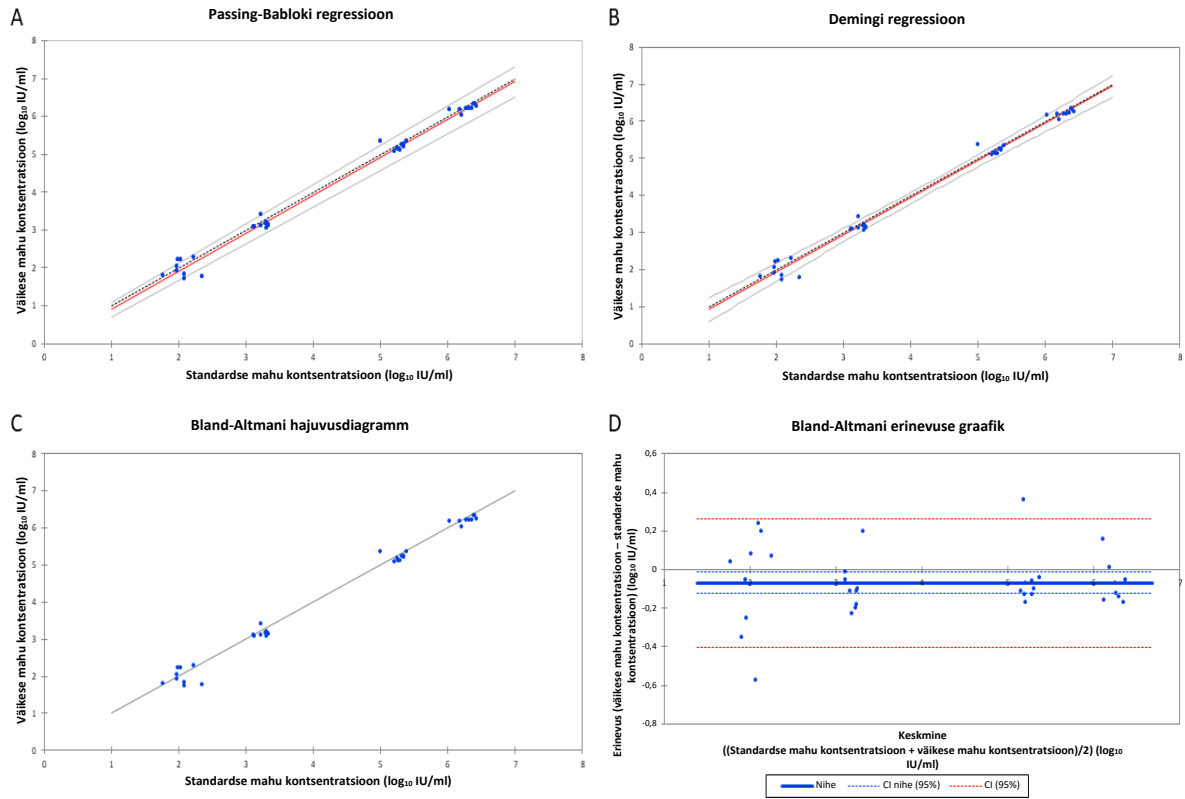
Tabel 15. Kvalitatiivsed meetodi võrdlustulemused analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay ja võrdlusanalüüsi vahel – plasma ja seerum

	Võrdlusanalüüs (POS)	Võrdlusanalüüs (NEG)	KOKKU
NeuMoDx HCV Quant Assay (POS)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
KOKKU	361	294	655
SENSITIIVSUS = 99,7% 95% CI (98,2–100%) *SPETSIIFILISUS = 92,2% 95% CI (88,3–94,9%)			

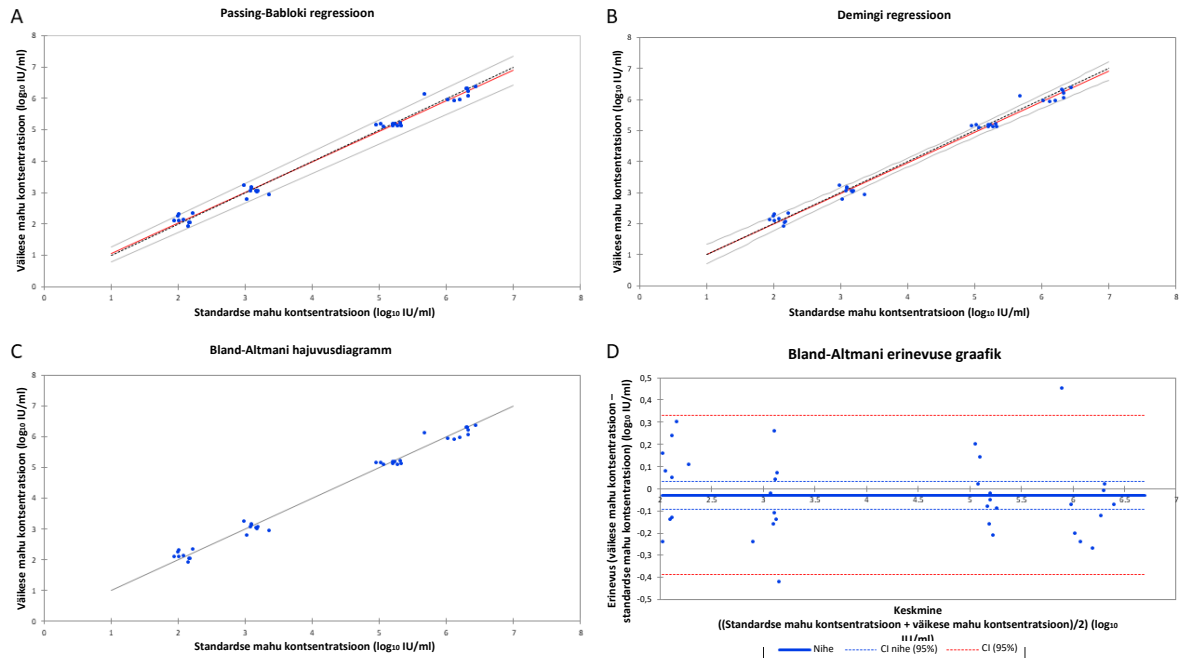
***MÄRKUS.** Analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay LLoQ on 0,9 log₁₀ IU/ml, mis on madalam kui võrdlusanalüüsil, mida kasutati referentsanalüüsina. Järgmiseks tehti analüüs, millest jäeti välja 9 proovi, mille puhul HCV tuvastati NeuMoDx analüüsiga, kuid võrdlusanalüüs andis negatiivse tulemuse. Jättes välja need 9 proovi, arutati analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay sensitiivsus uuesti ja tulemuseks saadi 95,1% 95% CI (91,7–97,2).

Kunstlike proovide testimine – 200 µl proovimahuga töövoog

Kvantitatiivne korrelatsioon 200 µl ja 550 µl proovimahuga töövoogude vahel kinnitati, kasutades paneeli, mis koosnes eraldiseisvatest HCV negatiivsetest plasma- ja seerumiproovidest, mida oli rikastatud nelja teadaoleva tasemega Accuplex HCV kontrollmaterjaliga, mis on jälgitav WHO 5. HCV RNA nukleiinhapetestide rahvusvahelise standardini. Need eraldiseisvad plasma- ja seerumiproovid töödeldi, kasutades nii 550 µl ja 200 µl proovimahuga töövoogusid kokku 324 teostatud testil. NeuMoDx tarkvara poolt 200 µl ja 550 µl proovimahu töövoogude korral kunstliku paneeli kohta esitatud kontsentratsioonide ekvivalentsuse võrdlused teostati eraldiseivate proovide põhjal. Demingi ja Passing-Babloki regressioonanalüüsi tõusud olid plasmas vastavalt 1,003 ja 1,000 lõikepunktidega –0,082 ja –0,085 ja seerumis vastavalt 0,974 ja 0,984 lõikepunktidega 0,086 ja 0,037, mis näitab kahe töötlemismahu töövoogude vahel HCV kvantifitseerimise suurepärasest ühilduvust. Blandi ja Altmani võrdlus näitas kahe töövoog vahel minimaalset nihet. Lisaks oli 200 µl töövoog eeldatava kontsentratsiooni ja esitatud kontsentratsiooni lihtsa lineaarse regressioonanalüüsi tõus 1,0432 ja korrelatsioonikordaja 0,994 (plasma) ning vastavalt 1,0007 ja 0,993 (seerum), mis näitab veelgi analüüsi NeuMoDx HCV Quant Assay 200 µl proovimahu töövoog suurepärasest toimivust. Nende uuringute tulemused on kokku võetud allpool joonisel 9 ja joonisel 10.



Joonis 9. Samaväärsuse diagrammi võrdlused 200 µl proovimahuga töövoa abil saadud kontsentratsioonide ja 550 µl proovimahuga töövooga saadud kontsentratsioonide vahel. A) Passing-Babloki regressioon. B) Demingi regressioon C) Bland-Altman hajuvusdiagramm D) Bland-Altman erinevuse diagramm – plasmaproovid



Joonis 10. Samaväärsuse diagrammi võrdlused 200 µl proovimahuga töövoa abil saadud kontsentratsioonide ja 550 µl proovimahuga töövooga saadud kontsentratsioonide vahel. A) Passing-Babloki regressioon. B) Demingi regressioon C) Bland-Altmani hajuvusdiagramm D) Bland-Altman erinevuse diagramm – seerumiproovid

VIITED

1. Rachel H. Westbrook, Geoffrey Dusheiko. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology Update: Hepatitis C*, Volume 61, Issue 1, Supplement, November 2014, Pgs S58-S68.
2. Annual Epidemiological Report for 2016, Hepatitis C, European Centre for Disease Prevention and Control. *Hepatitis C*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018. (<https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/pdfs/2016HepSurveillanceRpt.pdf>)
3. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2: 161–76.
4. Surveillance for Viral Hepatitis – United States, 2016, CDC. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/index.htm>
5. Diagnosis and management of hepatitis C virus-infected children. Javeri R. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2011;30(11):983 – 985.
6. American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) and Infectious Disease Society of America (IDSA), HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C, Sept 21, 2017. (www.hcvguidelines.org)
7. Centers for Disease Control (CDC), Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians Recommendations and Reports MMWR / Vol. 62 / May 7, 2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014

KAUBAMÄRGID


NeuMoDx™ ja NeuDry™ on ettevõtte NeuMoDx Molecular, Inc. kaubamärgid.
 AcroMetrix™ on ettevõtte Thermo Fisher Scientific kaubamärk.
 Armored RNA® on registreeritud Asuragen, Inc. kaubamärk
 BD Vacutainer® on Becton, Dickinson, and Company registreeritud kaubamärk
 BD, PPT™, SST™ on Becton, Dickinson and Company kaubamärgid
 TaqMan® on ettevõtte Roche Molecular Systems, Inc. registreeritud kaubamärk.


Kõik muud tootenimed, kaubamärgid ja registreeritud kaubamärgid, mis võivad esineda selles dokumendis, on nende vastavate omanike omandid.


SÜMBOLITE SELETUSED

R only Ainult retsepti alusel


 Tootja

 *In vitro* diagnostiline meditsiiniseade


 Volitatud esindaja Euroopa Ühenduses

 Katalooginumber


 Partii kood

 Kasutamise lõppkuupäev

 Temperatuuri piir

 Mitte korduskasutada

 Sisaldab piisavalt <n> testi jaoks

 Vaadake kasutusjuhendit

 Ettevaatust

 Bioloogilised ohud

 CE-märgis



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
 The Netherlands



Tehniline tugi / järelevalve analüüs: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents