

REF Testovací proužek NeuMoDx™ HBV Quant Test Strip 201300

R only

UPOZORNĚNÍ: Pouze pro export do USA

IVD Pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System

 Chcete-li vložit aktualizace, přejděte na internetové stránky: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 288 Molecular System, výr. č. 40600108.

Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 96 Molecular System, výr. č. 40600317.

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay je automatizovaný, amplifikační *in vitro* test nukleové kyseliny pro kvantifikaci DNA viru hepatitidy B (Hepatitis B Virus, HBV) ve vzorcích lidské plazmy a séra na HBV genotypy A až H u jedinců infikovaných virem HBV. Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay prováděná na molekulárních soustavách NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System (soustava/soustavy NeuMoDx System) zahrnuje automatizovanou extrakci DNA k izolování cílové nukleové kyseliny ze vzorku a polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (Polymerase Chain Reaction, qPCR) k zacílení na vysoce konzervované sekvence v genu viru hepatitidy B.

Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay je určena k použití jako pomůcka při léčbě pacientů s HBV infekcí. Výsledky analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay je nutné interpretovat v kontextu veškerých relevantních klinických a laboratorních nálezů. Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay není určena k použití jako screeningový test krve nebo krevních produktů nebo jako diagnostický nástroj k diagnostice klinického stavu HBV infekce.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Plnou lidskou krev odebranou do sterilních zkumavek pro odběr krve, které obsahují buď kyselinu ethylenediamintetraoctovou (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA), nebo kyselinu-citrát-dextrózu (Acid Citrate Dextrose, ACD) jako antikoagulační činidla, případně odebranou do zkumavek pro přípravu plazmy (Plasma Preparation Tubes, PPT) lze použít pro přípravu plazmy, zatímco sérum by mělo být odebráno do zkumavek pro odběr séra nebo pro separaci séra (Serum Separation Tubes, SST). Při přípravě na testování se do soustavy NeuMoDx System vloží pomocí stojanu na zkumavky se vzorkem plazma nebo sérum v sekundární zkumavce se vzorkem nebo frakcionovaná krev v primární zkumavce se vzorkem, které jsou kompatibilní se soustavou NeuMoDx System. U každého vzorku se alikvotní podíl vzorku plazmy nebo séra smíchá s lyzačním pufrém NeuMoDx Lysis Buffer 1 a soustava NeuMoDx System automaticky provede všechny kroky nezbytné k extrakci cílové nukleové kyseliny, přípravě izolované DNA pro amplifikaci pomocí PCR v reálném čase a k detekci produktů amplifikace (úseků cílového genomu HBV ve vysoce konzervované oblasti kódující *protein X* a *protein preC*). Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay obsahuje kontrolu zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1) DNA, která pomáhá sledovat přítomnost možných inhibičních látek a také selhání soustavy NeuMoDx System nebo reagentie, ke kterému může dojít během extrakce a amplifikace.

Virus hepatitidy B (Hepatitis B Virus, HBV) je příčinným agens jaterní infekce virem hepatitidy B a je celosvětovým zdravotnickým problémem. Hepatitida B může způsobit buď akutní hepatitidu, nebo se rozvinout do chronického stavu, jehož důsledkem je cirhóza nebo rakovina jater. Riziko vzniku chronického stavu je primárně spojeno s věkem: pokud je virus přenesen při narození, existuje > 90% pravděpodobnost, že se chronický stav rozvine, zatímco infikovaná dospělá osoba má 2–6% pravděpodobnost vzniku chronického stavu.¹ Virus HBV se přenáší buď kontaktem s krví s infikovanou osobou, pohlavním přenosem, sdílením jehel s infikovanou osobou při injekčním užívání drog (píchnutím do žíly) nebo vertikálním přenosem z matky na dítě během porodu. Ve Spojených státech amerických žije přibližně 850 000 lidí s HBV infekcí, kdy je většina nových infekcí důsledkem přenosu pohlavním stykem nebo injekčním užíváním drog.² Je známo, že v Africe a západním Tichomoří je infikováno až 5 % populace. V roce 2015 zapříčinila HBV infekce celosvětově 885 000 úmrtí, většinou na cirhózu nebo hepatocelulární karcinom.³ Existuje vakcína, která je při prevenci HBV infekce účinná na 95 %, jejímž výsledkem je méně diagnostikovaných případů každý rok.⁴

V současnosti je standardní léčbou HBV infekce antivirová terapie, která vyžaduje neustálý monitoring, aby bylo zajištěno, že léčba postupuje podle přání. Monitorování terapie za použití analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay může lékařům poskytnout nezbytné informace, které pomohou řídit pacienty s HBV infekcemi.

PRINCIPY POSTUPU

Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay kombinuje automatizovanou extrakci DNA, amplifikaci a detekci pomocí PCR v reálném čase. Vzorky plné krve jsou pro přípravu plazmy odebrány do zkumavek s EDTA, ACD nebo PPT a/nebo pro přípravu séra do zkumavek SST. Primární vzorek (frakcionované) krve nebo alikvotní podíl plazmy/séra v kompatibilní sekundární zkumavce se vzorkem je označen čárovým kódem a umístěn do soustavy NeuMoDx System. Soustava NeuMoDx System automaticky nasaje alikvotní podíl plazmy/séra, smíchá jej s pufrém NeuMoDx Lysis Buffer 1 a činidly obsaženými na destičce NeuMoDx Extraction Plate a zahájí zpracování. Soustava NeuMoDx System automatizuje a integruje extrakci a zkoncentrování DNA, přípravu reagentie a amplifikaci/detekci nukleové kyseliny cílových sekvencí pomocí PCR v reálném čase. Zahrnutá kontrola zpracování vzorku (Sample Process Control, SPC1) pomáhá monitorovat přítomnost inhibičních látek, selhání soustavy, procesu nebo reagentie. Jakmile je vzorek vložen do soustavy NeuMoDx System, není nutný žádný zásah obsluhy.

Soustava NeuMoDx System k automatickému provedení lýzy, extrakce DNA a odstranění inhibitorů využívá kombinaci zahřívání, lytického enzymu a extrakčních reagentie. Uvolněné nukleové kyseliny jsou zachyceny paramagnetickými částicemi. Částice s navázanou nukleovou kyselinou jsou vloženy do kazety NeuMoDx Cartridge, kde jsou nenavázané prvky vymyty promývací reagentie NeuMoDx Wash Reagent. Navázaná DNA se potom eluuje za použití uvolňovací reagentie NeuMoDx Release Reagent. Soustava NeuMoDx System eluovanou DNA využije k rehydrataci amplifikačních reagentie NeuDry™, které obsahují všechny prvky nezbytné k amplifikaci cílů HBV a SPC1. Tímto je umožněna simultánní amplifikace a detekce jak cíle, tak kontrolních sekvencí DNA. Po rekonstituci suchých reagentie PCR soustava NeuMoDx System nadávkuje připravenou PCR-ready směs do jedné PCR komory (na každý vzorek) kazety NeuMoDx Cartridge. K amplifikaci a detekci kontrolních a cílových sekvencí DNA (pokud jsou přítomné) dochází v PCR komoře. Kazeta NeuMoDx Cartridge je zkonstruována tak, aby po PCR obsahovala amplikon, čímž se prakticky eliminuje riziko kontaminace po amplifikaci.

Amplifikované cíle jsou detekovány v reálném čase pomocí chemizmu hydrolyzační sondy (běžně označovaný jako chemizmus TaqMan®) pomocí fluorogenních oligonukleotidových molekul sondy, specifických pro amplikony jejich příslušných cílů. Sondy TaqMan sestávají z fluoroforu, kovalentněpřipojeného k 5' konci oligonukleotidové sondy, a ze zhášedla na 3' konci. Když je sonda neporušená, fluorofor a zhášedlo jsou v blízkosti, což umožňuje, aby molekula zhášedla potlačila fluorescenci emitovanou fluoroforem prostřednictvím Försterův rezonanční přenos energie (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

TaqMan sondy jsou určeny k reasociaci DNA v úseku amplifikovaném specifickou sadou primerů. Jak polymeráza Taq DNA prodlužuje primer a syntetizuje nové vlákno, 5' až 3' exonukleázová aktivita polymerázy Taq DNA degraduje sondu, která reasociovala na templát. Degradací sondy se uvolňuje fluorofor a narušuje její blízkost ke zhášedlu, takže účinek zhášení je v důsledku FRET překonán a detekce fluoroforu je možná. Výsledný fluorescenční signál detekovaný v termocykleru soustavy NeuMoDx System s kvantitativní PCR je přímo úměrný uvolněnému fluoroforu a může být korelován s množstvím přítomného cíle.

Sonda TaqMan značená fluoroforem (excitace: 490 nm a emise: 521 nm) na 5' konci a tmavým zhášedlem na 3' konci se používá k detekci DNA viru HBV. Pro detekci SPC1 je TaqMan sonda označena alternativním fluorescenčním barvivem (excitace: 535 nm a emise: 556 nm) na 5' konci a tmavým zhášedlem na 3' konci. Software soustavy NeuMoDx System monitoruje fluorescenční signál vydávaný sondami TaqMan na konci každého amplifikačního cyklu. Když je amplifikace hotova, software soustavy NeuMoDx System údaje analyzuje a podá zprávu o konečném výsledku (POSITIVE (POZITIVNÍ) / NEGATIVE (NEGATIVNÍ) / INDETERMINATE (NEURČITÝ) / UNRESOLVED (NEROZLIŠENO) / NO RESULT (BEZ VÝSLEDKU)). Pokud je výsledek pozitivní a vypočítaná koncentrace je v mezích stanovitelnosti, software soustavy NeuMoDx System také poskytuje kvantitativní hodnotu spojenou se vzorkem.

REAGENCE / SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Dodaný materiál

REF.	Obsah	Počet jednotek v balení	Počet testů na jednotku	Počet testů v balení
201300	Testovací proužek NeuMoDx HBV Quant Test Strip <i>Suché reagenty PCR obsahující sondu TaqMan a primery specifické pro HBV a SPC1.</i>	6	16	96

Požadované, ale nedodávané materiály (k dispozici samostatně od společnosti NeuMoDx)

REF.	Obsah
100200	Extrakční destička NeuMoDx Extraction Plate <i>Suché paramagnetické částice, lytický enzym a kontroly zpracování vzorků</i>
800100 nebo 800102	Kalibrátory NeuMoDx HBV Calibrator <i>Jednorázové sady kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot HBV pro stanovení validity kalibrační křivky</i>
900101 nebo 900102	Externí kontroly NeuMoDx HBV External Control <i>Jednorázové sady pozitivních a negativních kontrol</i>
400400	Pufr NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	Promývací reagenty NeuMoDx Wash Reagent
400200	Uvolňovací reagenty NeuMoDx Release Reagent
100100	Zásobník NeuMoDx Cartridge
235903	Hroty Hamilton® CO-RE / CO-RE II (300 µl) s filtry
235905	Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (1 000 µl) s filtry

Potřebné přístrojové vybavení

Molekulární soustava NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] nebo NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Testovací proužek NeuMoDx HBV Quant Test Strip je určen pouze pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx System.
- Spotřební materiál ani reagenty po uvedené době expirace nepoužívejte.
- Nepoužívejte žádné reagenty, pokud je bezpečnostní těsnění rozbito nebo je při dodání poškozen obal.
- Spotřební materiál nebo reagenty nepoužívejte, pokud je ochranný váček při dodání otevřený nebo rozbítý.
- K dispozici musí být platná kalibrace testování (generovaná zpracováním kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot z kalibrátorů NeuMoDx HBV Calibrator) předtím, než lze pro klinické vzorky generovat výsledky testu.
- Externí kontroly NeuMoDx HBV External Control musejí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay zpracovány každých 24 hodin.

- Minimální objem vzorku závisí na velikosti zkumavky, stojanu se vzorky a zpracování objemu vzorku, jak je definováno níže. Objem menší, než je specifikované minimum, může vést k chybě „Quantity Not Sufficient“ (Nedostatečné množství).
- Použití vzorků skladovaných při nesprávných teplotách nebo po uplynutí specifikovaných dob skladování může vést k neplatným nebo chybným výsledkům.
- U všech reagií a spotřebního materiálu zabraňte mikrobiální a deoxyribonukleázové (DNázové) kontaminaci. Při použití sekundárních zkumavek se doporučuje používat sterilní jednorázové přenosové pipety bez DNázy. Na každý vzorek použijte novou pipetu.
- Abyste předešli kontaminaci, s kazetou NeuMoDx Cartridge po amplifikaci nemanipulujte ani ji nerozebírejte. Za žádných okolností nevyjímejte kazety NeuMoDx Cartridge z nádoby na biologický nebezpečný odpad (NeuMoDx 288 Molecular System) nebo z koše na nebezpečný biologický odpad (NeuMoDx 96 Molecular System). Zásobník NeuMoDx Cartridge je zkonstruován tak, aby kontaminaci zabránil.
- V případě, že laboratoř provádí také testy PCR s otevřenými zkumavkami, musí být zajištěno, že testovací proužek NeuMoDx HBV Quant Test Strip, přídatný spotřební materiál a reagentie nezbytné k testování, ochranné osobní prostředky, jako například rukavice a laboratorní pláště, a soustava NeuMoDx System nejsou kontaminovány.
- Při manipulaci s reagentiemi a spotřebním materiálem NeuMoDx byste měli nosit čisté nitrilové rukavice bez obsahu pudru. Měli byste dávat pozor, abyste se nedotýkali vrchního povrchu zásobníku NeuMoDx Cartridge, povrchu fóliového těsnění testovacího proužku NeuMoDx HBV Quant Test Strip a extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate ani vrchního povrchu lyzačního pufru NeuMoDx Lysis Buffer 1; při manipulaci se spotřebním materiálem a reagentiemi byste se měli dotýkat pouze bočních stran.
- Pro každou reagentii jsou, v příslušných případech, poskytnuty bezpečnostní listy (BL), které jsou k dispozici na internetové stránce www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy. Nekuřte, nepijte ani nejzte v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo reagentiemi.
- Se vzorky vždy zacházejte tak, jako by byly infekční. Postupujte v souladu s bezpečnými laboratorními postupy, například těmi popsanými v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁵ a v dokumentu M29-A4⁶ institutu CLSI.
- Nepoužité reagentie a odpad likvidujte podle státních, federálních, oblastních a místních předpisů.
- Nepoužívejte opakovaně.



UCHOVÁVÁNÍ, MANIPULACE A STABILITA PRODUKTU

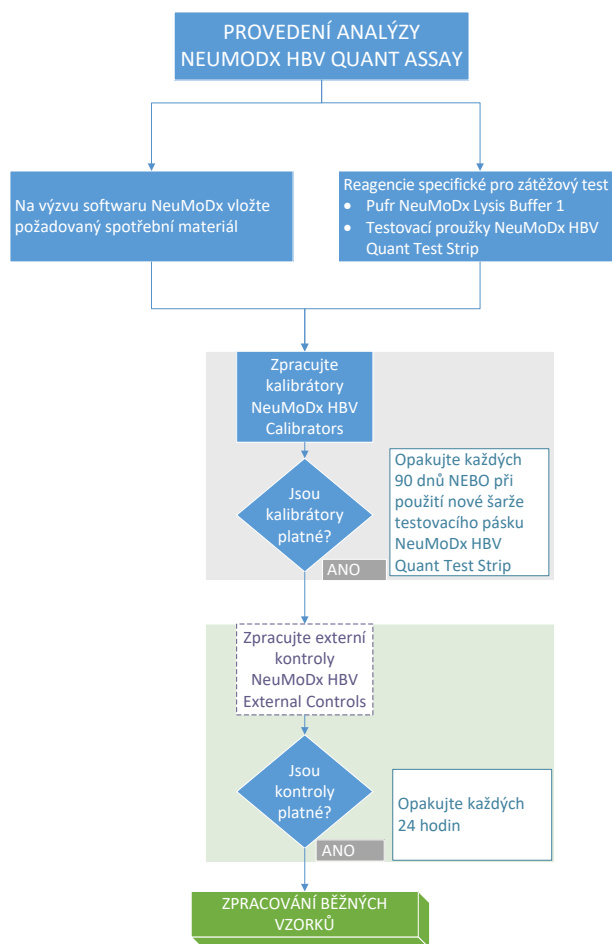
- Testovací proužky NeuMoDx HBV Quant Test Strip jsou stabilní v primárním obalu po dobu expirace, která je uvedena na štítku produktu, při uchovávání při teplotě mezi 4–28 °C.
- Po uplynutí uvedeného data expirace spotřební materiály ani reagentie nepoužívejte.
- Nepoužívejte žádný testovací produkt, pokud byl primární či sekundární obal viditelně narušen.
- Nevkládejte žádný produkt testu, který byl již dříve vložen do jiné soustavy NeuMoDx System.
- Testovací proužek NeuMoDx HBV Quant Test Strip může po vložení zůstat v přístroji soustavy NeuMoDx System po dobu 62 dnů. Zbývající životnost vložených testovacích proužků je sledována pomocí softwaru a hlášena uživateli v reálném čase. Soustava vyvze k vyjmutí testovacího proužku, který byl používán po uplynutí povolené doby.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

1. Se všemi vzorky, kalibrátory a kontrolami zacházejte, jako kdyby byly schopné přenosu infekčních agens.
2. Plnou krev nebo jakékoli vzorky skladované v původních zkumavkách nezmrazujte.
3. Pro přípravu vzorků plazmy by měla být plná krev odebrána do sterilních zkumavek za použití EDTA nebo ACD jako antikoagulanty. Při přípravě a skladování postupujte podle pokynů výrobce zkumavky pro odběr vzorků.
4. K přípravě vzorků séra je třeba odebrat plnou krev do zkumavek SST. Při přípravě a skladování postupujte podle pokynů výrobce zkumavky pro odběr vzorků.
5. Vzorky lze testovat v primárních odběrových zkumavkách nebo v sekundárních zkumavkách se vzorky. Doporučeno pro testování v primárních zkumavkách:
 - a. Vzorky plazmy: Zkumavka BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD č. 368589) nebo BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD č. 362799).
 - b. Vzorky séra: Zkumavka BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) nebo zkumavka BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
6. Připravené vzorky mohou před zpracováním zůstat na soustavě NeuMoDx System až po dobu 8 hodin v případě plazmy a až po dobu 24 hodin v případě séra. Pokud je třeba delší doby skladování, doporučujeme vzorky buď zchladit, nebo zmrazit jako sekundární alikvotní podíly.
7. Připravené vzorky by při teplotě 2–8 °C neměly být před testováním skladovány déle než 7 dnů a při pokojové teplotě by měly být skladovány maximálně 8 hodin v případě plazmy a 24 hodin v případě séra.
8. Připravené vzorky mohou být před zpracováním skladovány při teplotě ≤ -20 °C po dobu až 4 týdnů (sérum) nebo 6 měsíců (plazma); zmrazené vzorky by před použitím neměly podstoupit více než 2 cykly zmrazení/rozmrazení v případě plazmy a 4 cykly zmrazení/rozmrazení v případě séra.

- a. Pokud jsou vzorky zmrazené, nechte je úplně rozmrazit při pokojové teplotě (15–30 °C); pro vytvoření rovnoměrně rozloženého vzorku vzorek zviřte.
 - b. Jakmile jsou zmrazené vzorky rozmrazeny, testování by mělo proběhnout do 24 hodin.
 - c. Zmrazení plazmy/séra ve zkumavkách pro primární odběr se nedoporučuje.
9. Pokud jsou vzorky přepravovány, měly by být zabaleny a označeny v souladu s platnými předpisy země a/nebo mezinárodními předpisy.
 10. Zřetelně vzorky označte a uveďte, že se jedná o vzorky k testování HBV.
 11. Přejděte k části *Příprava testu*.

Celý proces realizace analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay je shrnut níže na *obrázku 1*.



Obrázek 1: Pracovní postup při realizaci analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava testu

Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay může proběhnout přímo v primárních zkumavkách pro odběr krve nebo u alikvotních podílů vzorků v sekundárních zkumavkách. Zpracování lze spustit pomocí jednoho ze dvou pracovních postupů zpracování objemů vzorků – pracovní postup pro zpracování vzorku o objemu 550 μ l a pracovní postup pro zpracování vzorku o objemu 200 μ l. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky.

1. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky. Primární odběrová zkumavka na krev může být označena a po odstředění umístěna přímo do 32místného stojanu na zkumavku se vzorkem; viz pokyny výrobce. Alternativně může být alikvotní podíl plazmy/séra přenesen do sekundární zkumavky pro zpracování v soustavě NeuMoDx System.

- Pokud testujete vzorek v primární odběrové zkumavce, vložte zkumavku označenou čárovým kódem do stojanu na zkumavky se vzorkem a před vložením do soustavy NeuMoDx System se ujistěte, že je sejmuta víčka. Minimální objemy **nad** gelovou vrstvou / buffy coat jsou definovány níže a budou splněny, pokud budou vzorky odebrány a zpracovány podle pokynů výrobce zkumavek. U vzorků, které jsou odebrány nesprávně, není provedení testu zaručeno.

Typ zkumavky	Minimální požadovaný objem vzorku	
	Pracovní postup pro 550 µl	Pracovní postup pro 200 µl
SST – 3,5 ml	1550 µl	1200 µl
PPT/SST – 5,0 ml	1800 µl	1450 µl
PPT/SST – 8,5 ml	2500 µl	2200 µl
K ₂ EDTA/sérum – 4,0 ml	1050 µl	700 µl
K ₂ EDTA/sérum – 6,0 ml	1250 µl	900 µl
K ₂ EDTA/sérum – 10,0 ml	1600 µl	1250 µl

- Pokud používáte sekundární zkumavku, přeneste alikvotní podíl plazmy/séra do zkumavky se vzorkem s čárovým kódem, která je kompatibilní se soustavou NeuMoDx System podle objemů definovaných níže:

Stojan na zkumavky se vzorkem	Velikost zkumavky	Minimální požadovaný objem vzorku	
		Pracovní postup pro 550 µl	Pracovní postup pro 200 µl
32místný stojan na zkumavky se vzorkem	Průměr 11–14 mm a výška 60–120 mm	700 µl	400 µl
24-Tube Specimen Tube Carrier (24místný stojan na zkumavky se vzorkem)	Průměr 14,5-18 mm a výška 60–120 mm	1100 µl	800 µl
Low Volume Specimen Tube Carrier (Stojan na zkumavky se vzorkem o malém objemu)	1,5ml mikrocentrifugační zkumavka s kónickým dnem	650 µl	300 µl

Obsluha soustav NeuMoDx System

Podrobné pokyny jsou uvedeny v návodech k obsluze molekulárních soustav NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System (výr. č. 40600108 a 40600317).

- Podle požadovaného objemu zpracování vzorku a typu zkumavky se vzorkem načtěte do soustavy NeuMoDx System objednávku testu:
 - Objem vzorku 550 µl je testován definováním typu vzorku jako „Plasma“ (Plazma) nebo „Serum“ (Sérum).
 - Objem vzorku 200 µl je testován definováním typu vzorku jako „Plasma2“ (Plazma 2) nebo „Serum2“ (Sérum 2).
 - Pokud to není v objednávce testu definováno, použijte se jako výchozí typ vzorku **Plasma (Plazma)** v **Secondary Tube (Sekundární zkumavka)**.
- Osadte jeden nebo více stojanů na testovací proužky NeuMoDx System testovacím proužkem (proužky) NeuMoDx HBV Quant Test Strip a k založení stojanu na testovací proužek (proužky) do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
- Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, přidejte potřebné spotřební materiály ke stojanům na spotřební materiál soustavy NeuMoDx System nezbytný spotřební materiál a pomocí dotykové obrazovky vložte stojany do soustavy NeuMoDx System.
- Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, vyměňte podle potřeby promývací reagenty NeuMoDx Wash Reagent, uvolňovací reagenty NeuMoDx Release Reagent, vyprázdněte odpadní reagenty z plnění, nádobu na biologicky nebezpečný odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 288 Molecular System), odpadní koš na hroty (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System) nebo koš na nebezpečný biologický odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System).
- Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, zpracujte kalibrátory NeuMoDx HBV Calibrator a/nebo externí kontroly NeuMoDx HBV External Control. Další informace týkající se kalibrátorů a kontrol lze najít v části *Zpracování výsledků*.
- Zkumavku (zkumavky) se vzorky/kalibrátory/kontrolami vložte do běžného stojanu na zkumavky se vzorkem a ujistěte se, že jsou ze všech zkumavek odstraněna víčka.
- Stojan (stojany) na zkumavky se vzorky umístěte na přihrádku automatického podavače a k vložení stojanu (stojanů) do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku. Tím se zahájí zpracování vložených vzorků pro určené testy, pokud je v systému nastaveno platné pořadí testů.

OMEZENÍ

1. Testovací proužek NeuMoDx HBV Quant Test Strip lze použít pouze na soustavách NeuMoDx System.
2. Účinnost testovacího proužku NeuMoDx HBV Quant Test Strip byla stanovena u vzorků plazmy připravených s EDTA/ACD jako antikoagulanty nebo u vzorků séra připravených ve zkumavkách pro separaci séra. Použití testovacího proužku NeuMoDx HBV Quant Test Strip nebylo u jiných zdrojů posuzováno a výkonové charakteristiky nejsou pro jiné typy vzorků známé.
3. Výkonost testovacích proužků NeuMoDx HBV Quant Test Strip byla stanovena pro testování v primární zkumavce za použití zkumavek BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube a BD Vacutainer SST Tube.
4. Při použití pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl bylo pozorováno malé zvýšení meze detekce a dolní meze stanovitelnosti analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay.
5. Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay se používá pouze pro účely kvantitativního monitorování. Není určena k použití pro kvalitativní detekci.
6. Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay se nesmí používat se vzorky od osob užívajících heparin.
7. Vzhledem k tomu, že detekce HBV závisí na množství částic cílové DNA přítomných ve vzorku, závisí spolehlivost výsledků na správném odběru vzorků, zacházení s nimi a jejich skladování.
8. Kalibrátory NeuMoDx HBV Calibrator a externí kontroly NeuMoDx HBV External Control musejí být zpracovány podle doporučení vložených do balení a na výzvu softwaru soustavy NeuMoDx System před zpracováním běžných klinických vzorků.
9. K chybným výsledkům testů může dojít kvůli nesprávnému odběru vzorků, nevhodné manipulaci s nimi, jejich nevhodnému skladování, technické chybě nebo záměně zkumavky se vzorkem. Kromě toho by se mohly objevit falešně negativní výsledky kvůli tomu, že množství virových částic ve vzorku je pod mezí detekce analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay.
10. Obsluha soustavy NeuMoDx System je omezena pouze na personál vyškolený v používání soustavy NeuMoDx System.
11. Pokud se ani cílový HBV, ani cílová SPC1 neamplifikují, bude oznámen neplatný výsledek (Indeterminate (Neurčitý), No Result (Bez výsledku) nebo Unresolved (Nerozlišeno)) a test by měl být zopakován.
12. Pokud je výsledek analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay Positive (Pozitivní), ale hodnota kvantifikace je mimo meze stanovitelnosti, soustava NeuMoDx System oznámí, zda byl detekovaný HBV *pod* dolní meze stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) nebo *nad* horní meze stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
13. V případě, že detekovaný HBV byl *pod* LLoQ, může být analýza zopakována (podle přání) s jiným alikvotním podílem vzorku.
14. V případě, že detekovaný HBV je *nad* ULoQ, může být analýza NeuMoDx HBV Quant Assay zopakována se zředěným alikvotním podílem původního vzorku. Doporučujeme ředění 1 : 1 000 v HBV negativní plazmě nebo diluentu Basematrix 53 Diluent (Basematrix), (SeraCare, Milford, MA). Koncentraci původního vzorku lze vypočítat takto:
$$\text{Původní koncentrace vzorku} = \log_{10}(\text{faktor ředění}) + \text{ohlášená koncentrace zředěného vzorku}.$$
15. Příležitostná přítomnost inhibitorů PCR v plazmě může vést k chybě stanovení soustavy. Pokud k tomu dojde, doporučujeme opakovat test se stejným vzorkem naředěným v diluentu Basematrix v poměru 1 : 10 nebo 1 : 100.
16. Pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat přítomnost životaschopných organismů. Avšak pozitivní výsledek je pro přítomnost DNA viru hepatitidy B presumptivní.
17. Delece nebo mutace v konzervovaných oblastech zacílených analýzou NeuMoDx HBV Quant Assay může za použití testovacího proužku NeuMoDx HBV Quant Test Strip ovlivnit detekci nebo vést k chybnému výsledku.
18. Výsledky z analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay by měly být použity jako doplněk klinických vyšetření a dalších informací, které má lékař k dispozici; analýza není určena k diagnostice infekce.
19. Aby nedošlo ke kontaminaci, doporučujeme správnou laboratorní praxi, včetně výměny rukavic mezi manipulacemi s patientskými vzorky.

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Dostupné výsledky lze zobrazit na kartě „Results“ (Výsledky) v okně Results (Výsledky) na dotykové obrazovce soustavy NeuMoDx System, případně je lze odtud vytisknout. Výsledky analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay automaticky generuje software soustavy NeuMoDx System používající rozhodovací algoritmus a parametry zpracování výsledků popsané v souboru definic analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay (HBV ADF). Výsledek může být ohlášen jako Negative (Negativní), Positive (Pozitivní) s ohlášením koncentrace HBV, Positive (Pozitivní) nad ULoQ, Positive (Pozitivní) pod LLoQ, Indeterminate (IND) (Neurčitý), Unresolved (UNR) (Nerozlišeno) nebo No Result (NR) (Bez výsledku) na základě stavu amplifikace cíle a kontroly zpracování vzorku. Výsledky jsou uváděny na základě rozhodovacího algoritmu ADF, shrnutého v *tabulce 1* uvedené níže.

Tabulka 1: Shrnutí rozhodovacího algoritmu pro analýzu HBV Quant Assay

VÝSLEDEK	Cílový HBV	Kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1)	Interpretace výsledků
Positive (Pozitivní) s ohlášenou koncentrací	Amplified (Amplifikováno) $0,9 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 550 μl) $1,4 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 200 μl)	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	DNA viru HBV detekována v kvantitativním rozmezí
Positive (Pozitivní), nad ULoQ	Amplified (Amplifikováno) $[\text{HBV}] > 9,0 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	DNA viru HBV detekována nad kvantitativním rozmezím
Positive (Pozitivní), pod LLoQ	Amplified (Amplifikováno) $[\text{HBV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 550 μl) $[\text{HBV}] < 1,4 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 200 μl)	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	DNA viru HBV detekována pod kvantitativním rozmezím
Negative (Negativní)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	DNA viru HBV nebyla detekována
Indeterminate (Neurčitý)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků dokončeno)		Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu†
No Result (Bez výsledku)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků zrušeno)		Zpracování vzorku bylo přerušeno; otestujte vzorek znovu†
Unresolved (Nerozlišeno)	Not Amplified, No System Error Detected (Neamplifikováno, Nebyla zjištěna žádná chyba systému)		Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu†

* Příznak No Result (Bez výsledku) je hlášen pouze u softwaru soustavy NeuMoDx System verze 1.8 a vyšší.

† Soustava NeuMoDx System je opatřena automatickou funkcí Rerun (Nová analýza) / Repeat (Opakovat), kterou si může koncový uživatel zvolit k zajištění, že výsledek IND/UNR/NR bude automaticky znovu zpracován, a tak se minimalizovaly prodlevy v hlášení výsledků.

Výpočet testu

- U vzorků v mezích stanovitelnosti analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay se koncentrace DNA viru HBV ve vzorcích počítá za pomoci uložené standardní křivky ve spojení s koeficientem kalibrace a objemem vzorku.
 - Koeficient kalibrace se vypočítá na základě výsledků kalibrátorů NeuMoDx HBV Calibrator zpracovaných tak, aby byla zajištěna validita standardní křivky pro danou šarži testovacího proužku NeuMoDx HBV Quant Test Strip na konkrétní soustavě NeuMoDx System.
 - Koeficient kalibrace je zahrnut do konečného stanovení koncentrace DNA viru HBV.
 - Software soustavy NeuMoDx zohledňuje při stanovování koncentrace DNA viru HBV v jednom ml vzorku vstupní objem vzorku.
- Výsledky analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay se udávají jako $\log_{10} \text{ IU/ml}$.
- Výsledná kvantifikace u neznámých vzorků je vysledovatelná k 4. mezinárodnímu standardu pro HBV organizace WHO.

Kalibrace testu

Platná kalibrace na základě standardní křivky je pro kvantitativní vyjádření DNA HBV ve vzorcích nezbytná. Pro získání platných výsledků musí být kalibrace testu provedena za použití externích kalibrátorů dodaných společností NeuMoDx Molecular, Inc.

Kalibrátory

- Sada kalibrátorů NeuMoDx HBV Calibrator musí být zpracována s každou novou šarží testovacích proužků NeuMoDx HBV Quant Test Strip, nebo pokud je do soustavy NeuMoDx System nahrán nový soubor definic analýzy HBV Quant Assay anebo pokud u aktuální sady kalibrátorů uplynula doba platnosti (v současnosti nastavená na 90 dnů), případně pokud je software soustavy NeuMoDx System upraven.
- Software soustavy NeuMoDx System uživatele uvědomí, kdy je třeba kalibrátory zpracovat. Novou šarží testovacích proužků nelze použít, dokud nebyly úspěšně zpracovány kalibrátory.
- Validita kalibrace je zajištěna následovně:
 - Pro zajištění validity je třeba zpracovat sadu se dvěma kalibrátory – jeden (1) pro vysokou hodnotu a jeden (1) pro nízkou hodnotu.
 - Výsledky nejméně dvou (2) ze tří (3) replikátů musejí být v mezích předem stanovených parametrů. Nominální cíl kalibrátoru pro nízkou hladinu je $3,7 \log_{10} \text{ IU/ml}$ a nominální cíl kalibrátoru pro vysokou hladinu je $5,7 \log_{10} \text{ IU/ml}$.
 - Kalibrační koeficient se vypočítá tak, aby zohlednil očekávanou změnu mezi šaržemi testovacích proužků. Tento koeficient kalibrace se používá při stanovení konečné koncentrace HBV.

4. Pokud jeden nebo oba kalibrátory kontrolou validity neprojdou, zpracování neúspěšného kalibrátoru (kalibrátorů) zopakujte za použití nové ampulky. V případě, že validitou neprojde jeden kalibrátor, je možné zopakovat pouze neúspěšný kalibrátor, jelikož soustava nevyžaduje, aby uživatel znovu kontroloval oba kalibrátory.
5. Pokud kalibrátor (kalibrátory) neprojdou kontrolou validity následovně po sobě, kontaktujte společnost NeuMoDx Molecular, Inc.

Kontrola kvality

Místní předpisy obvykle stanoví, že laboratoř je odpovědná za kontrolní postupy, které monitorují přesnost a preciznost celého analytického procesu, a musí stanovit počet, typ a četnost testů kontrolních materiálů pomocí ověřených specifikací výkonu pro nemodifikovaný a schválený testovací systém.

Externí kontroly

1. Pozitivní a negativní externí kontroly musejí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay zpracovány každých 24 hodin. Pokud sada validních výsledků externích kontrol neexistuje, software soustavy NeuMoDx System vyzve uživatele k provedení těchto kontrol dřív, než budou moci být ohlášeny výsledky vzorků.
2. Validita externích kontrol bude vyhodnocena soustavou NeuMoDx System na základě očekávaného výsledku. Pozitivní kontrola by měla přinést HBV Positive (Pozitivní) výsledek a negativní kontrola by měla přinést HBV Negative (Negativní) výsledek.
3. S neshodným výsledkem externích kontrol by mělo být zacházeno následovně:
 - a) Pozitivní výsledek testu ohlášený u negativní kontroly vzorku ukazuje na problém s kontaminací vzorku.
 - b) Výsledek Negative (Negativní) testu u pozitivního kontrolního vzorku může naznačovat problém související s reagensy nebo přístrojem.
 - c) V každém výše uvedeném případě anebo v případě výsledku Indeterminate (IND) (Neurčitý) či No Result (NR) (Bez výsledku) externí kontroly NeuMoDx HBV External Control zopakujte s čerstvými ampulkami kontroly/kontrol, které testem validity neprošly.
 - d) Pokud pozitivní externí kontrola NeuMoDx HBV External Control nepřestává hlásit výsledek Negative (Negativní), kontaktujte technický servis společnosti NeuMoDx.
 - e) Pokud negativní externí kontrola NeuMoDx HBV External Control nepřestává hlásit výsledek Positive (Pozitivní), pokuste se předtím, než kontaktujete technický servis společnosti NeuMoDx, eliminovat všechny zdroje možné kontaminace, včetně výměny všech reagensů.

Kontroly (interní) zpracování vzorků

Exogenní kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1) je zabudována do extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate a u každého vzorku prochází celým procesem extrakce nukleové kyseliny a amplifikace s PCR v reálném čase. Každý testovací proužek NeuMoDx HBV Quant Test Strip obsahuje primery a sondu specifické pro SPC1, které umožňují detekci přítomnosti SPC1 spolu s cílovou DNA HBV (pokud je přítomna) prostřednictvím multiplex PCR. Detekce amplifikace SPC1 umožňuje softwaru soustavy NeuMoDx System sledovat účinnost extrakce DNA a procesy amplifikace pomocí PCR.

Neplatné výsledky

Pokud se analýze NeuMoDx HBV Quant Assay prováděné na soustavě NeuMoDx System nepodaří po dokončení zpracování vzorku vyprodukovat platný výsledek, bude na základě typu chyby, ke které došlo, oznámen výsledek buď jako Indeterminate (IND) (Neurčitý), No Result (NR) (Bez výsledku), nebo Unresolved (UNR) (Nerozlišeno).

Výsledek IND bude ohlášen tehdy, pokud je během zpracování vzorků detekována chyba soustavy NeuMoDx System. V případě ohlášení výsledku IND doporučujeme test zopakovat.

Pokud nebude detekována žádná validní amplifikace DNA HBV nebo SPC1, přičemž nedošlo k žádné chybě systému, bude oznámen výsledek UNR, který ukazuje na možné selhání reagentie nebo na přítomnost inhibitorů. V případě ohlášení výsledku UNR se jako první krok doporučuje opakování testu. Pokud opakovaný test není úspěšný, lze ke snížení účinků jakékoli inhibice vzorku použít ředění vzorku.

Pokud analýza NeuMoDx HBV Quant Assay provedená na soustavě NeuMoDx System nedokáže přinést platný výsledek a zpracování vzorku se před dokončením přeruší, bude ohlášen výsledek No Result (NR) (Bez výsledku). V případě ohlášení výsledku NR doporučujeme test zopakovat.

VÝKONOVÁ CHARAKTERISTIKA

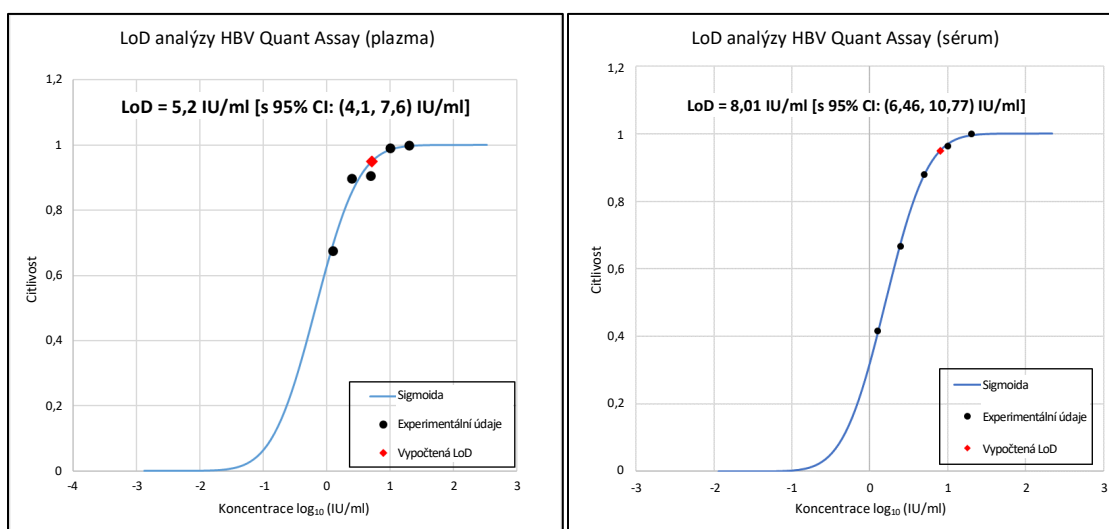
Analytická citlivost – mez detekce za použití standardu WHO

Analytická citlivost analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay byla charakterizována testováním negativních vzorků a série roztoků 4. mezinárodního standardu WHO ve vyšetřené negativní krevní plazmě a séru s cílem stanovit na soustavách NeuMoDx System mez detekce (Limit of Detection, LoD). LoD byla definována jako nejnižší detekovaná cílová hladina při poměru 95 % tak, jak byla stanovena analýzou Probit. Měření byla prováděna po dobu 3 dnů napříč několika soustavami NeuMoDx System s několika šaržemi reagensů NeuMoDx. Bylo provedeno další měření pro potvrzení LoD analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay při použití pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl. Míry detekce z obou měření jsou uvedeny v *tabulce 2*.

Tabulka 2: Pozitivní míry detekce ke stanovení LoD analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay

	Cílová koncentrace [IU/ml]	Cílová koncentrace [\log_{10} IU/ml]	PLAZMA			SÉRUM		
			Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce	Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
550 μ l	20	1,30	108	108	100 %	107	107	100 %
	10	1	108	107	99%	108	104	96%
	5	0,70	108	98	91%	108	95	88%
	2,5	0,40	108	97	90%	108	72	67%
	1,25	0,10	108	73	68%	108	44	42%
	NEG	N/A	108	0	0 %	107	0	0%
200 μ l	25	1,40	43	43	100 %	44	44	100 %

LoD analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay pro genotyp HBV A (4. mezinárodní standard WHO) v plazmě byla stanovena na 5,2 IU/ml (95% CI 4,1–7,6 IU/ml) [(0,72 \log_{10} IU/ml) (95% CI 0,61–0,88 \log_{10} IU/ml)] s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 μ l (obrázek 2). LoD analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay pro vzorky séra byla stanovena na 8,0 IU/ml (95% CI 6,5–10,8 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95% CI 0,8–1,0 \log_{10} IU/ml)] s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 μ l (obrázek 2).


Obrázek 2: Probitová analýza použitá ke stanovení LoD analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay, plazma (vlevo) a sérum (vpravo)

Analytická citlivost – mez stanovitelnosti – dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) s použitím standardu WHO

Dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) je definována jako nejnižší cílová hladina, při které je dosaženo detekce > 95 % A hodnoty TAE \leq 1,0. Za účelem stanovit LLoQ byla pro každou z cílových hladin HBV, které jako součást výpočtu LoD vykazovaly > 95 % detekce, spočítána celková analytická chyba (Total Analytical Error, TAE). TAE je stanovena následovně:

$$TAE = \text{odchylka} + 2 \times SD \text{ (Westgardova pravidla)}$$

Odchylka je absolutní hodnota mezi průměrem vypočítané koncentrace a očekávanou koncentrací. SD odkazuje na standardní odchylku kvantitativně vyjádřené hodnoty vzorku.

Sestavené výsledky pro vzorky s 5 hladinami HBV použité při stanovování LLoQ s využitím 4. mezinárodního standardu WHO jsou uvedeny v *tabulce 3*. LLoQ pro 4. mezinárodní standard WHO v plazmě za použití analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay (pracovní postup pro objem vzorku 550 μ l) byla stanovena na 5,5 IU/ml (0,74 \log_{10} IU/ml). Bylo provedeno samostatné měření s cílem potvrdit LLoQ při použití pracovního postupu pro objem vzorku 200 μ l a tyto výsledky prokázaly hodnotu LLoQ 25 IU/ml, což je rovněž uvedeno v *tabulce 3*.

LLoQ analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay pro vzorky séra byla stanovena na 6,0 IU/ml s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 μ l a 25 IU/ml pro pracovní postup pro nízký objem vzorku (200 μ l), jak je uvedeno v *tabulce 3*.

Tabulka 3: LLoQ analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay, s odchylkou a TAE

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

Analytická citlivost – LoD a LLoQ napříč genotypy HBV

Původně byla stanovena LoD pro genotyp A (4. mezinárodní standard WHO) a pak proběhlo další testování okolo stanovené LoD za použití každého z ostatních 7 genotypů. Bylo testováno třicet šest (36) replikátů při hladinách odpovídajících 2násobku, 1násobku a 0,5násobku horní meze LoD s 95 % CI (~7 IU/ml) za použití analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl. Pozitivní procentní míra pro každý genotyp u každé z těchto testovaných hladin byla zpracována do tabulky a použita k výpočtu LoD pomocí probitové analýzy.

U těchto testovaných hladin byla také spočítána celková analytická chyba. Nejnižší hladina s pozitivní detekcí 95 % a spočítanou TAE ≤1,0 byla pro genotyp znovu vyložena jako LLoQ. U všech genotypů byla mez detekce analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay pro vzorky plazmy s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl prokázána jako 6,2 IU/ml (0,79 log₁₀ IU/ml) a LLoQ byla prokázána jako 7,6 IU/ml (0,88 log₁₀ IU/ml), jak je uvedeno v *tabulce 4*.

Tabulka 4. Genotypy HBV testované v plazmě s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl

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

Na základě výsledku těchto měření společnost NeuMoDx prohlašuje, že **LoD a LLoQ** u analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay pro vzorky **plazmy a séra** s využitím **pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl** je **25 IU/ml (1,4 log₁₀ IU/ml)**.

Společnost NeuMoDx prohlašuje, že **LoD a LLoQ** u analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay pro vzorky **plazmy a séra** s využitím **pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl** je **8,0 IU/ml (0,9 log₁₀ IU/ml)**.

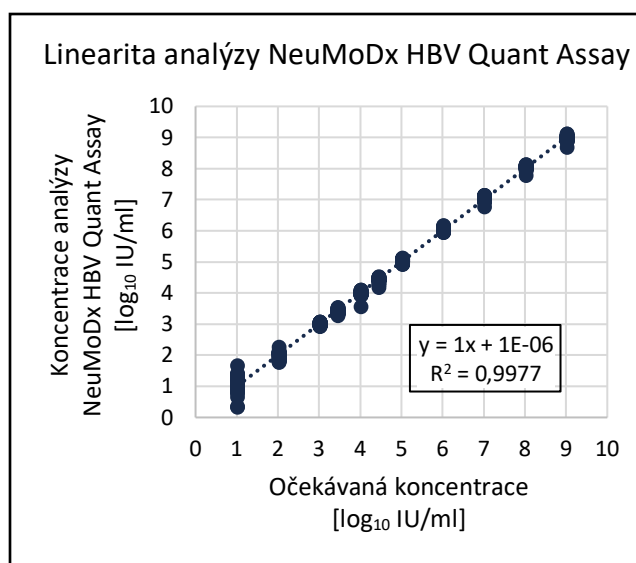
Analytická citlivost – linearita a stanovení horní meze stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearita a horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay byly stanoveny v plazmě přípravou řady ředění s použitím vysoce HBV pozitivního klinického vzorku (Access Biologicals, Vista, CA) se stanovenou návazností na 4. mezinárodní standard WHO. Ve smíšené HBV negativní plazmě byl připraven 11prvkový panel s cílem vytvořit zkušební panel, který by pokryl rozsah koncentrací 9,02–1,02 log₁₀ IU/ml. Zkušební panel byl zpracován se 6 replikáty na každé úrovni ve 2 soustavách NeuMoDx System a se 3 šaržemi kritických reagensů. Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay prokázala schopnost kvantifikovat HBV v lineárním rozsahu 8 log₁₀ (včetně kritických bodů zdravotnických rozhodnutí) s odchylkou ±0,22 log₁₀ IU/ml. Použití regresní metody 2. a 3. řádu nepřineslo žádnou výraznou výhodu. Za použití údajů z tohoto měření byla ULoQ stanovena na 9,02 log₁₀ IU/ml [*tabulka 5 a obrázek 3*].

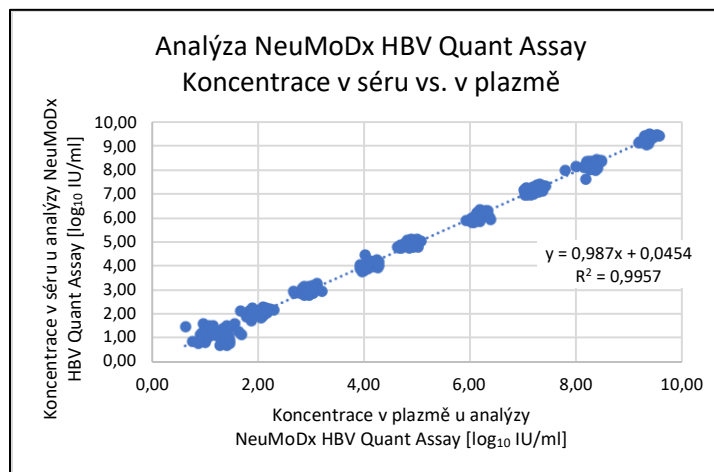
Tabulka 5: Linearita analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay (posouzeno u genotypu A)

Cílová konc. (IU/ml)	Cílová konc. (\log_{10} IU/ml)	Střední konc. (\log_{10} IU/ml)	Směrodatná odchylka	Odchylka	Předpokládaná lineární metoda	Odchylka od nelineární metody
1,05E+09	9,02	8,99	0,08	0,06	9,02	-0,04
1,05 E+08	8,02	8,05	0,07	0,05	8,02	0,03
1,05 E+07	7,02	7,05	0,07	0,06	7,02	0,04
1,05 E+06*	6,02	6,05	0,05	0,05	6,02	0,03
1,05 E+05	5,02	5,04	0,05	0,04	5,02	0,00
2,82E+04*	4,45	4,43	0,07	0,05	4,45	-0,01
1,05 E+04	4,02	3,99	0,09	0,05	4,02	-0,02
2,82E+03*	3,45	3,41	0,07	0,06	3,45	-0,03
1,05 E+03	3,02	3,00	0,04	0,04	3,02	-0,03
1,05 E+02	2,02	1,99	0,11	0,09	2,02	-0,01
1,05 E+01	1,02	1,09	0,29	0,23	1,02	0,06

* Blízko bodům zdravotnických rozhodnutí


Obrázek 3: Lineární rozsah analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay v plazmě

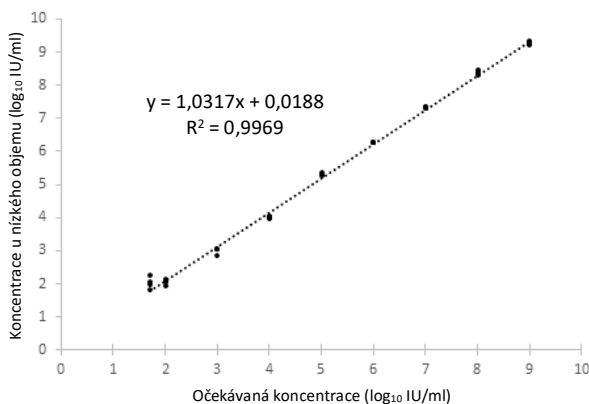
K prokázání ekvivalence matrice bylo provedeno další měření a analýza srovnala kvantitativní výsledky z NeuMoDx HBV u vzorků připravených v plazmě a séru za použití dvou různých modelů regresních metod, včetně nástroje pro regresní analýzu v aplikaci MS Excel a metody Passing-Bablok. Výsledky vykazaly silnou korelaci reprezentovanou hodnotami směrnice a průsečíku, které se velice blížily 1,00, respektive 0,00, a R^2 o hodnotě 0,99 (MS Excel nástroj Regrese) nebo p-hodnotu 0,270 (Passing-Bablok). Koncentrace analýzy HBV ohlášené soustavou NeuMoDx System pro plazmovou matici ve srovnání s odpovídajícími vzorky séra jsou uvedeny na *obrázku 4*.



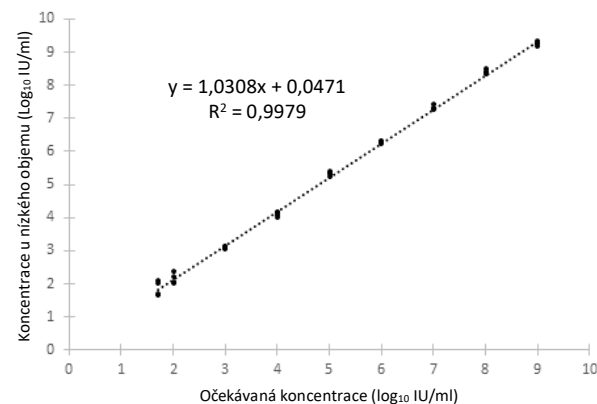
Obrázek 4: Lineární rozsah analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay mezi matricemi

Linearita a ULoQ byly poté potvrzeny pro pracovní postup pro objem vzorku 200 μ l v rozsahu 9,31–1,71 \log_{10} IU/ml. Byla provedena srovnání ekvivalence mezi koncentracemi udávanými softwarem NeuMoDx pro pracovní postupy pro 200 μ l a 550 μ l. Demingova a Passing-Bablokova regresní analýza ukázala vynikající korelaci a směrnici blízkou 1 a minimální průsečky (odchylky) uváděných koncentrací u vzorků jak plazmy, tak i séra v lineárním rozmezí. Blandovo a Altmanovo srovnání hlášené koncentrace pro pracovní postup pro objem vzorku 200 μ l se střední hlášenou koncentrací pro oba pracovní postupy pro objem vzorku 200 μ l a 550 μ l ukázalo minimální odchylku, což označuje přesnost algoritmu použitého ke generování výsledků z pracovního postupu pro 200 μ l. Navíc jednoduchá lineární regrese srovnávající očekávanou koncentraci s hlášenou koncentrací pro pracovní postup pro 200 μ l měla směrnici blízkou 1, což ukazuje vynikající korelaci [obrázek 5]. Dohromady tato srovnání ukazují přesnou stanovitelnost HBV v celém lineárním rozsahu analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay za použití pracovního postupu pro objem vzorku 200 μ l.

A Jednoduchá lineární regrese pro vzorky plazmy



B Jednoduchá lineární regrese pro vzorky séra



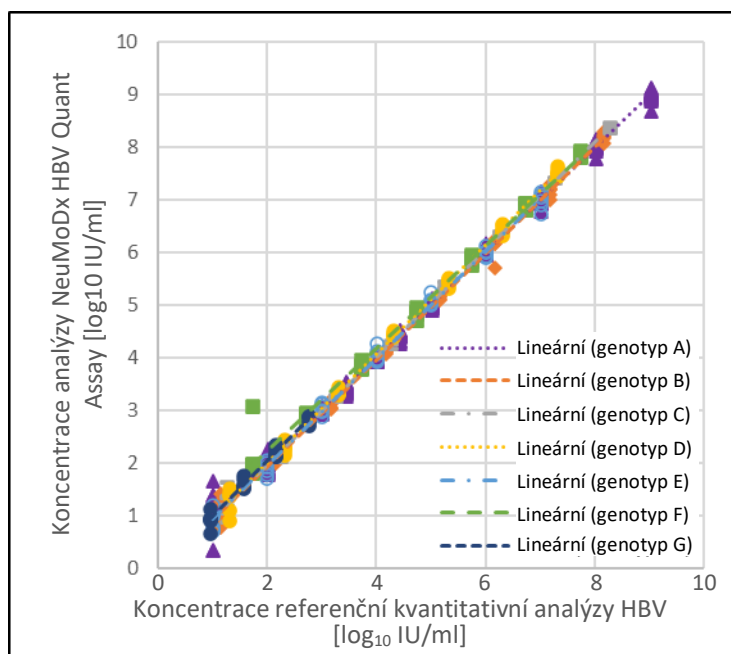
Obrázek 5: Lineární vztah mezi očekávanými koncentracemi a koncentracemi hlášenými soustavou NeuMoDx pro pracovní postup pro 200 μ l v a) plazmě a b) séru

Linearita napříč genotypy

Linearita analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay ve vzorku plazmy pro genotypy HBV byla charakterizována testováním při alespoň čtyřech (4) různých koncentracích každého genotypu HBV, připravených ve smíšené HBV negativní plazmě. Testované hladiny cílového HBV použité v této studii závisely na koncentraci zdrojového vzorku, a tudíž se napříč genotypy lišily. Měření proběhlo u každého genotypu za použití 6 replikátů u každé hladiny. Linearita napříč genotypy viru HBV je znázorněna v tabulce 6 a na obrázku 6.

Tabulka 6: Linearita analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay napříč genotypy

Genotyp	Rovnice linearity y = stanovitelnost analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay x = očekávaná stanovitelnost	R ²
A	$y = 1x + 1E-06$	0,9977
B	$y = 1,0129x - 0,0964$	0,9975
C	$y = 1,0250x - 0,0898$	0,998
D	$y = 1,0379x - 0,0896$	0,9975
E	$y = 1,0182x - 0,096$	0,9956
F	$y = 0,9736x + 0,276$	0,9906
G	$y = 1,0547x - 0,0835$	0,9813


Obrazek 6: Linearita analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay napříč genotypy

Analytická specifičnost a zkřížená reaktivita

Analytická specifičnost byla prokázána screeningem zkřížené reaktivity 32 organismů, které se ve vzorcích krve/plazmy běžně nacházejí, a také druhů, které se HBV fylogeneticky podobají. Organismy byly připraveny ve směsích skládajících se ze 4 až 6 organismů testovaných při vysoké koncentraci. Testované organismy jsou uvedeny v *tabulce 7*. U žádného z testovaných organismů nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita, čímž je potvrzena 100% analytická specifičnost analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay.

Tabulka 7: Patogeny použité k prokázání analytické specifičnosti – zkřížené reaktivity

Adenovirus 2	Dengue V1	Hepatitida A	HPV 16	Ileus (ILHV)	Žlutá zimnice
Adenovirus 5	Dengue V2	Hepatitida C	HPV 18	Chřipka A	Virus Zika
Banži Virus	Dengue V3	Lidský herpesvirus 6a	HSV1	Parvo B19	
BK virus	Dengue V4	Lidský herpesvirus 8	HSV 2	Zarděnky	
Cytomegalovirus	Virus Epstein-Barr	HIV 1	HTLV 1	Virus encefalitidy St. Louis	
VZV	Virus kravských neštovic	HIV 2	HTLV 2	Virus západonilské horečky	

Interferující látky – komenzální organismy

Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay byla hodnocena na interferenci v přítomnosti necílových organismů za použití stejných směsí organismů, jako byly organismy připravené pro testování analytické specifčnosti. Organismy byly testovány buď individuálně, nebo smíšené ve skupinách po 4–6 organismech ve vyšetřené HBV negativní plazmě a obohacené o kontroly HBV při koncentraci 3,7 log₁₀ IU/ml. Jak naznačila minimální odchylka stanovitelnosti z kontrolních vzorků, které neobsahovaly žádný interferující přípravek, nebyla za přítomnosti těchto komenzálů pozorována žádná významná interference [tabulka 8].

Tabulka 8: Testování interference – komenzální organismy

Necílové organismy	Průměrná konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odchylka (log ₁₀ IU/ml)
Skupina 1 (BK Virus, cytomegalovirus, virus Epstein-Barr, lidský herpesvirus 6a, lidský herpesvirus 8)	3,51	0,10
Skupina 2 (Adenovirus 2, adenovirus 5, dengue V2, dengue V3, dengue V4)	3,38	0,22
Skupina 3 (Parvo B19, HTLV 1, HTLV 2, IIV-1, IIV-2, žlutá zimnice, virus Zika)	3,62	0,06
Skupina 4 (HPV 16, HPV 18, HSV 1, HSV 2, dengue V1)	3,57	0,04
Skupina 5 (Virus encefalitidy St. Louis, VZV, virus kravských neštovic, virus západonilské horečky)	3,57	0,03
HAV	3,58	0,05
Banž virus	3,41	0,19
HIV-1	3,47	0,15
HIV-2	3,56	0,05
Zarděnky	3,16	0,44
Chřipka A	3,60	0,03
HCV	3,58	0,04

Interferující látky — endogenní a exogenní látky

Účinnost testovacího páska NeuMoDx HBV Quant Test Strip byla hodnocena za přítomnosti typických exogenních a endogenních interferujících látek, které se v klinických HBV vzorcích plazmy objevily. Mezi tyto látky patřily neobvykle vysoké hladiny krevních složek a také běžné antivirové léky, které byly zařazeny do *tabulky 9*. Každá z endogenních a exogenních látek uvedených v *tabulce 10* níže byla přidána k vyšetřené HBV negativní lidské plazmě obohacené o 3,7 log₁₀ IU/ml HBV a u údajů byla zkoumána interference. Kromě toho byla na možnou interferenci testována i plazma ve stavu při běžném onemocnění souvisejícím s infekcí virem hepatitidy B.

Tabulka 9: Testování interference – exogenní přípravky (klasifikace léků)

Směs	Přípravek	Klasifikace
1	Zidovudin (ZDV)	Inhibitor reverzní transkriptázy
	Saquinavir	Inhibitor HIV proteázy
	Ritonavir	Inhibitor HIV proteázy
	Klarithromycin	Antibiotikum
	Interferon alfa-2a	Modulátor imunity
	Interferon alfa-2b	Modulátor imunity
2	Abakavir-sulfát	Inhibitor reverzní transkriptázy
	Amprenavir	Inhibitor proteázy
	Ribavirin	Modulátor imunity
	Entecavir	Antivirotikum proti HBV
	Fluoxetin	SSRI antidepresivum
	Valaciclovir hydrochloridu	Antivirotikum
3	Tenofovir-disoproxil	HBV/HIV antivirotikum
	Lamivudin	HBV/HIV antivirotikum
	Ganciclovir	Antivirotikum proti CMV
	Valganciclovir	Antivirotikum proti CMV
	Nevirapin	Inhibitor reverzní transkriptázy
4	Efavirenz	Inhibitor reverzní transkriptázy
	Lopinavir	Inhibitor proteázy
	Enfuvirtid	Inhibitor HIV fúze
	Ciprofloxacin	Antibiotikum
	Paroxetin	SSRI antidepresivum
5	Adefovir (dipivoxil)	Antivirotikum
	Azithromycin	Antibiotikum
	Indinavir-sulfát	Inhibitor HIV proteázy
	Sertralin	SSRI antidepresivum

Tabulka 10: Testování interference – exogenní a endogenní přípravky

Endogenní	Průměrná konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odchylka (log ₁₀ IU/ml)
Hemoglobin	3,50	0,20
Triglyceridy	3,51	0,09
Bilirubin	3,56	0,13
Albumin	3,51	0,17
Exogenní (přípravky)	Průměrná konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odchylka (log ₁₀ IU/ml)
Směs 1: Zidovudin (ZDV), Saquinavir, Ritonavir, Klarithromycin, Interferon alfa-2a, Interferon alfa-2b	3,58	0,08
Směs 2: Abakavir-sulfát, Amprenavir, Ribavirin, Entecavir, Fluoxetin, Valaciclovir Hydrochlorid	3,56	0,04
Směs 3: Tenofovir disoproxil, Lamivudin, Ganciclovir, Valganciclovir, Nevirapin	3,59	0,06
Směs 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtid, Ciprofloxacín, Paroxetin,	3,60	0,07
Směs 5: Adefovir (dipivoxil), Azithromycin, Indinavir-sulfát, Sertralin	3,56	0,19
Stav onemocnění	Průměrná konc. (log ₁₀ IU/ml)	Odchylka (log ₁₀ IU/ml)
Antinukleární protilátka (Antinuclear Antibody, ANA)	3,61	0,10
Systémový lupus erythematosus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,63	0,10
Revmatoidní artritida (Rheumatoid Arthritis, RA)	3,57	0,09
Protilátky anti-HCV	3,58	0,07
Protilátky anti-HBV	3,64	0,11
Alkoholická cirhóza	3,68	0,15
Revmatoidní faktor (Rheumatoid Factor, RF)	3,63	0,10
Nealkoholická steatohepatitida (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	3,49	0,06

Vnitrolaboratorní preciznost

Preciznost testovacího páska NeuMoDx HBV Quant Test Strip byla stanovena testováním 8prvkového panelu se vzorky HBV, které zahrnovaly genotypy A a C, za použití tří soustav NeuMoDx System po dobu 12 dnů. Preciznost byla charakterizována v rámci jednoho cyklu, jednoho dne a jedné soustavy a celková směrodatná odchylka byla stanovena jako $\leq 0,22 \log_{10}$ IU/ml. Preciznost mezi pracovníky obsluhy charakterizována nebyla, jelikož obsluha při zpracování vzorků za použití soustavy NeuMoDx System nehraje žádnou významnou roli. Výsledky vnitrolaboratorní preciznosti jsou uvedeny v *tabulce 11*.

Tabulka 11: Výsledky měření vnitrolaboratorní preciznosti

PRVEK PANELU	CÍLOVÁ KONC. (Log ₁₀ IU/ml)	STŘEDNÍ KONC. (Log ₁₀ IU/ml)	N	Odchylka	SD v rámci cyklu	SD v rámci dne	SD v rámci soustavy	Celková SD
Genotyp A	7,75	7,89	36	0,14	0,06	0,07	0,07	0,07
	5,75	5,83	36	0,11	0,07	0,10	0,10	0,10
	3,75	3,70	36	0,11	0,11	0,13	0,15	0,15
	1,75	1,54	36	0,23	0,16	0,22	0,22	0,22
Genotyp C	6,27	6,23	36	0,10	0,08	0,09	0,10	0,10
	4,27	4,18	36	0,08	0,08	0,10	0,10	0,10
	3,27	3,14	36	0,09	0,08	0,12	0,12	0,12
	2,27	2,08	36	0,12	0,12	0,15	0,16	0,16

Reprodukovatelnost mezi šaržemi

Reprodukovatelnost mezi šaržemi byla u testovacího proužku NeuMoDx HBV Quant Test Strip stanovena za použití tří různých šarží klíčových reagensů – lizačního pufru NeuMoDx Lysis Buffer 1, extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate a testovacího proužku NeuMoDx HBV Quant Test Strip. K hodnocení účinnosti byl použit 8prvkový panel s HBV genotypy A a C. Testování probíhalo za použití tří šarží reagensů na třech soustavách NeuMoDx System po dobu 6 dnů. Byla analyzována variace v šaržích a mezi nimi. Maximální celková odchylka byla 0,12 log₁₀ IU/ml a celková maximální SD byla 0,24 log₁₀ IU/ml. Mezi šaržemi nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v účinnosti, jelikož stanovitelnost všech prvků panelu byla v mezích specifikované tolerance. Výsledky reprodukovatelnosti mezi šaržemi jsou uvedeny níže v *tabulce 12*.

Tabulka 12: Výsledky měření reprodukovatelnosti mezi šaržemi

PRVEK PANELU	CÍLOVÁ KONC. [log ₁₀ IU/ml]	STŘEDNÍ KONC. [log ₁₀ IU/ml]	N	Odchylka	V rámci ŠARŽE SD	Mezi ŠARŽEMI SD	Celkem SD
Genotyp A	8,02	7,99	36	0,03	0,15	0,09	0,17
	6,02	5,96	36	0,06	0,17	0,06	0,18
	4,02	3,90	36	0,12	0,14	0,09	0,17
	2,02	1,92	36	0,10	0,21	0,12	0,24
Genotyp C	6,27	6,32	36	0,05	0,06	0,08	0,10
	4,27	4,31	36	0,04	0,22	0,09	0,24
	3,27	3,30	36	0,03	0,20	0,07	0,21
	2,27	2,32	36	0,05	0,13	0,13	0,18

Účinnost kontroly

Za použití dvou běžných HBV genotypů (A a C) byla vyhodnocena účinnost SPC1 obsažené v analýze NeuMoDx HBV Quant Assay, která má ohlásit selhání jakéhokoli kroku zpracování nebo inhibici ovlivňující výkon testu analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay. Testované podmínky jsou reprezentativní pro kritická selhání zpracování, ke kterým by během zpracování vzorku mohlo teoreticky dojít a která by *nemusela být odhalena* čidly, která výkon soustavy NeuMoDx System monitorují. Účinnost SPC1 byla posouzena simulací podmínek takového selhání. Neúčinnost procesu, která měla na detekci/stanovitelnost HBV neblahý vliv, se odrazila v účinnosti cílové SPC1 (přítomnost inhibitoru a nedostatečné promytí). U podmínek, za kterých nebyla amplifikace SPC1 ovlivněna, se ukázalo, že cílový HBV se také amplifikoval v mezích hlášené stanovitelnosti 0,2 log¹⁰ IU/ml u kontrolních vzorků.

Tabulka 13: Účinnost kontroly zpracování vzorků

Testovaná selhání kroků zpracování	Stav amplifikace kontroly zpracování vzorků	Stav amplifikace cílového HBV	Výsledek analýzy
Presence of Inhibitor (Přítomnost inhibitoru)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Delivered (Promytí nebylo dodáno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Blowout (Bez pročištění)	Amplified (Amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	Positive (Pozitivní) se stanovitelností do 0,2 Log ₁₀ IU/ml kontroly

Křížová kontaminace

Míra křížové kontaminace analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay byla stanovena testováním tří sad vzorků HBV, kde se střídaly vzorky vysoce pozitivní a negativní. Celkem bylo testováno 144 replikátů běžného HBV negativního vzorku lidské EDTA plazmy a 144 replikátů HBV vzorku s vysokým titrem při 8,0 log₁₀ IU/ml. Všechny 144 replikátů negativního vzorku bylo negativních, což je důkazem, že během zpracování vzorku na soustavě NeuMoDx System k žádné křížové kontaminaci nedošlo.

Ekvivalence matrice vzorků

Testování bylo provedeno za účelem stanovit srovnatelné výsledky u vzorků plazmy odebraných jak v odběrných zkumavkách s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA), tak ve zkumavkách s kyselinou-citrátem-dextrózou (Acid Citrate Dextrose, ACD). Kromě toho bylo provedeno testování k prokázání ekvivalence mezi čerstvými a zmrazenými vzorky. Čtyřicet individuálních dárcovských vzorků pocházejících z BioIVT bylo odebráno do odběrových zkumavek s EDTA i s ACD. Po dodání byly tyto čerstvé vzorky uměle obohaceny o čtyři hladiny genotypu A nebo C viru HBV a testovány na ekvivalenci. Vzorky pak byly zmrazeny po dobu minimálně 24 hodin, rozmrazeny a znovu testovány. Mezi čerstvými a zmrazenými vzorky a vzorky EDTA a ACD byla pomocí regresní analýzy prokázána vynikající ekvivalence.

Tabulka 14: Regresní analýza výsledků ekvivalence vzorků

Parametr (kritéria přijatelnosti)	Čerstvé vzorky ve srovnání se zmrazenými	ACD ve srovnání s K2EDTA
Směrnice (0,9-1,1)	1,002	0,996
Průsečík [$< 0,5$]	-0,031	0,018
Koeficient určení [$R^2 > 0,95$]	0,995	0,993

Bylo provedeno další testování, aby se prokázala ekvivalence výkonu analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay za použití vzorků v primárních odběrových zkumavkách ve srovnání se vzorky v sekundárních odběrových zkumavkách. Panely HBV negativních dárcovských vzorků uměle obohacených o cílový HBV (AccuPlex™ HBV Control) byly nejprve zpracovány z primárních zkumavek se vzorky. Zbývající plazma z každého vzorku byla rozdělena do sekundární zkumavky se vzorkem a znovu zpracována. Nebyl nalezen žádný významný rozdíl v uváděných výsledcích mezi zpracováním v primární a sekundární zkumavce se vzorkem.

Ekvivalence výkonu analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay ve vzorcích čerstvého versus zmrazeného séra byla také hodnocena pomocí panelu individuálních čerstvých dárcovských vzorků séra, uměle obohacených o HBV v koncentracích pokrývajících lineární rozsah analýzy. Po zpracování čerstvých vzorků byly vzorky séra zmrazeny po dobu alespoň 24 hodin na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zmrazené vzorky byly poté rozmrazeny a znovu testovány. Lineární ekvivalence mezi identickými čerstvými a zmrazenými vzorky byla hodnocena pomocí Passing-Bablokovy a Demingovy regresní analýzy. P hodnota z Passing-Bablokovy regrese 0,329 (vyšší než 0,05) a Demingův regresní korelační koeficient 0,989 ukazují vynikající ekvivalenci mezi vzorky zpracovány jako čerstvé a jako nejprve zmrazené. Odchylka mezi čerstvým a zmrazeným stavem byla stanovena podle Blanda-Altmana jako extrémně zanedbatelná hodnota $-0,002\text{ log}_{10}\text{ IU/ml}$ a dále demonstruje ekvivalenci zpracování čerstvého a zmrazeného vzorku. Nakonec byla korelace mezi koncentracemi HBV hlášenými soustavou a očekávanými koncentracemi pro čerstvé i zmrazené vzorky stanovena jednoduchou lineární regresí s hlášenými hodnotami R^2 0,991 a 0,985.

Stabilita vzorku

HBV negativní vzorky EDTA plazmy a séra byly uměle obohaceny o HBV v koncentraci $3,7\text{ log}_{10}\text{ IU/ml}$ a testovány v různých časových bodech období, ve kterém byly uloženy v soustavě NeuMoDx System, a to: okamžitě (čas 0), po 4 hodinách, po 8 hodinách a po 24 hodinách. Mezi časovými body nebyl pozorován žádný významný rozdíl ve výkonu, což naznačuje, že vzorek lze do soustavy NeuMoDx System vložit až na 24 hodin bez jakéhokoli dopadu na výkon analýzy.

Podobné testování bylo také provedeno u vzorků plazmy a séra skladovaných v laboratorní lednici (mezi $2\text{ až }8\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu až 7 dnů před testováním a žádný významný rozdíl ve výkonu nebyl pozorován.

Nakonec byly vzorky, které byly před zpracováním skladovány při $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu až 6 měsíců (plazma) a až 4 měsíců (sérum), testovány a ve vztahu k čerstvým vzorkům nebyl žádný významný rozdíl vykázan. Cyklus zmrazení/rozmrazení byl opakován a po 2 cyklech zmrazení/rozmrazení (plazma) či 4 cyklech zmrazení/rozmrazení (sérum) znovu nebyla prokázána žádná změna ve výkonu.

Korelační metoda

Vzorky plazmy

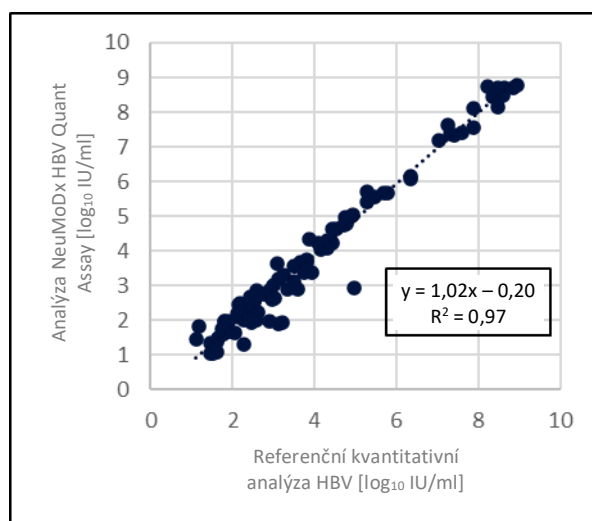
Kvalitativní a kvantitativní účinnosti analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay byly hodnoceny ve srovnání s analýzami komparátory schválenými úřadem FDA / s označením CE testováním nezředěných klinických vzorků plazmy od pacientů infikovaných virem HBV. Testování interně provedla společnost NeuMoDx prostřednictvím jednoduše zaslepené studie za použití klinických vzorků od tří nezávislých referenčních laboratoří. Výsledky všech 308 HBV pozitivních a negativních vzorků byly zpracovány v kvalitativní analýze za účelem vypočítat klinickou citlivost a specifitu analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay. Kvalitativní analýza byla provedena včetně pozitivních vzorků pod LLoQ a bez nich, jelikož zařazení takto nízkých vzorků se může mezi testy lišit. Celkem 97 HBV pozitivních klinických vzorků v mezích lineárního rozsahu pro oba testy společného bylo použito k vytvoření lineární regrese pro stanovení kvantitativní účinnosti. Kromě vynikající senzitivity a specifity prokázal testovací pásek NeuMoDx HBV Quant Test Strip vynikající kvantitativní vztah k analýze komparátory. Na základě těchto výsledků byla citlivost analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay odhadnuta na 100 % (CI 96,4 % – 100 %) a specifita byla odhadnuta na 95,6 % (CI 91,9 % – 97,7 %). Tyto 95 % intervaly spolehlivosti byly vypočítány pomocí metody skóre 95 % intervalu spolehlivosti dle EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance, Approved Guideline, Vol 28, No 3.⁶

Tabulka 15: Metriky klinické citlivosti a specifčnosti analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay na molekulární soustavě NeuMoDx 288 Molecular System pro vzorky plazmy

	Referenční analýza (POZ.)	Referenční analýza (NEG.)	CELKEM
Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ.)	103	9	112
Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG.)	0	196	196
CELKEM	103	205	308
CITLIVOST = 100 % 95% CI (96,4 % – 100 %) SPECIFIČNOST = 95,6 % 95 % CI (91,9 %–97,7 %)			

Tabulka 16: Metriky klinické citlivosti a specifčnosti analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay na molekulární soustavě NeuMoDx 288 Molecular System s vyloučením vzorků plazmy < LLoQ

	Referenční analýza (POZ.)	Referenční analýza (NEG.)	CELKEM
Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ.)	99	5	104
Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG.)	0	196	196
CELKEM	99	201	300
CITLIVOST = 100 % 95% CI (96,3 % – 100 %) SPECIFIČNOST = 97,5 % 95% CI (94,3 %–98,9 %)			



Obrázek 7: Měření kvantitativní korelační metodou pomocí analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay

Další testování bylo provedeno na molekulární soustavě NeuMoDx 96 Molecular System za použití 159 reziduálních klinických vzorků plazmy. Tak jako u předchozího testování, provedeného na soustavě NeuMoDx 288, byly výsledky získané ze soustavy NeuMoDx 96 srovnány s výsledky udanými analýzami schválenými úřadem FDA a/nebo označenými CE, které použily zdrojové laboratoře při běžném testování pro vyšetření pacientů. Výsledky včetně pravdivostní tabulky s klinickou citlivostí a specifčností jsou s 95% CI uvedeny v *tabulce 17*.

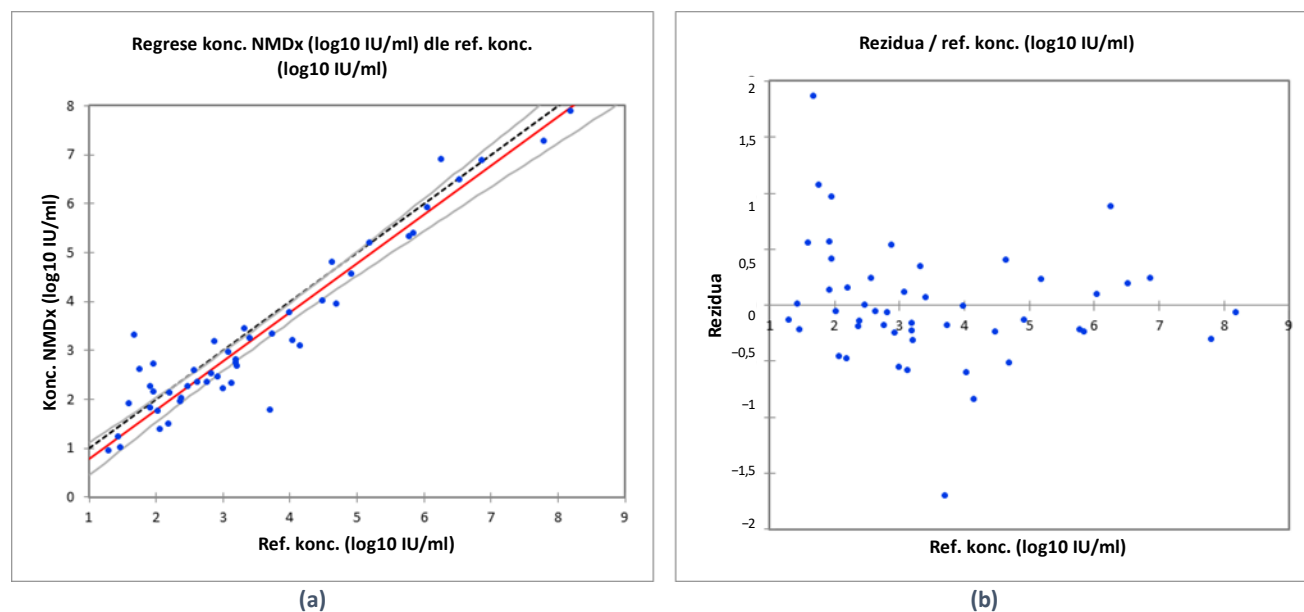
Tabulka 17: Souhrn klinického výkonu – analýza NeuMoDx HBV Quant Assay na molekulární soustavě NeuMoDx 96 Molecular System

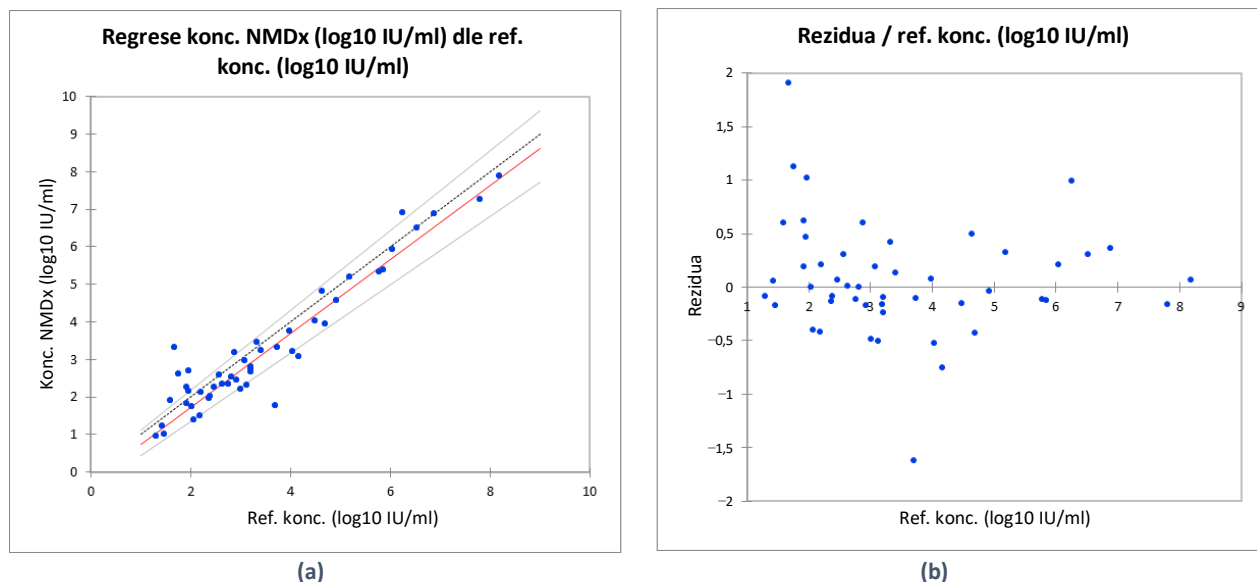
	Referenční analýza (POZ.)	Referenční analýza (NEG.)	CELKEM
Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay (POZ.)	60	2	62
Analýza NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG.)	1	95	96
CELKEM	61	97	158
CITLIVOST = 98 % 95% CI (90 %–100 %) SPECIFIČNOST = 98 % 95% CI (92 %–100 %)			

Vzorky séra

Kvantitativní účinnost analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay byla hodnocena ve srovnání s analýzami komparátorů schválených úřadem FDA / označených značením CE testováním deidentifikovaných, reziduálních, HBV pozitivních vzorků séra od pacientů infikovaných virem HBV. Interně ve společnosti NeuMoDx bylo pomocí analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay testováno celkem 66 klinicky známých HBV pozitivních vzorků séra získaných ze dvou nezávislých referenčních laboratoří. Ze známých pozitivních testovaných vzorků séra bylo identifikováno 58 jako pozitivních výsledků, z nichž devět (9) výsledků bylo pod LLoQ a nad ULoQ pro analýzu NeuMoDx HBV Quant Assay a/nebo referenční test. Celkem 49 HBV pozitivních klinických vzorků v mezích lineárního rozsahu pro oba testy společného bylo použito k vytvoření regresních analýz pro stanovení kvantitativní účinnosti.

Pro znázornění korelace mezi koncentracemi analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay a hodnotami koncentrace referenčních testů u všech testovaných vzorků byly pomocí Demingovy a Passing-Bablokovy regresní analýzy vytvořeny grafy ekvivalence a reziduí, které jsou uvedeny na obrázku 8 a 9. Kvalita Demingovy regresní metody je ilustrována koeficientem směrnice 0,99 s 95% CI (0,93, 1,07) a průsečíkem (odchylkou) $-0,22$ s 95% CI $(-0,56, 0,12)$, což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx HBV Quant Assay a referenčními testy jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou. Kvalita Passing-Bablokovy lineární metody je ilustrována koeficientem směrnice 0,99 s CI 95% (0,91, 1,06) a průsečíkem (odchylkou) $-0,25$ s 95% CI $(-0,48, 0,06)$, což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx HBV Quant Assay a referenčními testy jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou, tak jak ukazuje *tabulka 18*.


Obrázek 8: Grafy ekvivalence (a) a reziduí (a) – kumulativní analýza pro test NeuMoDx HBV Test versus referenční testy – Analýza Demingovou metodou.



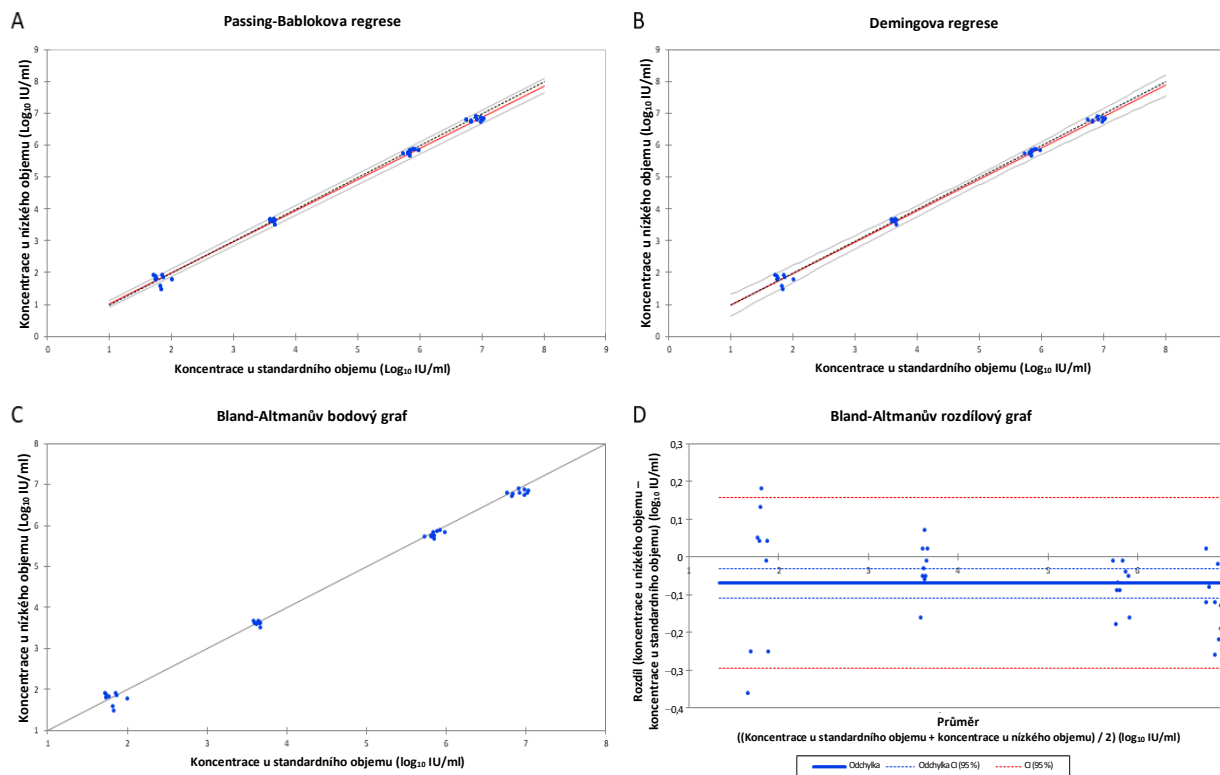
Obrázek 9: Grafy ekvivalence (a) a reziduí (b) – kumulativní analýza pro analýzu NeuMoDx HBV Quant Assay versus referenční testy – Passingova-Bablokova analýza.

Tabulka 18. Shrnutí lineární regresní analýzy Demingovou a Passingovou-Bablokovou metodou pro vzorky séra

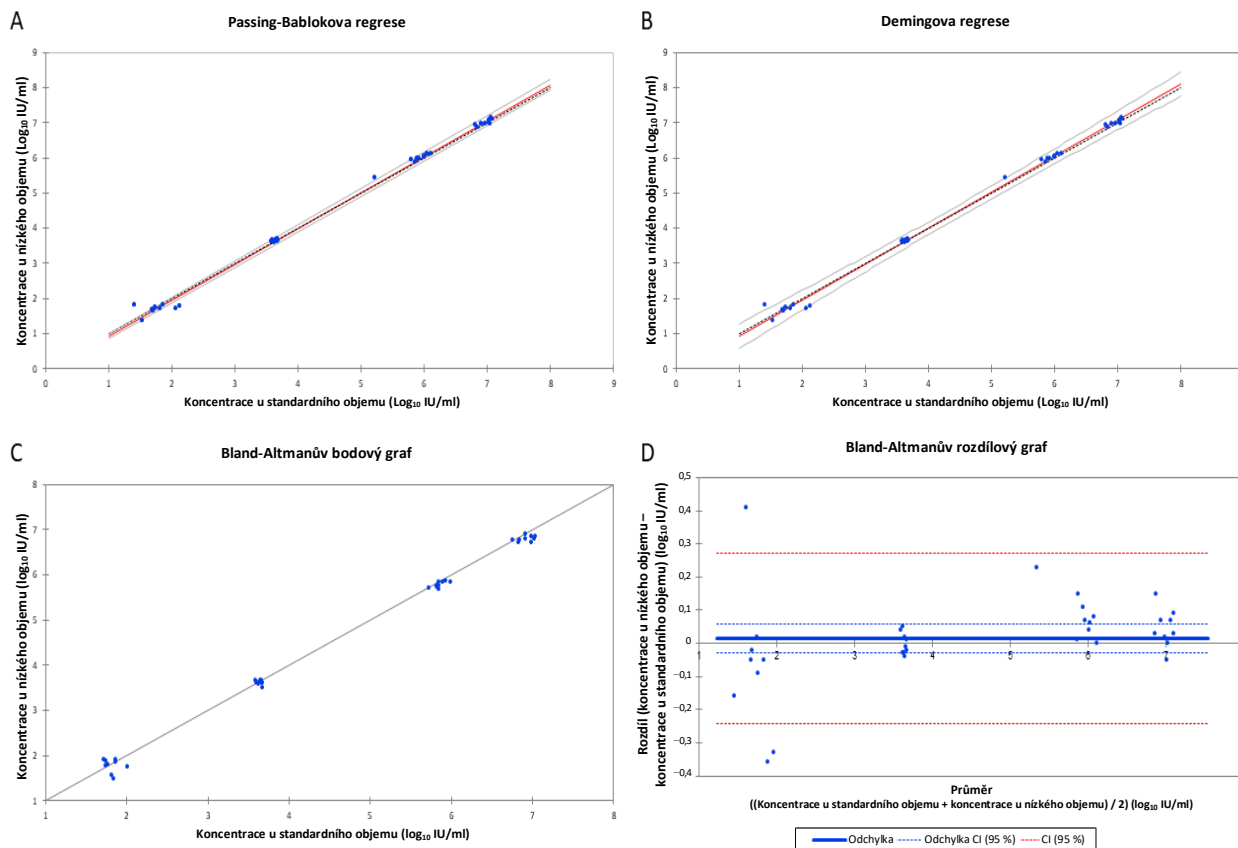
Analýza Demingovou metodou			Analýza metodou Passing-Bablok		
Průsečík	Koeficient směrnice	R2	Průsečík	Koeficient směrnice	P hodnota
-0,22 CI 95 % (-0,56, 0,12)	0,99 CI 95 % (0,93, 1,07)	0,95	-0,25 CI 95 % (-0,48, 0,06)	0,99 CI 95 % (0,91, 1,06)	0,89

Testování uměle připravených vzorků – pracovní postup pro objem vzorku 200 µl

Kvantitativní korelace mezi pracovními postupy pro objem vzorku 200 µl a 550 µl byla potvrzena pomocí panelu sestávajícího z jednotlivých vzorků HBV negativní plazmy a séra obohacených čtyřmi známými hladinami kontrolního HBV materiálu, navázaného na 4. mezinárodní standard WHO pro DNA HBV pro testování nukleových kyselin. Tyto jednotlivé vzorky plazmy a séra byly zpracovány pomocí pracovních postupů pro objemu vzorku 550 µl i 200 µl u celkem 288 provedených testů. Porovnání ekvivalence mezi koncentrací hlášenou softwarem NeuMoDx pro pracovní postupy pro objem vzorku 200 µl a 550 µl s uměle vytvořeným panelem byly provedeny na základě individuálních vzorků. Demingova a Passing-Bablokova regresní analýza měla směrnici 0,985 a 0,998 s průsečíky -0,001, respektive 0,053 u plazmy, a směrnice 1,024 a 1,018 s průsečíky 0,095, respektive 0,070 u séra, což ukazuje vynikající shodu kvantifikace HBV mezi těmito dvěma objemy zpracování. Porovnání podle Blanda a Altmana ukázalo minimální odchylku mezi těmito dvěma pracovními postupy. Navíc jednoduché lineární regresní analýzy s očekávanou koncentrací a hlášenou koncentrací pro pracovní tok pro 200 µl měly směrnici 1,047 a korelační koeficient 0,998 (plazma) a 1,113 a 0,992 (sérum), což dále podporuje vynikající účinnost s použitím pracovního postupu pro objemu vzorku 200 µl u analýzy NeuMoDx HBV Quant Assay. Výsledky těchto měření jsou shrnuty níže na obrázku 10 a obrázku 11.



Obrázek 10: Graf ekvivalence se srovnáním hlášených koncentrací pro nízký objem vzorku s hlášenými koncentracemi pro standardní objem. A) Passing-Bablokova regrese. B) Demingova regrese. C) Bland-Altmanův bodový graf D) Bland-Altmanův rozdílový graf – vzorky plazmy



Obrázek 11: Graf ekvivalence se srovnáním hlášených koncentrací pro nízký objem vzorku s hlášenými koncentracemi pro standardní objem. A) Passing-Bablokova regrese. B) Demingova regrese. C) Bland-Altmanův bodový graf D) Bland-Altmanův rozdílový graf – vzorky séra

REFERENCE

1. Mother-to-child transmission of hepatitis B virus in sub-Saharan Africa: time to act. Andersson, Monique I et al. The Lancet Global Health, Volume 3, Issue 7, e358 - e359
2. Schillie S, Vellozzi C, Reingold A, et al. Prevention of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. MMWR Recomm Rep 2018;67(No. RR-1):1–31. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6701a1>.
3. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet. April 2017. <http://www.who.int> (last accessed 20 November 2017)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

NeuMoDx™ je ochranná známka společnosti NeuMoDx Molecular, Inc.
 NeuDry™ je ochranná známka společnosti NeuMoDx Molecular, Inc.
 TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.


Všechny ostatní názvy produktů, ochranné známky a registrované ochranné známky, které se mohou objevit v tomto dokumentu, jsou majetkem příslušných vlastníků.


LEGENDA K SYMBOLŮM


R only Pouze na lékařský předpis


 Výrobce


 Zdravotnický prostředek pro diagnostiku *in vitro*

 Autorizovaný zástupce v Evropském společenství


 Katalogové číslo


 Číslo šarže

 Datum spotřeby


 Omezení teploty


 Nepoužívejte opakovaně

 Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů

 Prostudujte si návod k použití

 Upozornění

 Biologická rizika

 Značka CE



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

Zadavatel (AUS):
QIAGEN Pty Ltd
Level 2 Chadstone Place
1341 Dandenong Rd
Chadstone VIC 3148
Australia



Emergo Europe B.V.
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

 2797

Technická podpora / vigilanční hlášení: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents