

REF 201501 NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip 2.0

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.qiaagen.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 EBV Quant Assay 2.0 je automatizovaný, amplifikační *in vitro* test nukleové kyseliny pro kvantifikace DNA lidského viru Epstein-Barrové (Epstein-Barr Virus, EBV) v EDTA plasmě odebrané imunokompromitovaným pacientům po transplantaci.

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 prováděná na molekulárních soustavách NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System zahrnuje automatizovanou extrakci DNA k izolování cílových nukleových kyselin ze vzorku a zacílení PCR v reálném čase na dvě vysoce konzervované oblasti v genomu EBV.

Analýza je určena k použití jako pomůcka při monitorování hladin DNA viru EBV v periferní krvi za účelem posouzení virové odpovědi na léčbu. Tato analýza je určena k použití ve spojení s klinickou přítomností a jinými laboratorními markery postupujícího onemocnění pro klinické řízení a monitoring infekce virem EBV.

Analýza není určena k použití jako screeningový test na přítomnost DNA viru EBV v krvi nebo přípravcích z krve. Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je určena k použití vyškoleným personálem klinické laboratoře, který je speciálně poučen a vyškolen v technikách PCR v reálném čase a diagnostických postupech *in vitro* a/nebo v použití molekulárních soustav NeuMoDx Molecular System. Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 není určena k samotestování ani k použití v místě péče.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

K přípravě plazmy lze použít plnou lidskou krev odebranou do sterilních zkumavek pro odběr krve s obsahem EDTA jako antikoagulantem. Pro zahájení testování se plazma ve zkumavce se vzorkem kompatibilní se soustavou NeuMoDx System umístí do k tomu určeného nosiče na zkumavky se vzorky a položí na pracovní stůl systému NeuMoDx System. U každého vzorku se poměrné množství 550 µl vzorku plazmy smíchá s lýzovým pufrem 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, pokud jsou přítomny, k amplifikaci a detekci produktů amplifikace (dvou vysoce konzervovaných oblastí v genomu viru EBV). Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 obsahuje kontrolu zpracování vzorků DNA (Sample Process Control, SPC1), která pomáhá sledovat přítomnost možných inhibičních látek a také selhání soustavy NeuMoDx System nebo reagentů, ke kterému může dojít během extrakce a amplifikace.

EBV je běžný virus s dvoušroubovicovou DNA, který patří do čeledi lidských herpesvirů, které infikují lidi v každém věku. Odhaduje se, že po celém světě je nebo bylo virem EBV nakaženo > 90 % jedinců.¹ EBV se šíří tělesnými tekutinami, jako jsou sliny, krev, sperma a transplantací orgánů. Mnoho lidí se EBV nakazí v dětství. Tito jedinci jsou při nakažení EBV obvykle asymptomatictí. U imunokompromitovaných jedinců se z EBV infekce mohou rozvinout závažnější příznaky a komplikace. Latentní EBV infekce představuje pro pacienty po transplantaci větší riziko. Mezi posttransplantační lymfoproliferativní choroby (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD) patří tvorba nádorů navozená EBV u B-buněk v důsledku účinku imunosupresiv na imunitní kontrolní mechanismy EBV. To představuje jednu z nejvýznamnějších příčin nemocnosti a úmrtnosti pacientů, kteří podstupují transplantaci některého orgánu.²

Monitorování virové nálože EBV lze využít jako pomůcku při diagnostice a léčbě PTLD asociované s EBV. Diagnóza však musí být stanovena pomocí biopsie. Monitorování virové nálože EBV lze použít také ke sledování odpovědi na léčbu PTLD asociovanou s EBV, obvykle pomocí rituximabu a snížení imunosupresivní léčby.³

PRINCIPY POSTUPU

K vlastnímu provedení analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 na soustavě NeuMoDx System využívá testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, kalibrátory NeuMoDx EBV Calibrator, externí kontroly NeuMoDx EBV External Control, lýzový pufr NeuMoDx Lysis Buffer 1 a obecně použitelné reagenty NeuMoDx. Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 kombinuje automatizovanou extrakci DNA, amplifikaci a detekci pomocí PCR v reálném čase. K přípravě plazmy se odebírají vzorky plné krve do zkumavek s obsahem EDTA. Vzorek plazmy ve zkumavce na vzorek kompatibilní se soustavou NeuMoDx System je umístěn do nosiče zkumavek se vzorky, který je pak vložen na pracovní stůl soustavy NeuMoDx System ke zpracování. Žádný další zásah obsluhy není nutný.

Soustavy NeuMoDx System k automatickému provedení buněčné lýzy, extrakce DNA a odstranění inhibitorů využívají kombinace zahřívání, lýtických enzymů a extrakčních reagentů. Uvolněné nukleové kyseliny jsou zachyceny magnetickými afinitními mikrokuličkami. Mikrokuličky se s navázanými nukleovými kyselinami vloží do kazety NeuMoDx Cartridge, kde se nenavázané složky, jiné než DNA, dále vymyjí promývací reagenty NeuMoDx Wash Reagent, a navázaná DNA se eluuje pomocí uvolňovací reagentie NeuMoDx Release Reagent. Soustavy NeuMoDx System potom eluovanou DNA využijí k rehydrataci proprietárních amplifikačních reagentů NeuDry™, které obsahují všechny prvky nezbytné k amplifikaci cílů specifických pro EBV a kontroly SPC1 pomocí PCR. Po rekonstituci PCR reagentů NeuDry rozdělí soustava NeuMoDx System připravenou PCR-ready směs do zásobníku NeuMoDx Cartridge. K amplifikaci a detekci kontrolní a cílové (pokud je přítomna) sekvence DNA dochází v PCR komoře zásobníku NeuMoDx Cartridge. Kazeta NeuMoDx Cartridge je určena také k tomu, aby v ní následně po PCR v reálném čase byl amplikon, čímž je po amplifikaci podstatně eliminováno riziko kontaminace.

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 cílí na dvě vysoce konzervované oblasti, BALF5 a BXFL1, v genomu viru EBV. Vzor s dvojitým zacílením snižuje riziko falešně negativních výsledků v případě mutací v jedné cílové oblasti, čímž zvyšuje robustnost analýzy. Amplifikované cíle jsou detekovány v reálném čase pomocí chemizmu hydrolyzační sondy (běžně označované jako chemizmus TaqMan®) za použití fluorogenních oligonukleotidových molekul sondy, specifických pro amplikony pro jejich příslušné cíle.

Sondy TaqMan sestávají z fluoroforu, kovalentně připojeného k 5' konci oligonukleotidové sondy, a ze zhasědla na 3' konci. Zatímco sonda je intaktní, fluorofor a zhasědlo jsou v blízkosti, čímž molekula zhasědla zháší fluorescenci emitovanou fluoroforem prostřednictvím Försterova rezonančního přenosu energie (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Sondy TaqMan 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. Degradaci sondy se uvolňuje fluorofor a rozbíjí blízkost ke zhasědlu, takže účinek zhasění je překonán prostřednictvím FRET a detekce fluoroforu fluorescencí je možná. Výsledný detekovaný fluorescenční signál je přímo úměrný uvolněnému fluoroforu a může souviset s množstvím přítomné cílové DNA.

Sonda TaqMan značená fluoroforem (excitace: 490 nm a emise: 521 nm) na 5' konci a tmavým zhasědlem na 3' konci se používá k detekci DNA viru EBV. Pro detekci SPC1 je sonda TaqMan označena alternativním fluorescenčním barvivem (excitace: 535 nm a emise: 556 nm) na 5' konci a tmavým zhasědlem 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 výsledku (POSITIVE (POZITIVNÍ) / NEGATIVE (NEGATIVNÍ) / INDETERMINATE (NEURČITÝ) / NO RESULT (BEZ VÝSLEDKU) / UNRESOLVED (NEROZLIŠENO)). Pokud je výsledek POSITIVE (POZITIVNÍ), software soustavy NeuMoDx System dodá také kvantitativní hodnotu přidruženou ke vzorku, případně oznámí, zda je vypočítaná koncentrace mimo lineární rozsah.



REAGENCIE / SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Dodaný materiál

REF.	Obsah	Počet jednotek v balení	Počet testů na jednotku	Počet testů v balení
201501	NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 Suché reagenty RT-PCR obsahující sondu TaqMan a primery specifické na EBV a SPC1.	6	16	96

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

REF.	Obsah
800501	NeuMoDx EBV Calibrators Sady jednorázových kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot EBV pro stanovení validity standardní křivky (1 ampulka z každé kontroly = 1 sada)
900502	NeuMoDx EBV External Controls Jednorázové sady EBV nízkou pozitivních, vysoko pozitivních a negativních kontrol ke stanovení každodenní validity analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 (1 ampulka na každou kontrolu = 1 sada)
100200	NeuMoDx Extraction Plate Suché paramagnetické částice, lytický enzym a kontroly zpracování vzorků
400500	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hroty Hamilton® CO-RE / CO-RE II (300 µl) s filtry
235905	Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (1000 µl) s filtry

Potřebné přístrojové vybavení

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

Software **NeuMoDx System Software**, verze 1.9.2.6 nebo vyšší



VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 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 rozbitý.
- K dispozici musí být platná kalibrace testování (generovaná zpracováním kalibrátorů NeuMoDx EBV Calibrator (REF 800501) vysokých a nízkých hodnot) předtím, než lze výsledky testu generovat pro klinické vzorky.
- Externí kontroly NeuMoDx EBV External Control [REF 900502] musejí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 zpracovány každých 24 hodin.
- Minimální objem vzorku sekundárních alikvotů plazmy EDTA je podrobně popsán níže v části Příprava testu. 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 reagiencí a spotřebního materiálu zabraňte mikrobiální a deoxyribonukleázové (DNázové) kontaminaci. Při použití sekundárních zkumavek se doporučuje používat sterilní jednorázové přenosové pipety bez DNázy. Pro každý vzorek použijte novou pipetu.
- Abyste předešli kontaminaci, s kazetou NeuMoDx Cartridge po amplifikaci nemanipulujte ani ji nerozebírejte. Za žádných okolností nevýjímte kazetu NeuMoDx Cartridge z nádoby na biologicky nebezpečný odpad (NeuMoDx 288 Molecular System) nebo z koše na nebezpečný biologický odpad (NeuMoDx 96 Molecular System). Kazeta NeuMoDx Cartridge je zkonstruována tak, aby kontaminaci zabránila.
- V případě, že laboratoř provádí také testy PCR s otevřenými zkumavkami, musí být zajištěno, že testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, přídatný spotřební materiál a reagencie nezbytné k testování, ochranné osobní prostředky, jako například rukavice a laboratorní pláště, a soustava NeuMoDx System nejsou kontaminovány.
- Při manipulaci s reagiencemi a spotřebním materiálem NeuMoDx byste měli nosit čisté nitrilové rukavice bez obsahu pudru. Měli byste dávat pozor, abyste se nedotýkali vrchního povrchu kazety NeuMoDx Cartridge, povrchu fóliového těsnění testovacího proužku NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 a extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate ani vrchního povrchu nádoby s lyzačním pufrem NeuMoDx Lysis Buffer; při manipulaci se spotřebním materiálem a reagiencemi byste se měli dotýkat pouze bočních stran.
- Pro každou reagenii 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 nejezte v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo reagiencemi.
- Se vzorky vždy zacházejte tak, jako by byly infekční, a v souladu s bezpečnými laboratorními postupy, například těmi popsány v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ a v dokumentu M29-A4 institutu CLSI.⁵
- Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (BL).
- Nepoužité reagencie a odpad likvidujte podle státních, federálních, oblastních a místních předpisů. Dodržujte doporučení uvedená v bezpečnostním listu (BL).

NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0



Obsahuje: kyselinu boritou. Nebezpečí! Způsobuje vážné podráždění očí. Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky. Před použitím si obstarajte speciální instrukce. Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Skladujte uzamčené. Obsah/nádobu zlikvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

Informace pro případ nouze

CHEMTREC

Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887



UCHOVÁVÁNÍ, MANIPULACE A STABILITA PRODUKTU

1. Testovací proužky NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 jsou stabilní v primárním obalu po dobu expirace, která je uvedena na štítku produktu, při uchování při teplotě mezi 15 °C až 28 °C.
2. Testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 může po vložení zůstat v přístroji soustavy NeuMoDx System po dobu 14 dnů. Zbývající životnost vložených testovacích proužků je sledována pomocí softwaru a hlášena uživateli v reálném čase. Soustava vyzve k vyjmutí testovacího proužku, který byl používán po uplynutí povolené doby.
3. Ačkoli kalibrátory NeuMoDx EBV Calibrator a externí kontroly NeuMoDx EBV External Control nejsou infekční, měly by být po použití v laboratoři zlikvidovány jako biologicky nebezpečný odpad, aby se snížilo riziko kontaminace.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

Se všemi vzorky manipulujte, jako kdyby byly schopné přenosu infekčních agens.

1. Plnou krev nebo jakékoli vzorky skladované v původních zkumavkách nezmrazujte.
2. Pro přípravu vzorků plazmy by měla být plná krev odebrána do sterilních zkumavek za použití EDTA jako antikoagulantu. Postupujte podle pokynů výrobce zkumavek pro odběr vzorků.
3. Plná krev odebraná v zařízeních vyjmenovaných výše může být před přípravou plazmy skladována a/nebo přepravována až po dobu 24 hodin při 2 °C až 25 °C. Příprava plazmy by měla být prováděna podle pokynů výrobce.
4. Připravené vzorky plazmy mohou před zpracováním zůstat na soustavě NeuMoDx System až po dobu 8 hodin. Pokud je třeba delší doby skladování, doporučujeme vzorky buď zchladit nebo zmrazit.
5. Připravené vzorky plazmy by při 2 až 8 °C neměly být před testováním skladovány déle než 7 dnů a maximálně 8 hodin při pokojové teplotě.
6. Připravené vzorky plazmy mohou být skladovány při teplotě –20 °C po dobu až 8 týdnů; vzorky plazmy by před použitím neměly být vystaveny více než 2 cyklům zmrazení/rozmrazení.
 1. Pokud jsou vzorky zmrazené, nechte je úplně rozmrazit při teplotě místnosti (15–30 °C); pro vytvoření rovnoměrně rozloženého vzorku vzorek zviňte. Vzorky by měly mít před testováním teplotu místnosti.
 2. Jakmile jsou zmrazené vzorky rozmrazeny, testování by mělo proběhnout do 8 hodin.
7. Pokud jsou vzorky přepravovány, měly by být zabaleny a označeny v souladu s platnými předpisy země a/nebo mezinárodními předpisy.

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava testu

1. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky, jak je popsáno níže.
2. Přeneste alikvotní podíl vzorku do zkumavky se vzorkem s čárovým kódem, která je kompatibilní se soustavou NeuMoDx System podle objemů definovaných níže:
3. *Pro vzorky plazmy:*
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (32 zkumavek): průměr 11–14 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem je $\geq 750 \mu\text{l}$
 - Stojan na zkumavky se vzorkem (24 zkumavek): průměr 14,5–18 mm a výška 60–120 mm; minimální plnicí objem je $\geq 1100 \mu\text{l}$
 - Stojan na zkumavky se vzorkem o malém objemu (32 zkumavek): 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavka s kónickým dnem; minimální plnicí objem je $\geq 650 \mu\text{l}$

Provoz soustavy 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).

1. Osadte jeden nebo více stojanů na testovací proužky NeuMoDx System Test Strip testovacím proužkem (proužky) NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 a k založení stojanu (stojanů) na testovací proužky do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
2. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, přidejte do stojanu na spotřební materiál soustavy NeuMoDx System nezbytný spotřební materiál a k založení stojanu (stojanů) do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
3. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, vyměňte podle potřeby promývací reagenty NeuMoDx Wash Reagent a uvolňovací reagenty NeuMoDx Release Reagent a 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) a nebo koš na nebezpečný biologický odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System).
4. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, zpracujte dle nutnosti kalibrátory Calibrators (REF 800501) a/nebo kontroly External Controls (REF 900502). Další informace týkající se kalibrátorů a kontrol lze najít v oddíle *Zpracování výsledků*.
5. Zkumavku (zkumavky) se vzorkem vložte do příslušného stojanu na zkumavky se vzorky a ujistěte se, že jsou ze všech zkumavek sejmuta víčka a vyjmuty tampony.
6. Umístěte stojan na zkumavky se vzorkem na přihrádku automatického podavače a pomocí dotykové obrazovky vložte stojan (stojany) do soustavy NeuMoDx System. Tím se zahájí zpracování vložených vzorků pro identifikovaný test (identifikované testy), pokud je v soustavě přítomno platné zadání testů.

OMEZENÍ

1. Testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 lze použít pouze na soustavách NeuMoDx System.
2. Účinnost testovacího proužku NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 byla stanovena u vzorků plazmy připravených z plné krve odebrané s EDTA jako antikoagulantem. Použití testovacího proužku NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 nebylo u jiných zdrojů posuzováno a výkonové charakteristiky nejsou pro jiné typy vzorků známy.
3. Vzhledem k tomu, že detekce EBV obecně závisí na množství virových částic přítomných ve vzorku, závisí spolehlivost výsledků na správném odběru vzorků, zacházení s nimi a jejich skladování.
4. K chybným výsledkům testů může dojít kvůli nesprávnému odběru vzorků, zacházení s nimi, jejich nevhodnému skladování, technické chybě nebo nesprávné identifikaci zkumavek 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 EBV Quant Assay 2.0.
5. Obsluha soustavy NeuMoDx System je omezena pouze na personál vyškolený v používání soustavy NeuMoDx System.
6. Pokud se ani cílový virus EBV, ani cílová SPC1 neamplifikují, bude oznámen neplatný výsledek (Indeterminate (neurčitý) nebo Unresolved (nerozlišeno)) a test by měl být zopakován.
7. Pokud před dokončením zpracování vzorku dojde k chybě systému, bude nahlášeno „No Result“ (Bez výsledku) a test by měl být zopakován.
8. V případě, že je detekovaná DNA viru EBV nad hodnotou ULOQ, může být analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 zopakována se zředěnou alikvotní částí původního vzorku. Doporučujeme ředění 1 : 100 nebo 1 : 1000 v EBV negativní plazmě nebo diluentu Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare®, Milford, MA). Soustava automaticky spočítá koncentraci původního vzorku takto: Původní koncentrace vzorku = \log_{10} (faktor ředění) + oznámená koncentrace zředěného vzorku, pokud je před opakováním v softwaru řádně zvolen faktor ředění.
9. Důsledkem přítomnosti PCR inhibitorů v plazmě může být chyba stanovitelnosti v systému; pokud k tomu dojde, doporučujeme test zopakovat se stejným vzorkem zředěným v diluentu Basematrix v poměru 1 : 10 nebo 1 : 100.
10. Pozitivní výsledek indikuje přítomnost DNA viru EBV.
11. Ačkoli je tato možnost malá, delece nebo mutace v konzervovaných oblastech, na které cílí analýza NeuMoDx EBV Quant Assay, mohou ovlivnit detekci a/nebo kvantifikaci a vést k chybnému výsledku.
12. Výsledky z analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 by měly být použity jako doplněk klinických vyšetření a dalších informací, které má lékař k dispozici; test není určen k diagnostice infekce.
13. Aby nedošlo ke kontaminaci, doporučujeme správnou laboratorní praxi, včetně výměny rukavic mezi manipulacemi s patientskými vzorky.

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Dostupné výsledky lze prohlížet nebo vytisknout ze záložky „Results“ (Výsledky) v okně Results (Výsledky) na dotykové obrazovce soustavy NeuMoDx System. Výsledky analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 automaticky generuje software soustavy NeuMoDx System používající algoritmus rozhodování a parametry zpracování výsledků popsané v souboru definic analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay Definition File (EBV Quant ADF verze 4.0.0 nebo vyšší). Výsledek analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 může být ohlášen jako Negative (negativní), Positive (pozitivní) s ohlášením koncentrace DNA viru EBV, Indeterminate (neurčitý), No Result (bez výsledku) nebo Unresolved (nerozlišeno) na základě stavu amplifikace cíle a kontroly zpracování vzorku. Výsledky jsou uváděny na základě rozhodovacího algoritmu ADF pro zpracování vzorků, shrnutého v *tabulce 1* uvedené níže.

Tabulka 1: Interpretace výsledků analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Výsledek	Cílové EBV	Kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Pozitivní)	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) [2 ≤ Ct < 28 AND (A) EPR > 1.3 AND (A) EP > 1200] OR (NEBO) [28 < Ct < 38 AND (A) EP > 1200]	N/A
Positive, above Upper Limit of Quantitation (Pozitivní, nad horní mezí stanovitelnosti) [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (log10 IU/ml)	[CONC] (KONC.) > 8,0 log10 IU/ml, NO QUANT (NENÍ STANOV.)	N/A
Positive, below Lower Limit of Quantitation (Pozitivní, pod dolní mezí stanovitelnosti) [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (log10 IU/ml)	[CONC] (KONC.) < 1,48 log10 IU/ml, NO QUANT (NENÍ STANOV.)	N/A
Negative (Negativní)	NOT AMPLIFIED (NEAMPLIFIKOVÁNO) N/A OR (NEBO) [2 ≤ Ct < 28 AND (A) EPR ≤ 1,3 AND EP > 1200] OR (NEBO) [28 ≤ Ct < 38 AND (A) EP > 1200] OR (NEBO) Ct > 38	AMPLIFIED (AMPLIFIKOVÁNO) [29 < Ct < 35 and (a) EP ≥ 2000]
No Result (Bez výsledku)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Neamplifikováno, Byla zjištěna chyba systému, Zpracování vzorků zrušeno)	
Indeterminate (Neurčitý)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Neamplifikováno, Byla zjištěna chyba systému, Zpracování vzorků dokončeno)	
Unresolved (Nerozlišeno)*	Not Amplified, No System Error Detected (Neamplifikováno, Nebyla zjištěna žádná chyba systému)	

EP = End Point Fluorescence (Hraniční fluorescence); EPR = End Point Fluorescence Ratio (Poměr hraniční fluorescence); Ct = Cycling Threshold (Prahová hodnota cyklování);

Quant (Stanov.) = vypočtené množství přítomného viru EBV vyjádřené v log₁₀ IU/ml. Viz oddíl Výpočet testu níže.

*Systém umožňuje volitelnou funkci Rerun/Repeat (Nová analýza / Opakovat) a umožňuje automatické opětovné zpracování v případě neplatného výsledku, aby se minimalizovaly prodlevy v ohlašování výsledků.

Výpočet testu: Vzorky

- U vzorků v lineárním rozsahu analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 se koncentrace DNA viru EBV ve vzorcích počítá za pomoci uložené standardní křivky ve spojení s koeficientem kalibrace.
 - „Koeficient kalibrace“ se vypočítá na základě výsledků kalibrátorů NeuMoDx EBV Calibrator zpracovaných tak, aby byla zajištěna validita standardní křivky pro každou šarži testovacího proužku NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 na konkrétní soustavě NeuMoDx System.
 - Koeficient kalibrace je do konečného stanovení koncentrace DNA EBV soustavou automaticky zahrnutý.
- Výsledky analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 se udávají jako IU/ml a log₁₀ IU/ml.
- Výsledná stanovitelnost u neznámých vzorků je výsledovatelná k 1. mezinárodnímu standardu organizace WHO pro techniku amplifikace nukleové kyseliny u viru Epstein-Barrové.

Výpočet testu: Kalibrátory

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

- Kalibrátory NeuMoDx EBV Calibrator jsou dodávány v soupravě (REF 800501) a obsahují cílový neinfekční opouzdřený virus EBV připravený v diluentu Basematrix.
- Sada kalibrátorů EBV musí být zpracována s každou novou šarží testovacích proužků NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, pokud je do soustavy NeuMoDx System nahrán nový soubor definic analýzy EBV, pokud je aktuální sada kalibrátorů za dobou platnosti (nastavenou na 90 dnů) nebo pokud je software soustavy NeuMoDx System upraven.
- Software soustavy NeuMoDx System uživatele uvědomí, kdy je třeba kalibrátory zpracovat; novou šarží testovacích proužků nelze k testování použít, dokud nebyly kalibrátory úspěšně zpracovány.

4. Validita kalibrace je zajištěna následovně:
 1. Pro zajištění validity je třeba zpracovat sadu se dvěma kalibrátory – pro vysokou a nízkou hodnotu.
 2. Pro získání platných výsledků je nutné mít výsledky nejméně 2 ze 3 replikátů v mezích předem stanovených parametrů. Nominální cíl kalibrátoru pro nízkou hladinu je 3 log₁₀ IU/ml a nominální cíl kalibrátoru pro vysokou hladinu je 5 log₁₀ IU/ml.
 3. Koeficient kalibrace se vypočítá tak, aby zohledňoval očekávanou variaci mezi šaržemi testovacích proužků; tento koeficient kalibrace se používá ke stanovení finální koncentrace DNA viru EBV.
5. 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.
6. Pokud kalibrátor (kalibrátory) neprojdou kontrolou validity podruhé za sebou, kontaktujte technickou podporu společnosti QIAGEN.

Neplatné výsledky

Pokud se analýze NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 prováděné na soustavě NeuMoDx System nepodaří vyprodukovat platný výsledek, bude výsledek ohlášen buď jako Indeterminate (neurčitý), No Result (bez výsledku), anebo Unresolved (nerozlišeno) podle typu chyby, ke které došlo. Pro získání platného výsledku by měl být test zopakován.

Výsledek Indeterminate (neurčitý) bude oznámen tehdy, pokud je během zpracování vzorků detekována chyba soustavy NeuMoDx System. V případě ohlášení výsledku Indeterminate (Neurčitý) se doporučuje opakování testu.

Výsledek No Result (Bez výsledku) bude ohlášen tehdy, pokud je detekována chyba soustavy NeuMoDx System a zpracování vzorku je přerušeno. V případě ohlášení výsledku No Result (Bez výsledku) se doporučuje opakování testu.

Výsledek Unresolved (Nerozlišeno) bude oznámen, pokud není detekován žádný cíl a nedojde k žádné amplifikaci kontroly zpracování vzorku, což naznačuje možné selhání reagentie nebo přítomnost inhibitorů. V případě ohlášení výsledku Unresolved (Nerozlišeno) se jako první krok doporučuje opakování testu. Pokud opakovaný test není úspěšný, lze použít zředěný vzorek pro snížení účinků možné inhibice (další pokyny naleznete v oddíle s omezeními).

Viz návod k obsluze molekulární soustavy NeuMoDx 288 Molecular System (PN: 40600108) nebo v návodu k uživatelské obsluze molekulárního systému NeuMoDx 96 Molecular System (výr. č.: 40600317), kde je uveden seznam kódů, které mohou souviset s neplatnými výsledky.

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. Externí kontrolní materiály, které pro pozitivní kontroly obsahují cílový neinfekční zapouzdřený virus EBV v diluentu Basematrix, případně diluent Basematrix pro negativní kontroly, dodává společnost QIAGEN v soupravě obsahující externí kontroly NeuMoDx EBV External Control [REF 900502].
2. Pozitivní a negativní externí kontroly je třeba provést jednou za 24 hodin. Pokud sada platných externích kontrol neexistuje, software soustavy NeuMoDx System vyzve uživatele ke zpracování těchto kontrol dřív, než budou moci být ohlášeny výsledky vzorků:

Externí kontroly NeuMoDx EBV External Control	Očekávaná koncentrace	Schéma barevného značení
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	1,5E4 IU/ml (4,18 log ₁₀ IU/ml)	Červená
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	150 IU/ml (2,18 log ₁₀ IU/ml)	Šedá
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	N/A	Černá

3. Při zpracovávání externích kontrol umístěte kontroly do stojanu na zkumavky se vzorkem a k založení stojanu do soustavy NeuMoDx System z přihrádky automatického podavače použijte dotykovou obrazovku. Soustava NeuMoDx System rozpozná čárové kódy a začne se zpracováním kontrolních materiálů, dokud nebudou k dispozici příslušné reagentie nebo spotřební materiál nutný k testování.
4. Validita těchto externích kontrol bude hodnocena soustavou NeuMoDx System na základě očekávaných výsledků.

Externí kontroly NeuMoDx EBV External Control	Výsledek stan. EBV	Výsledek SPC1
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	EBV POSITIVE (EBV POZITIVNÍ) [Conc] (Konc.) 3,68–4,68 log ₁₀ IU/ml	Pozitivní SPC1
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	EBV POSITIVE (EBV POZITIVNÍ) [Conc] (Konc.) 1,58–2,78 log ₁₀ IU/ml	Pozitivní SPC1
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	EBV NEGATIVE (EBV NEGATIVNÍ)	Pozitivní SPC1

5. S neshodným výsledkem externích kontrol by mělo být zacházeno následovně:
 1. Pozitivní výsledek testu hlášený u vzorku negativní kontroly může naznačovat kontaminaci a je třeba prověřit postupy kontroly kvality laboratoře, aby se zjistila příčina. Zajistěte oddělené prostory pro přípravu vzorků, manipulaci s kontrolami a přípravu RT-PCR. Tipy na další řešení problémů naleznete v návodu k obsluze molekulárních soustav *NeuMoDx 288 Molecular System* nebo *NeuMoDx 96 Molecular System*.
 2. Výsledek testu Negative (Negativní), ohlášený u pozitivní kontroly vzorku, může naznačovat, že se jedná o problém související s reagentií nebo přístrojem.

- V každém výše uvedeném případě anebo v případě výsledku No Result (NR, bez výsledku), Unresolved (UNR, nerozlišeno) nebo Indeterminant (IND, neurčitý) neúspěšnou kontrolu zopakujte s čerstvě rozmrazenou ampulkou / rozmrazenými ampulkami kontroly/kontrol, které testem validity neprošly.
- Pokud pozitivní externí kontrola nepřestává hlásit výsledek Negative (Negativní), kontaktujte technickou podporu společnosti QIAGEN.
- Pokud negativní kontrola nepřestává hlásit výsledek Positive (Pozitivní), pokuste se eliminovat všechny zdroje možné kontaminace, včetně výměny všech reagensů, a dřív, než kontaktujete technickou podporu společnosti QIAGEN, cyklus zopakujte.
- Pokud externí kontroly neposkytnou očekávané výsledky, je nutné zopakovat sadu pozitivních i negativních kontrol. Výsledky vzorků nebudou ohlášeny, pokud kontroly neposkytnou očekávané výsledky.
- Soustava NeuMoDx System je opatřena automatickou funkcí Rerun (Nová analýza) / Repeat (Opakovat), kterou si může uživatel zvolit k zajištění, že výsledek INVALID (NEPLATNÝ) bude automaticky znovu zpracován, a tak se minimalizovaly prodlevy v hlášení výsledků.

Kontroly (interní) zpracování vzorků

Exogenní kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1) je zabudována do extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate a u každého vzorku/kontroly/kalibrátoru prochází celým procesem extrakce nukleové kyseliny a amplifikace s RT-PCR v reálném čase. Každý testovací proužek NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 obsahuje primery a sondu specifické pro kontrolu SPC1. Tato kontrola SPC1 umožňuje soustavě NeuMoDx System sledovat účinnost extrakce DNA a procesy amplifikace pomocí RT-PCR.

VÝKONOVÁ CHARAKTERISTIKA

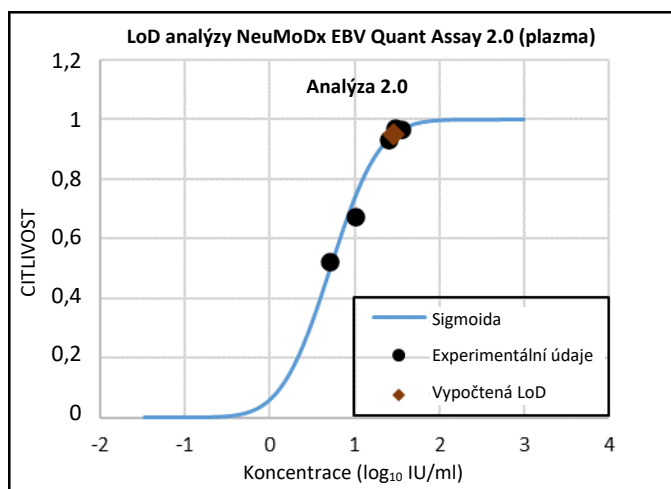
ANALYTICKÁ CITLIVOST – mez detekce

Analytická citlivost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 byla charakterizována ve dvou postupných fázích: 1. Předběžné posouzení meze detekce (Limit of Detection, LoD) (probitová analýza), po kterém následuje 2. Potvrzení LoD. V části 1 byly testovány negativní vzorky a série ředění 1. mezinárodního standardu WHO ve screeningové lidské plazmě negativní na EBV, aby se stanovila předběžná hodnota LoD na soustavách NeuMoDx System. Předběžná hodnota LoD byla definována jako nejnižší detekovaná cílová hladina při poměru 95 % tak, jak byla stanovena probitovou analýzou. V části 2 byla předběžná hodnota LoD potvrzena testováním uměle připraveného panelu na úrovni LoD. Obě fáze studie byly prováděny po dobu 3 dnů napříč několika soustavami s několika šaržemi reagensů NeuMoDx. V části 1 bylo zpracováno celkem 144 replikátů na každé úrovni ředění. Míry detekce jsou uvedeny v *tabulce 2*.

Tabulka 2: Stanovení předběžné hodnoty LoD analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Cílová koncentrace [IU/ml]	Cílová koncentrace [\log_{10} IU/ml]	PLAZMA		
		Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
35	1,54	144	139	96,5%
30	1,48	144	140	97,2%
25	1,40	143	133	93,0%
10	1,00	144	97	67,4%
5	0,70	143	75	52,4%
NEG	---	144	0	0,0%

Hodnota LoD analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 v plazmě pomocí 1. mezinárodního standardu WHO pro EBV byla stanovena jako 29,3 IU/ml ($1,47 \log_{10}$ IU/ml) s 95% intervalem spolehlivosti (Confidence Interval, CI) 24,4–37,1 IU/ml, ($1,39$ – $1,57 \log_{10}$ IU/ml) [obrázek 1]. Tato hodnota LoD byla následně potvrzena analýzou míry shody, která je uvedena v *tabulce 3*.



Obrázek 1: Probitová analýza použitá ke stanovení LoD analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 u vzorků plazmy

Tabulka 3: Potvrzení hodnoty LoD analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Soustava	Cílová koncentrace [IU/ml]	Cílová koncentrace [log ₁₀ IU/ml]	Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
N96	29,3	1,47	96	94	97,9%
N288			96	92	95,8%
Všechny			192	186	96,9%

LoD pro genotyp 2 (GT2) viru EBV byla potvrzena s hodnotou 29,3 IU/ml [1,47 log₁₀ IU/ml], jak bylo stanoveno analýzou míry shody.

Na základě výsledku obou studií byla hodnota LoD analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 stanovena jako 29,3 IU/ml [1,47 log₁₀ IU/ml].

ANALYTICKÁ CITLIVOST – dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

LLOQ je definována nejnižší cílová hladina, při které je dosaženo detekce > 95 % A celkové analytické chyby (Total Analytical Error, TAE) ≤ 1,0. Za účelem stanovení LLoQ byla pro každou z cílových hladin EBV, které jako součást výpočtu LoD vykazovaly > 95% detekce, spočítána chyba 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.

Zpracované výsledky pro 5 úrovní vzorků plazmy 1. mezinárodního standardu WHO pro r EBV, použité při stanovování hodnoty LLoQ, jsou uvedeny v *tabulce 4*. Na základě těchto údajů a dříve stanovené LoD, byla LLoQ stanovena jako 30,0 IU/ml (1,48 log₁₀ IU/ml) a následně potvrzena pro genotyp 2 (GT2) viru EBV.

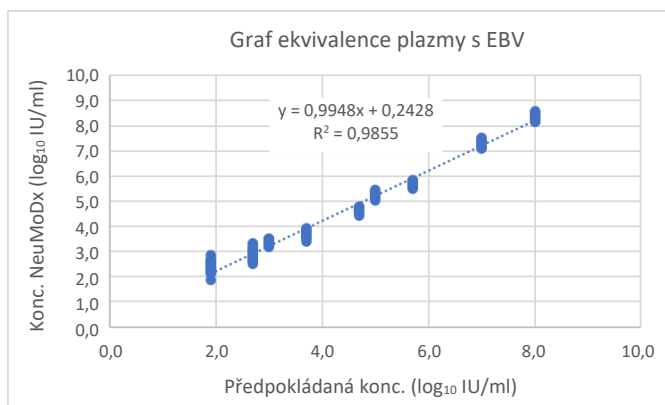
Tabulka 4: LLoQ analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, s odchylkou a chybou TAE

Cílová konc. [IU/ml]	Cílová konc. [log ₁₀ IU/ml]	Plazma				
		Průměrná konc. [log ₁₀ IU/ml]	Míra detekce	SD	Odchylka	TAE
35	1,54	2,05	96,5%	0,23	0,50	0,96
30	1,48	1,97	97,2%	0,24	0,49	0,98
25	1,40	1,93	93,0%	0,24	0,53	1,02
10	1,00	1,96	67,4%	0,31	0,96	1,59
5	0,70	1,83	52,4%	0,27	1,13	1,68

Na základě výsledků těchto studií byla hodnota LoD analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 stanovena na 29,3 IU/ml (1,47 log₁₀ IU/ml) a hodnota LLoQ byla stanovena na 30,0 IU/ml [1,48 log₁₀ IU/ml].

Linearita a určení horní meze stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearita a horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 u plazmy byly stanoveny přípravou série ředění za použití zapouzdřeného cílového EBV NeuMoDx a kromě 1. mezinárodního standardu WHO pro EBV za použití také kultury ATCC EBV (ATCC, Manassas, VA). Dohledatelnost k 1. mezinárodnímu standardu WHO pro EBV byla zajištěna pro všechny sekundární standardy před testováním. Ve smíšené EBV negativní plazmě byl připraven 10prvkový panel za účelem vytvořit panel, který by pokryl rozsah koncentrací 1,48–8,0 log₁₀ IU/ml. Hodnota ULoQ analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 byla stanovena jako 8,0 log₁₀ IU/ml. K hodnocení linearity standardní křivky byl připraven konfirmační panel a koncentrace analýzy EBV ohlášené soustavou NeuMoDx System ve srovnání s očekávanými hodnotami jsou uvedeny na *obrázku 2*.

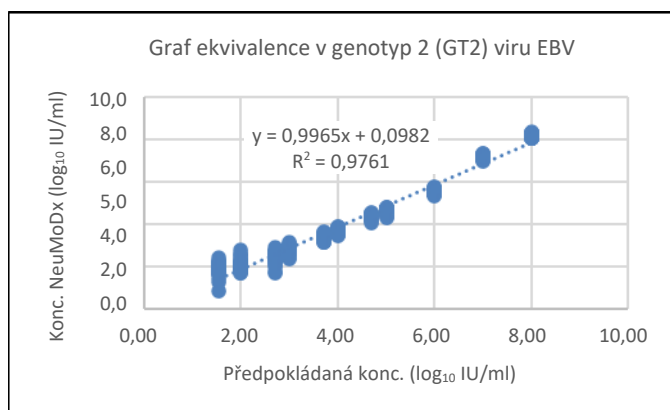

Obrázek 2: Linearita analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Linearita genotypu 2 (GT2) viru EBV

Linearita analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pro genotyp 2 (GT2) viru EBV byla charakterizována testováním jedenácti různých koncentrací GT2 viru EBV s potvrzenou návazností na 1. mezinárodní standard WHO pro EBV, připravených ve směsné plazmě negativní na EBV. Studie byla provedena testováním 36 replikátů v 11 koncentracích ve 2 soustavách NeuMoDx System a se 3 šaržemi testovacích proužků EBV Quant Test Strip 2.0. Linearita genotypu 2 (GT2) viru EBV je znázorněna v *tabulce 5* a *obrázku 3*.

Tabulka 5: Linearita analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pro genotyp 2 viru EBV

Genotyp	Rovnice linearity y = stanovitelnost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 x = očekávaná stanovitelnost	R ²
GT2	$y = 0,9965x - 0,0982$	0,9761



Obrázek 3: Linearita analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pro genotyp 2 viru EBV

Analytická specifita – zkřížená reaktivita

Analytická specifita byla prokázána screeningem zkřížené reaktivity 36 organismů, které se mohou nacházet ve vzorcích krve/plazmy, a také druhů, které se viru EBV fylogeneticky podobají. Organismy byly připraveny ve směsích po 5 až 6 organismech při vysoké koncentraci. Testované organismy jsou uvedeny v *tabulce 6*. U žádného z testovaných organismů nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita, což potvrzuje 100% analytickou specifitu analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Tabulka 6: Patogeny použité k prokázání analytické specifity

Necílové organismy					
Polyomavirus BK	Adenovirus typu 5	Herpes simplex virus 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Cytomegalovirus	Virus hepatitidy C	Herpes simplex virus 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Lidský herpesvirus 6	Parvovirus B19	Varicella zoster virus	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Lidský herpesvirus 7	JC virus	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Lidský herpesvirus 8	Lidský papilomavirus 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus hepatitidy B	Lidský papilomavirus 18	SV 40	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>

Analytická specifita – interferující látky, komezálové

Interference u analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 byla vyhodnocena za přítomnosti necílových organismů, a to za použití stejných směsí organismů, jaké byly připraveny pro testování zkřížené reaktivity, uvedených výše v *tabulce 6*. Plazma negativní na EBV byla obohacena o organismy smíšené do skupin po 4–7; tyto směsi byly potom obohaceny o cílový virus EBV při koncentraci 90 IU/ml [1,95 log₁₀ IU/ml]. Jak naznačila minimální odchylka stanovitelnosti z kontrolních vzorků, které neobsahovaly žádný interferující přípravek, nebyla za přítomnosti těchto organismů pozorována žádná významná interference.

Analytická specifčnost – interferující látky, endogenní a exogenní látky

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 byla hodnocena za přítomnosti typických exogenních a endogenních interferujících látek, které se v klinických vzorcích plazmy s EBV objevily. Mezi tyto látky patřily neobvykle vysoké hladiny krevních složek a také běžné antivirové léky a imunosupresiva, která jsou zařazena do *tabulky 7*. Každá látka byla přidána k vyšetřené krevní lidské plazmě negativní na EBV, obohacené o 90 IU/ml [$1,95 \log_{10}$ IU/ml] EBV a u vzorků byla zkoumána interference srovnáním uvedené koncentrace s pozitivní kontrolou. Kromě toho byla na možnou interferenci testována i plazma ve stavu při běžném onemocnění souvisejícím s infekcí virem EBV. Průměrná koncentrace a odchylka u všech testovaných látek ve srovnání s kontrolními vzorky uměle obohacenými o stejnou hladinu viru EBV jsou uvedeny v *tabulce 8*. Žádná z exogenních a endogenních látek specifčnost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 neovlivnila.

Tabulka 7: Testování interference – exogenní přípravky (klasifikace léků)

Směs	Název léku	Klasifikace	Směs	Název léku	Klasifikace
Směs 1	Azathioprin	Imunosupresivum	Směs 4	Trimethoprim	Antibiotikum
	Cyklosporin	Imunosupresivum		Vankomycin	Antibiotikum
	Foscarnet	Antivirotikum (herpetické viry)		Takrolimus	Imunosupresivum
	Ganciclovir	Antivirotikum (EBV)		Everolimus	Imunosupresivum
	Valganciklovir hydrochlorid	Antivirotikum (EBV)		Klavulanát draselný	Antibiotikum
Směs 2	Prednison	Kortikosteroid/ imunosupresivum	Směs 5	Famotidin	Blokátor histaminových receptorů
	Cidofovir	Antivirotikum (EBV)		Sulfamethoxazol	Antibiotikum
	Cefotetan	Antibiotikum (širokospektré)		Valaciclovir	Antivirotikum (herpetické viry)
	Cefotaxime	Antibiotikum (širokospektré)		Letermovir	Antivirotikum (EBV)
	Flukonazol	Protiplísňový lék		Ticarcillin disodium	Antibiotikum
Směs 3	Mycophenolate mofetil	Imunosupresivum	Leflunomid	Imunosupresivum	
	Mycophenolate sodium	Imunosupresivum			
	Piperacillin	Antibiotikum			
	Sirolimus/Rapamycin	Imunosupresivum			
	Tazobactam	Modifikované antibiotikum			

Tabulka 8: Testování interference – endogenní a exogenní přípravky

Endogenní + stav onemocnění	Průměrná konc.	Odchylka
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Hemoglobin	2,19	0,32
Triglyceridy	1,90	0,02
Bilirubin	2,12	0,24
Albumin	1,95	0,07
Systémový lupus erythematosus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	2,08	0,20
Antinukleární protilátka (Antinuclear Antibody, ANA)	2,36	0,48
Revmatoidní artritida (Rheumatoid Arthritis, RA)	1,89	0,01
Pozitivní kontrola	1,88	N/A
Exogenní (medikace)	Průměrná konc.	Odchylka
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Směs 1: Azathioprin, Cyklosporin, Foscarnet, Ganciclovir, Valganciklovir hydrochlorid	2,19	0,09
Směs 2: Prednison, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxime, Flukonazol	2,11	0,01
Směs 3: Mycophenolate mofetil, Mycophenolate sodium, Piperacillin, Sirolimus/Rapamycin, Tazobactam	2,16	0,06
Směs 4: Trimethoprim, Vankomycin, Takrolimus, Everolimus, Klavulanát draselný	2,24	0,14
Směs 5: Famotidin, Sulfamethoxazol, Letermovir, Valaciclovir, Ticarcillin disodium, Leflunomid	2,26	0,16
Pozitivní kontrola	2,10	N/A

Vnitrolaboratorní preciznost

Preciznost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 byla stanovena testováním 3 replikátů 6prvkového panelu se vzorky EBV připravených s pozitivní kontrolou EBV NeuMoDx a kulturou EBV (ATCC, Manassas, VA) dvakrát denně za použití dvou soustav NeuMoDx 288 System a dvakrát za použití soustav NeuMoDx 96 System po dobu 12 dnů. Preciznost byla charakterizována v rámci jednoho cyklu, jednoho dne a jedné soustavy a celková směrodatná odchylka byla stanovena jako $\leq 0,18 \log_{10}$ IU/ml. Napříč soustavami, dny nebo cykly byla prokázána vynikající preciznost, jak je uvedeno v *tabulce 9*. Preciznost mezi pracovníky obsluhy charakterizována nebyla, jelikož obsluha při zpracování vzorků za použití soustavy NeuMoDx System nehraje žádnou významnou roli.

Tabulka 9: Vnitrolaborní preciznost – analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 na soustavách NeuMoDx System

Konc. cílového EBV (Log ₁₀ IU/ml)	Průměrná konc. EBV (Log ₁₀ IU/ml)	SD v rámci soustavy	SD v rámci dne	SD v rámci cyklu	Celková SD (v rámci laboratoře)
7,70	7,82	0,10	0,08	0,08	0,11
6,00	6,07	0,12	0,11	0,11	0,13
5,00	4,75	0,13	0,12	0,11	0,13
4,00	3,78	0,13	0,11	0,11	0,14
3,00	2,93	0,15	0,14	0,13	0,16
1,95	2,19	0,17	0,16	0,16	0,18

Reprodukovatelnost mezi šaržemi

Reprodukovatelnost mezi šaržemi u analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 byla stanovena vyhodnocením 3 šarží testovacích proužků NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 jako součásti studie vnitrolaborní preciznosti. K hodnocení účinnosti byl použit 6prvkový panel plazmy pozitivní na EBV (*tabulka 10*). Výsledky získané napříč šaržemi byly analyzovány a jsou prezentovány v *tabulce 10*. Celková maximální odchylka u testovacích proužků NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strip 2.0 byla 0,29 log₁₀ IU/ml a celková maximální SD byla 0,18 log₁₀ IU/ml. Provedený ekvivalent byl prokázán napříč šaržemi, jelikož stanovitelnost všech prvků panelu byla v mezích stanovené tolerance.

Tabulka 10: Reprodukovatelnost mezi šaržemi – analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, testovací proužek

Očekávaná konc. (log ₁₀ IU/ml)	Šarže 1			Šarže 2			Šarže 3		
	Prům. konc. (log ₁₀ IU/ml)	Log konc SD	Abs. odchylka	Prům. konc. (log ₁₀ IU/ml)	Log konc SD	Abs. odchylka	Prům. konc. (log ₁₀ IU/ml)	Log konc SD	Abs. odchylka
7,70	7,82	0,11	0,12	7,84	0,10	0,14	7,79	0,09	0,09
6,00	6,08	0,12	0,08	6,10	0,10	0,10	6,04	0,10	0,04
5,00	4,77	0,13	0,23	4,78	0,13	0,22	4,71	0,10	0,29
4,00	3,80	0,15	0,20	3,81	0,13	0,19	3,74	0,11	0,26
3,00	2,96	0,16	0,04	2,96	0,15	0,04	2,87	0,16	0,13
1,95	2,20	0,18	0,25	2,22	0,18	0,27	2,16	0,16	0,21

Účinnost kontroly zpracování vzorků

Analýza NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 obsahuje kontrolu zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC1), která má ohlásit selhání jakéhokoli kroku zpracování nebo inhibiči ovlivňující výkon analýzy. Za použití analýzy NeuMoDx CMV Quant Assay jako vzoru byla účinnost SPC1 u vzorků plazmy testována za podmínek reprezentativních 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. Vzorky pozitivní na cytomegaloviry (při 3 Log₁₀ IU/ml) a negativní vzorky se musely vypořádat s následujícími podmínkami: přítomností inhibitoru, absencí nedodaného promývacího činidla a absencí propláchnutí. Neúčinnost procesu, která měla na detekci/stanovitelnost virového cíle nepříznivý vliv, se odrazila v účinnosti cílové SPC1, jak ukazuje *tabulka 11*. Ve všech testovaných případech bylo prokázáno, že buď kontrola zpracování vzorků dostatečně monitorovala neúčinnost procesu a přítomnost inhibitorů, nebo nepříznivý vliv předpokládané neúčinnosti procesu na detekci SPC1 ani na detekci a stanovitelnost virového cíle, nebyl významný. Tudíž efektivní monitoring účinnosti analýzy na soustavě NeuMoDx System kontrolou SPC1 byl s úspěchem prokázán.

Tabulka 11: Účinnost kontroly zpracování vzorků u virové DNA v plazmě*

Testovaná selhání kroků zpracování	Stav amplifikace kontroly zpracování vzorků 1	Cílový CMV Stav amplifikace	Výsledek analýzy
Presence of Inhibitor (Přítomnost inhibitoru)	Not Amplified (Neamplifikováno)	Not Amplified (Neamplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Delivered (Promytí nebylo dodáno)	Not Amplified (Neamplifikováno)	Not Amplified (Neamplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Blowout (Bez pročištění)	Amplified (Amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	Positive (Pozitivní) se stanovitelností do 0,3 log ₁₀ IU/ml kontroly

*K hodnocení účinnosti kontroly zpracování vzorků byl jako modelová soustava použit cytomegalovirus (CMV) ve vzorcích plazmy.

Křížová kontaminace

Míra křížové kontaminace u vzorků plazmy byla stanovena zpracováním vzorků, kde se střídaly vzorky vysoce pozitivní a negativní vzorky EBV. Bylo provedeno pět sad takového mozaikového testu celkem se 60 replikátů plazmy negativní na EBV a 60 replikátů EBV plazmy obohacené při 6,0 Log₁₀ IU/ml na obou soustavách NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System. V obou typech soustav bylo všech 120 replikátů negativního vzorku hlášeno jako negativních, což je důkazem, že během zpracování vzorku plazmy na soustavách NeuMoDx System k žádné křížové kontaminaci nedošlo.

Ekvivalence matrice vzorků

Bylo provedeno testování k prokázání ekvivalence mezi čerstvými a zmrazenými vzorky plazmy za použití podobného viru přenášeného krví, CMV, jako vzoru. Čerstvé vzorky byly uchovávány při 4 °C, dokud nebyly obohaceny třemi hladinami CMV a otestovány na ekvivalenci. Vzorky byly zmrazeny minimálně na 24 hodin při teplotě -20 °C. Po této době skladování ve zmrazeném stavu byly vzorky rozmrazeny a znovu testovány. Výsledky ze vzorků čerstvé a zmrazené plazmy byly porovnány z hlediska ekvivalence pomocí regresní analýzy. Údaje prokázaly vynikající ekvivalenci mezi vzorky čerstvé a zmrazené plazmy se sklonem 1,0 a velmi nízkou odchylkou (průsečík), jak je uvedeno v *tabulce 12* níže.

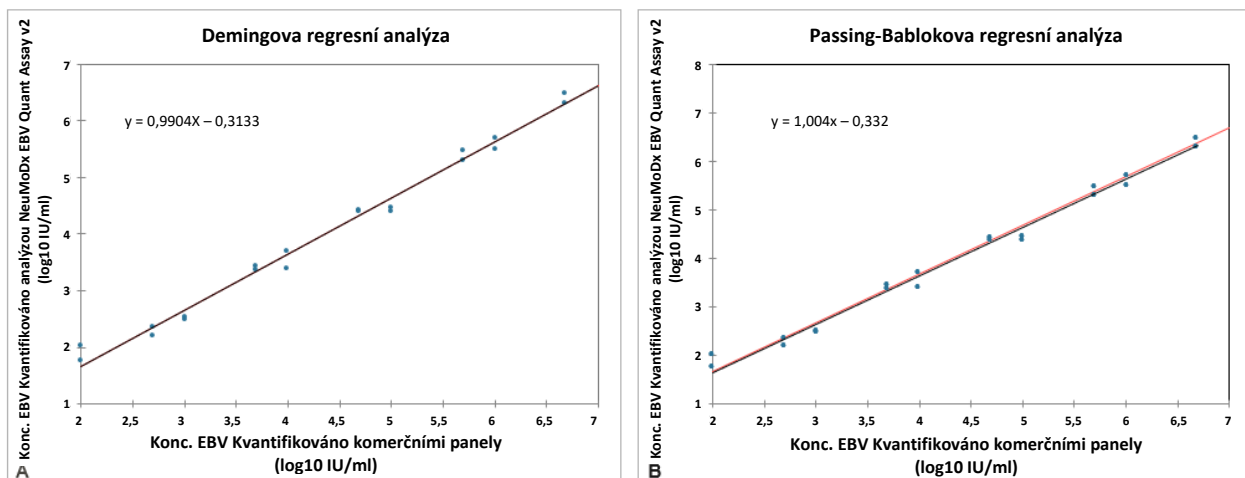
Tabulka 12: Ekvivalence matrice vzorků

Požadavek na parametry	Čerstvé EDTA vzorky ve srovnání se zmrazenými
Směrnice (0,9-1,1)	1,000
Průsečík < 0,5 log ₁₀ IU/ml	0,020
p-hodnota > 0,05	0,631

Charakterizace kvantitativní účinnosti

Kvantitativní účinnost analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 byla charakterizována zpracováním dvou komerčních verifikačních panelů EBV od společnosti AcroMetrix a Exact Diagnostics (s návazností na 1. mezinárodní standard WHO pro EBV) na soustavách NeuMoDx Molecular System.

Mezi analýzou NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a dvěma komerčními verifikačními panely EBV (*obrázek 4*) bylo buď regresní analýzou podle Deminga (*obrázek 4A*) nebo Passing-Bablokovou metodou (*obrázek 4B*) dosaženo vynikající korelace.



Obrázek 4. Graf ekvivalence mezi verifikačními panely AcroMetrix a Exact Diagnostics a analýzou NeuMoDx EBV Quant Assay.

A. Lineární regresní analýza metodou Deming. B. Lineární regresní analýza metodou Passing-Bablok.

Kvalita regresní metody podle Deminga je znázorněna celkovým koeficientem směrnice 0,990 a průsečíkem (odchylkou) -0,313, což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a verifikačními panely EBV jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou. Lineární metoda podle Passinga-Babloka také podporuje význam korelace mezi výsledky získanými z analýzy NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a verifikačních panelů EBV s celkovým koeficientem směrnice 1,004 a průsečíkem (odchylkou) -0,332. *P-hodnota* analýzy metodou podle Passinga-Babloka byla vypočítána jako 0,988.

Tabulka 13: Shrnutí lineární regresní analýzy metodami Deming a Passing-Bablok

Analýza metodou Deming		Analýza metodou Passing-Bablok	
Průsečík	Koeficient směrnice	Průsečík	Koeficient směrnice
-0,313	0,990	-0,332	1,004
CI 95 % (-0,620, -0,007)	CI 95 % (0,928, 1,053)	CI 95 % (-0,548, -0,116)	CI 95 % (0,950, 1,047)

REFERENCE

1. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
2. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant Direct*. 2016 Jan; 2(1): e48.
3. About Epstein-Barr Virus (EBV).” Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, 28 Sept. 2020, www.cdc.gov/epstein-barr/about-ebv.html
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. 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.

Seracare® je ochranná známka společnosti Seracare Life Sciences, 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

Pouze na lékařský předpis

Pouze na lékařský předpis



Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů



Výrobce



Viz návod k použití



Zdravotnický prostředek pro diagnostiku *in vitro*



Upozornění



Autorizovaný zástupce v Evropském společenství



Nebezpečnost pro zdraví



Katalogové číslo



Značka CE



Číslo šarže



Obsahuje



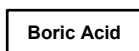
Datum spotřeby



Obsahuje biologický materiál živočišného původu



Omezení teploty



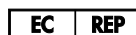
Kyselina boritá



Nepoužívejte opakovaně



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



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

Technická podpora / vigilanční hlášení: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents

