

REF 201400 NeuMoDx™ CMV Quant Test Strip**R only**

POZOR: Samo za izvoz v ZDA

IVD Za diagnostično uporabo *in vitro* s sistemoma NeuMoDx 288 in NeuMoDx 96 Molecular SystemsPosodobljena navodila najdete na: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 288 Molecular System; št. dela 40600108

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 96 Molecular System; št. dela 40600317

NAMEN UPORABE

Test NeuMoDx CMV Quant Assay je avtomatiziran *in vitro* test amplifikacije nukleinske kisline za kvantifikacijo DNK citomegalovirusa (CMV) v primerkih človeške plazme za genotipe CMV od gB1 do gB4 pri posameznikih, okuženih z virusom CMV. Test NeuMoDx CMV Quant Assay, implementiran v sistemih NeuMoDx 288 Molecular System in NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System(s)) vključuje avtomatizirano ekstrakcijo DNK za izolacijo ciljne nukleinske kisline iz primerka ter verižno reakcijo polimeraze v realnem času (polymerase chain reaction, PCR) za targetiranje visoko ohranjenih sekvenc v genomu citomegalovirusa.

Test NeuMoDx CMV Quant Assay je namenjen za *in vitro* kvantifikacijo DNK citomegalovirusa (CMV) v svežih in zamrznjenih primerkih človeške plazme z uporabo NeuMoDx 288 in NeuMoDx 96 Molecular Systems. Ta test je namenjen za uporabo skupaj s klinično predstavitvijo in drugimi laboratorijskimi označevalci napredka bolezni za klinično upravljanje in nadzor okužbe s CMV. Test ni namenjen kot presejalni test za prisotnost CMV v krvi ali krvnih produktih.

POVZETEK IN RAZLAGA

Za pripravo plazme se lahko uporabi človeška polna kri, zbrana v epruvetah za sterilno zbiranje krvi, ki vsebuje EDTA ali ACD kot agent za antikoagulacijo. Med pripravo na testiranje se za začetek obdelave plazma, v epruveti za vzorce, združljivi s NeuMoDx System, naloži v NeuMoDx System z uporabo namenskega prenosnika za epruvete s primerki. Za vsak primerek se zmeša 550 µl alikvota vzorca plazme s pufrum NeuMoDx Lysis Buffer 1, sistem NeuMoDx System pa samodejno izvede vse korake, ki so potrebni za ekstrakcijo nukleinske kisline, pripravi izolirano DNK za amplifikacijo s PCR v realnem času ter amplificira in zazna produkte amplifikacije, če so prisotni (deli tarče genoma CMV v visoko ohranjenih regijah). NeuMoDx CMV Quant Assay vključuje kontrolo obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) DNK, ki pomaga nadzorovati prisotnost potencialno inhibitornih snovi ter napak NeuMoDx System ali reagenta, s katerimi se lahko srečamo med postopkom ekstrakcije in amplifikacije.

CMV je splošni virus DNK z dvojno vijačnico iz družine človeški herpes virusov, ki napadajo ljudi vseh starostnih obdobj.ocene kažejo, da bo do 40. leta starosti s CMV okužena več kot polovica prebivalstva.¹ CMV se širi s telesnimi tekočinami, kot je slina, urin, kri, solze, semenska tekočina in materino mleko. Imunokompetentni posamezniki, ki so okuženi s CMV, so običajno asimptomatski, okužba z virusom pa je resna za dojenčke in ljudi z oslabilnim imunskim sistemom. Noseče mame lahko CMV prenesejo na svoje nerojene otroke in med drugimi razvojnimi in motoričnimi motnjami povzročijo prirojeno CMV okvaro sluha. CMV je glavni patogen za paciente s kompromitiranim imunskim sistemom, vključno s prejemniki pri presaditvi parenhimskih organov, prejemniki matičnih krvnih celic, pacienti, okuženi s HIV ter pacienti, ki so zdravljeni z imunomodulacijskimi zdravili.² Nadzor virusne obremenitve s CMV je primarno uporabljen pri populacijah s kompromitiranim imunskim sistemom, kjer povzroča številne morbidnosti, vključno s pljučnico, boleznimi prebavil, hepatitisom in encefalitisom, kot tudi večjo verjetnost zavračanja organov in drugimi oportunističnimi okužbami.

Diagnoza okužbe s CMV ne temelji samo na testiranju nukleinske kisline (Nucleic Acid Testing, NAT); testiranje NAT se uporablja poleg testiranja antigenov, ki vključuje barvanje polimorfonuklearnih levkocitov (PMN) za zgođen strukturno nižji protein matrice v CMV, kot tudi drugi simptomi, ki jih lahko doživlja pacient. Testiranje virusne obremenitve s CMV se uporablja rutinsko za določanje, kdaj je potrebna protivirusna terapija, kot tudi za nadzor učinkovitosti takih terapij³. Medtem ko so trenutne smernice za upravljanje in zdravljenje okužb s CMV pri posameznikih s kompromitiranim imunskim sistemom nejasne glede časa pričetka protivirusne terapije, vse zahtevajo konstanten nadzor virusne obremenitve, ko se protivirusna terapija prične za blaženje resnih stranskih učinkov zdravil pri takih populacijah.

NAČELA POSTOPKA

Za izvedbo analize s testom NeuMoDx CMV Quant Assay na sistemu NeuMoDx System se uporablja testne trakove NeuMoDx CMV Quant Test Strip, kalibratorje NeuMoDx CMV Calibrators, zunanje kontrole NeuMoDx CMV External Controls, pufer NeuMoDx Lysis Buffer 1 in reagente NeuMoDx za splošno uporabo. Test NeuMoDx CMV Quant Assay združuje samodejno ekstrakcijo DNK, amplifikacijo in zaznavanje s PCR v realnem času. Primerki polne krvi se za pripravo plazme zbirajo v epruvetah EDTA ali ACD. Primerek plazme se v epruveti, združljivi s sistemom NeuMoDx System, postavi na prenosnik za epruvete s primerki, ki se nato naloži na NeuMoDx System za obdelavo. Dodatno posredovanje upravljavca ni potrebno.

Sistemi NeuMoDx Systems za samodejno izvajanje lize celic, ekstrakcijo DNK in odstranjevanje inhibitorjev uporabljajo kombinacijo toplote, litičnih encimov in ekstrakcijskih reagentov. Sproščene nukleinske kisline ujamejo paramagnetni delci. Delci z vezanimi nukleinskimi kislinami se vstavijo v kartušo NeuMoDx Cartridge, kjer so nevezane komponente, ki niso DNK, dodatno izprane z reagentom za izpiranje NeuMoDx Wash Reagent, vezana DNK pa se eluira z reagentom za sprostitvev NeuMoDx Release Reagent. Sistemi NeuMoDx Systems nato uporabijo izluženo DNK za rehidracijo lastniških amplifikacijskih reagentov NeuDry™, ki vsebujejo vse potrebne elemente za amplifikacijo CMV-specifičnih in SPC1 tarč s PCR. Pri rekonstituciji reagentov PCR NeuDry sistem NeuMoDx System izvrže mešanico, pripravljeno za PCR v NeuMoDx Cartridge. Amplifikacija in zaznava sekvenc DNK kontrole in tarče (če so prisotne) se izvede v območju komore PCR kartuše NeuMoDx Cartridge. NeuMoDx Cartridge je zasnovana tudi, da vsebuje amplikon po PCR v realnem času, ki posledično izloči tveganje kontaminacije po amplifikaciji.

Amplificirane tarče so zaznane v realnem času s kemijo v šobi za hidrolizo (splošno imenovano kemija TaqMan®) z uporabo fluorogenih oligonukleotidnih molekul šobe, specifičnih za amplikone za njihove ustrezne tarče.

TaqMan šobe so sestavljene iz fluorofora, ki je kovalentno vezan na 5'-koncu oligonukleotidne šobe in dušilec na 3'-koncu. Dokler je šoba nedotaknjena, sta fluorofor in dušilec v bližini, zato molekula dušilca zaduši fluorescenco, ki jo fluorofor oddaja prek Försterjevega resonančnega prenosa energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Šobe TaqMan so zasnovane tako, da se prilegajo znotraj regije DNK, ki jo amplificira specifični komplet primerjev. Ko polimeraza DNK Taq razširi primer in sintetizira novo verigo, aktivnost eksonukleaze v smeri 5' proti 3' koncu polimeraze Taq DNA degradira šobo, ki se prilega predlogi. Degradacija šobe sprosti fluorofor in zlomi bližino dušilca ter tako premaga učinek dušenja zaradi FRET ter omogoči zaznavanje fluorescenc fluorofora. Nastali fluorescenčni signal, zaznan v kvantitativnem PCR termopomnoževalniku sistema NeuMoDx System je neposredno sorazmeren s sproščenim fluoroforom, možno je vzpostaviti korelacijo s količino prisotne tarče DNK.

Šoba TaqMan, označena s fluoroforom (vzbujanje: 490 nm in emisija: 521 nm) na koncu 5', temni dušilec na koncu 3' pa se uporablja za zaznavanje DNK CMV. Šoba TaqMan je za zaznavo kontrole obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) označena z drugačnim fluorescentnim barvilom (vzbujanje: 535 nm in emisija: 556 nm) na koncu 5' in s temnim dušilcem na koncu 3'. Programska oprema sistema NeuMoDx System nadzoruje fluorescentni signal, ki ga oddajajo šobe TaqMan na koncu vsakega amplifikacijskega cikla. Ko je amplifikacija končana, programska oprema sistema NeuMoDx System analizira podatke in sporoči končni rezultat (POSITIVE-POZITIVEN/NEGATIVE-NEGATIVEN/INDETERMINATE-NEDOLOČEN/UNRESOLVED-NEREŠEN). Če je rezultat POZITIVEN, programska oprema NeuMoDx System zagotovi tudi kvantitativno vrednost, povezano z vzorcem oziroma pošlje sporočilo, če je izračunana koncentracija znotraj omejitev koncentracije.

REAGENTI/POTROŠNI MATERIAL

Priloženi materiali

REF.	Vsebina	Testi na enoto	Testi na paket
201400	NeuMoDx CMV Quant Test Strip <i>Posušeni reagenti PCR, ki vsebujejo CMV-specifične šobe in primerje TaqMan, SPC1-specifična šoba in primerji TaqMan.</i>	16	96

Potrebni reagenti in potrošni materiali, ki niso priloženi (na voljo ločeno pri družbi NeuMoDx)

REF.	Vsebina
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Posušeni paramagnetni delci, litični encim in kontrole obdelave vzorca</i>
800400	NeuMoDx CMV Calibrators <i>Kompleti visokih in nizkih kalibratorjev CMV za enkratno uporabo za določanje veljavnosti standardne krivulje</i>
900401	NeuMoDx CMV External Controls <i>Kompleti pozitivnih in negativnih kontrol CMV za enkratno uporabo za določanje dnevne veljavnosti testa NeuMoDx CMV Quant Assay</i>
400400	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Konice Hamilton CO-RE / CO-RE II (300 µl) s filtri
235905	Konice Hamilton CO-RE / CO-RE II (1000 µl) s filtri

Potrebni instrumenti

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

OPOZORILA IN VARNOSTNI UKREPI

- NeuMoDx CMV Quant Test Strip je namenjen samo diagnostični uporabi *in vitro* s sistemi NeuMoDx Systems.
- Ne uporabljajte reagentov ali potrošnega materiala po navedenem roku uporabe.
- Ne uporabljajte reagentov, če je varnostni pečat prelomljen oziroma če je embalaža ob prejemu poškodovana.
- Ne uporabljajte potrošnega materiala ali reagentov, če je zaščitna vrečka ob prejemu odprta ali poškodovana.
- Veljavna testna kalibracija (ki se ustvari z obdelavo visokih in nizkih kalibratorjev NeuMoDx CMV Calibrators [REF 800400]) mora biti na voljo, preden je možno ustvariti testne rezultate za klinične vzorce.
- Zunanje kontrole NeuMoDx CMV External Control [REF 900401] je treba obdelati vsakih 24 ur med testiranjem s testom NeuMoDx CMV Quant Assay.

- Minimalni volumen primerka znaša 1 ml plazme EDTA/ACD pri uporabi prenosnika za 32 epruvet; volumen pod 1 ml lahko privede na napake sistema NeuMoDx System.
- Izvedba testa CMV na primerkih, shranjenih pri neprimerni temperaturi oziroma po preteku obdobja za shranjevanje lahko pri uporabi testnih trakov NeuMoDx CMV Quant Test Strip proizvede neveljavne ali napačne rezultate.
- Vselej preprečite kontaminacijo katerega koli reagenta in potrošnega materiala z mikrobi ali dezoksiribonukleazo (DNaza). Priporočena je uporaba sterilnih pipet za prenos brez Dnaze. Za vsak primerek uporabite novo pipeto.
- Kartuše NeuMoDx Cartridge po amplifikaciji ne prijemajte oziroma je ne odlomite, da se izognete kontaminaciji. Kartuš NeuMoDx Cartridge v nobenem primeru ne odstranjujte iz zabojnikov za biološke odpadke (NeuMoDx 288 Molecular System) oziroma koša za biološke odpadke (NeuMoDx 96 Molecular System). Kartuša NeuMoDx Cartridge je zasnovana tako, da preprečuje kontaminacijo.
- V primerih, kjer teste PCR z odprtimi epruvetami izvaja tudi laboratorij, je potrebno zagotoviti, da testni trakovi NeuMoDx CMV Quant Test Strip, dodatni potrošni material in reagenti, potrebni za testiranje, osebna zaščitna oprema kot so rokavice in laboratorijskih plašči ter NeuMoDx System niso kontaminirani.
- Pri ravnanju z reagenti in potrošnim materialom NeuMoDx uporabljajte čiste nitrilne rokavice brez pudra. Bodite previdni, da se ne dotaknete zgornje površine NeuMoDx Cartridge, tesnilne folije površine testnega traku NeuMoDx CMV Quant Test Strip ali ekstrakcijske plošče NeuMoDx Extraction Plate oziroma zgornje površine NeuMoDx Lysis Buffer 1; s potrošnim materialom in reagenti ravnajte tako, da se dotikate samo stranskih površin.
- Varnostni listi (Safety Data Sheets, SDS) so na voljo na zahtevo.
- Po izvedbi testa si temeljito umijte roke.
- Pipete ne uporabljajte z usti. Ne kadite, pijte ali jejte v območjih, kjer ravnate s primerki ali reagenti.
- S primerki vedno ravnajte, kot da so kužni, in v skladu z varnimi postopki v laboratorijih, kot so tisti, opisani v *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ in dokumentu CLSI M29-A4.⁵
- Neuporabljene reagente in odpadke zavržite v skladu z državnimi, zveznimi, okrajnimi in lokalnimi predpisi.

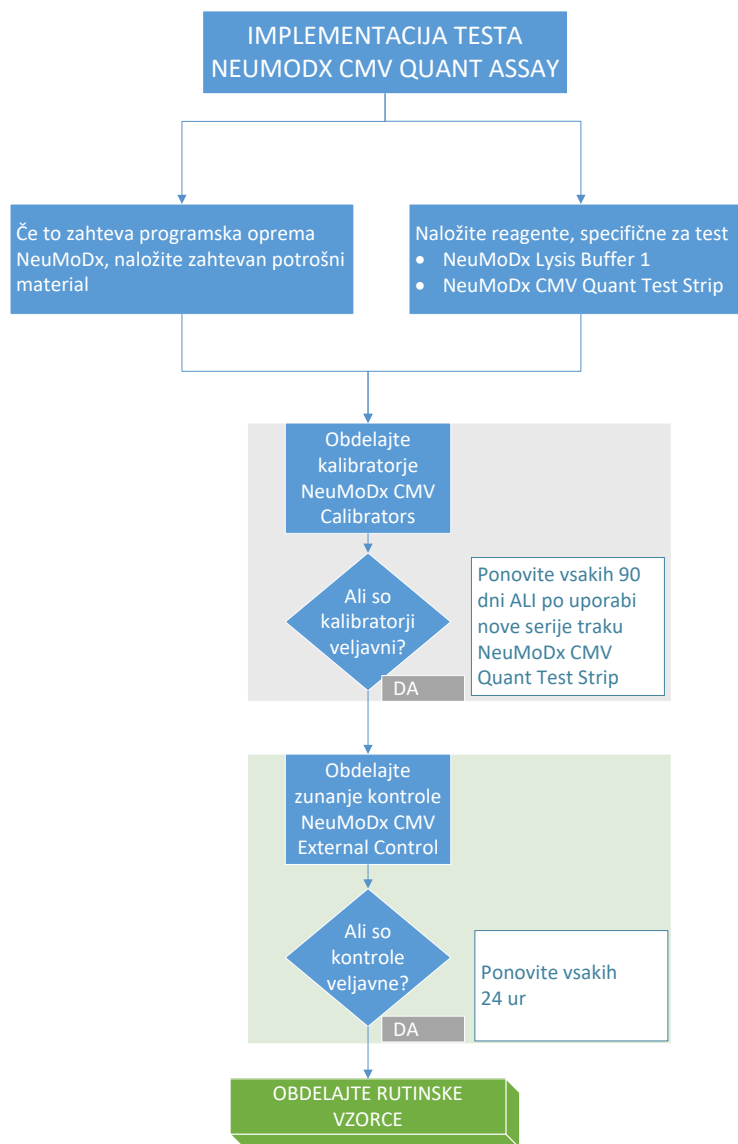
SHRANJEVANJE, RAVNANJE IN STABILNOST IZDELKA

- Vsi reagenti in potrošni material NeuMoDx (z izjemo zunanjih kontrol in kalibratorjev) so v prvotni embalaži stabilni pri temperaturi od 18 do 23°C v navedenem roku veljavnosti, ki se nahaja neposredno na oznaki izdelka.
- Testni trak NeuMoDx CMV Quant Test Strip, naložen v sistem NeuMoDx System, je stabilen 14 dni; programska oprema sistema NeuMoDx System bo zahtevala odstranitev testnih trakov, ki so bili v sistemu NeuMoDx System v uporabi več kot 14 dni, prav tako bo potrebno odpreti in v NeuMoDx System naložiti nove testne trakove NeuMoDx CMV Quant Test Strips.
- Kalibratorji in kontrole NeuMoDx niso kužni, vendar jih je po uporabi potrebno odvreči v laboratoriju med odpadke z biološko nevarnostjo, saj vsebujejo material tarče po obdelavi v sistemu, kar lahko v primeru neustreznega ravnanja povzroči kontaminacijo.

ZBIRANJE, TRANSPORT IN SHRANJEVANJE PRIMERKOV

1. Z vsemi primerki ravnajte, kot da lahko prenašajo povzročitelje okužb.
2. V primarnih epruvetah ne zamrzujte polne krvi ali katerikoli primerkov.
3. Za pripravo primerkov plazme je treba plazmo zbrati v sterilnih epruvetah, ki za antikoagulate uporabljajo EDTA ali ACD. Upoštevajte navodila proizvajalca epruvet za odvzem primerkov.
4. Polna kri, odvzeta v zgoraj navedenih napravah, je lahko pred pripravo plazme shranjena in/ali v transportu do 24 ur pri temperaturi 2°C do 25°C. Pripravo plazme je treba izvesti v skladu z navodili proizvajalca.
5. Pripravljeni primerki plazme lahko ostanejo v sistemu NeuMoDx System do 8 ur pred pričetkom obdelave. Če je potrebno daljše obdobje shranjevanja, priporočamo, da primerke shranite v hladilniku ali zamrzovalniku.
6. Pripravljeni primerki plazme so lahko shranjeni pri temperaturi med 2 in 8 °C največ 7 dni pred testiranjem ter največ 8 ur pri sobni temperaturi.
7. Pripravljeni primerki so lahko shranjeni pri temperaturi ≤ -20 °C do 26 tednov za plazmo pred obdelavo; vzorci plazme pred uporabo ne smejo iti skozi kot 2 cikla zamrzovanja/odtajanja.
 - a. Če so vzorci zamrznjeni, se morajo najprej popolnoma odtaliti pri sobni temperaturi (15–30 °C); zavržite, da ustvarite enakomerno porazdeljen vzorec.
 - b. Ko so zamrznjeni vzorci odtajani, je testiranje treba izvesti v roku 8 ur.
8. Če bodo primerki poslani, jih je treba zapakirati in označiti v skladu z veljavnimi državnimi in/ali mednarodnimi predpisi.
9. Primerke jasno označite in navedite, da so namenjeni za testiranje CMV.
10. Nadaljujte na razdelek *Priprava testa*.

Celoten postopek za implementacijo testa NeuMoDx CMV Quant Assay je povzet spodaj na *sliki 1*.



Slika 1: Potek dela pri implementaciji testa NeuMoDx CMV Quant Assay

NAVODILA ZA UPORABO

Priprava testa

1. Oznako s črtno kodo primerka namestite na epruveto s primerkom, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System.
2. S pipeto za prenos prenesite ≥ 1 ml plazme v (sekundarno) epruveto s primerkom s črtno kodo, če uporabljate prenosnik za 32 epruвет, oziroma > 2 ml, če uporabljate prenosnik za 24 epruвет. Potrebna je previdnost, da se strdki iz vzorca plazme ne prenesejo v epruveto s primerkom. Uporabite drugo pipeto za prenos za vsak primerek.
3. Sekundarna epruveta mora biti skladna z naslednjimi specifikacijami za epruветe, združljivimi s sistemom NeuMoDx System, glede na prenosnik za epruветe s primerki, ki se uporabljajo za obdelavo.
 - Prenosnik za 32 epruвет: med 11 mm in 14 mm premera ter med 60 mm in 120 mm višine
 - Prenosnik za 24 epruвет: med 14,5 mm in 18 mm premera ter med 60 mm in 120 mm višine

Delovanje sistema NeuMoDx™ System

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistemov NeuMoDx 288 in 96 Molecular Systems (št. dela 40600108 in 40600317)

1. Enega ali več prenosnikov testnih trakov NeuMoDx System Test Strip carrier napolnite s testnimi trakovi NeuMoDx CMV Quant Test Strip in uporabite zaslon na dotik, da jih naložite v sistem NeuMoDx System.
2. Če to zahteva programska oprema NeuMoDx System, dodajte potrebno količino potrošnega materiala v vsebnike potrošnega materiala NeuMoDx System in uporabite zaslon na dotik, da prenosnik(e) naložite v NeuMoDx System.
3. Če to zahteva programska oprema NeuMoDx System, zamenjajte NeuMoDx Wash Reagent, NeuMoDx Release Reagent, spraznite odpadke pri polnjenju oziroma zabojnik z biološko nevarnimi odpadki, kot je ustrezno.
4. Če to zahteva programska oprema sistema NeuMoDx System, obdelajte kalibratorje calibrators [REF 800400] in/ali zunanje kontrole external controls [REF 900401], kot je potrebno. Dodatne informacije glede kalibratorjev in kontrol so na voljo v razdelku *Obdelava rezultatov*.
5. Epruveta(e) s primerkom/kalibratorjem/kontrolo naložite v standardne prenosnike za 32 epruvet in poskrbite, da so pokrovi odstranjeni z vseh epruvet s primerkom.
6. Prenosnik za epruvete s primerki postavite na katerikoli odprt položaj na polici samodejnega nalagalnika in uporabite zaslon na dotik, da prenosnik naložite v sistem NeuMoDx System. S tem se bo pričela obdelava naloženih primerkov za določen(e) test(e).

OMEJITVE

- Trak NeuMoDx CMV Quant Test Strip se lahko uporablja samo v sistemih NeuMoDx Systems.
- Delovanje testnega traku NeuMoDx CMV Quant Test Strip je bilo potrjeno za primerke plazme, pripravljene iz odvzete polne krvi z antikoagulantom EDTA/ACD; uporaba testnih trakov NeuMoDx CMV Quant Test Strip z drugimi tipi kliničnih primerkov ni bila ocenjena, zato karakteristike delovanja tega testa za druge tipe primerkov niso znane.
- Ker je zaznavanje CMV odvisno od števila prisotnih organizmov v vzorcu, so zanesljivi rezultati odvisni od ustreznega zbiranja, ravnanja in shranjevanja primerkov.
- Kalibratorji in zunanje kontrole morajo biti obdelani po priporočilih v priloženih navodilih in pred obdelavo rutinskih kliničnih vzorcev, če to zahteva programska oprema sistema NeuMoDx System.
- Do napačnih rezultatov lahko pride zaradi nepravilnega odvzema, obravnave ali shranjevanja primerkov, tehnične napake ali zamenjave epruvet s primerki. Poleg tega se lahko pojavijo lažni negativni vzorci, če je število virusnih delcev v vzorcu pod mejo zaznave testa NeuMoDx CMV Quant Assay.
- Sistem NeuMoDx System lahko uporablja izključno osebje, ki je bilo usposobljeno za uporabo sistema NeuMoDx System.
- Če se ne amplifikirata niti tarča CMV niti tarča SPC1, bo javljen neveljaven rezultat (Indeterminate (Nedoločen) ali Unresolved (Nerešeno)), test pa bo potrebno ponoviti.
- Če je rezultat testa NeuMoDx CMV Quant Assay pozitiven, kvantifikacijska vrednost pa je pod mejo kvantifikacije, bo NeuMoDx System javil, če je bil zaznan CMV *pod* spodnjo mejo kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ali *nad* zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- Če je bil zaznan CMV pod spodnjo mejo kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), je možno test NeuMoDx CMV Quant Assay ponoviti (po želji) z drugim alikvotom primerka.
- V primeru, da je zaznan CMV nad zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantification, ULoQ), je možno test NeuMoDx CMV Quant Assay ponoviti z razredčenim alikvotom prvotnega primerka. Priporočena je raztopina 1:100 ali 1:1000 v CMV-negativni plazmi ali redčilu Basematrix 53 (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Koncentracijo prvotnega primerka je možno izračunati po naslednjem postopku:

$$\text{Koncentracija prvotnega primerka} = \log_{10}(\text{faktor redčenja}) + \text{dobljena koncentracija razredčenega vzorca}.$$
- Občasna prisotnost inhibitorjev PCR v plazmi lahko privede na napake pri kvantifikaciji sistema; če se to pojavi, priporočamo ponovitev testa z istim primerkom, ki je razredčen v redčilu Basematrix v razmerju 1:10 ali 1:100.
- Pozitiven rezultat ne pomeni nujno prisotnosti živih organizmov. Vseeno pa pozitiven rezultat predvideva prisotnost DNK citomegalovirusa.
- Izbris ali mutacije v ohranjenih regijah, ki so tarča testa NeuMoDx CMV Quant Assay, lahko vplivajo na zaznavo oziroma lahko privedejo do napačnih rezultatov pri uporabi testnih trakov NeuMoDx CMV Quant Test Strip.
- Rezultati testa NeuMoDx CMV Quant Assay se naj uporabljajo kot dodatek kliničnim opazovanjem in drugim podatkom, ki so na voljo zdravniku; test ni namenjen diagnozi okužbe.
- Priporočene so dobre laboratorijske prakse, vključno z menjavo rokavic med ravnanjem s primerki pacientov, da preprečite kontaminacijo.

OBDELAVA REZULTATOV

Razpoložljive rezultate si je mogoče ogledati oziroma natisniti na zavihku »Results« (Rezultati) v oknu Results (Rezultati) na zaslonu na dotik sistema NeuMoDx System.

Rezultate testa NeuMoDx CMV Quant Assay samodejno ustvari programska oprema sistema NeuMoDx System z uporabo algoritma za odločanje in parametrov za obdelavo rezultatov, navedenih v definicijski datoteki testa NeuMoDx CMV Assay Definition File (CMV ADF). Rezultat testa NeuMoDx CMV Quant Assay je lahko negativen, pozitiven s sporočeno koncentracijo CMV, Positive above ULoQ (pozitiven nad ULoQ), Positive below LLoQ (pozitiven pod LLoQ), Indeterminate (nedoločen) ali Unresolved (nerešen), na podlagi statusa amplifikacije tarče in nadzora obdelave vzorca. Rezultati so sporočeni na podlagi algoritma za določanje v preglednici 1.

Preglednica 1: Algoritem za odločanje v testu NeuMoDx CMV Quant Assay

Rezultat	CMV	Kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Pozitivno)	$[2 \leq Ct \leq 9 \text{ AND (IN) } EPR > 2 \text{ AND (IN) } EP \geq 1500]$ ALI $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (IN) } EP \geq 1500]$	Ni na voljo
Positive (Pozitivno), nad zgornjo mejo kvantifikacije [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (\log_{10} IE/ml)	[CONC] (KONC) > 8,0 \log_{10} IE/ml, NO QUANT (NI KVANT.)	Ni na voljo
Positive (Pozitivno), pod spodnjo mejo kvantifikacije [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (\log_{10} IE/ml)	[CONC] (KONC) < 1,3 \log_{10} IE/ml, NO QUANT (NI KVANT.)	Ni na voljo
Negative (Negativno)	N/A (ni na voljo) OR (ALI) $[2 \leq Ct < 9 \text{ AND (IN) } EPR \leq 2]$ ALI $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (IN) } EP < 1500]$ OR (ALI) Ct > 41	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) ($28 \leq Ct \leq 34$) and (in) EP ≥ 2000
Indeterminate (Nedoločen)	NOT AMPLIFIED /Systems Errors Noted (NI AMPLIFICIRANO/zabeležene napake sistema)	
Unresolved (Nerešeno)	NOT AMPLIFIED/No System Errors Noted (NI AMPLIFICIRANO/ sistemske napake niso zabeležene)	

EP = End Point Fluorescence (fluorescenca na končni točki) (po popravku izhodišča); EPR = End Point Fluorescence Ratio (razmerje fluorescence na končni točki); Ct = Cycling Threshold (Mejna točka cikla);
 Quant = izračunana količina prisotnega CMV, izražena v \log_{10} IE/ml. Glejte testno kalkulacijo spodaj.

Testna kalkulacija

- Za vzorce znotraj območja kvantifikacije testa NeuMoDx CMV Quant Assay je koncentracija DNK CMV v vzorcih izračunana z uporabo shranjene standardne krivulje, skupaj s koeficientom kalibracije.
 - »Koeficient kalibracije« se izračuna na podlagi rezultatov NeuMoDx CMV calibrators, ki so bili obdelani za določanje veljavnosti standardne krivulje za določeno serijo testnih trakov NeuMoDx CMV Quant Test Strip na specifičnem NeuMoDx System.
 - Koeficient kalibracije je vključen v končno določitev koncentracije DNA CMV.
- Rezultati testa NeuMoDx CMV Quant Assay so izraženi v \log_{10} IE/ml.
- Dobljena kvantifikacija neznanih vzorcev je sledljiva do 1. Mednarodnega standarda WHO za CMV.

Testna kalibracija

Za kvantifikacijo DNA CMV v primerkih je potrebna veljavna kalibracija, ki temelji na standardni krivulji. Za ustvarjanje veljavnih rezultatov je potrebno dokončati testno kalibracijo z uporabo kalibratorjev, ki jih zagotavlja podjetje NeuMoDx Molecular, Inc.

Zunanji kalibratorji

- NeuMoDx CMV Calibrators so na voljo v kompletu [REF 800400] in vsebujejo tarče CMV v kapsulah, ki niso kužne, in so pripravljene v redčilu Basematrix.
- Komplet kalibratorjev CMV je potrebno obdelati z vsako novo serijo testnih trakov NeuMoDx CMV Quant Test Strips, oziroma če je v NeuMoDx System naložena nova definicijska datoteka testa CMV, oziroma če je trenutni komplet kalibratorjev presegel rok veljavnosti (trenutno nastavljen na 90 dni), oziroma v primeru spremembe programske opreme NeuMoDx System.
- Programska oprema NeuMoDx System bo uporabnika obvestila, kdaj je kalibratorje potrebno obdelati; nova serija testnih trakov ne more biti uporabljena za testiranje, dokler kalibratorji niso bili uspešno obdelani.

4. Veljavnost kalibracije je določena na naslednji način:
 - a) Za določanje veljavnosti mora biti obdelan komplet dveh kalibratorjev – visokega in nizkega.
 - b) Za ustvarjanje veljavnih rezultatov morata vsaj 2 od 3 ponovljenih vzorcev prikazati rezultate znotraj predhodno določenih parametrov. Nazivna tarča nizkega kalibratorja je $3 \log_{10}$ IE/ml in nazivna tarča visokega kalibratorja je $5 \log_{10}$ IE/ml.
 - c) Koeficient kalibracije se izračuna za upoštevanje pričakovane variacije med serijami testnih trakov; ta koeficient kalibracije se uporabi pri določanju končne koncentracije CMV.
5. Če sta en ali oba kalibratorja neuspešna pri preverjanju veljavnosti, ponovite obdelavo neuspešnega kalibratorja/neuspešnih kalibratorjev z novo vialo. Če en kalibrator ne prestopi veljavnosti, je možno ponoviti samo neuspešen kalibrator, saj sistem od uporabnika ne zahteva ponovne izvedbe obeh kalibratorjev.
6. Če kalibrator(ji) ne prestopi(jo) testa veljavnosti dvakrat zapored, se obrnite na NeuMoDx Molecular, Inc.

Nadzor kakovosti

Lokalni predpisi običajno določajo, da je laboratorij odgovoren za nadzorne postopke, ki spremljajo točnost in preciznost celotnega analitičnega postopka, in mora določiti število, vrsto in pogostost preskušanja kontrolnih materialov z uporabo preverjenih specifikacij učinkovitosti za nespremenjen, odobren testni sistem.

Zunanje kontrole

1. Zunanje kontrolne materiale, ki vsebujejo nekužne tarče CMV v kapsulah v redčilu Basematrix za pozitivne kontrole, dobavlja NeuMoDx Molecular, Inc., v kompletu, ki vsebuje NeuMoDx CMV External Controls [REF 900401].
2. Pozitivne in negativne zunanje kontrole je treba obdelati enkrat na 24 ur. Če komplet veljavnih zunanjih kontrol ne obstaja, bo sistem NeuMoDx System od uporabnika zahteval, da te kontrole obdela, preden bo lahko pripravil rezultate vzorca.
3. Če so zahtevane zunanje kontrole, vzemite komplet zunanjih kontrol iz zamrzovalnika in pustite vialo na sobni temperaturi (15–30 °C), dokler se popolnoma ne odtajajo. Nežno zavrtite, da zagotovite homogenost.
4. Z uporabo zaslona na dotik in ko je prenosnik za epruvete s primerki postavljen na polico samodejnega nalagalnika, naložite stekleničke s pozitivnimi in negativnimi kontrolami v sistem NeuMoDx System. Sistem NeuMoDx System bo prepoznal črtno kodo in začel obdelovati epruvete s primerki, razen če reagentov oziroma potrošnega materiala, potrebnega za testiranje, ni na voljo.
5. Veljavnost zunanjih kontrol bo sistem NeuMoDx System ocenil na podlagi pričakovanega rezultata. Pozitivna kontrola bi morala prikazati pozitiven rezultat CMV in negativna kontrola bi morala prikazati negativen rezultat CMV.
6. Odstopajoče rezultate glede zunanjih kontrol je treba obravnavati na naslednji način:
 - a) Positive (Pozitivno) rezultat testa pri negativnem kontrolnem vzorcu nakazuje težavo s kontaminacijo primerka.
 - b) Negative (Negativno) rezultat testa za pozitivni kontrolni vzorec lahko kaže na težavo z reagentom ali instrumentom.
 - c) V obeh zgoraj navedenih primerih ponovite neuspele NeuMoDx CMV External Control s sveže odtajano vialo kontrole, ki ni prestala testa veljavnosti.
 - d) Če pozitivna NeuMoDx CMV External Control še naprej javlja Negative (negativno) rezultat, se obrnite na službo za stranke podjetja NeuMoDx.
 - e) Če negativna zunanja kontrola NeuMoDx CMV External Control še naprej javlja Positive (Pozitivno) rezultat, skušajte izločiti vse vire morebitne kontaminacije, vključno z menjavo VSEH reagentov, preden se obrnete na službo za stranke podjetja NeuMoDx.

(Notranje) kontrole obdelave vzorca

Eksogena kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) je vključena v NeuMoDx Extraction Plate ter je z vsakim vzorcem vključena v celotni postopek ekstrakcije nukleinske kisline ter amplifikacije PCR v realnem času. Primerji in šobe, specifični za SPC1, so tudi vključeni v vsak testni trak NeuMoDx CMV Quant Test Strip, s čimer je omogočena zaznava prisotnosti nadzora obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) poleg tarče DNK CMV (če je prisotna) preko multipleksa PCR v realnem času. Zaznava amplifikacije SPC1 programske opreme sistema NeuMoDx System omogoča nadzor učinkovitosti ekstrakcije DNK in postopka amplifikacije PCR.

Neveljavni rezultati

Če test NeuMoDx CMV Quant Assay, izveden na sistemu NeuMoDx System, ne ustvari veljavnega rezultata, bo na podlagi tipa napake, ki se je pojavila, javljen kot Indeterminate (Nedoločen) (IND) ali Unresolved (Nerešeno) (UNR).

Rezultat IND (Nedoločen) bo javljen, če je med obdelavo vzorca zaznana napaka sistema NeuMoDx System. V primeru, da je sporočen rezultat IND (Nedoločen), je priporočen ponovni test.

Rezultat UNR bo javljen, če ni zaznana veljavna amplifikacija DNK CMV ali SPC1, kar nakazuje morebitno napako reagenta ali prisotnost inhibitorjev. V primeru, da je javljen rezultat UNR (Nerešeno), je ponovni test možno izvesti kot prvi korak. Če ponovni test ni uspešen, lahko uporabite razredčen primerek, da ublažite učinke morebitne inhibicije v vzorcu.

KARAKTERISTIKE DELOVANJA

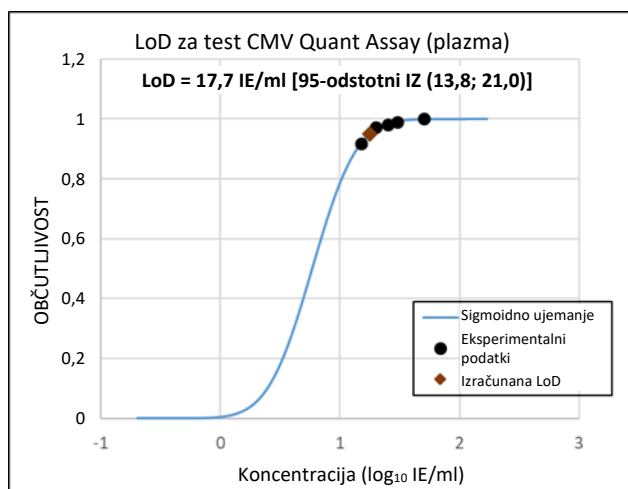
Analitična občutljivost – meja zaznave z uporabo standarda WHO

Analitična občutljivost testa NeuMoDx CMV Quant Assay je določena s testiranjem negativnih primerkov in serije razredčenja 1. Mednarodnega standarda WHO v presejani negativni človeški plazmi za določanje meje zaznave (Limit of Detection, LoD) na NeuMoDx Systems. Meja zaznave (Limit of Detection, LoD) je bila definirana kot najnižja ciljna stopnja, zaznana pri stopnji 95 %, kot je bilo določeno z analizo tipa Probit. Študija je bila izvedena v obdobju 3 dni na več sistemih z več serijami reagentov NeuMoDx. Vsak sistem je obdelal 18 ponovljenih vzorcev na dan pri vsaki stopnji razredčenja. Stopnje zaznave so prikazane v *preglednici 2*.

Preglednica 2: Pozitivne stopnje zaznavanja za določanje LoD testa NeuMoDx CMV Quant Assay

Ciljna koncentracija [IE/ml]	Ciljna koncentracija [\log_{10} IE/ml]	PLAZMA		
		Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja
50	1,70	108	108	100,0 %
30	1,48	108	107	99,1 %
25	1,40	108	106	98,1 %
20	1,30	108	105	97,2 %
15	1,18	108	99	91,7 %
NEG	---	108	0	0,0 %

Meja zaznave (Limit of Detection, LoD) testa NeuMoDx CMV Quant Assay v plazmi za varianto gB1 je bila določena pri 17,7 IE/ml (1,25 \log_{10} IE/ml) s 95-odstotnim intervalom zaupanja (IZ) 13,8–21,0 IE/ml, (1,14–1,32 \log_{10} IE/ml) [slika 2]. LoD po vseh genotipih znaša 20,0 IE/ml (1,30 \log_{10} IE/ml), kot je določila analiza stopnje zadetkov.



Slika 2: Analiza stila probit, uporabljena za določanje LoD testa NeuMoDx CMV Quant Assay v vzorcih plazme

Analitična občutljivost – kvantifikacijska meja – spodnja meja kvantifikacije (LLOQ)

Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) je definirana kot najnižja ciljna stopnja, pri kateri je dosežena zaznava > 95 % IN kjer je TAE \leq 1,0. Za določanje spodnje meje kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) je bila izračunana skupna analitična napaka (Total Analytical Error, TAE) za vsako od ciljnih stopenj CMV, ki so poročale zaznavo > 95 % kot del izračuna meje zaznave (Limit of Detection, LoD). TAE je opredeljena na naslednji način:

$$\text{TAE} = \text{odstopanje} + 2 * \text{SD (Westgard Statistic)}$$

Odstopanje je absolutna vrednost razlike med povprečjem izračunane koncentracije in pričakovano koncentracijo. SD se nanaša na standardno deviacijo kvantificirane vrednosti vzorca.

Združeni rezultati za 5 stopenj za primerke plazme s CMV (varianta gB1), uporabljene v študiji LLOQ, so prikazani v *preglednici 3*. Na podlagi tega niza podatkov in predhodno določene LoD, je bila LLOQ določena pri 20,0 IE/ml (1,30 \log_{10} IE/ml) in potrjen za vse genotipe.

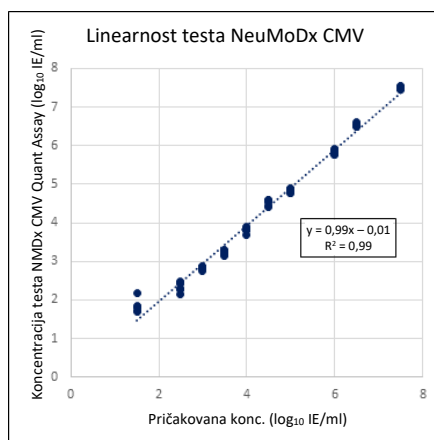
Preglednica 3: Spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) testa NeuMoDx CMV Quant Assay, z odstopanjem in TAE

Ciljna konc. [IE/ml]	Ciljna konc. [log ₁₀ IE/ml]	Plazma				
		Povprečna konc. [log ₁₀ IE/ml]	Zaznava (%)	SD	Odstopanje	TAE
50	1,70	1,75	100,0	0,16	0,05	0,37
30	1,48	1,62	99,1	0,24	0,14	0,62
25	1,40	1,56	98,1	0,19	0,17	0,55
20	1,30	1,57	97,2	0,22	0,27	0,72
15	1,18	1,52	91,7	0,21	0,35	0,78

Na podlagi rezultatov teh študij sta bili LoD in LLoQ testa NeuMoDx CMV Quant Assay določeni pri 20,0 IE/ml [1,30 log₁₀ IE/ml].

Linearnost in določanje zgornje meje količinskega določanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearnost in zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) testa NeuMoDx CMV Quant Assay sta bila določena v plazmi s pripravo serij redčenja z uporabo tarče CMV NeuMoDx v kapsuli in Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) z vzpostavljen sledljivostjo do 1. Mednarodnega standarda WHO. 9-članska plošča je bila pripravljena v združeni CMV-negativni plazmi, s katero je bila ustvarjena plošča, ki bi pokrivala razpon koncentracije 8–1,7 log₁₀ IE/ml. Zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) testa NeuMoDx CMV Quant Assay je bila določena pri 8,0 log₁₀ IE/ml. Koncentracije testa CMV, ki jih poroča NeuMoDx System, v primerjavi s pričakovanimi vrednostmi, so predstavljene na *sliki 3*.



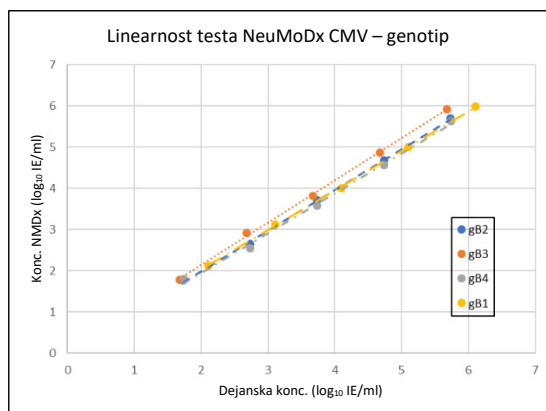
Slika 3: Linearnost testa NeuMoDx CMV Quant Assay

Linearnost med genotipi

Linearnost testa NeuMoDx CMV Quant Assay v štirih genotipih CMV (gB1, gB2, gB3 in gB4) je bila določena s testiranjem petih različnih koncentracij vsakega genotipa CMV, pripravljenega v združeni CMV-negativni plazmi. Stopnje tarč CMV, testiranih v tej študiji, so bile odvisne od koncentracije izvornega primerka in so se zato razlikovale med genotipi. Študija je bila izvedena s testiranjem 6 ponovljenih vzorcev vsakega od 4 genotipov pri 5 koncentracijah. Linearnost za štiri genotipe CMV je prikazana v *preglednici 4* in na *sliki 4*.

Preglednica 4: Linearnost testa NeuMoDx CMV Quant Assay med genotipi

Genotip	Enačba linearnosti y = kvantifikacija NeuMoDx CMV Assay x = pričakovano količinsko določanje	R ²
gB1	y = 0,960x + 0,103	0,994
gB2	y = 0,989x + 0,009	0,996
gB3	y = 1,023x + 0,099	0,967
gB4	y = 0,968x + 0,004	0,992



Slika 4: Linearnost testa NeuMoDx CMV Quant Assay med genotipi

Analitična specifičnost – navzkrižna reaktivnost

Analitična specifičnost je bila prikazana s presejanjem 35 organizmov, ki jih za navzkrižno reaktivnost običajno najdemo v primerkih krvi/plazme, kot tudi v vrstah, ki so filogenetsko podobne CMV. Organizmi so bili pripravljene v skupinah po 5–6 organizmov ter testirani pri visoki koncentraciji. Testirani organizmi so prikazani v preglednici 5. Navzkrižna reaktivnost pri testiranih organizmih ni bila opažena, kar potrjuje 100 % analitično specifičnost testa NeuMoDx CMV Quant Assay.

Preglednica 5: Patogeni, uporabljeni za prikaz analitične specifičnosti

Netarčni organizmi					
Poliomavirus (virus BK)	Adenovirus tipa 5	Virus herpes simpleks tipa 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Virus Epstein-Barr	Virus hepatitisa C	Virus herpes simpleks tipa 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Človeški herpes virus tipa 6	Parvovirus B19	Virus varicella zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Človeški herpes virus tipa 7	Virus JC	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Človeški herpes virus tipa 8	Človeški papilomavirus 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus hepatitisa B	Človeški papilomavirus 18	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Analitična specifičnost – moteče snovi, komezalni organizmi

Test NeuMoDx CMV Quant Assay je bil ocenjen glede interference v prisotnosti neciljnih organizmov z uporabo istih skupin organizmov, pripravljenih za testiranje navzkrižne reaktivnosti in navedenih zgoraj v preglednici 5. Negativna plazma CMV je bila obogatena z organizmi, združenimi v skupinah po 4–7 ter obogatena tudi s tarčo CMV pri koncentraciji $3 \log_{10}$ IE/ml. V prisotnosti teh komezalnih organizmov niso opazili nobenih pomembnih interferenc, kar kaže minimalni odklon kvantifikacije od kontrolnih primerkov, ki niso vsebovali motečega agenta.

Analitična specifičnost – moteče snovi, endogene in eksogene snovi

Test NeuMoDx CMV Quant Assay je bil ocenjen v prisotnosti tipičnih eksogenih in endogenih motečih snovi, s katerimi se srečujemo v primerkih klinične plazme s CMV. Vsebovale so nenavadno visoke stopnje krvnih komponent, pa tudi splošna protivirusna zdravila, ki so razvrščena v preglednici 6. Vsaka snov je bila dodana presejani CMV-negativni človeški plazmi, obogateni z $3 \log_{10}$ IE/ml CMV, vzorci pa so bili analizirani glede motenj. Poleg tega je bila pred morebitnimi motnjami testirana tudi plazma s splošnimi boleznimi, povezana z okužbo s CMV. Povprečna koncentracija in odstopanje vseh testiranih snovi v primerjavi s kontrolnimi vzorci, obogatenimi z isto ravno CMV, sta navedena v preglednici 7. Nobena od eksogenih in endogenih snovi je vplivala na specifičnost testa NeuMoDx CMV Quant Assay.

Preglednica 6: Testiranje interference – eksogene snovi (klasifikacije zdravil)

Skupina	Ime zdravila	Klasifikacija	Skupina	Ime zdravila	Klasifikacija
Skupina 1	Azatioprin	Imunosupresiv	Skupina 4	Trimetoprim	Antibiotik
	Ciklosporin	Imunosupresiv		Vankomicin	Antibiotik
	Foskarnet	Protivirusno zdravilo (Herpesviridae)		Takrolimus	Imunosupresiv
	Ganciklovir	Protivirusna zdravila (CMV)		Everolimus	Imunosupresiv
	Valganciklovir hidroklorid	Protivirusna zdravila (CMV)		Kalijev klavulanat	Antibiotik
Skupina 2	Prednizon	Kortikosteroid/immunosupresiv	Skupina 5	Famotidin	Antagonist histaminskih receptorjev
	Cidofovir	Protivirusna zdravila (CMV)		Sulfametoksazol	Antibiotik
	Cefotetan	Antibiotik (širokega spektra)		Valaciklovir	Protivirusno zdravilo (Herpesviridae)
	Cefotaksim	Antibiotik (širokega spektra)		Letermovir	Protivirusna zdravila (CMV)
	Flukonazol	Antimikotik		Dinatrijev tikarcilin	Antibiotik
Skupina 3	Mikofenolat mofetil	Imunosupresiv	Leflunomid	Imunosupresiv	
	Natrijev mikofenolat	Imunosupresiv			
	Piperacillin	Antibiotik			
	Sirolim/rapamicin	Imunosupresiv			
	Tazobaktam	Modificiran antibiotik			

Preglednica 7: Testiranje interference – eksogeni in endogeni agenti

Endogena	Povprečna konc.	Odstopanje
	log ₁₀ IE/ml	log ₁₀ IE/ml
Hemoglobin	2,97	0,07
Trigliceridi	3,03	0,13
Bilirubin	3,01	0,11
Albumin	2,88	-0,02
Eksogeni (zdravila)	Povprečna konc.	Odstopanje
	log ₁₀ IE/ml	log ₁₀ IE/ml
Skupina 1: Azatioprin, ciklosporin, foskarnet, ganciklovir, valganciklovir hidroklorid	2,88	-0,02
Skupina 2: Prednizon, cidofovir, cefotetan, cefotaksim, flukonazol	2,91	0,01
Skupina 3: Mikofenolat mofetil, natrijev mikofenolat, piperacillin, sirolim/rapamicin, tazobaktam	2,98	0,08
Skupina 4: Trimetoprim, vankomicin, takrolimus, everolimus, kalijev klavulanat	3,05	0,15
Skupina 5: Famotidin, sulfametoksazol, letermovir, valaciklovir, dinatrijev tikarcilin, leflunomid	2,87	-0,03
Stanje bolezni	Povprečna konc.	Odstopanje
	log ₁₀ IE/ml	log ₁₀ IE/ml
Antinuklearno protitelo (Antinuclear Antibody, ANA)	2,90	0,00
Sistemiški eritematozni lupus (SLE)	3,04	0,14
Revmatoidni artritis	2,99	0,09

Natančnost znotraj laboratorija

Natančnost testa NeuMoDx CMV Quant Assay je bila določena s testiranjem 3 ponovljenih vzorcev 4-članske plošče primerkov CMV, pripravljenih s pozitivno kontrolo Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) dvakrat dnevno, z uporabo dveh sistemov NeuMoDx 288 Systems in enega sistema NeuMoDx 96 System v obdobju 12 dni. Opredeljena je bila natančnost znotraj izvedbe, znotraj dneva in znotraj sistema, skupni standardni odklon pa je bil določen pri $\leq 0,15 \log_{10}$ IE/ml. Med sistemi, dnevi ali izvedbami je bila prikazana odlična natančnost, kot je prikazano v *preglednici 8*. Natančnost med upravljavci ni bila določena, saj upravljavec ne igra pomembne vloge pri obdelavi vzorcev z uporabo sistema NeuMoDx System.

Preglednica 8: Natančnost znotraj laboratorija – test NeuMoDx CMV Quant Assay na sistemih NeuMoDx System

Koncentracija tarče CMV [log ₁₀ IE/ml]	Povprečna konc. CMV [log ₁₀ IE/ml]	SD znotraj sistema	SD znotraj dneva	SD znotraj izvajanja	Skupna SD (znotraj laboratorija)
5,7	5,64	0,09	0,09	0,07	0,13
4,7	4,58	0,10	0,10	0,08	0,14
3,7	3,60	0,09	0,09	0,07	0,12
2,7	2,62	0,13	0,13	0,10	0,15

Ponovljivost med serijami

Ponovljivost med serijami testa NeuMoDx CMV Quant Assay je bila določena z uporabo treh različnih serij ključnih reagentov – NeuMoDx CMV Lysis Buffer 1, ekstrakcijskih plošč NeuMoDx Extraction Plates in testnih trakov NeuMoDx CMV Quant Test Strips. Za oceno delovanja je bila uporabljena 4-članska plošča CMV, pripravljena s kontrolo CMV Exact. Testiranje se je izvedlo s tremi serijami reagentov na treh sistemih v obdobju 6 dni. Variacija znotraj serije in med serijami je bila analizirana, rezultati pa so predstavljeni v *preglednici 9*. Maksimalno celotno odstopanje je znašalo 0,12 log₁₀ IE/ml in maksimalna skupna SD je bila 0,39 log₁₀ IE/ml. Izvedena ekvivalenca je bila prikazana v vseh serijah, saj je bila kvantifikacija vseh članov plošče znotraj specifikacije tolerance.

Preglednica 9: Ponovljivost med serijami – test NeuMoDx CMV Quant Assay

Koncentracija tarče CMV [log ₁₀ IE/ml]	Povprečna konc. CMV [log ₁₀ IE/ml]	N (Veljavni rezultati na serijo)	Odstopanje	Med SD serijo	SD znotraj serije	Skupna SD
5,7	5,65	36	0,05	0,27	0,15	0,31
4,7	4,63	36	0,07	0,22	0,13	0,26
3,7	3,58	36	0,12	0,34	0,18	0,39
2,7	2,64	36	0,06	0,12	0,14	0,18

Učinkovitost kontrole

SPC1 je vključen v test NeuMoDx CMV Quant Assay za poročanje o napakah v korakih postopka ali oviranja, ki bi vplivalo na izvedbo testa. Učinkovitost je bila testirana v pogojih, reprezentativnih za kritične napake v korakih postopka, ki bi se lahko pojavile med obdelavo vzorca in ki jih nadzorni senzorji sistema NeuMoDx System *morda ne bi zaznali*. Pozitivni (pri 3 log₁₀ IE/ml) in negativni primerki so bili izzvani v prisotnosti kontrole v naslednjih pogojih: prisotnost inhibitorja, brez dovajanja raztopine za izpiranje in brez izpihanja po izpiranju. Neučinkovitosti v procesu, ki so negativno vplivale na zaznavo/kvantifikacijo CMV, so bile prezrcaljene z delovanjem tarče SPC1, kot je prikazano v *preglednici 10*. V vseh testiranih instancah je bilo prikazano, da je kontrola obdelave vzorca neučinkovitosti v postopku ter prisotnost inhibitorjev nadzoroval zadovoljivo oziroma da pričakovana neučinkovitost postopka ni imela bistvenega negativnega učinka na zaznavo SPC1, niti na zaznavo in kvantifikacijo CMV. Zato se je SPC1 izkazal kot uspešen pri učinkovitem nadzoru delovanja testa na sistemu NeuMoDx System.

Preglednica 10: Učinkovitost kontrole obdelave vzorca

Testirana napaka koraka postopka	Status amplifikacije kontrole obdelave vzorca 1	Status amplifikacije tarče CMV	Rezultat testa
Presence of Inhibitor (Prisotnost inhibitorja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Delivered (Brez izpiranja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Blowout (Brez izpihanja po izpiranju)	Amplified (Amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	Positive (Pozitivna) kvantifikacija znotraj 0,3 log ₁₀ IE/ml kontrole

Stopnja veljavnih rezultatov

Za določitev odstotka veljavnih rezultatov je bila uporabljena retrospektivna analiza podatkov, pridobljenih med oceno delovanja NeuMoDx CMV Assay na sistemih NeuMoDx System. Veljavni testni rezultati bodo imenovani pozitivni ali negativni; neveljavni testni rezultati se lahko objavijo kot Indeterminate (IND; nedoločljivi) ali Unresolved (Nerešeno) (UNR), na podlagi statusa amplifikacije tarče in kontrole obdelave vzorca. Rezultat IND (Nedoločeno) običajno povzroči napaka instrumenta, ki privede do napake tarče in/ali nadzora notranjega postopka za amplifikacijo. Rezultat UNR (Nerešeno) je vzorcem določen, če se tako tarča kot interna kontrola ne amplificirata, pri tem pa ni zaznana napaka instrumenta. V retrospektivno analizo je bilo vključenih 1.100 posameznih rezultatov testa NeuMoDx CMV Quant Assay, ki je vključevala podatke, pridobljene tako na sistemih NeuMoDx 288 kot NeuMoDx 96. Stopnja UNR je bila določena pri 0,91 % (10/1.100), stopnja IND pa pri 0,36 % (4/1.100); s tem so bili doseženi kriteriji za sprejemljivost analize. Zato je bila stopnja veljavnih rezultatov testa NeuMoDx CMV Assay v sistemih NeuMoDx Systems določena pri 98,7 % s 95-odstotnim IZ (97,9–99,2).

Navzkrižna kontaminacija

Stopnja navzkrižne kontaminacije za test NeuMoDx CMV Quant Assay je bila določena s testiranjem treh sklopov primerkov CMV, z izmenjujoče visoko pozitivnimi in visoko negativnimi primerki. Skupno je to vključevalo testiranje 108 ponovljenih vzorcev CMV-negativne plazme in 108 ponovljenih vzorcev obogatene plazme CMV pri 6,0 log₁₀ IE/ml. Vseh 108 ponovljenih vzorcev negativnega primerka je bilo določenih kot negativnih, kar prikazuje, da se med obdelavo vzorca na NeuMoDx System navzkrižna kontaminacija ni pojavila.

Ekvivalenca matrice primerka

Testiranje je bilo izvedeno za dokaz ekvivalence matrice primerka med polno krvjo, zbrano v epruvetah za pripravo plazme, ki vsebujejo etilendiamin tetraacetno kislino (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA), in tistih, ki vsebujejo kislinsko citratno dekstrozo (Acid Citrate Dextrose, ACD). Izvedeno je bilo dodatno testiranje, s katerim je bila določena ekvivalenca med svežimi in zamrznjenimi primerki plazme (zbrane v dveh tipih epruвет). Sveži primerki so bili shranjeni pri 4 °C, dokler niso bili obogateni s tremi stopnjami CMV in testirani glede ekvivalence. Nato so bili vzorci zamrznjeni vsaj za 24 ur pri -20°C. Za tem obdobjem hranjenja v zamrznjenem stanju so bili primerki odtajani in ponovno testirani. Rezultati svežih in zamrznjenih primerkov plazme kot tudi EDTA v primerjavi z ACD so bili primerjani glede ekvivalence z analizo regresije. Podatki so prikazali odlično ekvivalenco med primerki plazme z EDTA in ACD ter primerki sveže in zamrznjene plazme, z nakloni znotraj 0,02 od 1,0 in zelo nizkim odstopanjem (prestrežanje), kot je predstavljeno v preglednici 11 spodaj.

Preglednica 11: Ekvivalenca matrice primerka

Zahteva parametra	ACD proti K2EDTA		Sveže proti zamrznjenemu	
	Sveže	Zamrznjeno	ACD	EDTA
Naklon [0,9-1,1]	1,000	0,982	1,014	1,000
Prestrežanje [$<0,5 \log_{10}$ IE/ml]	-0,050	0,018	-0,061	0,020
Vrednost $p > 0,05$	0,848	0,644	0,895	0,631

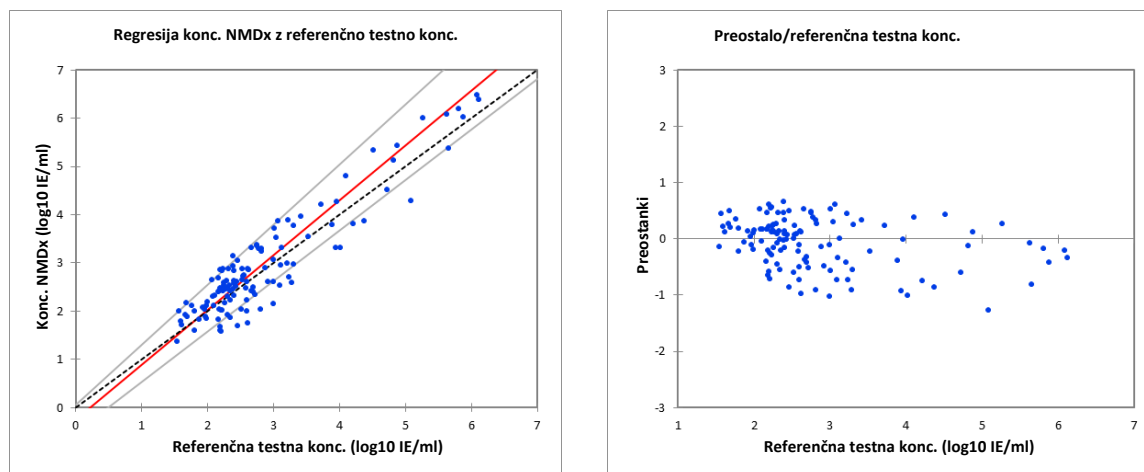
Primerjava klinične metode

Kvantitativno delovanje testa NeuMoDx CMV Quant Assay je bilo ocenjeno v primerjavi s primerjalnimi testi, odobrenimi s strani FDA/CE, kjer so bili testirani nerazredčeni klinični primerki pacientov, okuženih s CMV. Testiranje je bilo izvedeno interno v podjetju NeuMoDx, in sicer z eno slepo študijo kliničnih preostalih primerkov brez identifikacije, pridobljenih od štirih zunanjih referenčnih laboratorijev. Skupno je bilo z uporabo testa NeuMoDx CMV Quant Assay na (enojni) slepi način v več molekularnih NeuMoDx Systems obdelanih 284 primerkov plazme.

Napake obdelave in sistema, dobljene v molekularnih NeuMoDx Systems, so bile minimalne in so ustrezale kriterijem. Skupaj so bili za vzorce pridobljeni 3 rezultati Indeterminate (IND; nedoločeno), kar je privedlo do skupne začetne stopnje IND 1 % pri s 95-odstotnem IZ (0,27–3,32 %). Za ponovno obdelavo teh 3 primerkov v sklopu normalnega poteka dela je bil volumen premajhen. Prvotno je bilo pridobljenih 10 rezultatov Unresolved (Nerešeno) (UNR) rezultatov, nato pa je test CMV Quant Assay za rezultate UNR priporočil postopek za raztopino 1:10 v redčilu Basematrix, in po ponovitvi testa so bili ob ustreznem redčenju dobljeni veljavni rezultati za vseh 10 vzorcev UNR. Zato je bila skupna stopnja napake pri obdelavi 1,06 % s 95-odstotnim IZ (0,27 %–3,3 %), zaradi tega, ker rezultatov Indeterminate (nedoločeno) ni bilo možno ponoviti zaradi nezadostnega volumna.

4 vzorci so ustvarili zastavo z napako pri kvantifikaciji in 3 od 4 je bilo možno ponovno testirati po priporočenem postopku z uporabo raztopine istega vzorca v razmerju 1:10 v redčilu Basematrix, s čimer je bil dobljen veljaven kvantitativen rezultat. Od 283 veljavnih rezultatov, dobljenih v študiji, je bilo test NeuMoDx CMV Quant Assay javil 129 vzorcev kot pozitivnih, z ustreznimi vrednostmi koncentracije, ki so jih določili referenčni testi. Med šestimi od teh vzorcev jih je referenčni test javil pet pod spodnjo mejo kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) in enega nad zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), zato je imelo ustrezno vrednost koncentracije 123 vzorcev, kot sta jo določila tako test NeuMoDx CMV Quant Assay kot referenčni testi CE-IVD in so bili uporabljeni za analizo kvantitativne korelacije. Analizi Demingove regresije in Passing-Bablok sta bili uporabljeni za korelacijo med vrednostmi koncentracije testa NeuMoDx CMV Assay in vrednostmi, ki so jih podali referenčni testi.

Grafični prikazi ekvivalence so bili ustvarjeni za predstavitev korelacije med koncentracijami testa NeuMoDx CMV Quant Assay in vrednostmi koncentracij pri referenčnih testih za vse vzorce, testirane z uporabo ujemanja z Demingovo regresijo in Passing-Bablok regresijo ter so predstavljeni na *sliki 5*.



Slika 5: Grafični prikaz ekvivalence (*levo*) in preostanka (*desno*) – kumulativna analiza (v obeh NeuMoDx Systems) rezultatov testa NeuMoDx CMV Quant Assay v primerjavi z rezultati referenčnih testov za VSE vzorce, ki temeljijo na analizi regresije Passing-Bablok.

Kakovost ujemanja regresije Deming je prikazana s koeficientom naklona 1,1, s 95-odstotnim IZ (1,0, 1,2) in prestrežanjem (odstopanjem) -0,18 s 95-odstotnim IZ (0,39, 0,03), kar prikazuje, da imajo dobljeni rezultati koncentracije med testom NeuMoDx CMV Quant Assay in referenčnimi testi visoko korelacijo ter sprejemljivo odstopanje. Kakovost linearnega ujemanja Passing-Bablok je prikazana s koeficientom naklona 1,1 s 95-odstotnim IZ (1,0, 1,2) in prestrežanjem (odstopanjem) -0,24 s 95-odstotnim IZ (-0,51, 0,06), kar prikazuje, da imajo rezultati koncentracije, pridobljene med testom NeuMoDx CMV Quant Assay in referenčnimi testi visoko korelacijo in sprejemljivo odstopanje, kot je prikazano v *preglednici 12*.

Preglednica 12: Povzetek analize linearne regresije Deming in Passing-Bablok

Demingova analiza		Analiza Passing-Bablok	
Prestrežanje	Koeficient naklona	Prestrežanje	Koeficient naklona
-0,18	1,1	-0,24	1,1
95 % IZ (-0,39, 0,03)	95 % IZ (1,0, 1,2)	95 % IZ (-0,51, 0,06)	95 % IZ (1,0, 1,2)

REFERENCE

- Centers for Disease Control (CDC). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. (2018). Retrieved from <https://www.cdc.gov/cmV/clinical/features.html>
- Kraft, C. S., Armstrong, W. S., & Caliendo, A. M. (2012). Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clinical infectious diseases*, 54(12), 1793-1797.
- A Ross, S., Novak, Z., Pati, S., & B Boppana, S. (2011). Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 11(5), 466-474.
- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

BLAGOVNE ZNAMKE










NeuMoDx™ je blagovna znamka družbe NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry™ je blagovna znamka družbe NeuMoDx Molecular, Inc.

TaqMan® je registrirana blagovna znamka družbe Roche Molecular Systems, Inc.

Vsa druga imena proizvodov, blagovnih znamk in registriranih blagovnih znamk, ki se morda pojavijo v tem dokumentu, so last njihovih zadevnih lastnikov.

SIMBOLI

SIMBOL	POMEN
R only	Samo na recept
	Proizvajalec
IVD	Diagnostični medicinski pripomoček <i>in vitro</i>
EC REP	Pooblaščen predstavnik v Evropski skupnosti
REF	Kataloška številka
LOT	Koda serije
	Rok uporabnosti
	Temperaturna meja
	Omejitev vlažnosti
	Ne uporabljajte ponovno
	Vsebuje zadostno količino za $<n>$ testov
	Glejte navodila za uporabo
	Pozor
	Biološka tveganja
CE	Oznaka CE

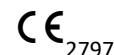


NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, ZDA

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



Tehnična podpora/poročanje v okviru vigilance: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents