



### 201800 NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip

OPREZ: Samo za izvoz u SAD



Za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx™ 288 i NeuMoDx™ 96 Molecular Systems



Prije upotrebe proizvoda potrebno je pažljivo pročitati ove upute. Upute proizvoda potrebno je točno slijediti.

Pouzdanost rezultata ispitivanja ne može se jamčiti u slučaju odstupanja od uputa navedenih u ovim uputama proizvoda.

Detaljnije upute potražite u korisničkom priručniku za sustav NeuMoDx™ 288 Molecular System; br. dijela 40600108

Detaljnije upute potražite u korisničkom priručniku za sustav NeuMoDx™ 96 Molecular System; br. dijela 40600317



### NAMJENA

Ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay automatizirani je *in vitro* test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za identifikaciju i kvantifikaciju DNK BK virusa (BKV) u uzorcima ekstrahiranim iz humane plazme/seruma i urina. Ispitivanje NeuMoDx BKV Assay provedeno na sustavu NeuMoDx™ 288 Molecular System i sustavu NeuMoDx™ 96 Molecular System (sustav(i) NeuMoDx™ System(s)) uključuje automatiziranu ekstrakciju DNK radi izolacije ciljane nukleinske kiseline iz ispitka i lančanu reakciju polimerazom (Polymerase Chain Reaction, PCR) u stvarnom vremenu radi ciljanja sekvenci u genomu BKV-a.

Ispitivanje NeuMoDx BKV Quant Assay namijenjeno je kao pomoć u dijagnosticiranju i praćenju infekcije BK virusom, u kombinaciji s drugim kliničkim i laboratorijskim nalazima.

### SAŽETAK I OBJAŠNJENJE

Za pripremu plazme može se upotrebljavati humana puna krv prikupljena u sterilne epruvete za prikupljanje krvi koje sadržavaju EDTA kao antikoagulacijsko sredstvo ili u epruvete za pripremu plazme (Plasma Preparation Tube, PPT), dok bi se serum trebao prikupljati u epruvete za prikupljanje seruma ili epruvete za odvajanje seruma (Serum Separation Tube, SST). Za testiranje ispitka urina uzorak urina prikuplja se u standardnu čašicu za prikupljanje urina bez konzervansa ili aditiva. Kako bi ih se pripremio za testiranje, plazma/serum ili urin u primarnoj ili sekundarnoj epruveti za ispitke kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx™ System postavljaju se na sustav NeuMoDx™ System u predviđeni nosač epruveta za ispitke radi početka automatizirane obrade. Za ispitke plazme/seruma, 550 µL alikvota uzorka miješa se s puferom NeuMoDx™ Lysis Buffer 1 s instrumenta ili se, kao druga mogućnost, 100 µL alikvota uzorka plazme/seruma miješa s puferom NeuMoDx™ Lysis Buffer 5. Za uzorke urina, 550 µL alikvota uzorka miješa se s puferom NeuMoDx™ Lysis Buffer 2 s instrumenta. Sustav NeuMoDx™ System automatski izvodi sve korake potrebne za ekstrakciju ciljane nukleinske kiseline, pripremu izolirane DNK za PCR amplifikaciju u stvarnom vremenu i, ako su prisutni, amplifikaciju i detekciju produkata amplifikacije. Ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay uključuje kontrolu obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) DNK za pomoć s praćenjem prisutnosti potencijalno inhibirajućih tvari kao i pogrešaka sustava NeuMoDx™ System ili reagensa koje se mogu dogoditi tijekom postupka ekstrakcije i amplifikacije.

BK poliomavirus (BKV) član je porodice dvolančanih DNK (double-stranded DNA, dsDNA) virusa Polyomaviridae. BKV uzrokuje čestu infekciju u djetinjstvu bez teških kliničkih sekvela, a > 80 % odraslih serološki je pozitivno BKV.<sup>1</sup> Primarna infekcija ovim dsDNA virusom obično je asimptomatska i pojavljuje se u djetinjstvu. Najčešći simptomi, u slučaju da postoje, su groznica i nespecifična infekcija gornjeg respiratornog trakta.<sup>2</sup> Nakon što se dogodi primarna infekcija, virus može ostati latentan na mnogim mjestima, najčešće na bubrežima. Do prijenosa može doći uslijed izlaganja tjelesnim tekućinama. U stanjima relativne ili apsolutne stanične imunodeficijencije virus se može ponovno aktivirati i uzrokovati bolest.<sup>2</sup>

Kvantifikacija virusnog opterećenja na temelju PCR-a u plazmi/serumu i urinu standardni je klinički alat za praćenje ponovne aktivacije BKV-a. Ispitivanja koja donose rezultate kvantitativnog PCR-a za BKV pokazuju pozitivnu korelaciju između viših virusnih opterećenja i veće vjerojatnosti od razvoja nefropatije povezane s BKV-om (BKV-Associated Nephropathy, BKVAN).<sup>1</sup> Drugi klinički alat koji se upotrebljava za opisivanje agregata BKV-a u urinu jest elektronska mikroskopija koja prikazuje trodimenzionalne agregate BKV-a. Međutim, ovo ispitivanje nije izvedivo za rutinsku kliničku praksu zbog cijene i ograničene dostupnosti elektronske mikroskopije.<sup>1</sup>

### NAČELA POSTUPKA

Za izvođenje analize s pomoću ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay na sustavu NeuMoDx™ System upotrebljavaju se testna traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, komplet kalibratora NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit, komplet kontrola NeuMoDx™ BKV External Control Kit, puferi NeuMoDx™ Lysis Buffer 1, NeuMoDx™ Lysis Buffer 2, NeuMoDx™ Lysis Buffer 5 i reagensi NeuMoDx™ opće namjene. Temperatura za pohranu reagensa iznosi +15/+30 °C.

Ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay kombinira automatiziranu ekstrakciju DNK, amplifikaciju i detekciju izvođenjem PCR-a u stvarnom vremenu. Ispitci plazme/seruma ili urina u primarnim ili sekundarnim epruvetama za ispitke kompatibilnim sa sustavom NeuMoDx™ System postavljaju se u nosač epruveta za ispitke koji se zatim postavlja na sustav NeuMoDx™ System radi obrade. Nije potrebna dodatna intervencija korisnika.

Za automatsko provođenje lize stanica i ekstrakcije DNK te za uklanjanje inhibitora sustavi NeuMoDx™ Systems koriste se kombinacijom topline, litičkog enzima i ekstrakcijskih reagensa. Paramagnetske čestice hvataju oslobođene nukleinske kiseline. Čestice s vezanim nukleinskim kiselinama postavljaju se u uložak NeuMoDx™ Cartridge, gdje se nevezane komponente koje nisu dio DNK ispiru s pomoću reagensa NeuMoDx™ Wash Reagent, a vezana DNK se eluira s pomoću reagensa NeuMoDx™ Release Reagent. Eluirana DNK zatim se upotrebljava u sustavima NeuMoDx™ Systems za rehidraciju patentiranih reagensa za amplifikaciju osušenih zamrzavanjem proizvođača Sentinel CH. (tehnologija STAT-NAT™) koji sadržavaju sve elemente neophodne za PCR amplifikaciju ciljnih sekvenci specifičnih za BKV i ciljnih sekvenci za SPC1. Nakon rekonstitucije liofiliziranih reagensa za PCR sustav NeuMoDx™ System pipetira pripremljenu mješavinu za PCR u uložak NeuMoDx™ Cartridge. Amplifikacija i detekcija kontrolnih i ciljnih DNK sekvenci (ako su prisutne) odvija se u području PCR komore uložka NeuMoDx™ Cartridge. Uložak NeuMoDx™ Cartridge također je osmišljen da zadrži amplikon nakon PCR-a u stvarnom vremenu i na taj način gotovo ukloni rizik od kontaminacije nakon amplifikacije.

Amplificirane ciljne sekvence detektiraju se u stvarnom vremenu s pomoću kemijskog protokola na temelju proba za hidrolizu (obično se naziva TaqMan® kemijski protokol) u kojem se upotrebljavaju fluorogene oligonukleotidne molekularne probe specifične za amplikone odgovarajućih ciljnih sekvenci.

TaqMan® probe sastoje se od fluorokroma kovalentno vezanog na 5' kraj oligonukleotidne probe i prigušivača na 3' kraju. Dok je proba netaknuta, fluorokrom i prigušivač nalaze se u blizini, zbog čega molekula prigušivača prigušuje fluorescenciju koju fluorokrom emitira putem Försterova prijenosa rezonantne energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

TaqMan® probe osmišljene su za sparivanje unutar regije DNK amplificirane određenim setom početnica. Kako DNK polimeraza Taq proizvodi početnicu i sintetizira novi lanac, 5' do 3' egzozukleazna aktivnost DNK polimeraze Taq degradira probu sparenu s predložkom. Degradacijom probe oslobađa se fluorokrom i prekida se njegova neposredna blizina prigušivaču, čime se zbog FRET-a prevladava učinak prigušivanja i omogućava fluorescentna detekcija fluorokroma. Dobiveni fluorescentni signal detektiran u kvantitativnom PCR termocikleru sustava NeuMoDx™ System izravno je proporcionalan oslobođenom fluorokromu i može se korelirati s količinom prisutne ciljne sekvence DNK.<sup>3</sup>

TaqMan® probe označene fluorokromima na 5' kraju i prigušivačima na 3' kraju upotrebljavaju se za detekciju DNK BKV-a i DNK SPC1. Softver sustava NeuMoDx™ System prati fluorescentni signal koji emitiraju TaqMan probe na kraju svakog ciklusa amplifikacije. Kada amplifikacija završi, softver sustava NeuMoDx™ System analizira podatke i izvještava konačni rezultat (POSITIVE (POZITIVNO) / NEGATIVE (NEGATIVNO) / INDETERMINATE (NEODREĐENO) / UNRESOLVED (NERAZRIJEŠENO) / NO RESULT (NEMA REZULTATA)). Ako je rezultat pozitivan i izračunata koncentracija je unutar granica kvantifikacije, softver sustava NeuMoDx System također daje kvantitativnu vrijednost koja se odnosi na uzorak.



### REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

#### Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Jedinica po pakiranju	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
201800	<b>NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip</b> <i>Reagensi za PCR osušeni zamrzavanjem koji sadrže TaqMan® probe i početnice specifične za BKV te TaqMan® probe i početnice specifične za SPC1.</i>	6	16	96

#### Reagensi i potrošni materijal koji su potrebni, ali nisu isporučeni (mogu se naručiti zasebno od tvrtke NeuMoDx)

REF.	Sadržaj
100200	<b>Pločica NeuMoDx™ Extraction Plate</b> <i>Suhe paramagnetske čestice, litički enzim i kontrole obrade uzorka</i>
800600	<b>NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit</b> <i>Setovi suhih kalibratora za BKV visoke i niske razine za jednokratnu upotrebu za utvrđivanje valjanosti standardne krivulje</i>
900601	<b>NeuMoDx™ BKV External Control Kit</b> <i>Setovi suhih pozitivnih kontrola i negativnih kontrola za BKV za jednokratnu upotrebu za utvrđivanje svakodnevne valjanosti ispitivanja NeuMoDx BKV Quant Assay</i>
400400	<b>NeuMoDx™ Lysis Buffer 1</b>
400500	<b>NeuMoDx™ Lysis Buffer 2</b>
400900	<b>NeuMoDx™ Lysis Buffer 5</b>
400100	<b>NeuMoDx™ Wash Reagent</b>
400200	<b>NeuMoDx™ Release Reagent</b>
100100	<b>NeuMoDx™ Cartridge</b>
235903	<b>Vršci s filtrima (300 µL) Hamilton CO-RE</b>
235905	<b>Vršci s filtrima (1000 µL) Hamilton CO-RE</b>

#### Potrebni instrumenti

Sustav **NeuMoDx™ 288 Molecular System** [REF. 500100] ili sustav **NeuMoDx™ 96 Molecular System** [REF. 500200]

#### UPOZORENJA I MJERE OPREZA

- Testna traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip namijenjena je samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx™ Systems.
- Prije izvođenja testa pročitajte sve upute u uputama za komplet.
- Ne upotrebljavajte reagensne ili potrošni materijal nakon navedenog datuma isteka roka trajanja.

- Ne upotrebljavajte reagense ako je zaštitna folija potrgana ili ako je pakiranje oštećeno po dolasku.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal ili reagense ako je zaštitna vrećica otvorena ili oštećena pri dolasku.
- Nemojte miješati s reagensima za amplifikaciju iz drugih komercijalnih kompleta.
- Nije za ponovnu upotrebu.
- Sve testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strips čuvajte u njihovim aluminijskim omotima na mjestu zaštićenom od svjetlosti i vlage.
- Valjana kalibracija testa (dobivena obradom kalibratora visoke i niske razine iz kompleta kalibratora NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit [REF. 800600]) mora biti dostupna prije dobivanja rezultata testa za kliničke uzorke.
- Komplet vanjskih kontrola NeuMoDx™ BKV External Control Kit (REF. 900601) mora se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay.
- Minimalni volumen ispitka ovisi o veličini epruvete, nosaču epruveta za ispitke i tijeku rada koji ovisi o volumenu ispitka kako je navedeno u nastavku. Volumen manji od navedenog minimuma može rezultirati pogreškom „Quantity Not Sufficient” (Nedovoljna količina).
- Izvođenje ispitivanja za BKV na ispitcima koji su se čuvali na neodgovarajućim temperaturama ili dulje od navedenih vremena pohrane može dati nevažne ili pogrešne rezultate ako se upotrebljava testna traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip.
- Izbjegavajte kontaminaciju svih reagensa i potrošnih materijala mikroorganizmima i deoksiribonukleazama (DNaza). U slučaju upotrebe sekundarnih epruveta za ispitke preporučuje se upotreba sterilnih jednokratnih pipeta za prijenos bez DNaze. Za svaki ispitak upotrebljavajte novu pipetu.
- Kako biste izbjegli kontaminaciju, ne rukujte uloškom NeuMoDx™ Cartridge i ne rastavljajte ga nakon amplifikacije. Nemojte vaditi uloške NeuMoDx™ Cartridges iz spremnika za biološki opasan otpad (NeuMoDx™ 288 Molecular System) ili koša za biološki otpad (NeuMoDx™ 96 Molecular System) ni u kojem slučaju. Uložak NeuMoDx™ Cartridge namijenjen je za sprječavanje kontaminacije.
- U slučajevima kada se u laboratoriju provode i PCR testovi na otvorenim epruvetama, potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, dodatnog potrošnog materijala i reagensa potrebnih za testiranje, osobne zaštitne opreme poput rukavica i laboratorijskih kuta te sustava NeuMoDx™ System.
- Pri rukovanju reagensima i potrošnim materijalom NeuMoDx™ potrebno je nositi čiste nitrilne rukavice bez pudera. Pazite da ne dodirujete gornju površinu uloška NeuMoDx™ Cartridge, površinu folije testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip ili pločice NeuMoDx™ Extraction Plate te gornju površinu spremnika pufera NeuMoDx™ Lysis Buffer 1, 2 i 5; pri rukovanju potrošnim materijalom i reagensima smiju se dodirivati samo bočne površine.
- Uz svaki se reagens (prema potrebi) isporučuje sigurnosno-tehnički list (Safety Data Sheet, SDS) dostupan na [www.neumodx.com/client-resources](http://www.neumodx.com/client-resources).
- Okomita crta na margini testa naznačuje promjene u usporedbi s prethodnom inačicom Uputa za upotrebu.
- Nakon izvođenja testa temeljito operite ruke.
- Ne pipetirajte ustima. Ne pušite, pijte ni ne jedite u područjima u kojima se rukuje ispitcima i reagensima.
- Ispitcima uvijek rukujte kao da su infektivni te u skladu sa sigurnim laboratorijskim postupcima poput onih opisanih u Standard on Bloodborne Pathogens<sup>4</sup>, Biosafety Level 2<sup>5</sup> agencije OSHA ili biste trebali primjenjivati druge odgovarajuće prakse za biološku sigurnost<sup>6,7</sup> za materijale koji sadržavaju ili za koje se sumnja da sadržavaju infektivne agense.
- Neiskorištene reagense i otpad odložite u skladu s državnim, saveznim, pokrajinskim i lokalnim propisima.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay trebali bi se tumačiti zajedno s drugim kliničkim i laboratorijskim nalazima.
- Kao što je slučaj s drugim testovima, negativni rezultati ne isključuju infekciju BKV-om.

### POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

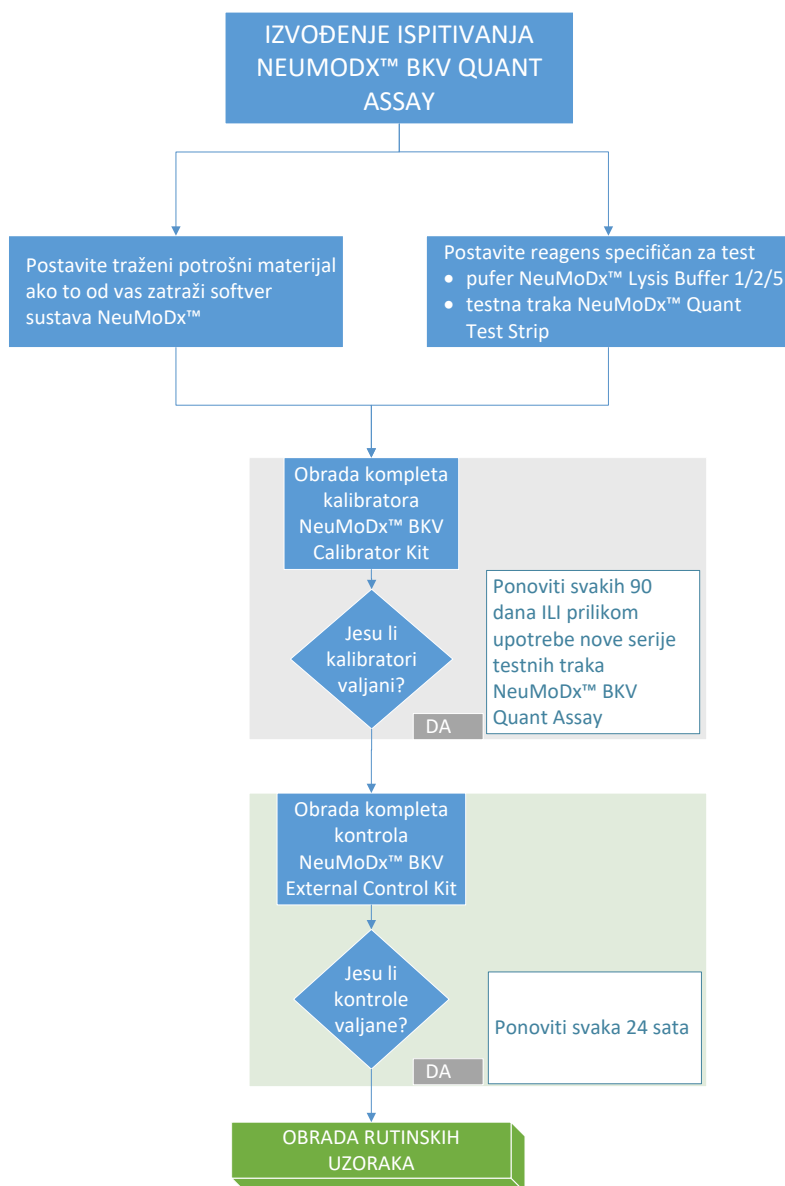
- Testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strips stabilne su u primarnom pakiranju na temperaturi od 15 do 30 °C do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci proizvoda.
- Testna traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip postavljena na sustav NeuMoDx™ System stabilna je 32 dana; softver sustava NeuMoDx™ System zatražit će uklanjanje testnih traka koje su se upotrebljavale na sustavu NeuMoDx™ System dulje od 32 dana te će biti potrebno otvoriti nove testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strips (izvaditi trake iz vrećice) i postaviti ih na sustav NeuMoDx System. Nemojte uklanjati aluminijsku foliju s trake tijekom njezina postavljanja na sustav NeuMoDx System.
- Kalibratori i kontrole NeuMoDx™ nisu infektivni, ali treba ih odložiti u laboratorijski biološki opasan otpad nakon upotrebe jer će nakon obrade na sustavu sadržavati ciljani materijal koji može uzrokovati kontaminaciju ako se s njime ne postupa ispravno.

### PRIKUPLJANJE, PRIJEVOZ I POHRANA ISPITAKA

1. Rukujte svim ispitcima kao da mogu prenijeti infektivne agense.
2. Nemojte zamrzavati punu krv ili ispitke plazme/seruma pohranjene u primarnim epruvetama.
3. Za pripremu ispitaka plazme punu krv treba prikupiti u sterilne epruvete uz primjenu antikoagulansa EDTA. Ispitci seruma trebali bi se pripremati u epruvetama za odvajanje seruma. Uzorci urina trebali bi se prikupljati u sterilne epruvete ili čašice. Pridržavajte se uputa proizvođača epruvete za prikupljanje ispitka.
4. Puna krv prikupljena u gore navedenim proizvodima može se čuvati i/ili prenositi do 24 sata na temperaturi od 2 °C do 8 °C prije pripreme plazme/seruma. Priprema uzoraka treba se izvoditi u skladu s uputama proizvođača.
5. Pohranu svježeg neobrađenog urina na sobnoj temperaturi trebalo bi minimizirati jer niska pH vrijednost i visok sadržaj uree brzo denaturiraju DNK, osobito na temperaturama od 25 °C i višima.

6. Pripremljeni ispitnici plazme/seruma i urina mogu se čuvati na sustavu NeuMoDx™ System do 24 sata prije obrade. Ako je potrebno dodatno vrijeme pohrane, preporučuje se stavljanje ispitnika u hladnjak ili zamrzavanje u obliku sekundarnih alikvota.
7. Pripremljeni ispitnici plazme/seruma i urina do testiranja bi trebali biti pohranjeni na temperaturi od 2 do 8 °C najviše 8 dana i na sobnoj temperaturi maksimalno 24 sata.
8. Pripremljeni ispitnici mogu se pohraniti na temperaturi < -20 °C do 8 tjedana prije obrade ako je riječ o plazmi i do 2 tjedna prije obrade ako je riječ o serumu; uzorci plazme i seruma ne bi trebali proći više od 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije upotrebe:
  - a. Ako su uzorci zamrznuti, ostavite ih da se u potpunosti odmrznu dok ne dosegnu sobnu temperaturu (15 – 30 °C); promiješajte na vorteks miješalici za dobivanje ravnomjerno raspodijeljenog uzorka.
  - b. Nakon odmrzavanja uzoraka testiranje treba provesti u roku od 24 sati.
  - c. Zamrzavanje plazme/seruma u primarnim epruvetama za prikupljanje se ne preporučuje.
9. Uzorci se urina nakon obrade mogu čuvati na temperaturi od 2 do 8 °C.
10. Ako se ispitnici otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.
11. Jasno označite ispitke i naznačite da su ispitnici za testiranje na BKV.
12. Prijedite na odjeljak *Priprema za test*.

Sažetak cjelokupnog postupka izvođenja ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay prikazan je na *Slika 1*.



**Slika 1.:** Tijek rada izvođenja ispitivanja NeuMoDx BKV Quant Assay

### UPUTE ZA UPOTREBU

#### Priprema za test

Za uzorke plazme/seruma, ispitivanje NeuMoDx BKV Quant Assay može se izvoditi izravno iz primarnih epruveta za prikupljanje krvi ili iz alikvota ispitaka u sekundarnim epruvetama. Obrada se može vršiti primjenom jednog od dvaju tijekova rada obrade volumena ispitaka – tijekom rada za volumen ispitka od 550 µL ili tijekom rada obrade za volumen ispitka od 100 µL. Uzorci urina obrađuju se isključivo primjenom tijekom rada za volumen ispitka od 550 µL.

1. Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom za ispitak na epruvetu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx™ System. Primarna epruveta za prikupljanje krvi može se označiti i postaviti izravno na nosač epruveta za ispitke za 32 epruvete nakon centrifugiranja prema uputama proizvođača.
2. Ako ispitak plazme/seruma testirate u primarnoj epruveti za prikupljanje, postavite epruvetu označenu crtičnim kodom u nosač epruveta za ispitke i pobrinite se da uklonite čep prije postavljanja na sustav NeuMoDx System. Minimalni volumeni **iznad** sloja gela / leukocita i trombocita definirani su u nastavku i bit će zadovoljeni ako se ispitci prikupe i obrade u skladu s uputama proizvođača epruveta. Radni učinak nije zajamčen za ispitke koji su prikupljeni nepravilno.

Prikupljanje krvi Vrsta epruvete	Minimalni potreban volumen ispitka	
	Tijek rada za 550 µL	Tijek rada za 100 µL
SST epruveta – 3,5 mL	1550 µL	1150 µL
PPT/SST epruveta – 5,0 mL	1800 µL	1400 µL
PPT/SST epruveta – 8,5 mL	2500 µL	2150 µL
K <sub>2</sub> EDTA/serum – 4,0 mL	1050 µL	650 µL
K <sub>2</sub> EDTA/serum – 6,0 mL	1250 µL	850 µL
K <sub>2</sub> EDTA/serum – 10,0 mL	1600 µL	1200 µL

3. Za uzorke urina ili uzorke plazme/seruma u sekundarnoj epruveti, prenesite alikvot ispitka u epruvetu za ispitak s crtičnim kodom kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System u skladu s volumenima definiranim u nastavku:

Nosač epruvete za ispitak	Veličina epruvete	Minimalni potreban volumen ispitka	
		Tijek rada za 550 µL	Tijek rada za 100 µL (samo za plazmu/serum)
32-Tube Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke za 32 epruvete)	promjer 11 – 14 mm, visina 60 – 120 mm	700 µL	350 µL
24-Tube Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke za 24 epruvete)	promjer 14,5 – 18 mm, visina 60 – 120 mm	1100 µL	750 µL
Low Volume Specimen Tube Carrier (Nosač epruveta za ispitke malog volumena)	epruveta od 1,5 mL za mikrocentrifugu sa stožastim dnom	650 µL	250 µL

#### Rad sustava NeuMoDx System

Detaljnije upute potražite u korisničkim priručnicima za sustave NeuMoDx™ 288 Molecular System i 96 Molecular System (br. dijelova 40600108 i 40600317)

1. Učitajte nalog za test u sustav NeuMoDx System u skladu sa željenom vrstom ispitka i epruvete:
  - volumen ispitka od 550 µL testira se definiranjem vrste ispitka kao „Plasma” (Plazma), „Serum” ili „Urine” (Urin)
  - volumen ispitka od 100 µL testira se definiranjem vrste ispitka kao „Plasma2” (Plazma2) ili „Serum2”
  - Ako nije definirano u nalogu za test, prema zadanim se postavkama upotrebljava vrsta ispitka **Plasma** (Plazma) u epruveti **Secondary Tube** (Sekundarna epruveta).
2. Aluminijske vrećice testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip zarezite na mjestu naznačenom bočnim urezima.
3. Trake izvadite iz vrećica netom prije upotrebe.
4. Prije upotrebe vrećica s trakama uvijek provjerite jesu li one dobro zatvorene te nalazi li se u njima vrećica sa sredstvom za isušivanje. Upotrebljavajte samo neoštećena pakiranja.
5. Odložite aluminijske vrećice i njihov sadržaj u otpad ako je vrećica sa sredstvom za isušivanje promijenila boju iz narančaste u zelenu.

6. Popunite jedan ili više nosača testnih traka na sustavu NeuMoDx™ System testnim trakama NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip i koristite se zaslonom osjetljivim na dodir da biste nosače testnih traka učitali u sustav NeuMoDx™ System.
7. Ako softver sustava NeuMoDx™ System to od vas zatraži, dodajte potreban potrošni materijal u nosače potrošnog materijala na sustavu NeuMoDx™ System i koristite se zaslonom osjetljivim na dodir da biste nosače učitali u sustav NeuMoDx™ System.
8. Ako softver sustava NeuMoDx™ System to od vas zatraži, zamijenite reagense NeuMoDx™ Wash Reagent i NeuMoDx™ Release Reagent te prema potrebi ispraznite otpad od ispiranja, spremnik za biološki opasan otpad (samo za sustav NeuMoDx 288 Molecular System), koš za otpad za vrške (samo za sustav NeuMoDx 96 Molecular) ili koš za biološki otpad (samo za sustav NeuMoDx 96 Molecular System).
9. Ako softver sustava NeuMoDx™ System to od vas zatraži, prema potrebi obradite kalibratore Calibrators (REF. 800600) i/ili vanjske kontrole External Controls (REF. 900601). Dodatne informacije o kalibratorima i kontrolama možete pronaći u odjeljku *Obrada rezultata*.
10. Postavite epruvetu/e s ispitkom/kalibratorom/kontrolom u standardni nosač za 32 epruvete i pobrinite se da uklonite čepove sa svih epruveta.
11. Postavite nosač epruveta za ispitke na bilo koji slobodan položaj na policu za automatsko postavljanje i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir učitajte nosač u sustav NeuMoDx™. To će pokrenuti obradu ispitaka postavljenih za identificirane testove ako u sustavu postoji valjani nalog za test.

### OGRANIČENJA

- Testna traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx™ Systems.
- Radne značajke testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip utvrđene su za ispitke plazme i seruma pripremljene iz pune krvi, prikupljene s antikoagulansom EDTA, te za ispitke urina; upotreba testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip s drugim vrstama kliničkih ispitaka nije procijenjena i radne značajke testa za druge vrste ispitaka nisu poznate.
- Malo povećanje granice detekcije i donje granice kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx BKV Quant Assay zabilježeni su tijekom primjene tijekom rada za volumen ispitka od 100 µL.
- Ispitivanje NeuMoDx BKV Quant Assay ne smije se upotrebljavati s uzorcima heparinizirane humane krvi.
- Budući da detekcija virusa BKV ovisi o broju organizama prisutnih u uzorku, pouzdani rezultati ovise o pravilnom prikupljanju, rukovanju i pohrani ispitaka.
- Kalibratori i vanjske kontrole moraju se obraditi prema preporukama u uputama proizvođača, ako to zatraži sustav NeuMoDx™ System, prije obrade rutinskih kliničkih uzoraka.
- Pogrešni rezultati javljaju se zbog nepropisnog prikupljanja, rukovanja i pohrane ispitaka, tehničke pogreške ili zamjene epruveta za ispitke. Dodatno, lažno negativni rezultati mogu se javiti jer je broj virusnih čestica u uzorku niži od granice detekcije ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay.
- Rad na sustavu NeuMoDx™ System ograničen je na osoblje obučeno za upotrebu sustava NeuMoDx™ System.
- Ako ne dođe do amplifikacije ciljne sekvence BKV-a i ciljne sekvence SPC1, prijavljuje se nevažeci rezultat (Indeterminate (Neodređeno), No Result (Nema rezultata) ili Unresolved (Nerazriješeno)) te je potrebno ponoviti test.
- Ako ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay ima rezultat Positive (Pozitivno), ali je vrijednost kvantifikacije izvan granica kvantifikacije, sustav NeuMoDx™ System prijavit će je li detektirani BKV ispod donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ili iznad gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- U slučaju da je detektirani BKV ispod LLoQ-a, ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay može se (po želji) ponoviti s drugim alikvotom ispitka.
- U slučaju da je detektirani BKV iznad ULoQ-a, ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay može se ponoviti s razrijeđenim alikvotom originalnog ispitka. Preporučuje se razrjeđenje u omjeru 1:1000 plazmom negativnom na BKV ili diluensom BaseMatrix 53 Diluent (BaseMatrix) (SeraCare, Milford, MA). Koncentracija originalnog ispitka može se izračunati na sljedeći način:
 
$$\text{koncentracija originalnog ispitka} = \log_{10}(\text{faktor razrjeđivanja}) + \text{prijavljena koncentracija razrijeđenog uzorka}.$$
- Povremena prisutnost inhibitora PCR-a u plazmi/serumu ili urinu može uzrokovati kvantifikacijsku pogrešku sustava; ako do toga dođe, preporučuje se ponoviti test s istim ispitkom razrijeđenim diluensom BaseMatrix u omjeru 1:10 ili 1:100.
- Pozitivan rezultat ne naznačava nužno prisutnost vijabilnih organizama. Međutim, pozitivan rezultat upućuje na vjerojatnu prisutnost DNK BKV-a.
- Delecija ili mutacije u konzerviranim regijama koje su ciljane ispitivanjem NeuMoDx™ BKV Quant Assay mogu utjecati na detekciju ili mogu dovesti do pogrešnih rezultata kada se upotrebljava testna traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay trebaju se upotrebljavati kao dodatak kliničkim opažanjima i ostalim informacijama koje su liječniku dostupne; test nije namijenjen dijagnosticanju infekcije.
- Preporučuje se dobra laboratorijska praksa, uključujući mijenjanje rukavica između rukovanja ispitcima pacijenata, kako bi se izbjegla kontaminacija.



### OBRADA REZULTATA

Dostupni rezultati mogu se pregledavati ili ispisivati s kartice „Results“ (Rezultati) u prozoru Results (Rezultati) na zaslonu osjetljivom na dodir sustava NeuMoDx™ System.

Rezultate ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay automatski generira softver sustava NeuMoDx™ System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx™ (BKV Assay Definition File, BKV ADF). Rezultat ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay može prijaviti kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom BKV-a, Positive (Pozitivno) iznad ULoQ-a, Positive (Pozitivno) ispod LLoQ-a, Indeterminate (IND) (Neodređeno), Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ili No Result (NR) (Nema rezultata) na temelju statusa amplifikacije ciljne sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultati se prijavljuju na temelju algoritma odlučivanja koji je sažet u nastavku u *Tablica 1.*

**Tablica 1.:** Sažetak algoritma odlučivanja ispitivanja NeuMoDx BKV Quant Assay

Rezultat	BKV	Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1)	Tumačenje rezultata
<b>Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom</b>	Amplified (Amplificirano) 1,3 ≤ [BKV] ≤ 8,0 log <sub>10</sub> IU/mL (tijek rada za 550 µL)* 2,3 ≤ [BKV] ≤ 8,0 log <sub>10</sub> IU/mL (tijek rada za 100 µL)*	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK BKV-a detektiran unutar kvantitativnog raspona
<b>Positive (Pozitivno), iznad gornje granice kvantifikacije [Upper Limit of Quantitation, ULoQ]</b>	Amplified (Amplificirano) [BKV] > 8,0 log <sub>10</sub> IU/mL	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK BKV-a detektiran iznad kvantitativnog raspona
<b>Positive (Pozitivno), ispod donje granice kvantifikacije [Lower Limit of Quantitation, LLoQ]</b>	Amplified (Amplificirano) [BKV] < 1,3 log <sub>10</sub> IU/mL (tijek rada za 550 µL)* [BKV] < 2,3 log <sub>10</sub> IU/mL (tijek rada za 100 µL)*	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK BKV-a detektiran ispod kvantitativnog raspona
<b>Negative (Negativno)</b>	Not Amplified (Nije amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	DNK BKV-a nije detektiran
<b>Indeterminate (Neodređeno)</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka završena)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeći; ponovno testirajte uzorak†
<b>No Result (Nema rezultata)</b>	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka prekinuta)		Obrada uzorka je prekinuta; ponovno testirajte uzorak†
<b>Unresolved (Nerazriješeno)</b>	Not Amplified, No System Error Detected (Nije amplificirano, Nema uočenih pogrešaka sustava)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeći; ponovno testirajte uzorak†

\*Tijek rada za 550 µL upotrebljava se s ispitnicima plazme/seruma i urina. Tijek rada za 100 µL upotrebljava se samo s ispitnicima plazme/seruma.

†Sustav NeuMoDx System opremljen je automatskom opcijom Rerun (Ponovna obrada)/Repeat (Ponavljanje testa) koju krajnji korisnik može odabrati kako bi osigurao da se rezultat IND (Neodređeno)/NR (Nema rezultata)/UNR (Nerazriješeno) automatski ponovno obradi kako bi se minimizirala kašnjenja u izvještavanju rezultata.

### Izračun testa

- Za uzorke unutar raspona kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay koncentracija DNK BKV-a u uzorcima računa se s pomoću pohranjene standardne krivulje u kombinaciji s koeficijentom kalibracije i volumenom ispitka.
  - Koeficijent kalibracije izračunava se na temelju rezultata dobivenih kompletnom kalibratora NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit koji su obrađeni kako bi se utvrdila valjanost standardne krivulje za određenu seriju testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip na određenom sustavu NeuMoDx™ System.
  - Koeficijent kalibracije uključen je u konačno određivanje koncentracije DNK BKV-a.
  - Softver sustava NeuMoDx uzima u obzir ulazni volumen ispitka prilikom određivanja koncentracije DNK BKV-a po mL ispitka.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay izraženi su u log<sub>10</sub> IU/mL.
- Dobivena kvantifikacija nepoznatih uzoraka sljediva je do 1. Međunarodnog standarda za BK virus (BKV) SZO-a (14/212)<sup>9</sup>.

### Kalibracija testa

Valjana kalibracija na temelju standardne krivulje neophodna je za kvantifikaciju DNK BKV-a u ispitnicima. Za dobivanje valjanih rezultata kalibracija testa mora se obaviti s pomoću kalibratora koje isporučuje tvrtka NeuMoDx™ Molecular, Inc.

### Kalibratori

1. Kalibratori NeuMoDx™ BKV Calibrators isporučuju se u kompletu (REF. 800600), a sastoje se od osušenih granula sintetske DNK BKV-a.
2. Set kalibratora za BKV treba obraditi sa svakom novom serijom testnih traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strips, ako se nova datoteka definicije ispitivanja za BKV učitava na sustav NeuMoDx™ System, ako je trenutačno postavljeni set kalibratora premašio razdoblje valjanosti (trenutačno postavljeno na 90 dana) ili ako je softver sustava NeuMoDx™ System izmijenjen.
3. Softver sustava NeuMoDx™ System obavijestit će korisnika kada treba obraditi kalibratore; nova serija testnih traka ne može se upotrebljavati dok kalibratori nisu uspješno obrađeni.
4. Ako je potrebno obraditi novi set kalibratora za BKV, pročitajte sve upute u uputama za komplet kalibratora NeuMoDx™ BKV Calibrator Kit prije izvođenja testa.
5. Valjanost kalibracije određuje se na sljedeći način:
  - a) Set koji sadržava dva kalibratora, visoke i niske razine, treba obraditi kako bi se utvrdila valjanost.
  - b) Za dobivanje valjanih rezultata barem 2 od 3 ponavljanja moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara. Nominalna ciljna vrijednost kalibratora niske razine iznosi  $3 \log_{10}$  IU/mL, a nominalna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi  $5 \log_{10}$  IU/mL.
  - c) Koeficijent kalibracije izračunat je kako bi se ispravila očekivana varijacija između serija testnih traka; taj koeficijent kalibracije primjenjuje se za određivanje konačne koncentracije BKV-a.
6. Ako provjera valjanosti nije uspjela za jedan ili oba kalibratora, ponovite obradu neuspjelog/ih kalibratora primjenom nove bočice. U slučaju neuspjele provjere valjanosti jednog kalibratora, moguće je ponoviti obradu samo neuspjelog kalibratora jer sustav od korisnika ne zahtijeva ponovnu obradu obaju kalibratora.

### Kontrola kvalitete

Lokalni propisi obično navode da je laboratorij odgovoran za postupke kontrole kojima se prati točnost i preciznost cijelog analitičkog postupka te da mora utvrditi broj, vrstu i učestalost primjene materijala za kontrolu testa s pomoću provjerenih specifikacija radnog učinka za nemodificirani, odobreni sustav testa.

### Vanjske kontrole

1. Kontrole BKV External Controls isporučuje tvrtka NeuMoDx Molecular, Inc. u kompletu BKV External Control Kit (REF. 900601). Pozitivne kontrole sadržavaju osušene granule sintetske DNK BKV-a.
2. Pozitivne i negativne vanjske kontrole trebaju se obraditi jednom svaka 24 sata. Ako set valjanih vanjskih kontrola ne postoji, softver sustava NeuMoDx™ System od korisnika će zatražiti da obradi te kontrole kako bi mogao prijaviti rezultate za uzorak.
3. Ako su potrebne vanjske kontrole, prije izvođenja testa pripremite pozitivne i negativne kontrole kako je navedeno u uputama za komplet NeuMoDx BKV External Control Kit.
4. S pomoću zaslona osjetljivog na dodir i nosača epruveta za ispitke postavljenog na policu za automatsko postavljanje učitajte bočice s pozitivnim i negativnim kontrolama u sustav NeuMoDx™ System. Sustav NeuMoDx™ System prepoznaje crtični kod i započinje obradu epruveta s ispitcima, osim ako reagensi ili potrošni materijal nužni za testiranje nisu dostupni.
5. Valjanost vanjskih kontrola procijenit će se na sustavu NeuMoDx™ System na temelju očekivanog rezultata. Pozitivna kontrola trebala bi dati rezultat Positive (Pozitivno) na BKV, a negativna kontrola trebala bi dati rezultat Negative (Negativno) na BKV.
6. U slučaju nepodudarnih rezultata vanjskih kontrola treba postupiti na sljedeći način:
  - a) Rezultat testiranja Positive (Pozitivno) prijavljen za negativan kontrolni uzorak ukazuje na problem kontaminacije ispitka.
  - b) Rezultat testiranja Negative (Negativno) prijavljen za pozitivan kontrolni uzorak može ukazivati na problem povezan s reagensima ili instrumentom.
  - c) U bilo kojem od gore navedenih slučajeva ili u slučaju rezultata Indeterminate (IND) (Neodređeno) ili No Result (NR) (Nema rezultata) ponovite obradu vanjskih kontrola NeuMoDx™ BKV External Controls koja nije uspjela s novom bočicom kontrole čije testiranje valjanosti nije uspjelo.
  - d) Ako se za pozitivnu kontrolu NeuMoDx™ BKV External Control i dalje dobiva rezultat Negative (Negativno), obratite se korisničkoj službi tvrtke NeuMoDx™.
  - e) Ako se za negativnu kontrolu NeuMoDx™ BKV External Control i dalje dobiva rezultat Positive (Pozitivno), pokušajte ukloniti sve izvore potencijalne kontaminacije, što uključuje zamjenu SVIH reagensa, prije nego što se obratite korisničkoj službi tvrtke NeuMoDx™.

### Kontrole obrade uzorka (unutarnje)

Egzogena kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) uključena je u pločicu NeuMoDx™ Extraction Plate i podvrgava se cijelom postupku ekstrakcije nukleinske kiseline i PCR amplifikacije u stvarnom vremenu sa svakim uzorkom. Početnice i probe specifične za SPC1 također su uključene u svaku testnu traku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, što omogućuje detekciju prisutnosti SPC1 zajedno s ciljnom sekvencom DNK BKV-a (ako je prisutna) putem multipleksnog PCR-a u stvarnom vremenu. Detekcija amplifikacije SPC1 softveru sustava NeuMoDx™ System omogućava praćenje učinkovitosti postupaka ekstrakcije DNK i PCR amplifikacije.



### Nevažeći rezultati

Ako ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx™ System ne uspije dati valjani rezultat, on se prijavljuje kao Indeterminate (IND) (Neodređeno), No Result (NR) (Nema rezultata) ili Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ovisno o vrsti pogreške koja se pojavila.

Rezultat IND (Neodređeno) prijavljuje se ako se tijekom obrade uzorka detektira pogreška sustava NeuMoDx™ System. U slučaju da je prijavljen rezultat IND (Neodređeno), preporučuje se ponovno testiranje.

Rezultat UNR (Nerazriješeno) prijavljuje se ako nije detektirana valjana amplifikacija DNK BKV-a ili SPC1, što ukazuje na moguću pogrešku reagensa ili na prisutnost inhibitora. U slučaju da je prijavljen rezultat UNR (Nerazriješeno), ponovno testiranje može se provesti kao prvi korak. U slučaju da ponovno testiranje ne uspije, može se upotrijebiti razrijeđeni ispitak kako bi se ublažili učinci inhibicije uzorka.

Ako ispitivanje NeuMoDx BKV Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat, a obrada uzorka se prekine prije završetka, on se prijavljuje kao No Result (NR) (Nema rezultata). U slučaju da je prijavljen rezultat NR (Nema rezultata), preporučuje se ponovno testiranje.

### RADNE ZNAČAJKE

#### Analitička osjetljivost – granica detekcije<sup>12</sup>

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay određena je testiranjem serijskih razrjeđivanja panela EDX BKV Verification Panel (Exact Diagnostics) kalibriranih s 1. Međunarodnim standardom za BK virus (BKV) SZO-a (14/212)<sup>9</sup> u uzorcima plazme/seruma i urina negativnima na BKV kako bi se utvrdila granica detekcije (Limit of Detection, LoD) na sustavima NeuMoDx Systems. Za plazmu/serum (550 µL) i urin LoD je definiran kao najbliža ciljna razina, eksperimentalno utvrđena, iznad koncentracije utvrđene probit analizom s intervalom pouzdanosti (Confidence Interval, CI) od 95 %. Za plazmu/serum (100 µL) istraživana je koncentracija jednog uzorka od 200 IU/mL primjenom analize stope uspješnosti te je potvrđena za LoD ako je stopa detekcije iznosila više od 95 %. Ispitivanje je provedeno tijekom 3 dana na više sustava s više serija reagensa NeuMoDx™. Svaki je sustav obradio 42 ponavljanja pri svakoj razini razrjeđivanja (pozitivni uzorci) i 8 ponavljanja za negativne uzorke po danu. Stope detekcije prikazane su u *Tablica 2. i 3.*

**Tablica 2.:** Pozitivne stope detekcije za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx BKV Quant Assay (plazma/serum od 550 µL i urin)

Ciljna koncentracija [IU/mL]	Ciljna koncentracija [ $\log_{10}$ IU/mL]	Tijek rada za PLAZMU/SERUM volumena 550 µL			URIN		
		Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
50	1,70	41	41	100 %	41	41	100 %
20	1,30	42	42	100 %	40	39	98 %
10	1,00	41	35	85 %	41	31	76 %
5	0,30	41	16	39 %	41	12	29 %
NEG.	0,00	20	0	0 %	24	0	0 %

**Tablica 3.:** Pozitivne stope detekcije za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx BKV Quant Assay (plazma/serum od 100 µL)

Ciljna koncentracija [IU/mL]	Ciljna koncentracija [ $\log_{10}$ IU/mL]	Tijek rada za PLAZMU/SERUM volumena 100 µL		
		Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
200	2,30	89	88	99%

Utvrđeno je da LoD ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay u plazmi/serumu (tijek rada za 550 µL) iznosi 20 IU/mL (1,3  $\log_{10}$  IU/mL) s 95-postotnim intervalom pouzdanosti (Confidence Interval, CI) od 11,03; utvrđeno je da LoD u urinu iznosi 20,0 IU/mL (1,3  $\log_{10}$  IU/mL) s 95-postotnim intervalom pouzdanosti (Confidence Interval, CI) od 13,09; utvrđeno je da LoD u plazmi/serumu (tijek rada za 100 µL) iznosi 200 IU/mL (2,3  $\log_{10}$  IU/mL).

#### Analitička osjetljivost – donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) i gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)<sup>12</sup>

Donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) i gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) definiraju se kao najniža ciljna razina i gornja ciljna razina pri kojima se postiže stopa detekcije > 95 % i TAE ≤ 1,0. Kako bi se odredili LLoQ i ULoQ, ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) izračunata je za svaku ciljnu razinu BKV-a za koju je dobivena detekcija > 95 %. TAE se definira na sljedeći način:

$$TAE = \text{odstupanje} + 2 \cdot SD \text{ [Westgardova statistička pravila]}$$

Odstupanje je apsolutna vrijednost razlike između prosječne izračunate koncentracije i očekivane koncentracije. SD se odnosi na standardnu devijaciju od vrijednosti kvantificirane za uzorak.

Objedinjeni rezultati za 5 razina ispitaka plazme/seruma ili urina s BKV-om koji su se upotrebljavali u ispitivanju LLoQ-a/UloQ -a prikazani su u *Tablica 4. i 5.* Na temelju tog skupa podataka i prethodno utvrđene vrijednosti LoD, utvrđeno je da LLoQ i ULoQ iznose 20 IU/mL ( $1,3 \log_{10}$  IU/mL) i  $7,58 \times 10^7$  IU/mL (ovdje aproksimirano na  $8 \log_{10}$  IU/mL) za uzorke plazme/seruma od 550  $\mu$ L i urina te 200 IU/mL ( $2,3 \log_{10}$  IU/mL) za uzorke plazme/seruma od 100  $\mu$ L.

**Tablica 4.:** ULoQ i LLoQ testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, s odstupanjem i vrijednosti TAE (plazma/serum od 550  $\mu$ L i urin)

Ciljna konc. [IU/mL]	Ciljna konc. [ $\log_{10}$ IU/mL]	Plazma/serum 550 $\mu$ L					Urin				
		Prosječna konc. [ $\log_{10}$ IU/mL]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE	Prosječna konc. [ $\log_{10}$ IU/mL]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE
$7,58 \times 10^7$	8	8	100	0,09	0,05	0,23	8	100	0,09	0,10	0,29
50	1,70	1,80	100	0,18	0,10	0,46	1,84	100	0,22	0,14	0,59
20	1,30	1,56	100	0,25	0,26	0,76	1,66	100	0,29	0,36	0,93
10	1,00	1,46	85	0,27	0,46	1,01	1,41	85%	0,41	0,41	1,22
5	0,30	1,27	39	0,48	0,97	1,92	1,31	38%	0,52	1,01	2,04

**Tablica 5.:** ULoQ i LLoQ testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip, s odstupanjem i vrijednosti TAE (plazma/serum od 100  $\mu$ L)

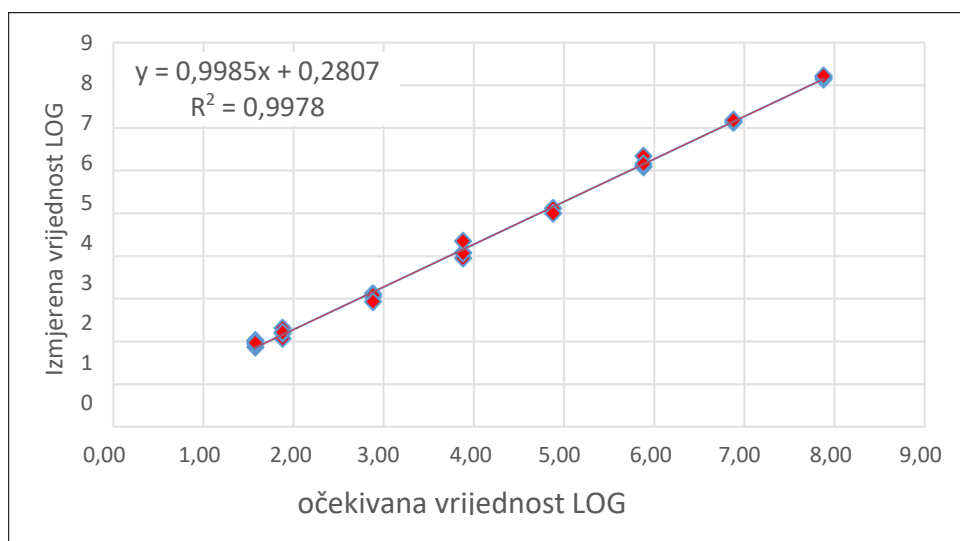
Ciljna konc. [IU/mL]	Ciljna konc. [ $\log_{10}$ IU/mL]	Plazma/serum 100 $\mu$ L				
		Prosječna konc. [ $\log_{10}$ IU/mL]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE
$7,58 \times 10^7$	8	8	100	0,09	0,07	0,25
200	2,30	2,30	99	0,39	0,003	0,78

Na temelju rezultata tih ispitivanja, utvrđeno je da LoD i LLoQ ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay oboje iznose 20 IU/mL ( $1,3 \log_{10}$  IU/mL) za plazmu/serum i urin u slučaju primjene tijekom rada za volumen ispitka od 550  $\mu$ L, te 200 IU/mL ( $2,30 \log_{10}$  IU/mL) za plazmu/serum u slučaju primjene tijekom rada volumen ispitka od 100  $\mu$ L. ULoQ za sve vrste ispitaka iznosi  $7,58 \times 10^7$  IU/mL ( $8 \log_{10}$  IU/mL).

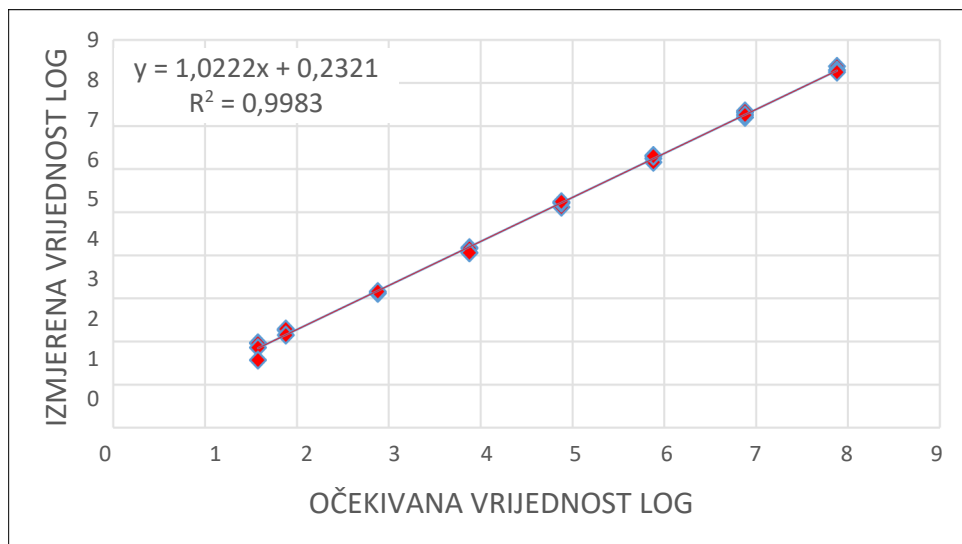
### Linearnost<sup>13</sup>

Linearnost testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip utvrđena je iz plazme/seruma i urina pripremom serijskih razrjeđivanja s pomoću sintetskog plazmida BKV-a (Integrated DNA Technologies) s utvrđenom sljedivosti od 1. međunarodnog standarda za BK virus (BKV) SZO-a (14/212).<sup>9</sup> Izvedeno je 11 serijskih razrjeđivanja sintetskog plazmida BKV-a, pripremljenih u diluensu BaseMatrix 53 negativnom na BKV ili u puliranom humanom urinu negativnom na BKV kako bi se pokrio raspon koncentracije od 7,88 do 1,58  $\log_{10}$  IU/ml za plazmu/serum od 550  $\mu$ L i urin te raspon koncentracije od 6,88 do 2,88  $\log_{10}$  IU/ml za plazmu/serum od 100  $\mu$ L.

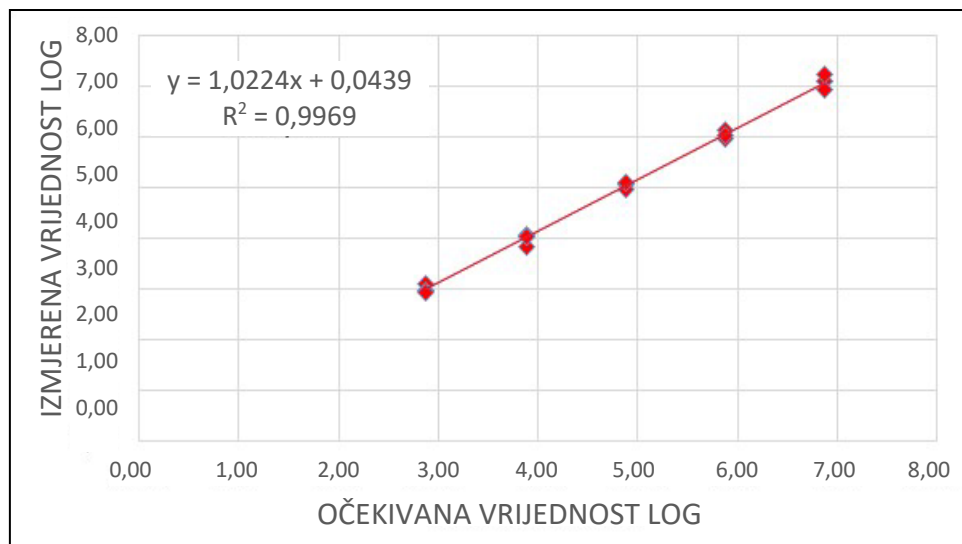
Koncentracije ispitivanja za BKV koje je prijavio sustav NeuMoDx™ System uspoređene s očekivanim vrijednostima prikazane su na *Slika 2.*, 3. i 4.



**Slika 2.:** Linearnost ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay za plazmu/serum (tijek rada za 550  $\mu$ L)



Slika 3.: Linearnost testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip za ispitke urina



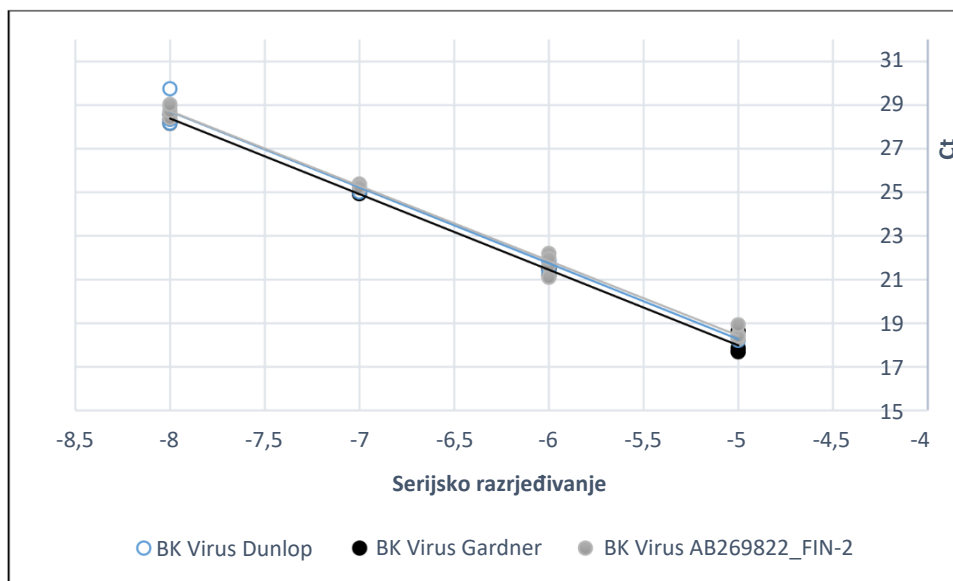
Slika 4.: Linearnost testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip za plazmu/serum (tijek rada za 100 µL)

### Linearnost za genotipove<sup>16</sup>

Linearnost ispitivanja NeuMoDx BKV Quant Assay za tri genotipa BKV-a (BK Virus Dunlop, BK Virus Gardner, BK Virus AB269822\_FIN-2) određena je testiranjem četiriju različitih koncentracija svakog od genotipova BKV-a pripremljenih u diluensu BaseMatrix 53 negativnom na BKV. Genotip BK virusa S72390 ne pokazuje polimorfizme u regiji ciljne sekvence gena pokrivena testnom trakom NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip. Ispitivanje je provedeno testiranjem 4 ponavljanja svakog od 3 genotipa pri 6 koncentracija (10-orostruko serijsko razrjeđivanje). Linearnost za tri genotipa BKV-a prikazana je u Tablica 6. i Slika 5.

Tablica 6.: Linearnost testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip za genotipove

Genotip	Jednadžba linearnosti $y = Ct$ ispitivanja NeuMoDx BKV Assay $x =$ serijsko razrjeđivanje	R <sup>2</sup>
BK Virus Dunlop	$y = -3,4808x + 0,8595$	0,9926
BK Virus Gardner	$y = -3,4682x + 0,6395$	0,9959
BK Virus AB269822_FIN-2	$y = -3,432x + 1,2683$	0,9947



Slika 5.: Linearnost testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip za genotipove

### Analitička specifičnost – križna reaktivnost<sup>10,11</sup>

Analitička specifičnost dokazana je probirom na 22 organizma koji se mogu često pronaći u ispitcima plazme/seruma ili urina te na vrste filogenetski slične BKV-u radi utvrđivanja križne reaktivnosti. Organizmi su pripremljeni u poolovima koji su sadržavali 5 – 6 organizama i testirani su pri visokim koncentracijama. Testirani organizmi prikazani su u *Tablica 7*. Nije uočena križna reaktivnost ni sa kojim od testiranih organizama, čime je potvrđena 100-postotna analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay.

Tablica 7.: Patogeni korišteni za dokazivanje analitičke specifičnosti

Organizmi koji nisu ciljani ispitivanjem					
HTLV-1/2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Virus hepatitisa B	Adenovirus tipa 5	Epstein-Barrov virus	Virus varicella-zoster	Virus hepatitisa C
Virus herpesa simpleksa tipa 1	Herpes simplex virus tipa 2	Humani herpes virus tipa 6	Humani herpes virus tipa 7	Humani herpes virus tipa 8	Virus humane imunodeficijencije-1
Virus humane imunodeficijencije-2	JC virus	SV40	<i>Citomegalovirus</i>		

### Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, komenzalni organizmi<sup>10,11</sup>

Interferencija ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay procijenjena je u prisutnosti organizama koji nisu ciljani ispitivanjem primjenom poolova organizama koji su jednaki onima pripremljenima za testiranje križne reaktivnosti, a koji su prethodno navedeni u *Tablica 7*. U plazmu negativnu na BKV dodani su poolovi organizama u skupinama od 5 do 6 te ciljna sekvenca BKV-a pri koncentraciji od 4 log<sub>10</sub> IU/mL. Nije uočena značajna interferencija u prisutnosti tih komenzalnih organizama na što ukazuje minimalna devijacija kvantifikacije od kontrolnih ispitaka koji ne sadrže interferirajuće agense.

### Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, endogene i egzogene tvari<sup>10,11</sup>

Ispitivanje NeuMoDx™ BKV Quant Assay procijenjeno je u prisutnosti uobičajenih egzogenih i endogenih interferirajućih tvari pronađenih u kliničkim ispitcima plazme/seruma ili urina s BKV-om. To je uključivalo abnormalno visoke razine komponenti krvi ili urina te uobičajene antivirusne lijekove koji su klasificirani u *Tablica 8*. Svaka tvar dodana je u probirani diluens BaseMatrix 53 ili humani urin negativne na BKV u koje je dodano 3 log<sub>10</sub> IU/mL BKV-a te su uzorci analizirani kako bi se utvrdila interferencija. Prosječna koncentracija i odstupanje svih ispitanih tvari u usporedbi s kontrolnim uzorcima u koje je dodana jednaka razina BKV-a navedeni su u *Tablica 9*. Nijedna od egzogenih i endogenih tvari nije utjecala na specifičnost ispitivanja NeuMoDx™ BKV Quant Assay.

**Tablica 8.:** Testiranje interferencije – egzogeni agensi (klasifikacija lijekova)

Pool	Naziv lijeka	Klasifikacija
Pool 1	Valganciklovir	ANTIVIRUSNI
	Prednizon	IMUNOSUPRESIVNI
	Cidofovir	ANTIVIRUSNI
	Cefotaksim	ANTIBIOTIK
	Mikofenolat mofetil	IMUNOSUPRESIVNI
Pool 2	Vankomicin	ANTIBIOTIK
	Takrolimus	IMUNOSUPRESIVNI
	Famotidin	ANTAGONIST HISTAMINA
	Valaciklovir	ANTIVIRUSNI
	Leflunomid	IMUNOSUPRESIVNI

**Tablica 9.:** Testiranje interferencije – egzogeni i endogeni agensi

Endogeni (plazma/serum)	Prosječna konc.	Odstupanje
	log <sub>10</sub> IU/mL	log <sub>10</sub> IU/mL
Trigliceridi 500 mg/dL	3,09	0,16
Konjugirani bilirubin (0,25 g/L)	3,09	0,16
Nekonjugirani bilirubin (0,25 g/L)	3,31	-0,06
Albumin (58,7 g/L)	3,12	0,13
Hemoglobin (2,9 g/L)	3,02	0,23
Endogeni (urin)	Prosječna konc.	Odstupanje
	log <sub>10</sub> IU/mL	log <sub>10</sub> IU/mL
Urobilirubin (> 2 mg/dL)	3,74	-0,09
Glukoza (1000 mg/dL)	4,00	0,04
Urin pH 4	3,75	0,29
Urin pH 10	3,77	0,27
Leukociti (1E5 stanica/mL)	3,68	-0,06
Krv 7 %	3,42	-0,32
Protein (albumin > 100 mg/dL)	3,96	0,08
Talk puder	3,92	0,12
Egzogeni (lijekovi)	Prosječna konc.	Odstupanje
	log <sub>10</sub> IU/mL	log <sub>10</sub> IU/mL
Pool 1: valganciklovir, prednizon, cidofovir, cefotaksim, mikofenolat mofetil	4,04	-0,06
Pool 2: vankomicin, takrolimus, famotidin, valaciklovir, leflunomid	4,07	-0,09

### Ponovljivost i preciznost unutar laboratorija<sup>14</sup>

Preciznost testne trake NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip određena je testiranjem 2 ponavljanja panela s 5 sastavnica s ispitnicima BKV-a pripremljenih s plazmidom BKV-a dvaput na dan s pomoću jednog sustava NeuMoDx™ 96 System u razdoblju od 20 dana. Određena je preciznost unutar analize i unutar dana i utvrđena je ukupna standardna devijacija od  $\leq 0,30 \log_{10}$  IU/mL. Dokazana je izvrsna preciznost po danima i obradama kako je prikazano u *Tablica 10*. Preciznost između korisnika nije određena jer korisnik ne igra značajnu ulogu u obradi uzoraka na sustavu NeuMoDx™ System.

**Tablica 10.:** Preciznost unutar laboratorija – ispitivanje NeuMoDx BKV Quant Assay na sustavima NeuMoDx Systems

Uzorak	SD unutar dana ( $\log_{10}$ IU/mL)	SD među danima ( $\log_{10}$ IU/mL)	SD unutar obrade ( $\log_{10}$ IU/mL)	SD među instrumentima ( $\log_{10}$ IU/mL)	SD unutar laboratorija ( $\log_{10}$ IU/mL)
<b>Ispitak plazme/seruma (ulazni volumen 550 <math>\mu</math>L)</b>					
RISppHIGH	0,10	0,08	0,10	0,01	0,13
RISppMIDDLE	0,14	0,10	0,11	0,06	0,17
RISppMLOW	0,22	0,12	0,21	0,02	0,25
RISppLOW	0,21	0,03	0,18	0,10	0,21
RISppNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Ispitak urina</b>					
RISpuHIGH	0,16	0,10	0,11	0,12	0,20
RISpuMIDDLE	0,21	0,09	0,16	0,13	0,23
RISpuMLOW	0,14	0,12	0,13	0,02	0,18
RISpuLOW	0,29	0,05	0,25	0,13	0,30
RISpuNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

### Obnovljivost među serijama<sup>14</sup>

Obnovljivost među serijama za testnu traku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip utvrđena je primjenom triju različitih serija testnih traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strips. Panel za BKV s 5 sastavnica pripremljen s plazmidom BKV-a upotrebljavao se za procjenu radnog učinka na jednom sustavu NeuMoDx™ 96 Molecular System u 3 odvojene obrade. Analizirane su varijacije unutar serija i među serijama, a rezultati izraženi kao apsolutno odstupanje kvantifikacije između serija prikazani su u *Tablica 11*. Maksimalno ukupno odstupanje iznosilo je  $0,27 \log_{10}$  IU/mL. Ekvivalentan radni učinak dokazan je među serijama jer je kvantifikacija svih sastavnica panela bila unutar specifikacije dopuštenih odstupanja.

**Tablica 11.:** Obnovljivost među serijama – ispitivanje NeuMoDx BKV Quant Assay

Uzorak	Apsolutno odstupanje između serije 1 i serije 2 ( $\log_{10}$ IU/mL)	Apsolutno odstupanje između serije 1 i serije 3 ( $\log_{10}$ IU/mL)	Apsolutno odstupanje između serije 2 i serije 3 ( $\log_{10}$ IU/mL)
<b>Ispitak plazme/seruma (550 <math>\mu</math>L)</b>			
7 $\log_{10}$ IU/mL	0,05	0,10	0,05
4 $\log_{10}$ IU/mL	0,02	0,03	0,05
3 $\log_{10}$ IU/mL	0,20	0,05	0,15
2 $\log_{10}$ IU/mL	0,02	0,24	0,26
0 $\log_{10}$ IU/mL	0,00	0,00	0,00
<b>Ispitak urina (550 <math>\mu</math>L)</b>			
7 $\log_{10}$ IU/mL	0,09	0,27	0,19
4 $\log_{10}$ IU/mL	0,25	0,06	0,19
3 $\log_{10}$ IU/mL	0,06	0,08	0,14
2 $\log_{10}$ IU/mL	0,03	0,11	0,14
0 $\log_{10}$ IU/mL	0,00	0,00	0,00



### Obnovljivost od instrumenta do instrumenta<sup>14</sup>

Obnovljivost od instrumenta do instrumenta za testnu traku NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip utvrđena je upotrebom triju različitih sustava (dva sustava NeuMoDx™ 288 Molecular System i jedan sustav NeuMoDx™ 96 Molecular System). Panel za BKV s 5 sastavnica pripremljen s plazmidom BKV-a upotrebljavao se za procjenu radnog učinka. Testiranje se provodilo paralelno na sustavima tijekom 5 dana. Određeno je variranje unutar dana i između sustava i utvrđena je ukupna standardna devijacija od  $\leq 0,30 \log_{10}$  IU/mL. Ekvivalentan radni učinak dokazan je među sustavima jer je SD u kvantifikaciji svih sastavnica panela bio unutar specifikacije dopuštenih odstupanja (*Tablica 12.*).

**Tablica 12.:** Obnovljivost od instrumenta do instrumenta – testna traka NeuMoDx™ BKV Quant Test Strip

Uzorak	SD ponovljivosti (log <sub>10</sub> IU/mL)	SD među danima (log <sub>10</sub> IU/mL)	SD unutar instrumenta (log <sub>10</sub> IU/mL)	SD među instrumentima (log <sub>10</sub> IU/mL)	SD obnovljivosti (log <sub>10</sub> IU/mL)
<b>Ispitak plazme/seruma (ulazni volumen 550 µL)</b>					
RISppHIGH	0,10	0,05	0,11	0,06	0,12
RISppMIDDLE	0,13	0,05	0,13	0,04	0,13
RISppMLOW	0,10	0,06	0,12	0,04	0,12
RISppLOW	0,12	0,05	0,13	0,04	0,13
RISppNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Ispitak urina</b>					
RISpuHIGH	0,11	0,05	0,12	0,06	0,14
RISpuMIDDLE	0,10	0,01	0,10	0,05	0,11
RISpuMLOW	0,09	0,04	0,10	0,07	0,12
RISpuLOW	0,15	0,02	0,15	0,05	0,16
RISpuNEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

### REFERENCE

1. Ambalathingal R, Francis R S *et al.* 2017. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev* 30(2):503-528.
2. Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. Bk virus: a clinical review. 2001 *Clin Infect Dis.* 15;33(2):191-202.
3. Navarro E, Serrano-Heras G *et al.* 2015. Real-time PCR Detection Chemistry. *Clin Chim Acta.*15;439:231-50.
4. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens, <https://www.osha.gov/lawsregs/regulations/standardnumber/1910/1910.1030>
5. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Ed. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
6. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2004.
7. CLSI. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline — Fourth Edition (M29-A4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
8. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline—First Edition CLSI Document MM13-A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005
9. Sheila Govind, Jason Hockley, Clare Morris, Neil Almond, Collaborative Study Group. 2019. The Development and Establishment of the 1st WHO BKV International Standard for Nucleic Acid Based Techniques. *Biologicals*; 60:75-84.
10. CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. Approved Guideline – Third Edition. CLSI document MM03. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
11. CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document MM06-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2010.
12. CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2012.
13. CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline – First Edition. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2003.
14. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2014.
15. CLSI. Metrological Traceability and Its Implementation; Approved Guideline – Second Edition. CLSI Report EP32-R. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2006.

### ZAŠTITNI ZNAKOVI

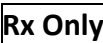













NeuMoDx™ je zaštitni znak tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.

TaqMan® je registrirani zaštitni znak tvrtke Roche Molecular Systems, Inc.

STAT-NAT® je registrirani zaštitni znak tvrtke SENTINEL CH. S.p.A.

Svi drugi nazivi proizvoda, zaštitni znakovi i registrirani zaštitni znakovi koji se mogu pojaviti u ovom dokumentu u vlasništvu su svojih vlasnika.

### SIMBOLI

SIMBOL	ZNAČENJE
	Upotreba samo uz recept
	Proizvođač
	Distributer
	Medicinski proizvod za <i>in vitro</i> dijagnostiku
	Kataloški broj
	Kôd šarže
	Pročitajte upute za upotrebu
	Oprez, pročitajte popratne dokumente
	Ograničenja temperature
	Skladištiti na suhom mjestu
	Nije za ponovnu upotrebu
	Ne izlagati svjetlosti
	Sadržava dovoljno za <n> testova
	Upotrijebiti do



SENTINEL CH. S.p.A.  
Via Robert Koch, 2  
20152 Milano, Italy

[www.sentinel diagnostics.com](http://www.sentinel diagnostics.com)



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

+1 888 301 NMDX (6639)  
[techsupport@neumodx.com](mailto:techsupport@neumodx.com)

Izveštaj o kontroli sigurnosti:  
[www.neumodx.com/contact-us](http://www.neumodx.com/contact-us)

Patent: [www.neumodx.com/patents](http://www.neumodx.com/patents)