

REF 300300 NeuMoDx™ HCV Quant Test Strip

R only

ATTENZIONE: solo per l'esportazione negli Stati Uniti

IVD Per uso diagnostico *in vitro* con NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular System*Per gli aggiornamenti dei fogli illustrativi, andare su: www.qiagen.com/neumodx-ifu**Per istruzioni dettagliate, fare riferimento al Manuale dell'operatore del NeuMoDx 288 Molecular System; P/N 40600108**Per istruzioni dettagliate fare riferimento al Manuale dell'operatore del NeuMoDx 96 Molecular System; P/N 40600317***USO PREVISTO**

Il NeuMoDx HCV Quant Assay è un test *in vitro* automatizzato di amplificazione dell'acido nucleico per la quantificazione del RNA del virus dell'epatite C (HCV) nei campioni di plasma e siero umani per i genotipi positivi all'anticorpo HCV da 1 a 6 di persone con infezione da HCV. Il NeuMoDx HCV Quant Assay implementato nel NeuMoDx 288 Molecular System e nel NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System) comprende l'estrazione automatizzata dell'RNA per isolare l'acido nucleico target dal campione e dalla la reazione a catena della polimerasi real-time con trascrittasi inversa (RT-PCR) per stabilire le sequenze ad elevata conservazione nel genoma virale dell'epatite C.

Il NeuMoDx HCV Quant Assay è destinato a fornire supporto nella gestione dei pazienti con infezioni da HCV. I risultati del NeuMoDx HCV Quant Assay devono essere interpretati nel contesto di tutti i risultati clinici e di laboratorio pertinenti. Il NeuMoDx HCV Quant Assay non è destinato a essere utilizzato come test di screening per il sangue o i suoi derivati o per diagnosticare lo stato clinico dell'infezione da HCV.

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Per la preparazione del plasma è possibile utilizzare sangue umano intero raccolto in provette sterili contenenti acido etilendiamminicotetratecico (EDTA) o acido citrato destrosio (ACD) come agenti anticoagulanti o in provette per la preparazione del plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT), mentre il siero deve essere raccolto nelle provette per la raccolta del siero o nelle provette per la separazione del siero (Serum Separation Tubes, SST). Per la preparazione del test, il plasma o il siero in una provetta per campioni secondaria o il sangue frazionato in una provetta per campioni primaria compatibile con il NeuMoDx System viene caricato sul NeuMoDx System utilizzando un portaprovette per campioni. Per ciascun campione, un'aliquota di campione di plasma/siero viene mescolata con NeuMoDx Lysis Buffer 3 e NeuMoDx System esegue automaticamente tutti i passaggi richiesti per estrarre l'acido nucleico target, preparare l'RNA isolato per l'amplificazione della PCR real-time e per amplificare e individuare i prodotti dell'amplificazione (se presenti). Il NeuMoDx HCV Quant Assay stabilisce due regioni ad elevata conservazione del genoma HCV per aumentare l'efficacia dell'esame. Il NeuMoDx HCV Quant Assay include anche un controllo di elaborazione dei campioni del RNA (Sample Process Control, SPC2) per aiutare a monitorare la presenza di potenziali sostanze inibitorie, nonché gli errori relativi al NeuMoDx System o ai reagenti, che si possono verificare durante i processi di estrazione e di amplificazione.

Il virus HCV è un virus a RNA a singolo filamento positivo capace di causare infezione sia acuta sia cronica.¹ Attualmente non esiste alcun vaccino per l'epatite C. Mentre l'infezione acuta è generalmente asintomatica e molto raramente associata a patologie potenzialmente letali, più della metà di coloro che hanno sviluppato l'HCV potrebbero sviluppare un'infezione cronica. Per coloro che hanno sviluppato l'infezione HCV cronica, il rischio di sviluppare cirrosi epatica entro 20 anni si attesta tra il 15% e il 30%. Complessivamente, si sospetta che circa 71 milioni di persone abbiano un'infezione HCV cronica, delle quali un numero importante si prevede che svilupperà cirrosi epatica o tumore epatico.²⁻⁴ Poiché l'HCV è un virus a trasmissione ematica, la sua trasmissione è avvenuta principalmente attraverso il sangue e i suoi derivati. L'adozione su larga scala di test di screening ematico ha permesso di ridurre drasticamente l'incidenza delle infezioni tramite donazioni di sangue.¹

La rilevazione di anticorpi anti HCV non distingue tra infezioni attive e infezioni eradicate. Pertanto, gli algoritmi per i test HCV di laboratorio richiedono la diagnosi di infezione HCV attiva in individui positivi agli anticorpi mediante la rilevazione dell'RNA dell'HCV nel plasma o nel siero, prima di iniziare la terapia (se necessaria). La quantificazione dell'RNA dell'HCV (carica virale) ora viene utilizzata di routine nella definizione e nel monitoraggio di un riuscito trattamento dell'HCV.

Le linee guida attuali per la gestione e il trattamento delle infezioni HCV raccomandano l'esecuzione di test quantitativi dell'RNA HCV prima di iniziare una terapia antivirale, al fine di stabilire la linea basale e a 12 o più settimane oltre il termine del trattamento. Talvolta potrebbero essere raccomandati ulteriori punti tempo. L'obiettivo della terapia dell'HCV è una risposta virologica sostenuta (Sustained Virologic Response, SVR) ed è definito come RNA dell'HCV non rilevabile (con un esame con limite di rilevazione < 25 IU/mL) dopo la terapia.⁵⁻⁷ Recenti linee guida dell'Associazione americana per lo studio delle patologie epatiche (American Association for the Study of Liver Diseases) suggeriscono di testare l'RNA dell'HCV non soltanto alla linea basale, ma anche a intervalli periodici durante il trattamento (ad es. 4 settimane) e a 12 settimane dal completamento del trattamento. Per identificare un'infezione HCV attiva vengono utilizzati i test per la rilevazione dell'RNA dell'HCV, combinati con i test sierologici.⁶

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il NeuMoDx HCV Quant Assay combina l'estrazione automatizzata, l'amplificazione e la rilevazione dell'RNA tramite RT-PCR real-time. I campioni di sangue intero vengono raccolti in provette con EDTA, ACD o PPT per la preparazione del plasma e/o nelle provette SST per la preparazione del siero. Il campione di sangue principale (frazionato) o un'aliquota di plasma/siero in una provetta per campioni secondaria compatibile viene etichettato con codice a barre e collocata sul NeuMoDx System. Il NeuMoDx System aspira automaticamente un'aliquota del plasma/siero per miscelarlo con NeuMoDx Lysis Buffer 3 e gli agenti contenuti nella NeuMoDx Extraction Plate per iniziare l'elaborazione. Il NeuMoDx System automatizza e integra l'estrazione e la concentrazione dell'RNA, la preparazione dei reagenti, l'amplificazione e la rilevazione dell'acido nucleico delle sequenze target mediante RT-PCR real-time. Il controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control, SPC2) incluso consente di monitorare la presenza di potenziali sostanze inibitorie nonché gli errori di sistema, processo o reagente. Una volta caricato il campione sul NeuMoDx System non è necessario alcun intervento dell'operatore.

Il NeuMoDx System utilizza una combinazione di calore, enzima litico e reagenti di estrazione per eseguire automaticamente la lisi, l'estrazione dell'RNA e l'eliminazione degli inibitori. Gli acidi nucleici rilasciati vengono catturati da microsferi paramagnetiche. Le particelle, con l'acido nucleico legato, sono caricate nella NeuMoDx Cartridge, dove gli elementi non legati vengono rimossi tramite lavaggio con NeuMoDx Wash Reagent. L'RNA legato viene quindi eluito utilizzando il NeuMoDx Release Reagent. Il NeuMoDx System utilizza quindi l'RNA eluito per reidratarne i reagenti di amplificazione di proprietà NeuDry™ contenenti tutti gli elementi necessari per l'amplificazione dei target di HCV e SPC2. Ciò consente l'amplificazione e la rilevazione simultanee dei target e delle sequenze di RNA di controllo. Dopo la ricostituzione dei reagenti RT-PCR essiccati, il NeuMoDx System dispensa la miscela pronta per RT-PCR in una camera PCR (per campioni) della NeuMoDx Cartridge. Trascrittasi inversa, amplificazione e rilevazione delle sequenze di controllo e target (se presenti) si verificano nella camera PCR. La NeuMoDx Cartridge è progettata per contenere l'amplicone dopo la PCR, eliminando in pratica il rischio della contaminazione post-amplificazione.

I target amplificati vengono rilevati in tempo reale utilizzando la chimica delle sonde a idrolisi (comunemente nota come chimica TaqMan®) con molecole di sonde oligonucleotidiche fluorogeniche specifiche per gli ampliconi dei rispettivi target. Le sonde TaqMan sono costituite da un fluoroforo legato covalentemente all'estremità 5' della sonda oligonucleotidica e da un quencher all'estremità 3'. Mentre la sonda è intatta, il fluoroforo e il quencher sono in prossimità, consentendo alla molecola quencher di sopprimere la fluorescenza emessa dal fluoroforo tramite FRET (Förster Resonance Energy Transfer).

Le sonde TaqMan sono progettate in modo tale da eseguire l'annealing all'interno di una regione del DNA amplificata da un set specifico di primer. Quando la Taq DNA polimerasi estende il primer e sintetizza il nuovo filamento, l'attività di esonucleasi 5'-3' della Taq DNA polimerasi degrada la sonda che ha eseguito l'annealing allo stampo. La degradazione della sonda rilascia il fluoroforo e spezza la prossimità con il quencher, superando quindi l'effetto di smorzamento dovuto al FRET e consentendo la rilevazione del fluoroforo. Il segnale di fluorescenza risultante rilevato nel termociclatore del NeuMoDx System per RT-PCR quantitativa è direttamente proporzionale al fluoroforo rilasciato e può essere correlato alla quantità di target presente.

Una sonda TaqMan contrassegnata da un fluoroforo (Eccitazione: 490 nm ed Emissione: 521 nm) all'estremità 5' e un quencher scuro all'estremità 3' vengono utilizzati per rilevare l'RNA dell'HCV. Per il rilevamento dell'SPC2, la sonda TaqMan è contrassegnata con un colorante fluorescente alternativo (Eccitazione: 535 nm ed Emissione: 556 nm) all'estremità 5' e un quencher scuro all'estremità 3'. Il software del NeuMoDx System monitora il segnale fluorescente emesso dalle sonde TaqMan alla fine di ogni ciclo di amplificazione. Quando l'amplificazione è completa, il software del NeuMoDx System analizza i dati e riporta un risultato finale POSITIVE (POSITIVO)/NEGATIVE (NEGATIVO)/INDETERMINATE (INDETERMINATO)/UNRESOLVED (IRRISOLTO)/NO RESULT (NESSUN RISULTATO). Se un risultato è positivo e la concentrazione calcolata rientra nei limiti della quantificazione, il software del NeuMoDx System fornisce anche un valore quantitativo associato al campione.

REAGENTI/MATERIALI DI CONSUMO

Materiali in dotazione

REF	Contenuto	Unità per confezione	Test per unità	Test per confezione
300300	NeuMoDx HCV Quant Test Strip <i>Reagenti RT-PCR essiccati contenenti sonde e primer TaqMan specifici per HCV e SPC2</i>	6	16	96

Materiali necessari ma non in dotazione (disponibili separatamente da NeuMoDx)

REF	Contenuto
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Particelle paramagnetiche, enzima litico e controlli di elaborazione dei campioni essiccati</i>
800200 o 800202	NeuMoDx HCV Calibrator <i>Set monouso di calibratori HCV alto e basso per stabilire la validità della curva di calibrazione</i>
900201 o 900202	NeuMoDx HCV External Control <i>Set monouso di controlli HCV positivi e negativi</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Puntali Hamilton CO-RE/CO-RE II (300 µL) con filtri
235905	Puntali Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µL) con filtri

Strumentazione richiesta

NeuMoDx 288 Molecular System [RIF 500100] o NeuMoDx 96 Molecular System [RIF 500200]



AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- La NeuMoDx HCV Quant Test Strip è per uso diagnostico *in vitro* solo con i NeuMoDx System.
- Non utilizzare i reagenti o i materiali di consumo dopo la data di scadenza indicata.
- Non utilizzare alcun reagente se il sigillo di sicurezza è rotto o se la confezione risulta danneggiata all'arrivo.
- Non utilizzare i materiali di consumo o i reagenti se il sacchetto di protezione appare aperto o rotto all'arrivo.
- Prima di poter generare i risultati dei test per i campioni clinici, è necessario avere a disposizione una calibrazione di test valida (generata elaborando i calibratori alto e basso dai NeuMoDx HCV Calibrator).
- È necessario elaborare i NeuMoDx HCV External Control ogni 24 ore per tutta la fase di test con il NeuMoDx HCV Quant Assay.
- Il volume minimo del campione dipende dalla dimensione della provetta, dal portaprovette per campioni e dall'elaborazione del volume del campione come definito di seguito. Un volume inferiore al minimo specificato può generare un errore "Quantity Not Sufficient" (Quantità non sufficiente).
- L'uso di campioni conservati a temperature non corrette oppure oltre i tempi di stoccaggio specificati può produrre risultati non validi o errati.
- Evitare la contaminazione microbica e da ribonucleasi (RNasi) di tutti i reagenti e i materiali di consumo in ogni momento. In caso di trasferimento del campione in provette secondarie, si raccomanda l'uso di pipette di trasferimento monouso sterili prive di RNasi. Utilizzare una nuova pipetta per ciascun campione.
- Per evitare la contaminazione, non manipolare o spezzare nessuna NeuMoDx Cartridge dopo l'amplificazione. In nessun caso recuperare le NeuMoDx Cartridge dal contenitore dei materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 288 Molecular System) o dal recipiente materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 96 Molecular System). La cartuccia NeuMoDx Cartridge è stata progettata in modo da prevenire la contaminazione.
- Nei casi in cui dal laboratorio siano condotti anche test per PCR in provetta aperta, è necessario assicurarsi che NeuMoDx HCV Quant Test Strip, i materiali di consumo e i reagenti aggiuntivi necessari per i test, i dispositivi di protezione individuale come guanti e camici da laboratorio e il NeuMoDx System non siano contaminati.
- Durante la manipolazione dei reagenti e dei materiali di consumo NeuMoDx, è necessario indossare guanti in nitrile, puliti e privi di polvere. Prestare attenzione a non toccare la superficie superiore della NeuMoDx Cartridge, la superficie della pellicola sigillante della NeuMoDx HCV Quant Test Strip e della NeuMoDx Extraction Plate o la superficie superiore del NeuMoDx Lysis Buffer 3; i materiali di consumo e i reagenti devono essere maneggiati toccando solo le superfici laterali.
- Per ogni reagente vengono fornite le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) (se applicabile) su www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.
- Non pipettare con la bocca. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti.
- Maneggiare sempre i campioni come se fossero infettivi e in conformità con procedure di laboratorio sicure, come quelle descritte in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁸ e nel Documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).⁹
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto in conformità alle normative nazionali, federali, provinciali, regionali e locali.
- Non riutilizzare.



STOCCAGGIO, MANIPOLAZIONE E STABILITÀ DEL PRODOTTO

- Le NeuMoDx HCV Quant Test Strip sono stabili nell'imballaggio primario fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del prodotto, se conservate a una temperatura compresa tra 4 e 28 °C.
- Non utilizzare i materiali di consumo e i reagenti dopo la data di scadenza indicata.
- Non utilizzare alcun prodotto di test se la confezione primaria o quella secondaria è stata visivamente compromessa.
- Non ricaricare alcun prodotto di test che sia stato caricato in precedenza su un altro NeuMoDx System.
- Una volta caricata, la NeuMoDx HCV Quant Test Strip può restare a bordo del NeuMoDx System fino a 14 giorni. Il periodo di validità residuo delle strisce reattive caricate è tracciato dal software e segnalato all'utente in tempo reale. La rimozione di una striscia reattiva utilizzata oltre il periodo consentito sarà richiesta dal sistema.

PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

1. Trattare tutti i campioni, i calibratori e i controlli come se fossero potenziali mezzi di trasmissione di agenti infettivi.
2. Non congelare sangue intero né altri campioni conservati in provette primarie.
3. Per preparare i campioni di plasma, è necessario raccogliere il sangue intero in provette sterili utilizzando EDTA o ACD come anticoagulante o in provette per la preparazione del plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT). Seguire le istruzioni del produttore per la preparazione e la conservazione di provette per la raccolta di campioni.
4. Per preparare i campioni di siero, è necessario raccogliere il sangue intero nelle provette per siero o SST. Seguire le istruzioni del produttore per la preparazione e la conservazione di provette per la raccolta di campioni.

5. I campioni possono essere testati in provette per la raccolta primarie o in provette per campioni secondarie. Provette consigliate per il test con provette primarie:
 - a. Campioni di plasma: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD n. 368589) o BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD n. 362799).
 - b. Campioni di siero: BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD n. 367820) o BD Vacutainer SST™ Tube (BD n. 367988).
6. I campioni preparati possono essere conservati sul NeuMoDx System per un massimo di 8 ore prima dell'elaborazione. Se è necessario un tempo di conservazione maggiore, si raccomanda di mettere i campioni in frigorifero o di congelarli in aliquote secondarie.
7. I campioni preparati devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C per non più di 7 giorni prima dell'analisi e per un massimo di 8 ore a temperatura ambiente.
8. I campioni preparati nelle provette secondarie possono essere conservati a ≤ -20 °C per un massimo di 24 settimane prima dell'elaborazione; i campioni congelati non devono essere sottoposti a più di (2) cicli di congelamento/scongelo prima dell'uso.
 - a. I campioni di plasma congelati e sottoposti a un (1) ciclo di congelamento/scongelo possono essere conservati a bordo del sistema per ulteriori 8 ore.
 - b. I campioni di plasma congelati e sottoposti a due (2) cicli di congelamento/sbrinamento non devono essere conservati a bordo del sistema per più di 4 ore.
 - c. I campioni di siero congelati e sottoposti a uno (1) o due (2) ciclo/i di congelamento/sbrinamento saranno testati subito dopo lo scongelamento.
 - d. Se i campioni vengono congelati, farli scongelare completamente a temperatura ambiente (15-30 °C); agitare con movimenti rotatori per ottenere un campione distribuito uniformemente.
 - e. Il congelamento del plasma/siero in provette di raccolta primarie non è consigliato.
9. Se i campioni vengono spediti, devono essere imballati ed etichettati in conformità alle normative locali e/o internazionali applicabili.
10. Etichettare i campioni in modo chiaro e indicare che i campioni sono per analisi dell'HCV.
11. Procedere con la sezione *Preparazione del test*.

Il processo complessivo per l'implementazione del NeuMoDx HCV Quant Assay è riepilogato nella *Figura 1* seguente.

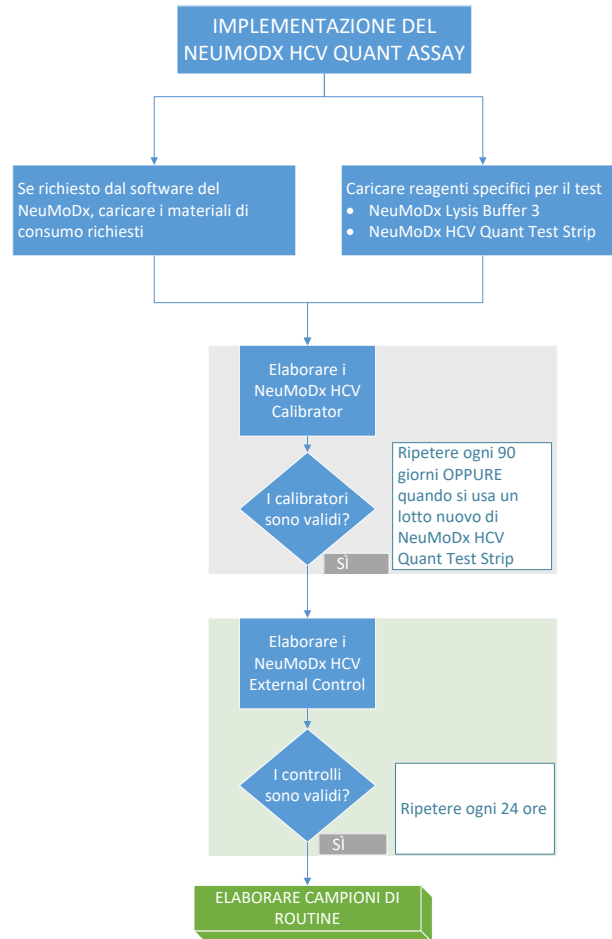


Figura 1: Flusso di lavoro di implementazione del NeuMoDx HCV Quant Assay

ISTRUZIONI PER L'USO

Preparazione del test

Il NeuMoDx HCV Quant Assay può essere eseguito direttamente dalle provette di raccolta primaria del sangue o dalle aliquote di campione nelle provette secondarie. L'elaborazione può essere eseguita utilizzando uno dei due flussi di lavoro di elaborazione dei volumi di campione, da 550 μ L o da 200 μ L.

1. Applicare l'etichetta con codice a barre del campione su una provetta per campioni compatibile con NeuMoDx System. La provetta di raccolta primaria del sangue deve essere etichettata e collocata direttamente in un portaprovette per campioni da 32 provette dopo la centrifugazione, come indicato dal produttore. In alternativa, è possibile trasferire un'aliquota del plasma in una provetta secondaria, per l'elaborazione sul NeuMoDx System.
2. Se il test del campione viene eseguito nella provetta di raccolta primaria, collocare la provetta con codice a barre in un portaprovette per campioni e accertarsi che il tappo venga rimosso prima del caricamento sul NeuMoDx System. Di seguito sono definiti i volumi minimi **al di sopra** dello strato leucocitario e saranno rispettati se i campioni vengono raccolti ed elaborati in base alle istruzioni del produttore delle provette. Per i campioni raccolti in modo non corretto non vengono garantite le prestazioni.

Tipo provetta	Volume minimo di campione richiesto	
	Flusso di lavoro da 550 µL	Flusso di lavoro da 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/Serum – 4,0 mL	1050 µL	700 µL
K ₂ EDTA/Serum – 6,0 mL	1250 µL	900 µL
K ₂ EDTA/Serum – 10,0 mL	1600 µL	1250 µL

3. Se si utilizza una provetta secondaria:
 - a. Agitare delicatamente il campione mediante movimenti rotatori per ottenere una distribuzione uniforme
 - b. Se si utilizza una pipetta di trasferimento nuova per ogni campione, trasferire un'aliquota del plasma o del siero nella provetta per campioni con codice a barre compatibile con il NeuMoDx System secondo i volumi definiti di seguito:

Portaprovette per campioni	Dimensioni provetta	Volume minimo di campione richiesto	
		Flusso di lavoro da 550 µL	Flusso di lavoro da 200 µL
32-Tube Specimen Tube Carrier (Portaprovette per campioni da 32 provette)	Diametro 11–14 mm per un'altezza di 60–120 mm	700 µL	400 µL
24-Tube Specimen Tube Carrier (Portaprovette per campioni da 24 provette)	Diametro 14,5-18 mm per un'altezza di 60–120 mm	1100 µL	800 µL
Low Volume Specimen Tube Carrier (Portaprovette per campioni a volume ridotto)	Provetta per microcentrifuga a fondo conico da 1,5 mL	650 µL	300 µL

- c. Occorre fare attenzione a non trasferire coaguli dal campione alla provetta per campioni.

Funzionamento del NeuMoDx System

Per istruzioni dettagliate, fare riferimento ai Manuali dell'operatore del NeuMoDx 288 e del 96 Molecular System (P/N 40600108 e 40600317)

1. Caricare l'ordine di test sul NeuMoDx System in base al volume dei campioni e al tipo di provetta per campioni desiderati.
 - Se si definisce il tipo di campione come "**Plasma**" o "**Serum**" (Siero) il volume di campione testato è di 550 µL
 - Se si definisce il tipo di campione come "**Plasma2**" o "**Serum2**" (Siero2) il volume di campione testato è di 200 µL
 - Se non è definito nell'ordine di test, verrà utilizzato come impostazione predefinita il tipo di campione **Plasma** in una **Secondary Tube** (Provetta secondaria).
2. Inserire una o più NeuMoDx HCV Quant Test Strip in uno o più supporti per NeuMoDx System Test Strip e usare il touchscreen per caricare tali supporti nel NeuMoDx System.
3. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, aggiungere i materiali di consumo necessari ai supporti dei materiali di consumo del NeuMoDx System e utilizzare il touchscreen per caricare i supporti nel NeuMoDx System.
4. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, sostituire NeuMoDx Wash Reagent e NeuMoDx Release Reagent, svuotare il contenitore dei rifiuti di adescamento, dei materiali di scarto a rischio biologico (solo NeuMoDx 288 Molecular System), il recipiente dei puntali di scarto (solo NeuMoDx 96 Molecular System) o il recipiente dei materiali di scarto a rischio biologico (solo NeuMoDx 96 Molecular System), secondo necessità.
5. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, elaborare i NeuMoDx HCV Calibrator e/o i NeuMoDx HCV External Control. È possibile trovare ulteriori informazioni sui calibratori e sui controlli nella sezione *Elaborazione dei risultati*.
6. Caricare le provette per campioni/calibratori/controlli in un portaprovette per campioni standard e assicurarsi che da tutte le provette siano stati rimossi i tappi.
7. Posizionare i portaprovette per campioni sul ripiano del caricatore automatico e utilizzare il touchscreen per caricare i portaprovette nel NeuMoDx System. In tal modo verrà avviata l'elaborazione dei campioni caricati per i test identificati, a condizione che nel sistema sia presente un ordine di test valido.

LIMITAZIONI

1. La NeuMoDx HCV Quant Test Strip può essere utilizzata solo sui NeuMoDx System.
2. Sono state definite le prestazioni della NeuMoDx HCV Quant Test Strip per i campioni di plasma preparati con EDTA/ACD come anticoagulante o i campioni di siero preparati nelle provette del separatore di siero. L'uso della NeuMoDx HCV Quant Test Strip con altre fonti non è stato valutato e le caratteristiche delle prestazioni non sono note per altri tipi di campioni.
3. Le prestazioni della NeuMoDx HCV Quant Test Strip sono state definite per il test con provette primarie utilizzando provette BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube e BD Vacutainer SST Tube.
4. Se i campioni vengono trattati non entro i limiti delle condizioni di conservazione, si può influire negativamente sull'accuratezza quantitativa del NeuMoDx HCV Quant Assay, ma in misura meno probabile sull'aliquota qualitativa del prelievo (positiva/negativa).
5. La conservazione di campioni di siero a bordo del sistema dopo una prolungata conservazione in stato congelato e l'esecuzione di due cicli di congelamento-scongelo senza effettuare test immediati possono influire negativamente sull'accuratezza quantitativa del NeuMoDx HCV Quant Assay.
6. Quando si utilizza un flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL, è stato osservato un piccolo aumento nel limite di rilevazione e nel limite inferiore della quantificazione del NeuMoDx HCV Quant Assay.
7. Il NeuMoDx HCV Quant Assay non deve essere utilizzato con campioni umani eparinizzati.
8. Poiché la rilevazione dell'HCV dipende dal numero di particelle virali di RNA target presenti nel campione, l'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza delle operazioni di prelievo, manipolazione e conservazione dei campioni.
9. I NeuMoDx HCV Calibrator e i NeuMoDx HCV External Control devono essere elaborati secondo le indicazioni contenute nei foglietti illustrativi presenti nella confezione e richiesti dal software del NeuMoDx System prima di elaborare i campioni clinici di routine.
10. Eventuali risultati errati potrebbero essere dovuti al fatto di non aver eseguito correttamente il prelievo, la manipolazione o la conservazione, a errori tecnici o a confusione tra provette per campioni. Inoltre potrebbero verificarsi falsi negativi se il numero di particelle virali nel campione è al di sotto del limite di rilevazione del NeuMoDx HCV Quant Assay.
11. Il NeuMoDx System è destinato a essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato all'uso del sistema.
12. Se non si amplificano sia il target HCV sia il target SPC2, si otterrà un risultato non valido (Indeterminate (Indeterminato), No Result (Nessun risultato) o Unresolved (Irrisolto)) e sarà necessario ripetere il test.
13. Se il risultato del NeuMoDx HCV Quant Assay è Positivo (Positivo), ma il valore di quantificazione è oltre i limiti di quantificazione, il NeuMoDx System indicherà se l'HCV rilevato era *al di sotto* del limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) o *al di sopra* del limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
14. Nel caso in cui l'HCV rilevato sia *al di sotto* del limite di quantificazione inferiore, è possibile ripetere il NeuMoDx HCV Quant Assay (se si desidera) con un'altra aliquota del campione.
15. Nel caso in cui l'HCV rilevato fosse al di sopra del limite di quantificazione superiore, è possibile ripetere il NeuMoDx HCV Quant Assay con un'aliquota diluita del campione originale. Si consiglia una diluizione nel rapporto 1:100 o 1:1000 nel plasma HCV-negativo o nel diluente Basematrix 53 (Basematrix, SeraCare, Milford, MA). La concentrazione di campione originale può essere calcolata come indicato di seguito:

$$\text{concentrazione del campione originale} = \log_{10}(\text{fattore di diluizione}) + \text{concentrazione segnalata del campione diluito}$$
16. La presenza occasionale di inibitori della PCR nel plasma e nel siero può dare luogo a un errore di quantificazione del sistema. Se si verifica tale condizione, è consigliabile ripetere il test con lo stesso campione diluito in Basematrix in un rapporto di 1:10 o 1:100.
17. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indice di possibile presenza di RNA del virus dell'epatite C.
18. Cancellazioni o mutazioni in entrambe le regioni conservate prese come target dal NeuMoDx HCV Quant Assay possono influenzare la rilevazione o potrebbero portare a un risultato errato quando si utilizza la NeuMoDx HCV Quant Test Strip.
19. I risultati del NeuMoDx HCV Quant Assay dovranno essere impiegati in aggiunta alle osservazioni cliniche e alle altre informazioni a disposizione del medico; il test non è destinato a diagnosticare l'infezione.
20. Si raccomandano buone pratiche di laboratorio, compreso il cambio di guanti tra una manipolazione dei campioni dei pazienti e quella successiva, per evitare la contaminazione.

ELABORAZIONE DEI RISULTATI

I risultati disponibili possono essere visualizzati o stampati dalla scheda "Results" (Risultati) nella finestra Results (Risultati) sul touchscreen del NeuMoDx System. I risultati del NeuMoDx HCV Quant Assay vengono generati automaticamente dal software del NeuMoDx System utilizzando l'algoritmo decisionale e i parametri di elaborazione dei risultati sono specificati nel file di definizione esame NeuMoDx HCV (HCV Assay Definition File, EBV ADF). Un risultato può essere Negative (Negativo), Positive (Positivo) con indicazione di una concentrazione di HCV, Positive (Positivo) al di sopra dell'ULOQ, Positive (Positivo) al di sotto dell'LLOQ, Indeterminate (Indeterminato) (IND), Unresolved (Irrisolto) (UNR) o No Result (Nessun risultato) (NR), in base allo stato di amplificazione del controllo del processo del target e del campione. I risultati sono riportati nell'algoritmo decisionale dell'ADF, riepilogato nella *Tabella 1* di seguito.

Tabella 1. Riepilogo dell'algoritmo decisionale del NeuMoDx HCV Quant Assay

RISULTATO	Target HCV	Controllo elaborazione campioni (Sample Process Control, SPC2)	Interpretazione dei risultati
Positive (Positivo) con indicazione della concentrazione	Amplified (Amplificato) 0,9 ≤ [HCV] ≤ 8,2 log ₁₀ IU/mL (flusso di lavoro da 550 µL) 1,5 ≤ [HCV] ≤ 8,2 log ₁₀ IU/mL (flusso di lavoro da 200 µL)	Amplified (Amplificato) o Not Amplified (Non amplificato)	Rilevato RNA HCV entro l'intervallo quantitativo
Positive (Positivo), al di sopra dell'ULOQ	Amplified (Amplificato) [HCV] > 8,2 log ₁₀ IU/mL	Amplified (Amplificato) o Not Amplified (Non amplificato)	Rilevato RNA HCV al di sopra dell'intervallo quantitativo
Positive (Positivo), al di sotto dell'LLOQ	Amplified (Amplificato) [HCV] < 0,9 log ₁₀ IU/mL (flusso di lavoro da 550 µL) [HCV] < 1,5 log ₁₀ IU/mL (flusso di lavoro da 200 µL)	Amplified (Amplificato) o Not Amplified (Non amplificato)	Rilevato RNA HCV al di sotto dell'intervallo quantitativo
Negative (Negativo)	Not Amplified (Non amplificato)	Amplified (Amplificato)	RNA HCV non rilevato
Indeterminate (Indeterminato)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Non amplificato, Rilevato errore di sistema, Elaborazione del campione completata)		Tutti i risultati target erano non validi; ripetere il test†
No Result* (Nessun risultato)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Non amplificato, Rilevato errore di sistema, Elaborazione del campione interrotta)		L'elaborazione dei campioni è stata interrotta; ripetere il test†
Unresolved (Irrisolto)	Not Amplified, No System Error Detected (Non amplificato, Nessun errore di sistema rilevato)		Tutti i risultati target erano non validi; ripetere il test†

*Il flag No Result (Nessun risultato) è riportato solo su NeuMoDx System versione software 1.8 e successive.

†Il NeuMoDx System è dotato di una funzione automatica Rerun/Repeat (Riesegui/Ripeti), che può essere selezionata dall'utente finale per garantire la rielaborazione automatica dei risultati IND/UNR/NR e ridurre così al minimo i ritardi nell'ottenimento dei risultati.

Calcolo del test

- Per i campioni che rientrano nel range di quantificazione del NeuMoDx HCV Quant Assay, la concentrazione di RNA dell'HCV presente nei campioni viene calcolata tramite la curva di standard memorizzata in combinazione con il coefficiente di calibrazione e il volume del campione.
 - In base ai risultati dei NeuMoDx HCV Calibrator elaborati per stabilire la validità della curva di standard, si calcola anche un coefficiente di calibrazione per ogni lotto di NeuMoDx HCV Quant Test Strip, su uno specifico NeuMoDx System.
 - Il coefficiente di calibrazione viene inserito automaticamente nella determinazione finale della concentrazione di RNA dell'HCV.
 - Il software del NeuMoDx tiene conto del volume di campione immesso al momento della determinazione della concentrazione del RNA dell'HCV per mL di campione.
- I risultati del NeuMoDx HCV Quant Assay sono espressi in log₁₀ IU/mL.
- La quantificazione dei campioni sconosciuti che ne risulta è tracciabile secondo il 5° Standard Internazionale dell'OMS sull'HCV.

Calibrazione del test

Per quantificare l'RNA dell'HCV presente nei campioni, è necessaria una calibrazione valida, basata sulla curva di standard. Per generare risultati validi, è necessario completare la calibrazione del test tramite i calibratori esterni forniti da NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibratori

1. È necessario elaborare un set di NeuMoDx HCV Calibrator con ogni nuovo lotto di NeuMoDx HCV Quant Test Strip, se si carica un nuovo file di definizione esame HCV nel NeuMoDx System, se il set di calibratori corrente ha superato il periodo di validità (attualmente impostato a 90 giorni) o se viene modificato il software del NeuMoDx System.
2. Il software del NeuMoDx System notificherà l'utente quando è necessario elaborare i calibratori. Non è possibile utilizzare per i test un nuovo lotto di strisce reattive finché i calibratori non sono stati elaborati correttamente.
3. La validità della calibrazione viene stabilita come segue:
 - a) Per stabilire la validità è necessario elaborare un set di due calibratori: uno (1) alto e uno (1) basso.
 - b) Almeno due (2) replicati su tre (3) devono dare risultati che rientrino nei parametri predefiniti. Il target nominale del calibratore basso è di $3 \log_{10}$ IU/mL e il target nominale del calibratore alto è di $5 \log_{10}$ IU/mL.
 - c) Viene calcolato un coefficiente di calibrazione per tenere conto dalla variazione attesa tra i lotti di strisce reattive. Tale coefficiente di calibrazione viene utilizzato per la determinazione della concentrazione finale di HCV.
4. Se uno o entrambi i calibratori non superano il controllo di validità, ripetere l'elaborazione dei calibratori che non hanno superato il controllo utilizzando una fiala nuova. Nel caso in cui un calibratore non superi il controllo di validità, è possibile ripetere l'elaborazione solo di quel calibratore, dato che il sistema non richiede all'utente di elaborare nuovamente entrambi i calibratori.
5. Se i calibratori non superano il controllo di validità consecutivamente, contattare NeuMoDx Molecular, Inc.

Controllo qualità

Le normative locali in genere specificano che il laboratorio è responsabile delle procedure di controllo che monitorano l'accuratezza e la precisione dell'intero processo analitico e devono stabilire il numero, il tipo e la frequenza di test dei materiali di controllo utilizzando specifiche di prestazione verificate per un sistema di test approvato e non modificato.

Controlli esterni

1. È necessario elaborare i controlli esterni positivi e negativi ogni 24 ore per tutta la fase di test con il NeuMoDx HCV Quant Assay. Se non esiste un set di controlli esterni validi, il software del NeuMoDx System richiederà all'utente di elaborare questi controlli prima di poter riportare i risultati del campione.
2. La validità dei controlli esterni sarà valutata dal NeuMoDx System in base al risultato atteso. Il controllo positivo deve fornire un risultato Positive (Positivo) all'HCV e il controllo negativo deve fornire un risultato Negative (Negativo) all'HCV.
3. Risultati discrepanti per i controlli esterni devono essere gestiti come segue:
 - a) Un risultato del test Positive (Positivo) riportato per un campione di controllo negativo indica un problema di contaminazione del campione.
 - b) Un risultato del test Negative (Negativo) riportato per un campione di controllo positivo potrebbe indicare l'esistenza di un problema riguardante un reagente o uno strumento.
 - c) In entrambi i casi sopra illustrati o in caso di un risultato Indeterminate (indeterminato) (IND) o No Result (Nessun risultato) (NR), ripetere i NeuMoDx HCV External Control con fiale fresche del controllo/dei controlli che non ha/hanno superato il test di validità.
 - d) Se il NeuMoDx HCV External Control positivo continua a dare un risultato Negative (Negativo), contattare l'assistenza tecnica di NeuMoDx.
 - e) Se il NeuMoDx HCV External Control negativo continua a dare un risultato Positive (Positivo), cercare di eliminare tutte le fonti di potenziale contaminazione, anche sostituendo tutti i reagenti prima di contattare l'assistenza tecnica di NeuMoDx.

Controlli (interni) di elaborazione dei campioni

Nella NeuMoDx Extraction Plate è incorporato un Controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control, SPC2) esogeno, che si sottopone all'intero processo di estrazione dell'acido nucleico e amplificazione mediante RT-PCR real-time con ogni campione. In ogni NeuMoDx HCV Quant Test Strip sono inclusi anche primer e sonda specifici per SPC2, consentendo la rilevazione della presenza dell'SPC2 insieme all'RNA dell'HCV target (se presente) tramite RT-PCR multiplex real-time. La rilevazione dell'amplificazione di SPC2 consente al software del NeuMoDx System di monitorare l'efficacia dei processi di estrazione e di amplificazione dell'RNA mediante PCR real-time.

Risultati non validi

Se un NeuMoDx HCV Quant Assay eseguito sul NeuMoDx System non è in grado di produrre un risultato valido dopo il completamento dell'elaborazione del campione, sarà riportato Indeterminate (Indeterminato) (IND), No Result (Nessun risultato) (NR) o Unresolved (Irrisolto) (UNR) in base al tipo di errore che si è verificato.

Il risultato sarà IND se viene rilevato un errore del NeuMoDx System durante l'elaborazione del campione. Se viene riportato un risultato IND, si consiglia di ripetere il test.

Se non viene rilevata alcuna amplificazione valida dell'RNA dell'HCV o dell'SPC2, sarà riportato un risultato UNR, a indicare un possibile errore dovuto al reagente o alla presenza di inibitori. In caso di risultato UNR, si consiglia in primo luogo di ripetere il test. Se ancora non si ottiene un risultato valido, è possibile usare un campione diluito per mitigare gli effetti di un'eventuale inibizione del campione.

Se un NeuMoDx HCV Quant Assay eseguito sul NeuMoDx System non riesce a produrre un risultato valido e l'elaborazione del campione viene interrotta prima del completamento, sarà riportato come No Result (Nessun risultato) (NR). Se viene riportato un risultato NR, si consiglia di ripetere il test.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica – Limite di rilevazione con lo Standard OMS

La sensibilità analitica del NeuMoDx HCV Quant Assay è stata caratterizzata testando campioni negativi e una serie di diluizioni tracciabili secondo il 5° Standard Internazionale dell'OMS (genotipo 1) nel plasma negativo umano e nel siero sottoposti a screening per determinare il limite di rilevazione (Limit of detection, LoD) sui NeuMoDx System. Il LoD è stato definito come il livello target più basso rilevato a una percentuale del 95% in base a un'analisi con modello Probit. Lo studio è stato realizzato nel corso di 3 giorni su vari sistemi con più lotti qualificati di reagenti NeuMoDx. Ogni sistema (N288 and N96) ha trattato 18 replicati in ciascun livello di diluizione al giorno. I tassi di rilevazione sono illustrati nella *Tabella 2*. È stato eseguito uno studio aggiuntivo per confermare il LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay quando si utilizza il flusso di lavoro per volume campione di 200 µL, i cui risultati sono mostrati nella *Tabella 3*.

Tabella 2. Tassi di rilevazione positivi per la determinazione del LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay – flusso di lavoro 550 µL

Concentrazione target [IU/mL]	Concentrazione target [log ₁₀ IU/mL]	PLASMA			SIERO		
		Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione	Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione
30	1,48	108	108	100%	108	108	100%
15	1,18	108	108	100%	108	107	99%
10	1,00	108	105	97%	108	102	94%
7,5	0,88	108	102	94%	108	105	97%
3,75	0,57	108	84	78%	108	86	80%
1,875	0,27	108	47	44%	108	63	58%
NEG	0	108	0	0%	107	1	0,93%

Tabella 3. Tassi di rilevazione positivi per la determinazione del LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay – flusso di lavoro 200 µL

Concentrazione target [IU/mL]	Concentrazione target [log ₁₀ IU/mL]	PLASMA			SIERO		
		Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione	Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione
75	1,88	N/A	N/A	N/A	22	22	100%
60	1,78	22	22	100%	22	22	100%
30	1,48	22	21	95,5%	22	20	90,9%
15	1,18	22	17	77,3%	22	19	86,4%
10	1,00	22	13	59,1%	22	15	68,2%
NEG	0	22	0	0%	22	0	0%

È stato determinato che il LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay nel plasma di tutti i genotipi era pari a 7,5 IU/mL (95% IC 6,4 – 9,2 IU/mL) [(0,9 log₁₀ IU/mL) (95% IC 0,8 – 1,0 log₁₀ IU/mL)], come testato sul NeuMoDx 288 Molecular System utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 550 µL (*Figura 2*). È stato determinato che il LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay per campioni di siero era pari a 8,0 IU/mL (IC 95% 6,6 - 10,4 IU/mL) [(0,9 log₁₀ IU/mL) (IC 95% 0,8-1,0 log₁₀ IU/mL)] utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 550 µL (*Figura 2*); il LoD presunto per entrambi i tipi di campione utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 550 µL è di **8,0 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL)**.

È stato determinato che il LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 200 µL era pari a 27,9 IU/mL (IC 95% 20,1-81,9) nei campioni di plasma e pari a 29,8 IU/mL (IC 95% 20,5-94,0) nei campioni di siero (*Figura 3*); il LoD presunto per entrambi i tipi di campione utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 200 µL è **30,0 IU/mL (1,5 log₁₀ IU/mL)**.

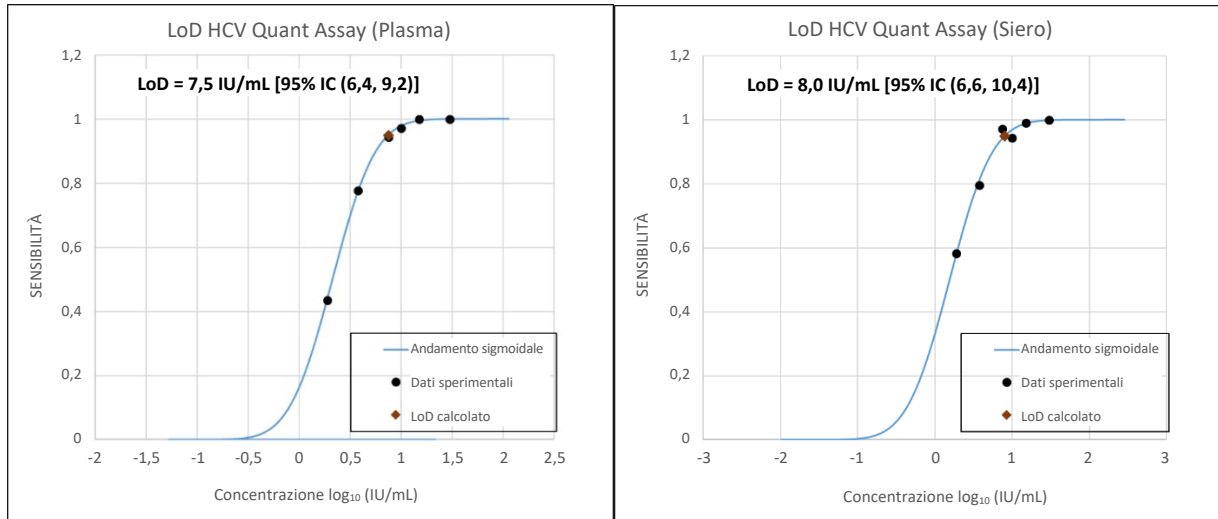


Figura 2: Analisi con modello Probit utilizzata per determinare il LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay, plasma (a sinistra) e siero (a destra): flusso di lavoro 550 μ L

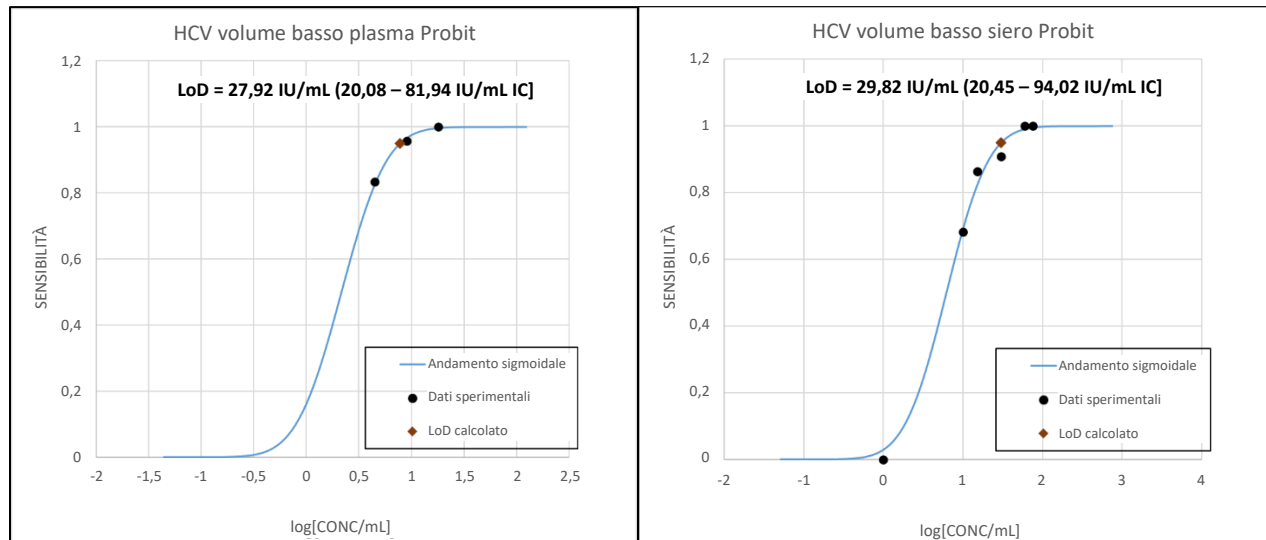


Figura 3: Analisi con modello Probit utilizzata per determinare il LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay, plasma (a sinistra) e siero (a destra): flusso di lavoro 200 μ L

Sensibilità analitica – Limite di quantificazione - Limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) con lo Standard dell'OMS

Il limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) si definisce come il livello target più basso a cui si ottiene un rilevamento >95% E un TAE $\leq 1,0$. Per determinare il valore LLoQ, l'errore analitico totale (Total Analytical Error, TAE) è stato calcolato per ciascuno dei livelli target HCV riportati con un rilevamento > 95% come parte del calcolo del valore di LoD. Il TAE è definito come segue:

$$\text{TAE} = \text{deviazione} + 2 \cdot \text{DS} \text{ [Statistica Westgard]}$$

La deviazione è il valore assoluto della differenza tra la media della concentrazione calcolata e la concentrazione attesa. DS si riferisce alla deviazione standard del valore quantificato del campione.

I risultati compilati per i 6 livelli di campioni di plasma e siero HCV testati nello studio LLoQ utilizzando il genotipo 1 con il flusso di lavoro per volume campione di 550 μ L sono illustrati nella *Tabella 4*. I risultati ottenuti da test aggiuntivi con l'utilizzo del flusso di lavoro per volume campione di 200 μ L sono illustrati nella *Tabella 5*.

Tabella 4. NeuMoDx HCV Quant Assay LLoQ, con deviazione e TAE – flusso di lavoro 550 µL

Conc. target [IU/mL]	Conc. target [log ₁₀ IU/mL]	Plasma					Siero				
		Conc. media [log ₁₀ IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE	Conc. media [log ₁₀ IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE
30,00	1,48	1,41	100	0,32	0,07	0,71	1,39	100	0,30	0,08	0,69
15,00	1,18	1,24	100	0,36	0,06	0,79	1,23	99	0,32	0,06	0,70
10,00	1,00	1,07	97	0,35	0,07	0,77	1,14	94	0,36	0,14	0,85
7,50	0,88	1,01	94	0,44	0,13	1,02	1,12	97	0,25	0,25	1,09
3,75	0,57	1,08	78	0,43	0,51	1,38	1,17	80	0,58	0,59	1,76
1,88	0,27	1,11	44	0,36	0,83	1,55	1,11	58	0,69	0,84	2,22

Tabella 5. NeuMoDx HCV Quant Assay LLoQ, con deviazione e TAE – flusso di lavoro 200 µL

Conc. target [IU/mL]	Conc. target [log ₁₀ IU/mL]	Plasma					Siero				
		Conc. media [log ₁₀ IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE	Conc. media [log ₁₀ IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE
75	1,88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1,56	100	0,23	0,32	0,78
60	1,78	1,93	100	0,39	0,15	0,93	1,56	100	0,27	0,22	0,76
30	1,48	1,35	96	0,44	0,11	0,99	1,45	91	0,41	0,03	0,85
15	1,18	1,37	77	0,42	0,18	1,03	1,36	86	0,53	0,18	1,25
10	1,00	1,26	59	0,56	0,25	1,36	1,15	68	0,53	0,15	1,21

È stato determinato che il LLoQ per il NeuMoDx HCV Quant Assay era pari a 7,7 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL) per il plasma e pari a 8,4 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL) per il siero, utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 550 µL; il LLoQ per entrambi, plasma e siero, era pari a **8,4 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL)** utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 550 µL.

È stato determinato che il LLoQ per il NeuMoDx HCV Quant Assay utilizzando lo Standard OMS era pari a 30,0 IU/mL (1,5 log₁₀ IU/mL) per il plasma e pari a 29,8 IU/mL (1,37 log₁₀ IU/mL) per il siero, utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 200 µL; il LLoQ per entrambi, plasma e siero, era pari a **30,0 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL)**, utilizzando il flusso di lavoro per volume campione di 200 µL.

Sensibilità analitica – LoD e LLoQ tra genotipi HCV

Il LoD è stato inizialmente stabilito per il genotipo 1 (5° Standard Internazionale dell'OMS) e successivamente sono stati eseguiti ulteriori test sul LoD stabilito utilizzando ciascuno degli altri 5 genotipi. Con il NeuMoDx HCV Quant Assay sono stati analizzati trentasei (36) replicati a livelli corrispondenti a 2X, 1X e 0,5X del limite superiore dell'IC del 95% del LoD utilizzando plasma con il flusso di lavoro per volume campione di 550 µL. Il tasso percentuale positivo per ciascun genotipo a ciascuno di questi livelli analizzati è stato riportato in tabella e utilizzato per calcolare il LoD mediante un'analisi con modello Probit.

È stato inoltre calcolato l'errore analitico totale (Total Analytical Error, TAE) a questi livelli analizzati. Il livello più basso con il 95% di rilevamento positivo e TAE calcolato ≤1,0 è stato nuovamente considerato come LLoQ per il genotipo. Questi risultati confermano che il NeuMoDx HCV Quant Assay mostra prestazioni di rilevazione eccellenti ed equivalenti su tutti i sei genotipi con un range di 4,5 – 7,5 IU/mL, comprendendo i risultati ottenuti con il 5° Standard internazionale dell'OMS (genotipo 1). In generale, è stato determinato che il LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay per tutti i genotipi era pari a 7,5 IU/mL (0,88 log₁₀ IU/mL) e il LLoQ era pari al valore più alto, cioè 7,7 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL), come riportato per il 5° Standard internazionale dell'OMS (genotipo 1, vedi sopra). La *Tabella 6* mostra i risultati per LoD e LLoQ per i test effettuati su tutti i genotipi HCV determinati nel plasma.

Tabella 6. Genotipi HCV analizzati nel plasma utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 550 µL

GENOTIPO	LoD [IU/mL]	LLoQ [IU/mL]
1	7,5	7,7
2	4,5	5,2
3	7,5	7,5
4	6,0	6,0
5	4,8	5,5
6	4,5	6,7

Sulla base dei risultati degli studi a cui si è fatto riferimento, il NeuMoDx presume un **LoD di 8,0 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL)** e un **LLoQ di 8,4 IU/mL (0,9 log₁₀ IU/mL)** per il NeuMoDx HCV Quant Assay in *plasma e siero*, utilizzando il **flusso di lavoro per volume campione di 550 µL**.

LoD e LLoQ presunti per il NeuMoDx HCV Quant Assay per **entrambi i tipi di campione (plasma e siero)** utilizzando il **flusso di lavoro per volume campione di 200 µL è pari a 30,0 IU/mL (1,5 log₁₀ IU/mL)**.

Sensibilità analitica – Linearità e determinazione del limite di quantificazione superiore (ULOQ)

La linearità e il limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULOQ) del NeuMoDx HCV Quant Assay sono stati stabiliti nel plasma preparando una serie di diluizioni tramite HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX) e AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) con tracciabilità stabilita secondo il 5° Standard Internazionale della OMS per l'EBV. È stato preparato un pannello di 11 componenti in plasma HCV–negativo raggruppato per creare un pannello che coprisse un range di concentrazione di 8,2 – 1,5 log₁₀ IU/mL. Il NeuMoDx HCV Quant Assay si è dimostrato in grado di quantificare l'HCV nell'intervallo lineare di 8 log₁₀ con una precisione di ±0,3 log₁₀ IU/mL sulla base dell'errore standard calcolato mediante l'intervallo di confidenza del 95%. Utilizzando i modelli di regressione del 2° o del 3° ordine non sono stati ottenuti vantaggi significativi. È stato determinato che l'ULOQ nel plasma era pari a 8,2 log₁₀ IU/mL. È stato eseguito uno studio successivo per dimostrare l'equivalenza delle matrici e l'analisi rispetto ai risultati quantitativi di NeuMoDx HCV per i campioni preparati nel plasma e nel siero utilizzando due modelli di andamento della regressione diversi, incluso lo strumento di regressione MS Excel e Passing-Bablok. I risultati hanno mostrato una forte correlazione rappresentata da valori di pendenza e intercetta molto vicini rispettivamente a 1,00 e 0,00 e un valore R2 di 0,99 (strumento di regressione MS Excel) o un valore P di 0,600 (Passing-Bablok). Le concentrazioni dell'esame HCV riportate dal NeuMoDx System rispetto ai valori attesi sono presentate nella *Figura 4*.

Linearità e ULOQ sono stati poi valutati con il flusso di lavoro per volume campione di 200 µL. Sono stati eseguiti confronti di equivalenza tra le concentrazioni segnalate dal software del NeuMoDx per i flussi di lavoro da 200 µL e 550 µL. L'analisi della regressione di Deming e della regressione di Passing-Bablok hanno mostrato una correlazione eccellente e una pendenza vicina a 1 e delle intercette minime (deviazione) delle concentrazioni riportate per i campioni di plasma e siero nell'intervallo lineare. Un confronto Bland-Altman della concentrazione riportata per il flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL con la concentrazione media riportata per i flussi di lavoro per volume campione sia da 200 µL che da 550 µL ha mostrato una deviazione minima, attribuendo precisione all'algoritmo usato per generare i risultati dal flusso di lavoro da 200 µL. Inoltre, una semplice regressione lineare che mette a confronto la concentrazione attesa e quella riportata per il flusso di lavoro da 200 µL aveva una pendenza vicina a 1, dimostrando una correlazione eccellente (*Figura 5*). Considerati insieme, questi confronti dimostrano una quantificazione precisa dell'HCV nell'intervallo lineare del NeuMoDx HCV Quant Assay utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL.

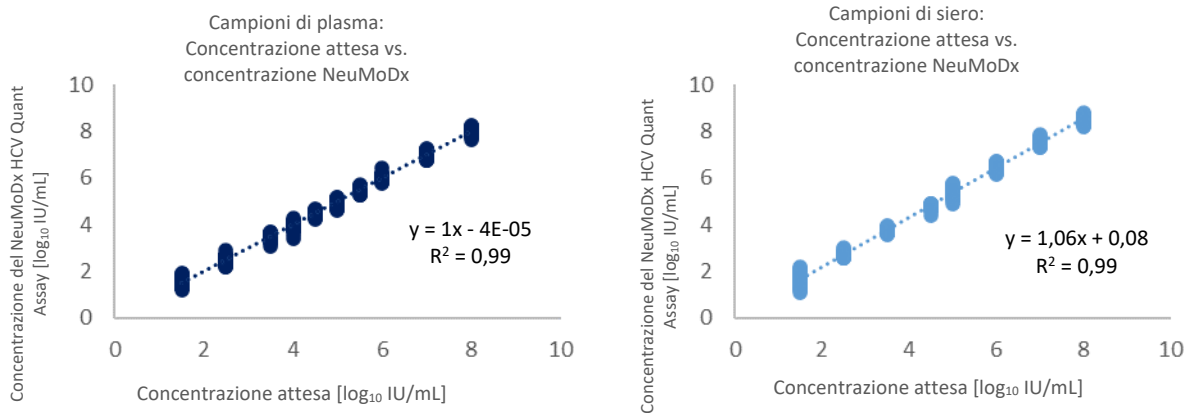


Figura 4: Range lineare del plasma (a sinistra) e del siero (a destra) in NeuMoDx HCV Quant Assay – flusso di lavoro 550 µL

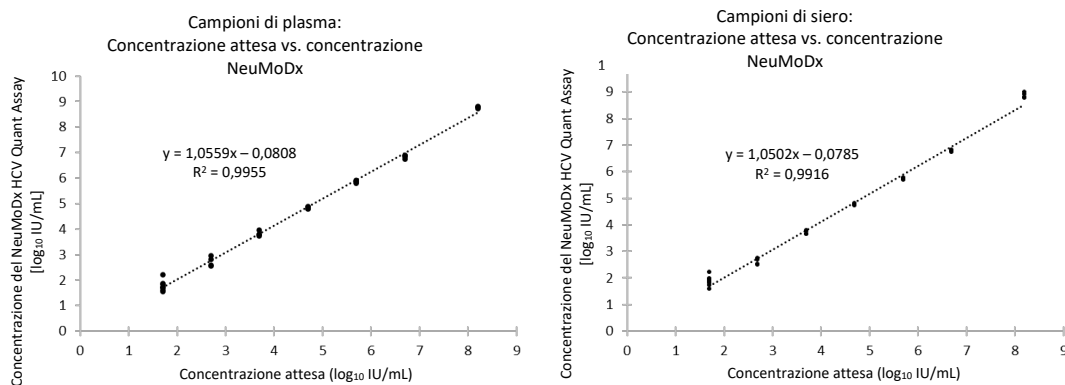


Figura 5: Range lineare del plasma (a sinistra) e del siero (a destra) in NeuMoDx HCV Quant Assay – flusso di lavoro 200 µL

Sensibilità analitica – Linearità tra genotipi

La linearità del NeuMoDx HCV Quant Assay tra i sei genotipi HCV è stata caratterizzata analizzando almeno quattro (4) concentrazioni diverse di ciascun genotipo di HCV preparato in un pool di plasma HCV–negativo. I livelli dei target HCV testati in questo studio sono dipesi dalla concentrazione del campione di origine, pertanto sono stati diversi tra tutti i genotipi. Lo studio è stato eseguito con ciascun genotipo utilizzando 6 replicati a ciascun livello. La linearità tra i sei genotipi di HCV è illustrata nella *Tabella 7* e nella *Figura 6*.

Tabella 7. Linearità del NeuMoDx HCV Quant Assay tra genotipi

Genotipo	Equazione della linearità y = quantificazione del NeuMoDx HCV Assay x = quantificazione attesa	R ²
1	$y = 1,054x + 0,1325$	0,979
2	$y = 1,0792x - 0,0748$	0,985
3	$y = 1,0423x - 0,0439$	0,981
4	$y = 1,0158x + 0,0292$	0,973
5	$y = 0,9873x + 0,1524$	0,994
6	$y = 1,0393x + 0,0396$	0,997

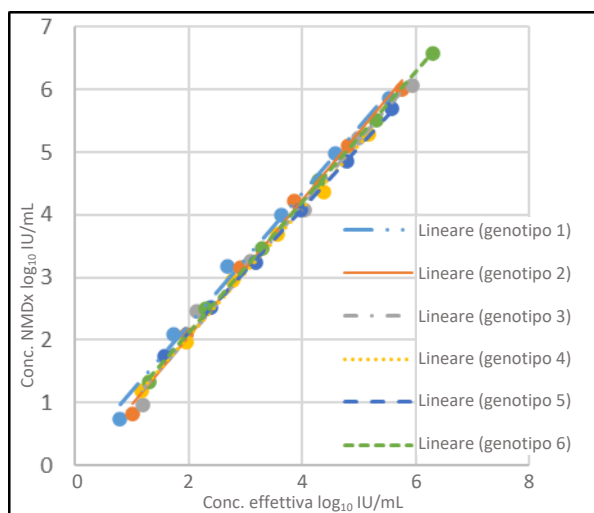


Figura 6: Linearità del NeuMoDx HCV Quant Assay tra genotipi

Specificità analitica – Reattività crociata

La specificità analitica è stata dimostrata sottoponendo a screening 33 organismi che si possono trovare in campioni di sangue/plasma, nonché in specie fitogeneticamente simili all'HCV per reattività crociata. Gli organismi sono stati preparati in gruppi di 4 – 6 organismi e analizzati ad alta concentrazione. Gli organismi analizzati sono mostrati nella *Tabella 8*. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con nessuno degli organismi analizzati, confermando la specificità analitica del 100% del NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabella 8. Patogeni utilizzati per dimostrare la specificità analitica

Organismi non target						
Adenovirus 2	Dengue V1	Epatite A	Virus dell'immunodeficienza umana 2	Virus T–infotropico dell'uomo 1	Propionibacterium acnes	Virus del Nilo occidentale
Adenovirus 5	Dengue V2	Epatite B	Papillomavirus umano 16	Virus T–infotropico dell'uomo 2	Rubella	Febbre gialla
Candida albicans	Dengue V3	Virus dell'herpes simplex (HSV) 1	Papillomavirus umano 18	Influenza A	Encefalite di Saint Louis	Virus Zika
Chlamydia trachomatis	Dengue V4	Virus dell'herpes simplex (HSV) 2	Virus dell'herpes umano 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Citomegalovirus	Virus di Epstein – Barr	Virus dell'immunodeficienza umana 1	Virus dell'herpes umano 8	Parvovirus B19	Staphylococcus epidermidis	

Specificità analitica – Sostanze interferenti, organismi commensali

Il NeuMoDx HCV Quant Assay è stato valutato per verificare l'interferenza nella presenza di organismi non target tramite gli stessi pool di organismi preparati per testare la reattività crociata elencati sopra nella *Tabella 8*. Il plasma HCV–negativo è stato arricchito con gli organismi raccolti in gruppi di 4–6 e arricchiti anche con un controllo HCV–positivo a una concentrazione di 1,4 log₁₀ IU/mL. Non sono state osservate interferenze significative nella presenza di questi organismi commensali, come indicato dalla deviazione minima della quantificazione dai campioni di controllo che non contenevano alcun agente interferente.

Specificità analitica – Sostanze interferenti, sostanze endogene ed esogene

Il NeuMoDx HCV Quant Assay è stato valutato in presenza di sostanze interferenti esogene ed endogene tipiche, trovate in campioni clinici di plasma con HCV. Questi includevano livelli insolitamente alti di componenti del sangue, nonché comuni farmaci antivirali, che sono stati classificati nella *Tabella 9*. Ciascuna sostanza è stata aggiunta al plasma umano HCV–negativo sottoposto a screening, arricchito con 1,7 log₁₀ IU/mL HCV, e i campioni sono stati analizzati per valutare l'interferenza. Inoltre, è stato testato anche il plasma a uno stadio comune di malattia associato all'infezione da epatite C, per valutare la potenziale interferenza. La concentrazione media e la deviazione di tutte le sostanze testate sono indicate nella *Tabella 10*. Nessuna delle sostanze esogene ed endogene ha avuto ripercussioni sulla specificità del NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabella 9. Test di interferenza – Agenti esogeni (classificazioni dei farmaci)

	Prodotto	Classificazione		Prodotto	Classificazione
Pool 1	Sofosbuvir	Antivirale HCV ad azione diretta	Pool 2	Paritaprevir	Inibitore della proteasi HCV NS3/4A
	Ledipasvir	Inibitore HCV		Ombitasvir	Antivirale HCV
	Velpatasvir	Inibitore HCV NS5A		Ritonavir	Inibitore della HIV proteasi
	Claritromicina	Antibiotico		Abacavir solfato	Inibitore della trascrittasi inversa
	Interferone alfa-2a	Immunomodulatore		Ribavirina	Immunomodulatore
Pool 3	Grazoprevir	Inibitore della proteasi HCV NS3/4A	Pool 4	Efavirenz	Inibitore della trascrittasi inversa
	Elbasvir	Inibitore HCV NS5A		Lopinavir	Inibitore della proteasi
	Tenofovir disoproxil	Antivirale HBV/HIV		Azitromicina	Antibiotico
	Lamivudina	Antivirale HBV/HIV		Dolutegravir	Antivirale HIV
	Valganciclovir	Antivirale CMV		Simeprevir	Inibitore della proteasi HCV NS3/4A
Pool 5	Emtricitabina	Antivirale HIV			
	Raltegravir	Antivirale HIV			
	Amoxicillina	Antibiotico			
	Rilpivirina	Antivirale HIV			
	Dasabuvir	Antivirale HCV ad azione diretta			
	Glecaprevir	Inibitore della proteasi HCV NS3/4A			

Tabella 10. Test di interferenza – Agenti esogeni ed endogeni

Endogena	Conc. media log ₁₀ IU/mL	Deviazione log ₁₀ IU/mL
Emoglobina	1,61	0,28
Trigliceridi	1,31	-0,02
Bilirubina	1,47	0,14
Albumina	1,47	0,14
Esogeno (farmaci)	Conc. media log ₁₀ IU/mL	Deviazione log ₁₀ IU/mL
Pool 1: zidovudina (ZDV), saquinavir, ritonavir, claritromicina, interferone alfa-2a, interferone alfa-2b	1,48	0,15
Pool 2: abacavir solfato, amprenavir, ribavirina, entecavir, fluoxetina, valaciclovir cloridrato	1,40	0,07
Pool 3: tenofovir disoproxil, lamivudina, ganciclovir, valganciclovir, nevirapina	1,40	0,07
Pool 4: efavirenz, lopinavir, enfuvirtide, ciprofloxacina, paroxetina,	1,51	0,18
Pool 5: Adefovir (dipivoxil), azitromicina, indinavir solfato, sertralina	1,40	0,07
Stato della malattia	Conc. media log ₁₀ IU/mL	Deviazione log ₁₀ IU/mL
Anticorpo anti-nucleo (Antinuclear Antibody, ANA)	1,53	0,18
Lupus eritematoso sistemico (LES)	1,29	-0,06
Artrite reumatoide (AR)	1,39	0,04
Anticorpi (HBV)	1,45	0,10
Cirrosi alcolica	1,43	0,08
Fattore reumatoide (RF)	1,43	0,08
Steatoepatite non alcolica (NASH)	1,32	-0,03

Precisione intra-laboratorio

La precisione del NeuMoDx HCV Quant Assay è stata determinata testando un pannello di 7 componenti di campioni di HCV preparati (incorporando sia HCV Armored RNA che AcroMetrix HCV Control) utilizzando i tre NeuMoDx System per 12 giorni. Sono state caratterizzate le precisioni intra-sessione, intra-giornata e intra-sistema ed è stata determinata la deviazione complessiva standard come $\leq 0,26 \log_{10}$ IU/mL. Non è stata trovata alcuna differenza significativa nelle prestazioni tra i sistemi, i giorni o le sessioni, come mostrato nella *Tabella 11*. La precisione fra operatori non è stata caratterizzata, in quanto l'operatore non riveste un ruolo significativo nell'elaborazione dei campioni con l'uso del NeuMoDx System.

Tabella 11. Precisione intra-laboratorio – NeuMoDx HCV Quant Assay su NeuMoDx System

	Conc. target [log ₁₀ IU/mL]	Conc. media [log ₁₀ IU/mL]	DS intra- sistema	DS intra- giornata	DS intra- sessione	DS intra- laboratorio (complessiva)
ARMORED	6	5,95	0,17	0,13	0,10	0,17
	5	4,87	0,20	0,14	0,12	0,20
	3	2,89	0,19	0,17	0,17	0,19
ACROMETRIX	4,4	4,45	0,12	0,10	0,08	0,13
	3,4	3,45	0,12	0,12	0,11	0,13
	2,4	2,41	0,17	0,15	0,15	0,17
	1,4	1,40	0,26	0,25	0,25	0,24

Riproducibilità lotto a lotto

La riproducibilità lotto a lotto del NeuMoDx HCV Quant Assay è stata determinata utilizzando tre lotti diversi di reagenti chiave: NeuMoDx Lysis Buffer 3, NeuMoDx Extraction Plates e NeuMoDx HCV Quant Test Strip. Per valutare le prestazioni è stato utilizzato un pannello di 7 componenti di HCV (incorporanti entrambi HCV Armored RNA e AcroMetrix HCV Control). L'analisi è stata eseguita utilizzando tre lotti di reagenti su tre sistemi in 6 giorni. È stata analizzata la variazione all'interno dei lotti e fra i lotti e i risultati sono presentati nella *Tabella 12*. La deviazione complessiva massima è stata di 0,24 log₁₀ IU/mL e la DS complessiva massima di 0,33 log₁₀ IU/mL. Non sono state trovate differenze significative fra i lotti in quanto la quantificazione di tutti i componenti del pannello è rientrata nella specifica di tolleranza.

Tabella 12. Riproducibilità lotto a lotto: NeuMoDx HCV Quant Assay

	Conc. target [log ₁₀ IU/mL]	Conc. media COMPLESSIVA [log ₁₀ IU/mL]	n (Risultati validi per lotto)	DEVIAZIONE ASS	DS fra lotti	DS intra-lotto	DS complessiva
ARMORED	6	5,76	36	0,24	0,35	0,13	0,37
	5	4,84	36	0,16	0,16	0,22	0,27
	3	2,81	36	0,19	0,31	0,16	0,35
ACROMETRIX	4,4	4,35	36	0,05	0,21	0,11	0,24
	3,4	3,31	36	0,09	0,17	0,11	0,20
	2,4	2,33	36	0,07	0,24	0,13	0,27
	1,4	1,38	36	0,02	0,23	0,13	0,33

Efficacia del controllo

L'SPC2 è incluso nel NeuMoDx HCV Quant Assay per segnalare errori o inibizioni nelle fasi di processo che si ripercuotono sulle prestazioni dell'esame. L'efficacia è stata testata nelle condizioni rappresentative di errori critici della fase di elaborazione che potrebbero verificarsi durante l'elaborazione dei campioni, che *possono non essere* rilevati dai sensori di monitoraggio delle prestazioni del NeuMoDx System. Campioni positivi (3 log₁₀ IU/mL) e campioni negativi sono stati messi alla prova in presenza di un controllo nelle seguenti condizioni: presenza di inibitore, nessun reagente di lavaggio fornito e nessun blow-out di lavaggio. Le lacune di elaborazione che hanno prodotto un effetto avverso sulla rilevazione/quantificazione dell'HCV sono state rispecchiate dalle prestazioni dell'SPC2 target, come da *Tabella 13*. In tutti gli esempi testati è stato dimostrato che: il controllo di elaborazione dei campioni monitorava adeguatamente le lacune di elaborazione e la presenza di inibitori, oppure la lacuna di elaborazione prevista non produceva un effetto avverso significativo sulla rilevazione dell'SPC2 o sulla rilevazione e quantificazione dell'HCV. Perciò l'SPC2 si è dimostrato efficace nel monitoraggio delle prestazioni dell'esame sul NeuMoDx System.

Tabella 13. Efficacia del Controllo di elaborazione dei campioni

Errore della fase di processo testata	Stato di amplificazione del Controllo di elaborazione dei campioni	Stato di amplificazione Target HCV	Risultato dell'esame
Presence of Inhibitor (Presenza di inibitore)	Not Amplified (Non amplificato)	Not Amplified (Non amplificato)	Unresolved (Irrisolto)
No Wash Delivered (Lavaggio non effettuato)	Not Amplified (Non amplificato)	Not Amplified (Non amplificato)	Unresolved (Irrisolto)
No Wash Blowout (Nessun blow-out di lavaggio)	Amplified (Amplificato)	Amplified (Amplificato)	Positive (Positivo) con quantificazione entro 0,3 log ₁₀ IU/mL del controllo

Tasso di risultati validi

Per determinare la percentuale di risultati validi, è stata utilizzata un'analisi retrospettiva dei dati ottenuti durante la valutazione delle prestazioni del NeuMoDx HCV Quant Assay sui NeuMoDx System. I risultati dei test validi saranno chiamati Positive (Positivo) o Negative (Negativo); i risultati dei test non validi potranno essere riferiti come Indeterminate (Indeterminato, IND) o Unresolved (Irrisolto, UNR) in base allo stato di amplificazione del target e al controllo di elaborazione dei campioni. Un'indicazione IND in genere è causata da un errore dello strumento che genera un errore nel target e/o nel controllo interno di elaborazione dei campioni per l'amplificazione. Un'indicazione UNR viene attribuita ai campioni, quando sia il target sia il controllo interno di elaborazione dei campioni non riescono a portare a termine l'amplificazione, anche se non sono rilevati errori nello strumento. Nell'analisi retrospettiva sono stati inclusi i risultati del NeuMoDx HCV Quant Assay su 1.962 individui; i risultati comprendevano i dati ottenuti da campioni sia di siero sia di plasma su entrambi i sistemi NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 System. È stato determinato che il tasso di risultati UNR era pari allo 0,61% (12/1962) e quello dei risultati IND era pari allo 0,41% (8/1962); questa determinazione soddisfa i criteri di accettazione dell'analisi. Pertanto, il tasso di risultati validi del NeuMoDx HCV Quant Assay tra le matrici cliniche e i NeuMoDx System è stato in definitiva pari al 99,0% con IC 95% (98,4-99,3).

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata per il NeuMoDx HCV Quant Assay è stato determinato testando tre set di campioni HCV composti da campioni altamente positivi e altamente negativi alternati. In totale, l'operazione ha coinvolto l'analisi di 144 replicati di un campione umano HCV-negativo e di 144 replicati di un campione HCV ad alto titolo a $8,2 \log_{10}$ IU/mL. Tutti i 144 i replicati del campione negativo sono stati riportati come negativi, dimostrando che non si è verificata contaminazione crociata durante l'elaborazione del campione sul NeuMoDx System.

Equivalenza delle matrici di campioni

I test sono stati eseguiti per dimostrare l'equivalenza delle matrici di campioni tra il sangue intero raccolto nelle provette di raccolta contenenti acido etilendiamminicotetrate (EDTA) e acido citrato destrosio (ACD) per la preparazione del plasma. Sono stati eseguiti ulteriori test per determinare l'equivalenza tra campioni di plasma fresco e congelato (raccolti nei due tipi di provette), nonché tra campioni di siero fresco e congelato. I campioni freschi sono stati conservati a 4 °C finché non sono stati arricchiti con quattro livelli di HCV e testati per valutare l'equivalenza. Successivamente i campioni sono stati congelati per un minimo di 24 ore a -20 °C. Dopo questo periodo di conservazione in condizioni di congelamento, i campioni sono stati scongelati e nuovamente analizzati. Sono stati confrontati i risultati dei campioni di siero e plasma freschi rispetto a quelli congelati, nonché tra campioni di plasma con EDTA rispetto a quelli di plasma con ACD, per valutare l'equivalenza tramite l'analisi della regressione. I dati hanno dimostrato un'equivalenza eccellente tra i campioni di plasma con EDTA e ACD, tra i campioni di plasma freschi e congelati e tra i campioni di siero freschi e congelati.

Sono stati eseguiti ulteriori test per dimostrare l'equivalenza delle prestazioni del NeuMoDx HCV Quant Assay sui campioni primari rispetto ai campioni secondari. I gruppi di campioni di donatori negativi all'HCV arricchiti con HCV target (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) e di campioni di donatori positivi all'HCV sono stati elaborati dapprima dalle provette per campioni primarie. Dopo l'elaborazione con le provette primarie, il plasma o il siero rimanente da ciascun campione è stato suddiviso in aliquote in una provetta per campione secondaria ed elaborato nuovamente. Non sono state rilevate differenze significative nei risultati riportati tra l'elaborazione con provette provetta per campioni di plasma primarie e secondarie.

Confronto tra metodi clinici

Le prestazioni qualitative e quantitative del NeuMoDx HCV Quant Assay sono state valutate rispetto agli esami di confronto approvati da FDA/CE analizzando campioni clinici non diluiti di pazienti infettati da HCV. L'analisi è stata eseguita internamente sul NeuMoDx tramite uno studio in singolo cieco, utilizzando i campioni clinici residui de-identificati ottenuti da sei laboratori di riferimento esterni. Sono stati elaborati complessivamente 323 campioni di plasma e 336 campioni di siero utilizzando il NeuMoDx HCV Quant Assay in modalità (singolo) cieco su più NeuMoDx Molecular System. Di questi campioni, 35 campioni di plasma e 13 campioni di siero sono stati elaborati su ENTRAMBI i sistemi NeuMoDx 288 e 96 Molecular System. Non è stato possibile ripetere l'elaborazione su alcuni dei campioni con risultato NON VALIDO, poiché non era disponibile una quantità sufficiente del campione.

Gli errori di elaborazione e sistema ottenuti sui NeuMoDx Molecular System sono stati minimi e i criteri sono stati soddisfatti. Inizialmente sono stati ottenuti in totale 4 risultati indeterminati (IND) per i campioni di plasma e 4 risultati indeterminati (IND) per i campioni di siero, pertanto il tasso IND iniziale è stato dell'1% (IC 95% 0,5% – 3%) per il plasma e dell'1% (IC 95% 0,4%–3%) per il siero. Inizialmente sono stati ottenuti in totale 3 risultati UNRESOLVED (Irrisolto, UNR) per i campioni di plasma e 5 UNR per i campioni di siero, arrivando così a un tasso generale dell'1% (IC 95% 0,2% – 3%) per il plasma e dell'1% (IC 95% 0,6% – 4%) per il siero.

I campioni che hanno generato risultati non validi (IND/UNR) o un "errore di quantificazione" sono stati nuovamente testati se era rimasto un volume sufficiente; è stata effettuata una diluizione su alcuni campioni per generare risultati validi. Per i 13 campioni con volume sufficiente per la ripetizione (diluiti O non diluiti), è stato ottenuto un risultato valido.

Dei 321 risultati validi ottenuti per i campioni di plasma e dei 334 risultati validi ottenuti per i campioni di siero, 206 campioni di plasma e 154 campioni di siero hanno generato un risultato POSITIVE (POSITIVO) sul NeuMoDx HCV Quant Assay con i corrispondenti valori di concentrazione assegnati dai test di riferimento. Per effettuare la correlazione tra i valori di concentrazione del NeuMoDx HCV Quant Assay e i valori refertati dai test di riferimenti per i campioni di plasma e siero sono state utilizzate le analisi della regressione di Deming e di Passing-Bablok.

Sono stati generati i grafici di equivalenza per rappresentare la correlazione tra le concentrazioni di NeuMoDx HCV Quant Assay e i valori di concentrazione del test di riferimento per tutti i campioni testati utilizzando l'analisi della regressione di Deming e Passing-Bablok, come illustrato nella *Figura 7* e *Figura 8*. La qualità del modello di regressione di Deming è illustrata da un coefficiente di pendenza di 1,00, con un IC del 95% (0,97; 1,03) e da un'intercetta (deviazione) di -0,16 con un IC del 95% (-0,37; 0,06), dimostrando che i risultati di concentrazione ottenuti fra il NeuMoDx HCV Quant Assay e i test di riferimento sono altamente correlati e presentano una deviazione accettabile. La qualità del modello lineare di Passing-Bablok è illustrata da un coefficiente di pendenza di 1,02 con un IC del 95% (0,99; 1,05) e un'intercetta (deviazione) di -0,28 con un IC del 95% (-0,43; -0,14), dimostrando che i risultati di concentrazione ottenuti tra il NeuMoDx HCV Quant Assay e i test di riferimento sono altamente correlati e presentano una deviazione accettabile, come mostrato nella *Tabella 14*.

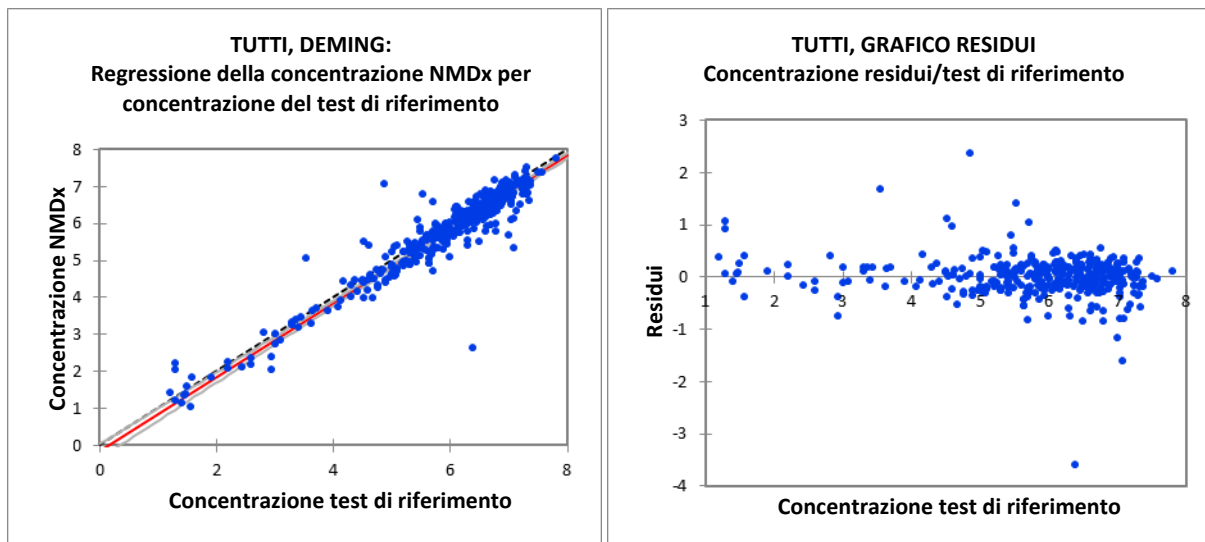


Figura 7: Grafici Equivalenza (a sinistra) e Residui (a destra) – Analisi cumulativa (su entrambi i NeuMoDx System) dei risultati con NeuMoDx HCV Quant Assay confrontati con i risultati del test di riferimento per TUTTI i campioni in base all'analisi della regressione di Deming.

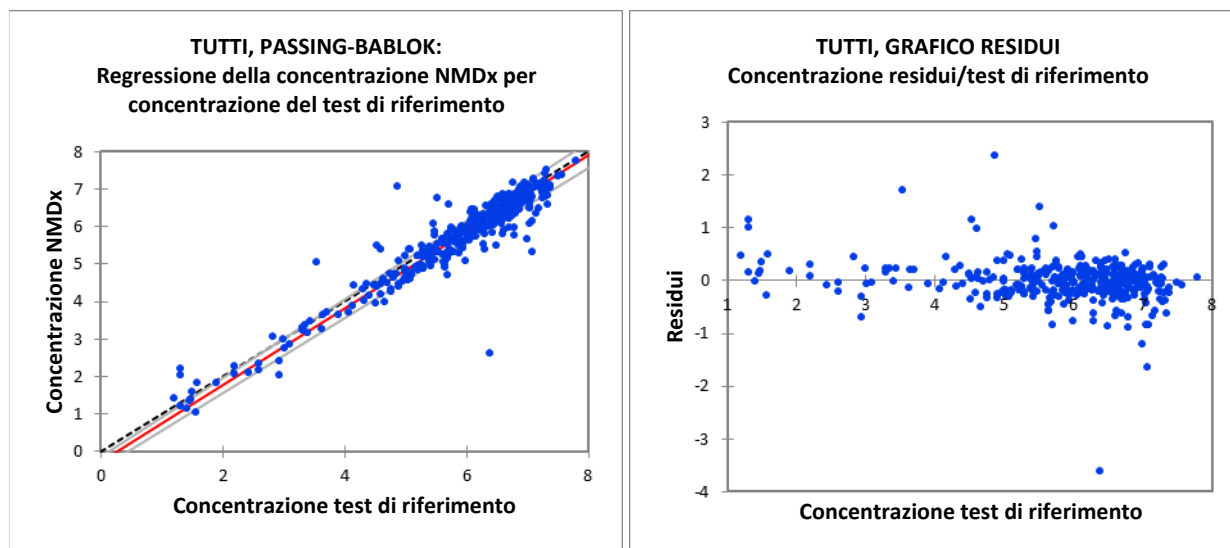


Figura 8: Grafici Equivalenza (a sinistra) e Residui (a destra): analisi cumulativa (su entrambi i NeuMoDx System) dei risultati con NeuMoDx HCV Quant Assay confrontati con i risultati del test di riferimento per TUTTI i campioni in base all'analisi della regressione di Passing-Bablok.

Tabella 14. Riepilogo dell'analisi di regressione lineare con metodo di Deming e di Passing-Bablok

	Analisi di Deming		Analisi di Passing-Bablok	
	Intercetta	Coefficiente di pendenza	Intercetta	Coefficiente di pendenza
CUMULATIVA (Tutti plasma + siero)	-0,16 IC 95% (-0,37, 0,06)	1,00 IC 95% (0,97, 1,03)	-0,28 IC 95% (-0,43, -0,14)	1,02 IC 95% (0,99, 1,05)

Dei 655 risultati validi ottenuti per i campioni di plasma e siero utilizzando il NeuMoDx HCV Quant Assay, 361 sono stati segnalati positivi dai test di riferimento per HCV e 294 sono stati segnalati negativi. La sensibilità e la specificità del NeuMoDx HCV Quant Assay sono state calcolate utilizzando i dati di tutti i campioni clinici validi confrontati con il test di riferimento, come compilato e illustrato nella *Tabella 15*. Dei 361 campioni positivi testati, 360 sono stati refertati come positivi dal NeuMoDx HCV Quant Assay, mostrando una sensibilità del 99,7% con IC del 95% (98,2% – 100%). Dei 294 campioni negativi testati, 271 sono stati refertati come negativi dal NeuMoDx HCV Quant Assay, mostrando una specificità del 92,2% con IC del 95% (88,3% – 94,9%).

L'equivalenza del NeuMoDx HCV Quant Assay è stata dimostrata su tutti i risultati con alta correlazione delle prestazioni d'esame tra il NeuMoDx 288 Molecular System, il NeuMoDx 96 Molecular System e il test di riferimento per i campioni di plasma e siero.

Tabella 15. Risultati del confronto con metodo qualitativo per NeuMoDx HCV Quant Assay confrontati con i test – Plasma e siero

	Esame di riferimento (POS)	Esame di riferimento (NEG)	TOTALE
NeuMoDx HCV Quant Assay (POS)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
TOTALE	361	294	655
SENSIBILITÀ = 99,7% IC 95% (98,2% – 100%) *SPECIFICITÀ = 92,2% IC 95% (88,3% – 94,9%)			

***NOTA:** L'LLoQ per il NeuMoDx HCV Quant Assay è pari a 0,9 log₁₀ IU/mL, che è inferiore all'esame con il comparatore utilizzato come test di riferimento. È stata eseguita un'analisi successiva escludendo 9 campioni in cui il NeuMoDx ha rilevato l'HCV, ma segnalati come negativi dall'esame con il comparatore. Escludendo questi 9 campioni, la specificità del NeuMoDx HCV Quant Assay è stata ricalcolata, ottenendo un valore del 95,1% con un IC del 95% (91,7 – 97,2).

Analisi dei campioni artificiali – Flusso di lavoro per volume campione di 200 µL

La correlazione quantitativa tra i flussi di lavoro del volume di campione da 200 µL e 550 µL è stata confermata utilizzando un pannello composto da singoli campioni di plasma HCV negativo e di siero arricchiti con quattro livelli noti di materiale Accuplex HCV Control, tracciabili secondo il 5° Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA HCV per i test dell'acido nucleico. Tali campioni singoli di plasma e siero sono stati elaborati utilizzando i flussi di lavoro per volume campione da 200 µL e da 550 µL, per un totale di 324 test eseguiti. I confronti di equivalenza tra la concentrazione riportata dal software del NeuMoDx per i flussi di lavoro per volume campione di 200 µL e 550 µL con pannello artificiale sono stati eseguiti sulla base dei singoli campioni. L'analisi della regressione di Deming e Passing-Bablok aveva una pendenza di 1,003 e 1,000 con intercette di -0,082 e -0,085, rispettivamente nel plasma, e di 0,974 e 0,984 con intercette di 0,086 e 0,037, rispettivamente nel siero, dimostrando una concordanza eccellente delle quantificazioni HCV tra i due volumi di elaborazione. Un confronto Bland-Altman ha mostrato una deviazione minima tra i due flussi di lavoro. Inoltre, l'analisi della regressione lineare semplice con la concentrazione attesa e la concentrazione riportata per il flusso di lavoro da 200 µL aveva una pendenza di 1,0432 e un coefficiente di correlazione di 0,994 (plasma) e di 1,0007 e 0,993 (siero), supportando prestazioni eccellenti utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL per il NeuMoDx HCV Quant Assay. I risultati di questi studi sono riepilogati nella *Figura 9* e nella *Figura 10*.

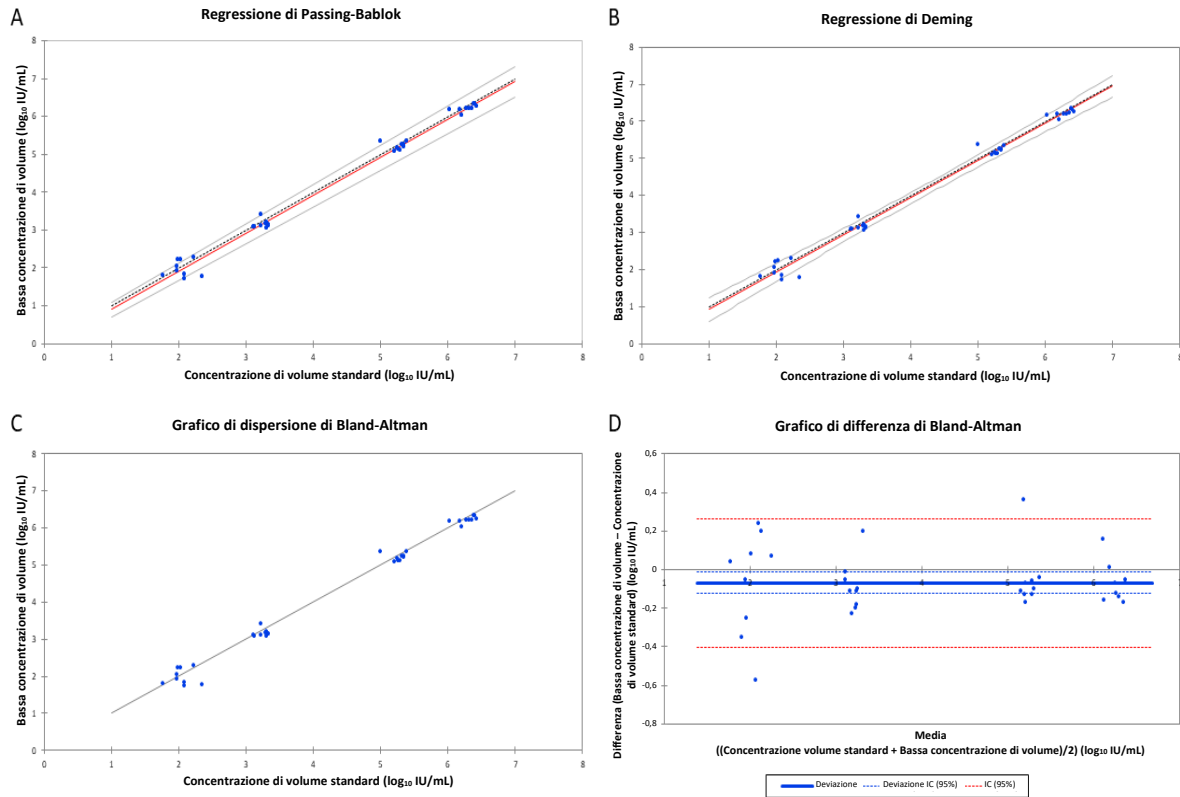


Figura 9: Confronti tra grafici di equivalenza delle concentrazioni riportate dal flusso di lavoro per volume campione di 200 μ L e quelle riportate dal flusso di lavoro per volume campione di 550 μ L. A) Regressione di Passing-Bablok. B) Regressione di Deming. C) Grafico di dispersione di Bland-Altman D) Grafico di differenza di Bland-Altman – Campioni di plasma

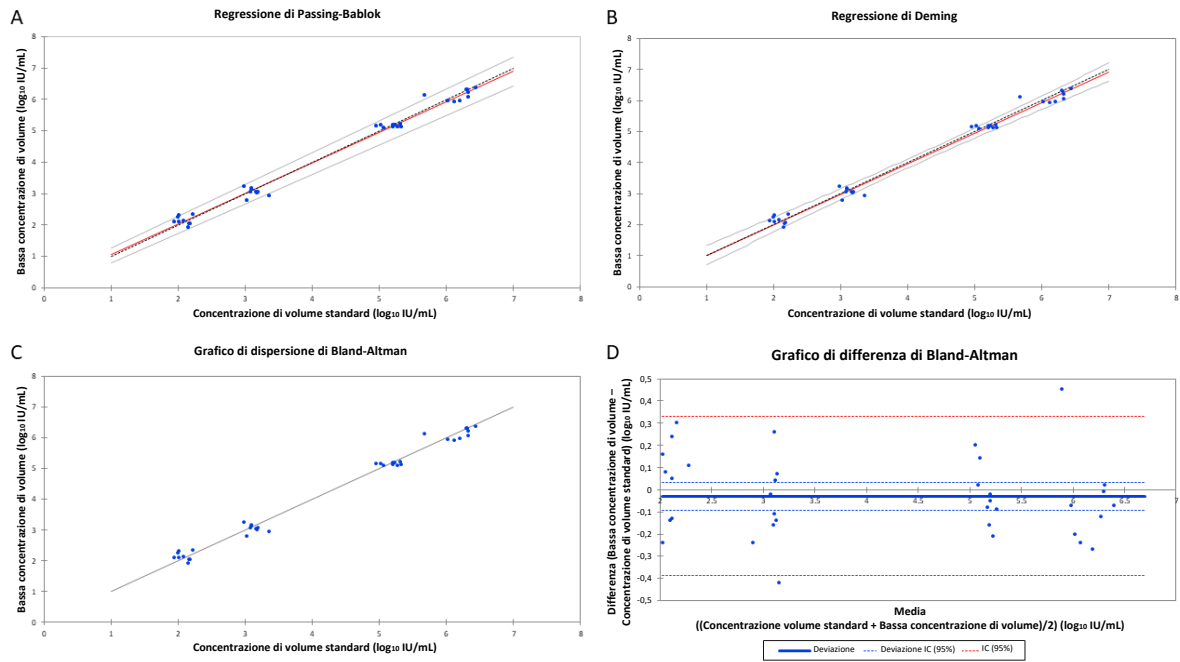


Figura 10: Confronti tra grafici di equivalenza delle concentrazioni riportate dal flusso di lavoro per volume campione di 200 μ L e quelle riportate dal flusso di lavoro per volume campione di 550 μ L. A) Regressione di Passing-Bablok. B) Regressione di Deming. C) Grafico di dispersione di Bland-Altman D) Grafico di differenza di Bland-Altman – Campioni di siero

BIBLIOGRAFIA















1. Rachel H. Westbrook, Geoffrey Dusheiko. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology Update: Hepatitis C*, Volume 61, Issue 1, Supplement, November 2014, Pgs S58-S68.
2. Annual Epidemiological Report for 2016, Hepatitis C, European Centre for Disease Prevention and Control. *Hepatitis C*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018. (<https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/pdfs/2016HepSurveillanceRpt.pdf>)
3. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2: 161–76.
4. Surveillance for Viral Hepatitis – United States, 2016, CDC. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/index.htm>
5. Diagnosis and management of hepatitis C virus-infected children. Javeri R. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2011;30(11):983 – 985.
6. American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) and Infectious Disease Society of America (IDSA), HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C, Sept 21, 2017. (www.hcvguidelines.org)
7. Centers for Disease Control (CDC), Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians Recommendations and Reports MMWR / Vol. 62 / May 7, 2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014


MARCHI COMMERCIALI

NeuMoDx™ e NeuDry™ sono marchi commerciali di NeuMoDx Molecular, Inc.
 AcroMatrix™ è un marchio commerciale di Thermo Fisher Scientific.
 Armored RNA® è un marchio commerciale registrato di Asuragen, Inc.
 BD Vacutainer® è un marchio commerciale registrato di Becton, Dickinson and Company
 BD e PPT™ e SST™ sono marchi commerciali di Becton, Dickinson and Company
 TaqMan® è un marchio commerciale registrato di Roche Molecular Systems, Inc.

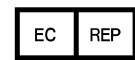
Tutti gli altri nomi di prodotto, i marchi commerciali e i marchi commerciali registrati che possono apparire in questo documento sono di proprietà dei rispettivi proprietari.

LEGENDA DEI SIMBOLI

 Solo su prescrizione medica	 Limite di temperatura
 Produttore	 Non riutilizzare
 Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	 Contenuto sufficiente per <n> test
 Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea	 Consultare le istruzioni per l'uso
 Numero di catalogo	 Attenzione
 Codice lotto	 Rischio biologico
 Data di scadenza	 Marchio CE

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

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

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

 2797

Assistenza tecnica/Rapporti di vigilanza: support@qiagen.com

Brevetto: www.neumodx.com/patents