


202500 NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip
OPREZ: samo za izvoz u SAD

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

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™ HHV-6 Quant Assay automatizirani je *in vitro* test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za kvantifikaciju i diferencijaciju DNK humanog betaherpesvirusa 6A (HHV-6A) i/ili DNK humanog betaherpesvirusa 6B (HHV-6B) u plazmi s EDTA kod imunokompromitiranih pacijenata nakon transplantacije.^{1,2}

Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx™ 288 Molecular System i sustavu NeuMoDx™ 96 Molecular System obuhvaća automatiziranu ekstrakciju DNK radi izolacije ciljnih nukleinskih kiselina iz ispitka te PCR u stvarnom vremenu koji cilja dvije vrlo konzervirane regije u genomima virusa HHV-6A i HHV-6B.

Ispitivanje je namijenjeno za pomoć u praćenju razina DNK virusa HHV-6A i/ili HHV-6B u plazmi s EDTA. Ispitivanje je namijenjeno za uporabu u kombinaciji s kliničkom slikom i drugim laboratorijskim markerima napretka bolesti za kliničko zbrinjavanje i praćenje infekcija virusom HHV-6A i/ili HHV-6B.

Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay nije namijenjeno za uporabu kao test probira na prisutnost DNK virusa HHV-6A i/ili HHV-6B u krvi ili krvnim pripravcima.

Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay namijenjeno je za uporabu od strane obučenog osoblja kliničkog laboratorija koje je posebno obučeno i osposobljeno za tehnike PCR-a u stvarnom vremenu i *in vitro* dijagnostičke postupke i/ili rad na sustavima NeuMoDx™ Molecular System. Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay nije namijenjeno za samotestiranje ili upotrebu na mjestima pružanja zdravstvene skrbi.

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). Kako bi se započelo testiranje, plazma u primarnoj ili sekundarnoj epruveti za ispitak kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx™ System postavlja se na sustav NeuMoDx™ System u predviđeni nosač epruveta za ispitke za početak automatizirane obrade.

Alikvot ispitka plazme volumena 550 µl miješa se s puferom NeuMoDx™ Lysis Buffer 1 i sustav NeuMoDx™ System automatski izvodi sve korake potrebne za ekstrakciju ciljnih nukleinskih kiselina, pripremu izolirane DNK za PCR amplifikaciju u stvarnom vremenu i, ako su prisutni, amplifikaciju i detekciju produkata amplifikacije. Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 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.

Humani herpes virus tipa 6 (HHV-6) dio je potporodice betaherpesvirusa i obuhvaća dvije različite vrste – HHV-6A i HHV-6B². Riječ je o virusu DNK koji ima tropizam za tkiva središnjeg živčanog sustava, krajnike, žlijezde slinovnice, bubrege, jetru, limfne čvorove, endotelne stanice i monocite/makrofage.⁴ Primarni sindrom povezan s infekcijom virusom HHV-6 jest egzantema subitum (odnosno rozeola ili šesta bolest).^{1,2,3,4} To je gotovo isključivo dječja bolest i čini 10 % do 30 % posjeta hitnoj službi među djecom mlađom od 2 godine.¹ Kao svi herpesvirusi, HHV-6 može uspostaviti cjeloživotnu latenciju nakon početne infekcije, između ostalog u hematopoetskim matičnim stanicama i germinativnim stanicama, čime se omogućuje horizontalni i vertikalni prijenos.² Taj fenomen opisan je kod 0,2 do 1 % opće populacije.⁴ Kod imunokompromitiranih domaćina latentni virus može se ponovno aktivirati i izazvati teške bolesti, uključujući pneumonitis, bolest središnjeg živčanog sustava (Central Nervous System, CNS) i odgođeno usađivanje koštane srži ili reakciju presatka protiv primatelja (Graft Versus Host Disease, GVHD). Incidencija ponovne aktivacije virusa HHV-6 u rasponu je od približno 0 % do 80 % (prosječno od 30 % do 50 %) kod pacijenata s transplantiranim solidnim organom (Solid Organ Transplant, SOT) ili pacijenata s transplantiranom koštanom srži (Bone Marrow Transplant, BMT), s blagom sklonošću BMT-u.¹ Ponovna aktivacija virusa HHV-6A se za razliku od HHV-6B rijetko identificira nakon transplantacije. Ponovna aktivacija virusa HHV-6B pogađa približno 40 % ispitanika unutar prvih nekoliko mjeseci. To je najčešći infektivni uzrok encefalitisa nakon transplantacije hematopoetskih matičnih stanica (Hematopoietic Cell Transplantation, HCT) (1 % slučajeva). Pacijenti koji razviju encefalitis uzrokovan virusom HHV-6B obično imaju istodobnu detekciju virusa HHV-6B u plazmi s virusnim opterećenjem ≥ 10.000 kopija/ml.³

NAČELA POSTUPKA

Za izvođenje analize kod ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay na sustavu NeuMoDx™ System upotrebljavaju se testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip, kalibrator NeuMoDx™ HHV-6 Calibrator, kontrole NeuMoDx™ HHV-6 External Control, pufer NeuMoDx™ Lysis Buffer 1 i NeuMoDx™ reagensi za opću uporabu. Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay kombinira automatiziranu ekstrakciju DNK, amplifikaciju i detekciju izvođenjem PCR-a u stvarnom vremenu. Ispitci plazme u primarnim ili sekundarnim epruvetama za ispitke kompatibilnima sa sustavom NeuMoDx™ System postavlja 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™ System koriste se kombinacijom topline, litičkog enzima i ekstrakcijskih reagensa. Mikrosfere s magnetskim afinitetom hvataju oslobođene nukleinske kiseline. Mikrosfere 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. Sustavi NeuMoDx™ System zatim upotrebljavaju eluiranu DNK za rehidraciju patentiranih reagensa za amplifikaciju osušenih zamrzavanjem proizvođača SENTINEL CH. S.p.A. koji sadržavaju sve elemente neophodne za PCR amplifikaciju ciljnih sekvenci specifičnih za HHV-6 i ciljne sekvence za SPC1. Nakon rekonstitucije liofiliziranih reagensa za PCR sustav NeuMoDx™ System pipetira pripremljenu mješavinu spremnu za PCR u uložak NeuMoDx™ Cartridge. Amplifikacija i detekcija kontrolnih i ciljnih (ako su prisutne) DNK sekvenci 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.

Ciljne sekvence genoma za testnu traku NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip su geni U31 i U67 za genome virusa HHV-6A i HHV-6B. 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 kompletom početnica. Kako DNK polimeraza Taq produžuje početnicu i sintetizira novi lanac, 5' do 3' egzozonukleazna 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.⁵

TaqMan® probe označene fluorokromima na 5' kraju i prigušivačima na 3' kraju upotrebljavaju se za detekciju DNK virusa HHV-6A, DNK virusa HHV-6B 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 rezultat (POSITIVE (POZITIVNO) / NEGATIVE (NEGATIVNO) / INDETERMINATE (NEODREĐENO) / UNRESOLVED (NERAZRIJEŠENO) / NO RESULT (NEMA REZULTATA)). Ako je rezultat pozitivan i izračunata koncentracija je unutar granica određivanja, softver sustava NeuMoDx™ System također daje kvantitativnu vrijednost koja se odnosi na uzorak ili izvještava ako je izračunata koncentracija izvan linearnog raspona.

REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
202500	Testna traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip <i>Reagensi za PCR osušeni zamrzavanjem koji sadržavaju TaqMan® probe i početnice specifične za HHV-6A, TaqMan® probe i početnice specifične za HHV-6B te TaqMan® probe i početnice specifične za SPC1.</i>	16	96

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

REF.	Sadržaj
100200	Pločica NeuMoDx™ Extraction Plate <i>Suhe paramagnetske čestice, litički enzim i kontrole obrade uzorka.</i>
801000	Kalibratori NeuMoDx™ HHV-6 Calibrator <i>Setovi suhih kalibratora za HHV-6A i HHV-6B visoke i niske razine za jednokratnu upotrebu za utvrđivanje standardne krivulje.</i>
901000	Kontrole NeuMoDx™ HHV-6 External Control <i>Setovi suhih pozitivnih kontrola i negativnih kontrola za HHV-6A i HHV-6B za jednokratnu upotrebu za utvrđivanje svakodnevne valjanosti ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay</i>
400400	NeuMoDx™ Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx™ Wash Reagent
400200	NeuMoDx™ Release Reagent
100100	NeuMoDx™ Cartridge
235903	Vršci s filtrima (300 µl) Hamilton CO-RE
235905	Vršci s filtrima (1000 µl) Hamilton CO-RE

Pojedinosti o reagensima i potrošnom materijalu potražite u odgovarajućim uputama

Potrebni instrumenti

Sustav NeuMoDx™ 288 Molecular System (REF. 500100) ili sustav NeuMoDx™ 96 Molecular System (REF. 500200).
Inačica softvera NeuMoDx System Software 1.9.2.6 ili novija.

UPOZORENJA I MJERE OPREZA

- Testna traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip namijenjena je samo za in vitro dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx™ System.
- Prije izvođenja testa pročitajte sve upute u uputama za komplet.
- Ne upotrebljavajte reagense 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.
- Za jednokratnu uporabu.
- Sve testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip čuvajte u njihovim aluminijskim omotima na mjestu zaštićenom od svjetlosti i vlage.
- Valjana kalibracija testa dobivena obradom kalibratora visoke i niske razine iz kalibratora NeuMoDx™ HHV-6 Calibrator (REF. 801000) mora biti dostupna prije dobivanja rezultata testa za kliničke uzorke.
- Kontrole NeuMoDx™ HHV-6 External Control (REF. 901000) moraju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip.
- Minimalni volumen ispitka ovisi o veličini epruvete, nosaču za ispitke i volumenu ispitka kako je navedeno u nastavku. Volumen manji od navedenog minimuma može rezultirati pogreškom „Quantity Not Sufficient” (Nedovoljna količina).
- Uporaba ispitaka koji su se čuvali pri neprikladnim temperaturama ili dulje od navedenog vremena pohrane može dati nevažne ili pogrešne rezultate.
- 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 upotrijebite novu pipetu.
- Kako biste izbjegli kontaminaciju, ne rukujte uloškom NeuMoDx™ Cartridge i ne rastavljajte ga nakon amplifikacije. Nemojte vaditi uloške NeuMoDx™ Cartridge 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 osmišljen 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™ HHV-6 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™ HHV-6 Quant Test Strip ili pločice NeuMoDx™ Extraction Plate te gornju površinu spremnika pufera NeuMoDx™ Lysis Buffer 1; pri rukovanju potrošnim materijalom i reagensima smiju se dodirivati samo bočne površine.
- Sigurnosno-tehnički listovi (Safety Data Sheets, SDS) dostupni su (prema potrebi) za svaki reagens na www.neumodx.com/client-resources.
- Okomita crta na margini teksta naznačuje promjene u usporedbi s prethodnom inačicom uputa.
- Nakon izvođenja testa temeljito operite ruke.
- Ne pipetirajte ustima. Nemojte pušiti, piti ni jesti u područjima u kojima se rukuje ispitcima ili reagensima.
- Ispitcima uvijek rukujte kao da su infektivni te u skladu sa sigurnim laboratorijskim postupcima poput onih opisanih u Standard on the Bloodborne Pathogens agencije OSHA.⁶ Za materijale koji sadržavaju ili za koje se sumnja da sadržavaju infektivne agense trebali biste primjenjivati razinu biološke sigurnosti 2⁷ ili druge odgovarajuće prakse za biološku sigurnost^{8,9}.
- Odložite nekorištene reagense i otpad u skladu s državnim, saveznim, pokrajinskim i lokalnim propisima. Pridržavajte se preporuka navedenih u sigurnosno-tehničkom listu (Safety Data Sheet, SDS).

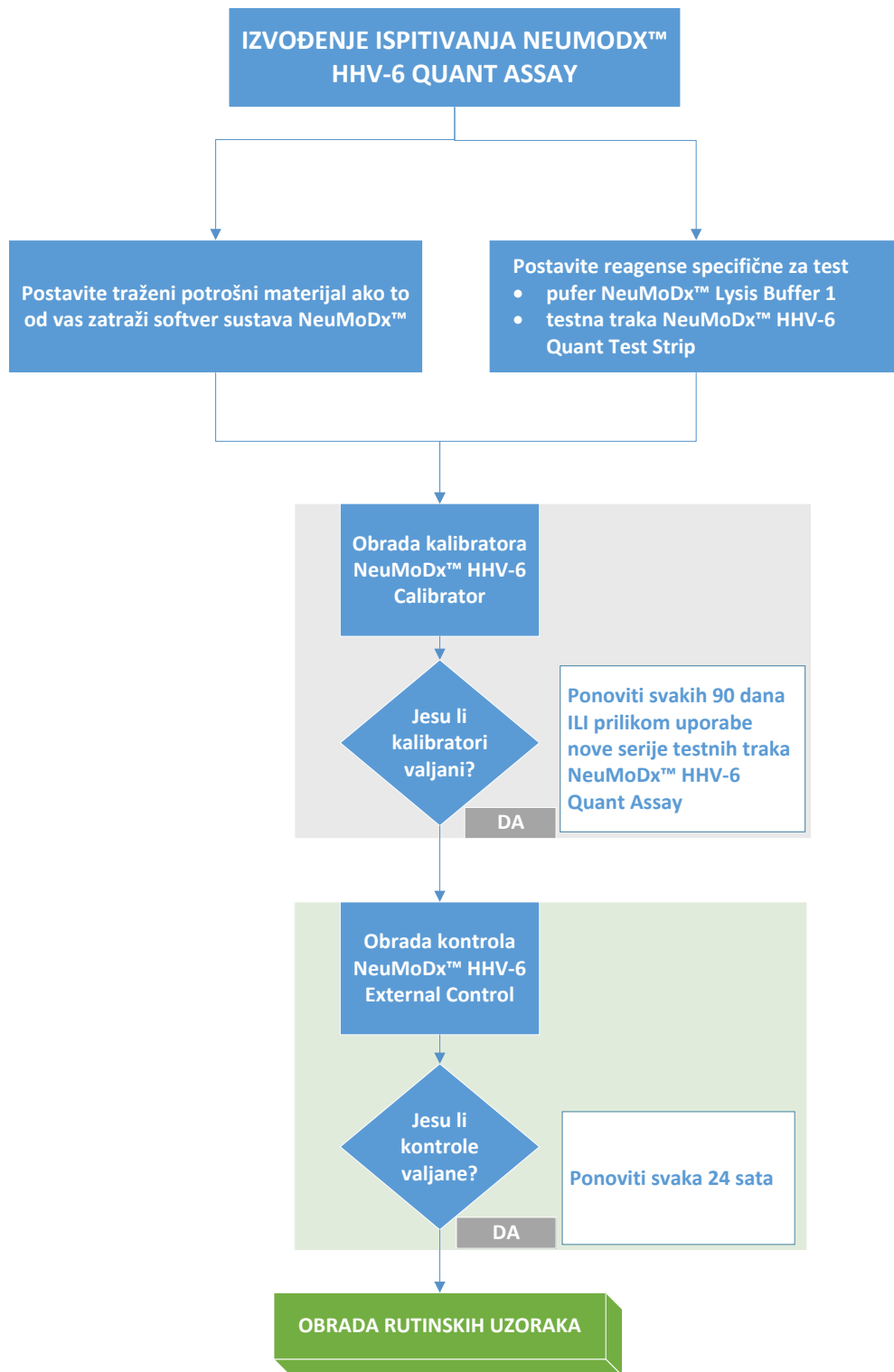
POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

- Testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip stabilne su u primarnom pakiranju na temperaturi od +15 °C / +30 °C do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci proizvoda.
- Testna traka NeuMoDx™ HHV-6 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™ HHV-6 Quant Test Strip (izvaditi trake iz vrećice) i postaviti ih na sustav NeuMoDx™ System. Nemojte uklanjati aluminijsku foliju s trake tijekom njezina postavljanja na nosač testnih traka.
- Kalibratori i kontrole NeuMoDx™ HHV-6 nisu infektivni, ali treba ih odložiti u laboratorijski biološki opasan otpad nakon upotrebe jer će sadržavati ciljni 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 pohranjene u primarnim epruvetama.
3. Za pripremu ispitaka plazme punu krv treba prikupiti u sterilne epruvete uz primjenu antikoagulansa EDTA. Pridržavajte se uputa proizvođača epruvete za prikupljanje ispitka.
4. Puna krv prikupljena u gore navedenim proizvodima može se pohraniti i/ili prevoziti do 24 sata na temperaturi od +2 °C / +8 °C prije pripreme plazme. Priprema uzoraka treba se izvoditi u skladu s uputama proizvođača.
5. Pripremljena plazma može se pohraniti na sustavu NeuMoDx[™] System do 24 sata prije obrade. Ako je potrebno dodatno vrijeme pohrane, preporučuje se stavljanje ispitaka u hladnjak ili zamrzavanje u obliku sekundarnih alikvota.
6. Pripremljeni ispitci plazme do testiranja moraju biti pohranjeni na temperaturi od +2 °C / +8 °C najviše 8 dana i na sobnoj temperaturi najviše 24 sata.
7. Pripremljeni ispitci mogu se pohraniti na temperaturi < -20 °C do 8 tjedana prije obrade; uzorci ne bi trebali proći više od 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije uporabe:
 - a. Ako su uzorci zamrznuti, ostavite ih da se prije testiranja u potpunosti odmrznu dok ne dosegnu sobnu temperaturu (+15 °C / +30 °C); promiješajte na vorteks miješalici za dobivanje ravnomjerno raspodijeljenog uzorka.
 - b. Nakon odmrzavanja uzoraka testiranje treba provesti u roku od 24 sata.
8. Ako se ispitci otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.
9. Jasno označite ispitke i naznačite da su ispitci za testiranje na HHV-6A i/ili HHV-6B.
10. Nastavite s odjeljkom *Priprema za test*.

Sažetak cjelokupnog postupka izvođenja ispitivanja NeuMoDx[™] HHV-6 Quant Assay prikazan je u nastavku na *slici 1*.



Slika 1: tijek rada izvođenja ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay.

UPUTE ZA UPOTREBU

Priprema za test

Za uzorke plazme, ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay može se izvoditi izravno iz primarnih epruveta za prikupljanje krvi ili iz alikvota ispitaka u sekundarnim epruvetama.

1. Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom na epruvetu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx™ System. Primarna epruveta za prikupljanje krvi može se označiti i postaviti izravno na odgovarajući nosač epruveta za ispitke nakon centrifugiranja prema uputama proizvođača.
2. Ako ispitak plazme 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.
3. Za uzorke plazme 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
Nosač epruveta za ispitke za 32 epruvete	promjer 11 – 14 mm, visina 60 – 120 mm	750 µl
Nosač epruveta za ispitke za 24 epruvete	promjer 14,5 – 18 mm, visina 60 – 120 mm	1100 µl
Nosač epruveta za ispitke malog volumena	epruveta od 1,5 ml za mikrocentrifugu sa stožastim dnom	650 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 epruvete.
2. Aluminijske vrećice testnih traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip zarezite na mjestu naznačenom bočnim urezima.
3. Trake izvadite iz vrećica netom prije upotrebe.
4. Prije upotrebe vrećica uvijek provjerite jesu li one dobro zatvorene te nalazi li se u njima vrećica sa sredstvom za isušivanje. Upotrebljavajte samo neoštećene vrećice.
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 NeuMoDx™ System Test Strip carrier testnim trakama NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosače testnih traka u sustav NeuMoDx™ System.
7. Ako vas softver sustava NeuMoDx™ System to zatraži, u nosače potrošnog materijala sustava NeuMoDx™ System dodajte potreban potrošni materijal i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosače u sustav NeuMoDx™ System.
8. Ako vas softver sustava NeuMoDx™ System to 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 System) 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 (REF. 801000) i/ili vanjske kontrole (REF. 901000). Dodatne informacije o kalibratorima i kontrolama možete pronaći u odjeljku Obrada rezultata.
10. Postavite epruvetu/e s kalibratorom/kontrolom u standardni nosač za 32 epruvete i pobrinite se da uklonite čepove sa svih epruveta.
11. Postavite nosače epruveta za ispitke na policu za automatsko postavljanje, pobrinite se da uklonite čepove sa svih epruveta i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosače u sustav NeuMoDx™ System. To će pokrenuti obradu ispitaka postavljenih za identificiranje testove ako u sustavu postoji valjani nalog za test.

OGRANIČENJA

- Testna traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx™ System.
- Radni učinak testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip utvrđen je za ispitke plazme pripremljene iz pune krvi prikupljene s antikoagulansom EDTA. Uporaba testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip s drugim vrstama ispitaka nije procijenjena i radne značajke testa za druge vrste ispitaka nisu poznate.
- Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay ne smije se upotrebljavati s uzorcima heparinizirane humane krvi.
- Budući da detekcija DNK virusa HHV-6A i/ili HHV-6B ovisi o broju organizama prisutnih u uzorku, pouzdani rezultati ovise o propisnom prikupljanju, rukovanju i skladištenju ispitaka.
- Pogrešni rezultati mogu se javiti zbog nepropisnog prikupljanja, rukovanja i skladištenja 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™ HHV-6 Quant Assay.
- Rad na sustavu NeuMoDx™ System ograničen je na osoblje obučeno za upotrebu sustava NeuMoDx™ System.
- Ako ne dođe do amplifikacije ciljnih sekvenci virusa HHV-6A, virusa HHV-6B i SPC1, prijavljuje se nevažeci rezultat (Indeterminate (Neodređeno) ili Unresolved (Nerazriješeno)) te je potrebno ponoviti test.
- Ako dođe do pogreške sustava prije dovršetka obrade uzorka, prijavljuje se rezultat „No Result” (Nema rezultata) te je potrebno ponoviti test.
- Ako ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay ima rezultat Positive (Pozitivno), ali je vrijednost određivanja izvan granica određivanja, sustav NeuMoDx™ System prijavit će je li detektirani DNK virusa HHV-6A i/ili HHV-6B ispod donje granice određivanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ili iznad gornje granice određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- U slučaju da je detektirani DNK virusa HHV-6A i/ili HHV-6B iznad gornje granice određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay može se ponoviti s razrijeđenim alikvotom originalnog ispitka. Preporučuje se razrjeđenje u omjeru 1:100 ili 1:1000 plazmom negativnom na DNK virusa HHV-6A i HHV-6B ili diluansom Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Sustav će automatski izračunati koncentraciju originalnog ispitka na sljedeći način: koncentracija originalnog ispitka = \log_{10} (faktor razrjeđivanja) + prijavljena koncentracija razrijeđenog uzorka, pod uvjetom da je faktor razrjeđivanja ispravno odabran u softveru prije ponavljanja.
- Povremena prisutnost inhibitora PCR-a u plazmi može uzrokovati pogrešku određivanja sustava; ako do toga dođe, preporuča se ponoviti test s istim ispitkom razrijeđenim diluansom Basematrix u omjeru 1:10 ili 1:100.
- Pozitivan rezultat ne naznačava nužno prisutnost vijabilnih organizama. Međutim, pozitivan rezultat ukazuje na prisutnost DNK virusa HHV-6A i/ili HHV-6B.
- Delecija ili mutacije u konzerviranim regijama koje su ciljane ispitivanjem NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay mogu utjecati na detekciju ili mogu dovesti do pogrešnih rezultata kada se upotrebljava testna traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 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™ HHV-6 Quant Assay automatski generira softver sustava NeuMoDx™ System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6. Rezultat ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay može se prijaviti kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom virusa HHV-6A i/ili HHV-6B, 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 iskazuju na temelju algoritma koji obrađuje rezultate u ADF-u, koji je sažet u nastavku u *tablici 1*.

Rezultati dobiveni s pomoću testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip trebali bi se tumačiti zajedno s drugim kliničkim i laboratorijskim nalazima.

Tablica 1: sažetak tumačenja rezultata ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay

Rezultat	HHV-6A/HHV-6B	Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1)	Tumačenje rezultata
Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom	Amplified (Amplificirano) $2,30 \leq [\text{HHV-6A}] \leq 6,0 \log_{10}$ kopija/ml	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK virusa HHV-6A detektirana unutar kvantitativnog raspona
	Amplified (Amplificirano) $2,30 \leq [\text{HHV-6B}] \leq 6,0 \log_{10}$ IU/ml	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK virusa tipa HHV-6B detektirana unutar kvantitativnog raspona
Positive (Pozitivno), iznad gornje granice određivanja [Upper Limit of Quantitation, ULoQ]	Amplified (Amplificirano) $[\text{HHV-6A}] > 6,0 \log_{10}$ kopija/ml	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK virusa HHV-6A detektirana iznad kvantitativnog raspona
	Amplified (Amplificirano) $[\text{HHV-6B}] > 6,0 \log_{10}$ IU/ml	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK virusa tipa HHV-6B detektirana iznad kvantitativnog raspona
Positive (Pozitivno), ispod donje granice određivanja [Lower Limit of Quantitation, LLoQ]	Amplified (Amplificirano) $[\text{HHV-6A}] < 2,30 \log_{10}$ kopija/ml	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK virusa HHV-6A detektirana ispod kvantitativnog raspona
	Amplified (Amplificirano) $[\text{HHV-6B}] < 2,30 \log_{10}$ IU/ml	Amplified (Amplificirano) ili Not Amplified (Nije amplificirano)	DNK virusa tipa HHV-6B detektirana ispod kvantitativnog raspona
Negative (Negativno)*	Not Amplified (Nije amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	DNK virusa HHV-6A/HHV-6B nije detektirana
Indeterminate (Neodređeno)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka završena)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeci; ponovno testirajte uzorak†
No Result (Nema rezultata)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Nije amplificirano, Otkrivena pogreška sustava, Obrada uzorka prekinuta)		Obrada uzorka je prekinuta; ponovno testirajte uzorak†
Unresolved (Nerazriješeno)	Not Amplified, No System Error Detected (Nije amplificirano, Nema uočenih pogrešaka sustava)		Svi rezultati ciljne sekvence bili su nevažeci; ponovno testirajte uzorak†

*Kao što je slučaj s drugim testovima, negativni rezultati ne isključuju infekciju virusom HHV-6A i/ili HHV-6B.

†Sustav NeuMoDx™ System opremljen je automatskom opcijom Rerun (Ponovna obrada) / Repeat (Ponavlanje) 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 određivanja ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay koncentracija DNK virusa HHV-6A i DNK virusa HHV-6B u uzorcima izračunata je s pomoću relativnih pohranjenih standardnih krivulja u kombinaciji s koeficijentima kalibracije.
 - Koeficijent kalibracije izračunava se na temelju rezultata dobivenih kalibratorima NeuMoDx™ HHV-6 Calibrator koji su obrađeni kako bi se utvrdila valjanost standardne krivulje za određenu seriju testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip, na određenom sustavu NeuMoDx™ System za svaku ciljnu sekvencu.
 - Koeficijent kalibracije uključen je u konačno određivanje koncentracije DNK virusa HHV-6A i DNK virusa HHV-6B.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay izraženi su u \log_{10} kopija/ml i kopija/ml za ciljnu sekvencu virusa HHV-6A te u \log_{10} IU/ml i IU/ml za ciljnu sekvencu virusa HHV-6B.
- Dobiveno određivanje nepoznatih uzoraka sljedivo je do verifikacijskog panela za HHV-6A EDX (Exact Diagnostics) kvantificiranog digitalnim kapljičnim PCR-om (digital droplet PCR, ddPCR) te do 1. međunarodnog standarda za DNK virusa HHV-6B SZO-a (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC kod: 15/266).

Kalibracija testa

Valjana kalibracija na temelju standardne krivulje neophodna je za određivanje DNK virusa tipa HHV-6A i/ili DNK virusa tipa HHV-6B u ispitcima. Za dobivanje valjanih rezultata kalibracija testa mora se obaviti i za HHV-6A i za HHV-6B s pomoću kalibratora koje isporučuje tvrtka NeuMoDx™ Molecular, Inc.

Kalibratori

1. Kalibratori NeuMoDx[™] HHV-6 Calibrator isporučuju se u kompletu (REF. 801000), a sastoje se od osušenih granula sintetske DNK virusa HHV-6A i DNK virusa HHV-6B te specifičnog pufera.
2. Set kalibratora za HHV-6 treba obraditi sa svakom novom serijom testnih traka NeuMoDx[™] HHV-6 Quant Test Strip, ako se nova datoteka definicije ispitivanja za HHV-6 učita 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 za testiranje dok kalibratori nisu uspješno obrađeni.
4. Ako je potrebno obraditi novi set kalibratora za HHV-6, pročitajte sve upute u uputama za kalibratore NeuMoDx[™] HHV-6 Calibrator prije izvođenja testa.
5. Valjanost kalibracije određuje se na sljedeći način:
 - a. Obradom seta dvaju kalibratora (visoke i niske razine) za svaku ciljnu sekvencu potrebno je generirati dva koeficijenta kalibracije – jedan za HHV-6A i jedan za HHV-6B – kako bi se utvrdila valjanost za svaku krivulju.
 - b. Za dobivanje valjanih rezultata barem 2 od 3 ponavljanja moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara. Za set kalibratora za HHV-6A nazivna ciljna vrijednost kalibratora niske razine iznosi 3,0 log₁₀ kopija/ml, a nazivna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi 5,0 log₁₀ kopija/ml, dok za set kalibratora za HHV-6B nazivna ciljna vrijednost kalibratora niske razine iznosi 3,0 log₁₀ IU/ml, a nazivna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi 5,0 log₁₀ 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 virusa HHV-6A i/ili HHV-6B.
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.
7. Ako provjera valjanosti kalibratora ne uspije drugi uzastopni put, obratite se tehničkoj podršci tvrtke QIAGEN.

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. Vanjske kontrole za HHV-6A i HHV-6B (REF. 901000) isporučuje tvrtka NeuMoDx™. Pozitivne kontrole sadržavaju osušene granule sintetske DNK virusa HHV-6A i HHV-6B. Negativna kontrola je pufer.
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 vanjske za kontrole HHV-6.
4. S pomoću zaslona osjetljivog na dodir i nosača epruveta za ispitke postavljenog na policu za automatsko postavljanje postavite pozitivne i negativne kontrole u sustav NeuMoDx™ System. Sustav NeuMoDx™ System prepoznaje crtični kod i započinje obradu epruveta s vanjskim kontrolama, 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 HHV-6A i HHV-6B, a negativna kontrola trebala bi dati rezultat Negative (Negativno) na HHV-6A i HHV-6B.
6. U slučaju nepodudarnih rezultata vanjskih kontrola treba postupiti na sljedeći način:
 - a. Rezultat testa Positive (Pozitivno) iskazan za negativan kontrolni uzorak ukazuje na problem s kontaminacijom ispitka te je potrebno provjeriti postupke kontrole kvalitete laboratorija kako bi se utvrdio temeljni uzrok. Pripremu uzoraka, rukovanje kontrolama i postavljanje PCR-a u stvarnom vremenu obavezno obavljajte u odvojenim područjima. Dodatne savjete za rješavanje problema potražite u korisničkom priručniku za sustav *NeuMoDx 288 ili 96 Molecular System*.
 - b. Rezultat testa 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 No Result (NR) (Nema rezultata), Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ili Indeterminate (IND) (Neodređeno), ponovite obradu neuspjelih kontrola s novim, svježe pripremljenim bočicama kontrola čije testiranje valjanosti nije uspjelo.
 - d. Ako se za pozitivne kontrole NeuMoDx™ HHV-6 External Control i dalje dobiva rezultat Negative (Negativno), obratite se tehničkoj podršci tvrtke QIAGEN.
 - e. Ako se za negativne kontrole NeuMoDx™ HHV-6 External Control i dalje dobiva rezultat Positive (Pozitivno), pokušajte ukloniti sve izvore potencijalne kontaminacije, što uključuje zamjenu SVIH reagensa, prije nego što se obratite tehničkoj podršci tvrtke QIAGEN.
7. Ako se za vanjske kontrole ne dobiju očekivani rezultati, potrebno je ponoviti set pozitivnih i negativnih kontrola. Uzorci se neće obraditi dok sustav ne obradi valjani set vanjskih kontrola. U slučaju da su uzorci u obradi kada rok vanjskih kontrola istekne, sustav će tražiti obradu valjanog seta vanjskih kontrola. Ako set vanjskih kontrola ne uspije dati valjane rezultate, rezultati za uzorak neće se prijaviti.

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/kontrolom/kalibratorom. Početnice i probe specifične za SPC1 uključene su u svaku testnu traku NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip, što omogućuje detekciju prisutnosti SPC1 zajedno s ciljnom sekvencom DNK virusa HHV-6A i/ili DNK virusa HHV-6B (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™ HHV-6 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. Test je potrebno ponoviti kako bi se dobio valjani rezultat.

Rezultat Indeterminate (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 No Result (Nema rezultata) prijavljuje se ako se detektira pogreška sustava NeuMoDx System te se obrada uzorka prekine. U slučaju rezultata No Result (Nema rezultata) preporučuje se ponovno testiranje.

Rezultat UNR (Nerazriješeno) prijavljuje se ako nema detektiranih ciljnih sekvenci i ako nema amplifikacije DNK virusa HHV-6A, DNK virusa HHV-6B i 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 (za dodatne upute pogledajte odjeljak Ograničenja).

Pogledajte korisnički priručnik za sustav NeuMoDx 288 Molecular System (br. dijela: 40600108) ili korisnički priručnik za sustav NeuMoDx 96 Molecular System (br. dijela: 40600317) za popis kodova pogrešaka koje mogu biti povezane s nevažećim rezultatima.

RADNE ZNAČAJKE^{10,11,15}

Analitička osjetljivost – granica detekcije¹²

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay određena je testiranjem serijskih razrjeđivanja verifikacijskog panela za HHV-6A EDX (Exact Diagnostics) i verifikacijskog panela za HHV-6B EDX (Exact Diagnostics, kalibriran s 1. međunarodnim standardom za HHV-6B, 15/266), u uzorcima plazme negativnima na HHV-6A/HHV-6B kako bi se utvrdila granica detekcije (Limit of Detection, LoD) na sustavima NeuMoDx™ System. Granica detekcije definirana je kao minimalna koncentracija koja se može detektirati, sa stopom uspjehnosti od 95 %. Izračunava se probit analizom koja se primjenjuje na eksperimentalne podatke, s intervalom pouzdanosti (Confidence Interval, CI) 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 *tablici 2*.

Tablica 2: pozitivne stope detekcije za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay

HHV-6A					HHV-6B				
Ciljna koncentracija [kopija/ml]	Ciljna koncentracija [\log_{10} kopija/ml]	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije	Ciljna koncentracija [IU/ml]	Ciljna koncentracija [\log_{10} IU/ml]	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
200	2,30	45	44	97,8 %	200	2,30	46	44	95,7 %
80	1,90	45	32	71,1 %	100	2,00	42	24	57,1 %
60	1,78	43	26	60,5 %	80	1,90	44	19	43,2 %
40	1,60	42	10	23,8 %	60	1,78	43	14	32,6 %
20	1,30	44	1	2,3 %	40	1,60	43	5	11,6 %
0	0	47	0	0 %	0	0	48	0	0 %

Probit analizom utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay iznosi 123,5 kopija/ml ($2,09 \log_{10}$ kopija/ml) (interval pouzdanosti od 95 %: od 102,1 do 145,0 kopija/ml) za HHV-6A i 178,2 IU/ml ($2,25 \log_{10}$ IU/ml) (interval pouzdanosti od 95 %: od 151,3 do 205,0 IU/ml) za HHV-6B.

Analička osjetljivost – donja granica određivanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) i gornja granica određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)¹²

Donja granica određivanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) i gornja granica određivanja (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 odredile donja granica određivanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) i gornja granica određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) izračunata je za svaku ciljnu razinu virusa tipa HHV-6A i HHV-6B za koju je dobivena detekcija > 95 % u sklopu testiranja granice detekcije. TAE se definira na sljedeći način:

$$TAE = |\text{Bias}| + 2 * SD \text{ [Westgardova statistička pravila]}$$

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

Objedinjeni rezultati za 5 razina ispitaka plazme s HHV-6A/HHV-6B koji su se upotrebljavali u ispitivanju donje granice određivanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) / gornje granice određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) prikazani su u tablicama 3 i 4. Na temelju tog skupa podataka i prethodno utvrđene vrijednosti granice detekcije (Limit of Detection, LoD), utvrđeno je da donja granica određivanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) i gornja granica određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) iznose 200 kopija/ml ($2,30 \log_{10}$ kopija/ml) i 1×10^6 kopija/ml za HHV-6A te 200 IU/ml ($2,30 \log_{10}$ IU/ml) i 1×10^6 IU/ml za HHV-6B.

Tablica 3: testna traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip; ULoQ i LLoQ za HHV-6A s odstupanjem i vrijednosti TAE

Ciljna konc. [kopija/ml]	Ciljna konc. [\log_{10} kopija/ml]	Prosječna konc. [\log_{10} kopija/ml]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE
10^6	6,00	5,76	100 %	0,34	0,24	0,91
200	2,30	2,34	97,8 %	0,30	0,03	0,63
80	1,90	2,19	71,1 %	0,27	0,28	0,83
60	1,78	2,21	60,5 %	0,21	0,43	0,86
40	1,60	2,18	23,8 %	0,15	0,57	0,87
20	1,30	2,17	2,3 %	N. P.	0,87	N. P.

Tablica 4: testna traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip; ULoQ i LLoQ za HHV-6B s odstupanjem i vrijednosti TAE

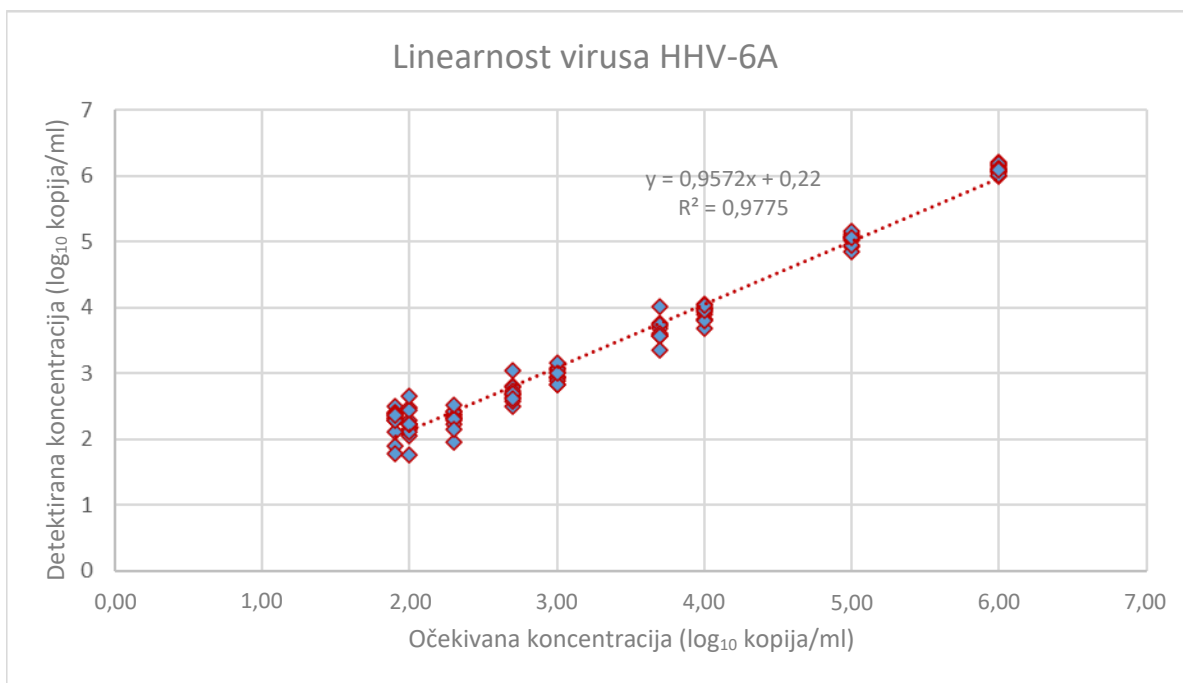
Ciljna konc. [IU/ml]	Ciljna konc. [log ₁₀ IU/ml]	Prosječna konc. [log ₁₀ IU/ml]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE
10 ⁶	6,00	6,06	100 %	0,32	0,06	0,71
200	2,30	2,12	95,7 %	0,22	0,18	0,62
100	2,00	2,04	57,1 %	0,24	0,04	0,52
80	1,90	1,99	43,2 %	0,26	0,08	0,61
60	1,78	1,92	32,6 %	0,26	0,15	0,67
40	1,60	1,79	11,6 %	0,22	0,19	0,62

Na temelju rezultata tih ispitivanja, utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay iznosi 123,5 kopija/ml (2,09 log₁₀ kopija/ml) za HHV-6A te 178,2 IU/ml (2,25 log₁₀ IU/ml) za HHV-6B. Vrijednosti granica određivanja (Limit of Quantitation, LoQ) iznosile su 200 kopija/ml (2,30 log₁₀ kopija/ml) za HHV-6A te 200 IU/ml (2,30 log₁₀ IU/ml) za HHV-6B. Gornja granica određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) iznosila je 1x10⁶ kopija/ml za HHV-6A te 1x10⁶ IU/ml za HHV-6B.

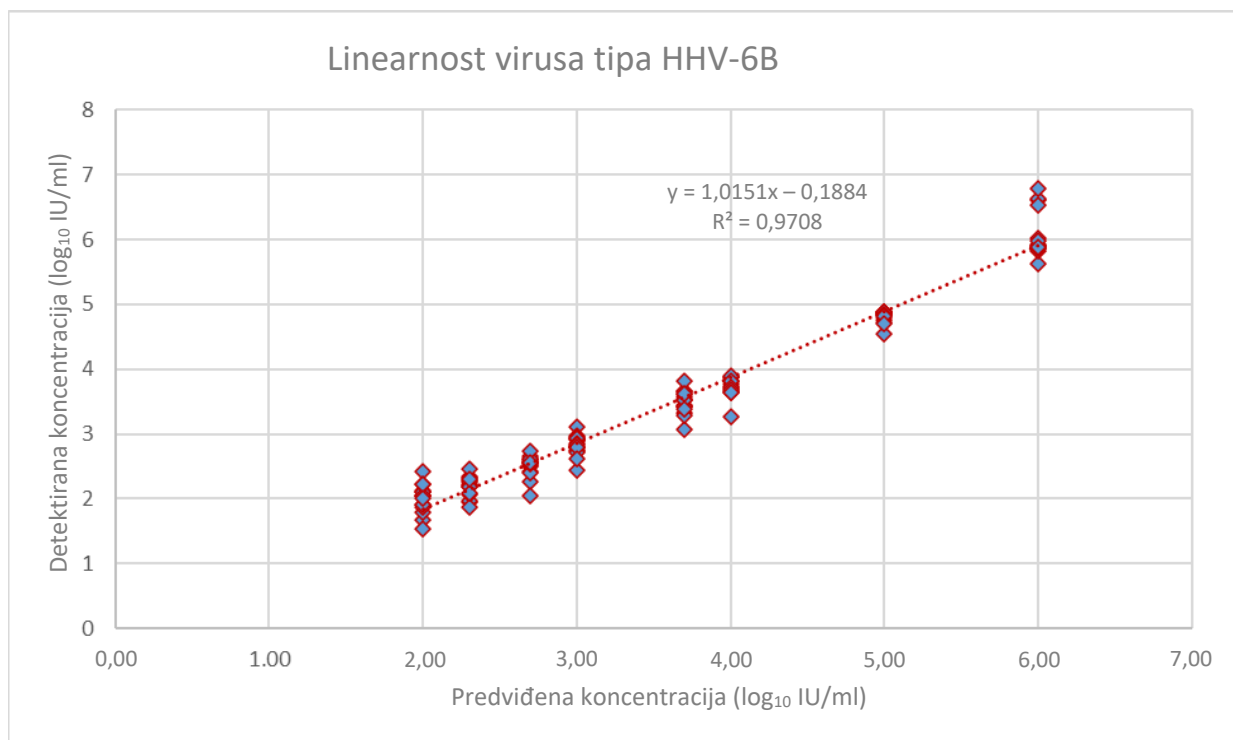
Linearnost¹³

Linearnost testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip utvrđena je na plazmi pripremom serijskih razrjeđivanja s pomoću verifikacijskog panela za HHV-6A EDX (Exact Diagnostics) i verifikacijskog panela za HHV-6B EDX (Exact Diagnostics). Izrađeno je osam (8) serijskih razrjeđivanja panela za HHV-6A/HHV-6B, pripremljenih u humanoj plazmi negativnoj na HHV-6A/HHV-6B, kako bi se pokrio raspon koncentracije od 6 – 2 log₁₀ kopija/ml.

Koncentracije ispitivanja za HHV-6A/HHV-6B koje je prijavio sustav NeuMoDx™ System uspoređene s očekivanim vrijednostima prikazane su na slikama 2 i 3.



Slika 2: linearnost ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay za HHV-6A



Slika 3: linearnost ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay za HHV-6B

Analitička specifičnost – križna reaktivnost^{10, 11}

Analitička specifičnost dokazana je probirom na 22 organizma koji se mogu često pronaći u ispocima plazme te na vrste filogenetski slične virusima HHV-6A i HHV-6B radi utvrđivanja križne reaktivnosti. Organizmi su pripremljeni u poolovima koji su sadržavali 5/6 organizama i testirani su pri visokim koncentracijama (3,48 log₁₀ kopija/ml). Testirani organizmi prikazani su u *tablici 5*. Nije uočena križna reaktivnost s bilo kojim od testiranih organizama, čime je potvrđena 100-postotna analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay.

Tablica 5: patogeni korišteni za dokazivanje analitičke specifičnosti

Organizmi koji nisu ciljani ispitivanjem					
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Virus humane imunodeficijencije 1	Virus hepatitisa B	Adenovirus tipa 5	Epstein-Barrov virus	Virus varicella-zoster	Enterovirus 68
BK virus	Virus herpesa simpleksa tipa 1	Virus herpesa simpleksa tipa 2	Humani gamaherpesvirus 8	Citomegalovirus	Humani betaherpesvirus 7
HTVL-1	HTVL-2	JC virus	SV40	Virus humane imunodeficijencije 2	

Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, komenzalni organizmi^{10, 11}

Interferencija ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay procijenjena je u prisutnosti organizama koji nisu ciljani ispitivanjem primjenom istih poolova organizama pripremljenih za testiranje križne reaktivnosti navedenih gore u tablici 6. U plazmu negativnu na HHV-6A/HHV-6B dodani su poolovi organizama u skupinama od 4 – 7 te ciljna sekvenca virusa HHV-6A/HHV-6B pri koncentraciji od 2,78 log₁₀ IU/ml (600 IU/ml; 3 x LoD). Nije uočena značajna interferencija u prisutnosti tih komenzalnih organizama na što ukazuje minimalna devijacija određivanja od kontrolnih ispitaka koji ne sadrže interferirajuće agense.

Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, endogene i egzogene tvari^{10, 11}

Ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay procijenjeno je u prisutnosti uobičajenih egzogenih i endogenih interferirajućih tvari pronađenih u kliničkoj plazmi virusa HHV-6A/HHV-6B. To je uključivalo abnormalno visoke razine komponenti krvi te uobičajene antivirusne lijekove koji su klasificirani u tablici 6. Svaka tvar dodana je u probranu humanu plazmu negativnu na HHV-6A/HHV-6B u koju je dodano 2,78 log₁₀ IU/ml (600 IU/ml; 3 x LoD) virusa HHV-6A/HHV-6B 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 virusa tipa HHV-6A/HHV-6B navedeni su u tablici 7. Nijedna od egzogenih i endogenih tvari nije utjecala na specifičnost ispitivanja NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay.

Tablica 6: 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 7: testiranje interferencije – egzogeni i endogeni agensi

Endogeni (plazma)	HHV-6A		HHV-6B	
	Prosječna konc.	Odstupanje	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ kopija/ml	log ₁₀ kopija/ml	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Trigliceridi (500 mg/dl)	1,91	0,24	2,10	-0,13
Konjugirani bilirubin (0,25 g/l)	2,14	0,01	2,07	-0,10
Nekonjugirani bilirubin (0,25 g/l)	1,71	0,44	1,61	0,37
Albumin (58,7 g/l)	2,27	-0,13	2,04	-0,06
Hemoglobin (2,9 g/l)	2,23	-0,08	1,98	-0,01
Humana DNK (2 mg/ml)	1,74	0,41	1,86	0,12
Egzogeni (lijekovi)	Prosječna konc.	Odstupanje	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ kopija/ml	log ₁₀ kopija/ml	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Pool 1: valganciklovir, prednizon, cidofovir, cefotaksim, mikofenolat mofetil	1,65	0,28	2,07	0,06
Pool 2: vankomicin, takrolimus, famotidin, valaciklovir, leflunomid	2,18	-0,25	1,97	0,16

Ponovljivost i preciznost unutar laboratorija¹⁴

Preciznost testne trake NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip određena je testiranjem 2 ponavljanja panela s 3 sastavnice s ispitcima virusa tipa HHV-6A/HHV-6B pripremljenih s plazmidom virusa tipa HHV-6A ili HHV-6B dvaput na dan s pomoću jednog sustava NeuMoDx™ 96 System u razdoblju od 20 dana. Određena je preciznost unutar obrade i unutar dana i utvrđena je ukupna standardna devijacija od $\leq 0,25 \log_{10}$ kopija/ml za HHV-6A te $\leq 0,25 \log_{10}$ IU/ml za HHV-6B. Dokazana je izvrsna preciznost među danima i obradama kao što je prikazano u *tablici 8*. Preciznost između korisnika nije određena jer korisnik ne igra značajnu ulogu u obradi uzoraka na sustavu NeuMoDx™ System.

Tablica 8: preciznost unutar laboratorija – ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay na sustavu NeuMoDx™ System 96

Uzorak	SD ponovljivosti	SD među obradama	SD unutar dana	SD među danima	Ukupni SD (unutar laboratorija)
HHV-6A					
5,67 log ₁₀ kopija/ml	0,166	0,000	0,166	0,051	0,173
4,67 log ₁₀ kopija/ml	0,071	0,000	0,071	0,048	0,086
3,67 log ₁₀ kopija/ml	0,190	0,028	0,192	0,059	0,200
2,48 log ₁₀ kopija/ml	0,151	0,051	0,159	0,000	0,159
HHV-6B					
5,14 log ₁₀ IU/ml	0,217	0,000	0,217	0,070	0,228
4,14 log ₁₀ IU/ml	0,155	0,000	0,155	0,056	0,165
3,14 log ₁₀ IU/ml	0,141	0,000	0,141	0,038	0,146
2,70 log ₁₀ IU/ml	0,225	0,079	0,239	0,000	0,239

Obnovljivost među serijama¹⁴

Obnovljivost među serijama za testnu traku NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip utvrđena je primjenom triju različitih serija testnih traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip. Panel za HHV-6A i HHV-6B s 4 sastavnice pripremljen s verifikacijskim panelom za HHV-6A EDX (Exact Diagnostics) ili verifikacijskim panelom za HHV-6B EDX (Exact Diagnostics) upotrebljavao se za procjenu radnog učinka na jednom sustavu NeuMoDx™ 96 Molecular System u 5 odvojenih obrada. Analizirane su varijacije unutar serija i među serijama, a rezultati izraženi kao standardna devijacija između serija prikazani su u *tablici 9*. Najveća maksimalna standardna devijacija iznosila je 0,257 kopija/ml. Ekvivalentan radni učinak dokazan je među serijama jer je standardna devijacija svih sastavnica panela bila unutar specifikacije tolerancije (SD obnovljivosti ≤ 0,3 log₁₀ kopija/ml).

Tablica 9: ponovljivost među serijama – ispitivanje NeuMoDx™ HHV-6 Quant Assay

Uzorak	SD ponovljivosti	SD među danima	SD unutar serije	SD među serijama	SD obnovljivosti
HHV-6A					
4,73 x 10 ⁵ kopija/ml	0,160	0,061	0,171	0,073	0,186
4,73 x 10 ³ kopija/ml	0,166	0,087	0,188	0,069	0,200
600 kopija/ml	0,099	0,088	0,132	0,091	0,160
HHV-6B					
1,38 x 10 ⁵ IU/ml	0,199	0,161	0,256	0,025	0,257
1,38 x 10 ³ IU/ml	0,214	0,068	0,224	0,093	0,243
600 IU/ml	0,120	0,069	0,139	0,062	0,152

Obnovljivost od instrumenta do instrumenta¹⁴

Obnovljivost od instrumenta do instrumenta za testnu traku NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip utvrđena je upotrebom triju različitih sustava (jedan sustav NeuMoDx™ 288 Molecular System i dva sustava NeuMoDx™ 96 Molecular System). Panel za HHV-6A/HHV-6B s 4 sastavnice pripremljen s verifikacijskim panelom za HHV-6A EDX (Exact Diagnostics) ili verifikacijskim panelom za HHV-6B EDX (Exact Diagnostics) upotrebljavao se za procjenu radnog učinka. Testiranje se provodilo na sustavima tijekom 5 dana. Određeno je variranje unutar dana i između sustava i utvrđena je ukupna standardna devijacija od ≤ 0,30 log₁₀ kopija/ml za HHV-6A te ≤ 0,30 log₁₀ IU/ml za HHV-6B. Ekvivalentan radni učinak dokazan je među sustavima jer je SD u određivanju svih sastavnica panela bio unutar specifikacije tolerancije (tablica 10).

Tablica 10: obnovljivost od instrumenta do instrumenta – testna traka NeuMoDx™ HHV-6 Quant Test Strip

Uzorak	SD ponovljivosti	SD među danima	SD unutar sustava	SD među sustavima	SD obnovljivosti
HHV-6A					
5,67 log ₁₀ kopija/ml	0,228	0,000	0,228	0,000	0,228
4,67 log ₁₀ kopija/ml	0,149	0,000	0,149	0,021	0,151
3,67 log ₁₀ kopija/ml	0,210	0,101	0,233	0,000	0,233
2,48 log ₁₀ kopija/ml	0,157	0,079	0,176	0,000	0,176
HHV-6B					
5,14 log ₁₀ IU/ml	0,215	0,072	0,227	0,000	0,227
4,14 log ₁₀ IU/ml	0,259	0,014	0,260	0,023	0,261
3,14 log ₁₀ IU/ml	0,178	0,062	0,189	0,000	0,189
2,70 log ₁₀ IU/ml	0,149	0,079	0,169	0,000	0,169

REFERENCE

- Rifai, N., Horvath, A.R., Wittwer, C.T., Tietz, N.W. (Eds.), 2018. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, Sixth edition. ed. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. Clin Microbiol Rev. 2015 Apr;28(2):313-35. doi: 10.1128/CMR.00122-14. PMID: 25762531; PMCID: PMC4402955.
- Hill JA. Human herpesvirus 6 in transplant recipients: an update on diagnostic and treatment strategies. Curr Opin Infect Dis. 2019 Dec;32(6):584-590. doi: 10.1097/QCO.0000000000000592. PMID: 31567413; PMCID: PMC7141773.
- Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7. Microbiol Spectr. 2016 Jun;4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0007-2015. PMID: 27337451.
- Navarro E, Serrano-Heras G et al. 2015. Real-time PCR Detection Chemistry. Clin Chim Acta.15;439:231-50. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens,
- US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Ed. Washington,DC: US Government Printing Office, January 2009.
- World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, 3rd ed.Geneva: World Health Organization, 2004.
- CLSI. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline — Fourth Edition (M29-A4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline—Second Edition CLSI Document MM13. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020
- CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. Approved Guideline – Third Edition. CLSI document MM03. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
- CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document MM06-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2010.
- CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2012.
- 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.
- CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2014.
- 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.

Seracare® je registrirani zaštitni znak tvrtke Seracare Life Sciences, Inc.

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
	Samo za upotrebu po nalogu liječnika
	Proizvođač
	Distributer
	<i>In vitro</i> dijagnostički medicinski proizvod
	Kataloški broj
	Kod šarže
	Pročitajte upute za upotrebu
	Oprez, pročitajte popratne dokumente
	Ograničenja temperature
	Skladištiti na suhom mjestu
	Za jednokratnu uporabu
	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



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

+1 888 301 NMDX (6639)

Tehnička podrška: support.qiagen.com
Izveštaj o kontroli sigurnosti: support.qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents