

REF 201500 NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip**R only**

OPREZ: samo za izvoz u SAD

IVD Za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx 288 i NeuMoDx 96 Molecular SystemZa ažurirane upute posjetite stranicu: www.qiagen.com/neumodx-ifu

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

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

NAMJENA

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay automatizirani je, *in vitro* test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za kvantifikaciju DNK humanog Epstein-Barrova virusa (Epstein-Barr virus, EBV) u plazmi. Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay provedeno na sustavu NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System (sustav(i) NeuMoDx System) uključuje automatiziranu ekstrakciju DNK radi izolacije ciljane nukleinske kiseline iz plazme i lančanu reakciju polimerazom (Polymerase Chain Reaction, PCR) u stvarnom vremenu koja cilja dvije vrlo konzervirane regije u genomu Epstein-Barrova virusa.

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay namijenjeno je za *in vitro* detekciju i kvantifikaciju DNK Epstein-Barrova virusa u svježim i zamrznutim ispitcima humane plazme na sustavima NeuMoDx 288 i NeuMoDx 96 Molecular System. Ispitivanje NeuMoDx EBV Assay namijenjeno je za uporabu u postavljanju dijagnoze i praćenju infekcija EBV-om. Ispitivanje se može upotrebljavati za mjerenje razina DNK EBV-a radi procjene odgovora na antivirusnu terapiju. Ispitivanje je namijenjeno za uporabu u kombinaciji s kliničkom slikom i drugim laboratorijskim markerima napretka bolesti za kliničko zbrinjavanje i praćenje infekcije EBV-om. Ispitivanje nije namijenjeno za uporabu kao test probira na prisutnost EBV-a u krvi ili krvnim pripravcima.

SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Za pripremu plazme može se upotrebljavati humana puna krv prikupljena u sterilnim epruvetama za prikupljanje krvi koje sadrže EDTA kao antikoagulacijsko sredstvo. Kako bi se započelo testiranje, plazma u epruveti za ispitke kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se na nosač epruveta za ispitke i na radnu površinu sustava NeuMoDx System. Za svaki se ispitak alikvot uzorka plazme volumena 250 µl miješa s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 5 i sustav NeuMoDx System automatski izvodi sve korake potrebne za ekstrakciju ciljane nukleinske kiseline, pripremu izolirane DNK za PCR amplifikaciju u stvarnom vremenu i, ako su prisutni, amplifikaciju i detekciju produkata amplifikacije (dvije vrlo konzervirane regije u genomu EBV-a). Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay uključuje kontrolu obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) DNK za pomoć s praćenjem prisutnosti potencijalno inhibirajućih tvari te pogrešaka sustava NeuMoDx System ili reagensa koje se mogu dogoditi tijekom postupka ekstrakcije i amplifikacije.

EBV je uobičajeni dvolančani DNK virus iz porodice humanih herpesvirusa kojim se mogu zaraziti osobe svih dobnih skupina. Procjenjuje se da je > 90 % osoba diljem svijeta trenutno zaraženo EBV-om ili su bile zaražene u prošlosti.¹ EBV se širi putem tjelesnih tekućina kao što su slina, krv i sperma te putem transplantacije organa. Mnogi se zaraze EBV-om u djetinjstvu. Te osobe, iako su zaražene EBV-om, potpuno su asimptomatske. Osobe s oslabljenim imunitetom mogu razviti teže simptome i komplikacije od infekcije EBV-om. Latentna infekcija EBV-om predstavlja najveću opasnost za pacijente nakon transplantacije. Posttransplantacijski limfoproliferativni poremećaji (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLDs) uključuju stvaranje tumora uzrokovanog EBV-om u B stanicama zbog učinka imunosupresivnih sredstava na imunološku kontrolu EBV-a, jednog od najznačajnijih uzroka morbiditeta i smrtnosti kod pacijenata koji su podvrgnuti bilo kojoj vrsti transplantacije organa.²

Praćenje virusnog opterećenja EBV-a olakšava postavljanje dijagnoze i liječenje PTLD-a povezanog s EBV-om. Međutim, detekcija nukleinske kiseline EBV-a u krvi nije dovoljna za postavljanje dijagnoze PTLD-a povezanog s EBV-om. Testiranje nukleinske kiseline (Nucleic Acid Testing, NAT) treba se upotrebljavati samo u kombinaciji s drugim laboratorijskim markerima napretka bolesti za kliničko zbrinjavanje i praćenje pacijenata zaraženih EBV-om. Iako su trenutačne smjernice za zbrinjavanje i liječenje infekcija EBV-om u osoba s oslabljenim imunitetom dvosmislene u smislu razdoblja *kada* treba započeti antivirusnu terapiju, u svima se navodi potreba za stalnim praćenjem virusnog opterećenja nakon što se započne antivirusna terapija kao pomoć u ublažavanju teških nuspojava lijekova u takvim populacijama.^{3,4}

NAČELA POSTUPKA

Za ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay na sustavu NeuMoDx System upotrebljavaju se testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip, kalibrator NeuMoDx EBV Calibrator, kontrole NeuMoDx EBV External Control, pufer NeuMoDx Lysis Buffer 5 i NeuMoDx reagensi za opću uporabu za izvođenje analize. Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay kombinira automatiziranu ekstrakciju DNK, amplifikaciju i detekciju izvođenjem PCR-a u stvarnom vremenu. Ispitci pune krvi prikupljaju se u epruvete s EDTA radi pripreme plazme. Ispitak plazme u epruveti za ispitak kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se u nosač epruveta za ispitke i zatim postavlja na radnu površinu sustava NeuMoDx System radi obrade. Nije potrebna dodatna intervencija korisnika.

Za automatsko provođenje lize stanica i ekstrakcije DNK te za uklanjanje inhibitora sustavi NeuMoDx Systems služe se kombinacijom topline, litičkog enzima i ekstrakcijskih reagensa. Paramagnetske čestice hvataju oslobođene nukleinske kiseline. Čestice s vezanim nukleinskim kiselinama postavljaju se u uložak NeuMoDx Cartridge, gdje se nevezane komponente koje nisu dio DNK ispiru s pomoću reagensa NeuMoDx Wash Reagent, a vezana DNK se eluira s pomoću reagensa NeuMoDx Release Reagent. U sustavima NeuMoDx Systems eluirana DNK zatim se upotrebljava za rehidraciju patentiranih NeuDry™ reagensa za amplifikaciju koji sadrže sve elemente neophodne za PCR amplifikaciju ciljnih sekvenci specifičnih za EBV i kontrole SPC1. Nakon rekonstitucije reagensa za PCR NeuDry sustav NeuMoDx System pipetira pripremljenu mješavinu spremnu za PCR u uložak NeuMoDx Cartridge. Amplifikacija i detekcija kontrolnih i ciljnih DNK sekvenci (ako su prisutne) odvija se u PCR komori uložka NeuMoDx Cartridge. Uložak NeuMoDx Cartridge također je osmišljen da zadrži aplikon nakon PCR-a u stvarnom vremenu i na taj način praktički ukloni rizik od kontaminacije nakon amplifikacije.

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay cilja dvije vrlo konzervirane regije, BALF5 i BXFL1, u genomu EBV-a. Dizajn ispitivanja s dvije ciljne sekvence smanjuje rizik od lažno negativnih rezultata u slučaju mutacije čime se povećava otpornost ispitivanja. Amplificirane ciljne sekvence detektirane su u stvarnom vremenu s pomoću kemijskog protokola na temelju proba za hidrolizu (obično se naziva TaqMan® kemijski protokol) u kojem se upotrebljavaju fluorogene oligonukleotidne molekularne probe specifične za amplikone odgovarajućih ciljnih sekvenci.

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

TaqMan probe osmišljene su za sparivanje unutar regije DNK amplificirane određenim kompletom početnica. Kako DNK polimeraza Taq produžuje početnicu i sintetizira novi lanac, 5' do 3' egzonukleazna aktivnost DNK polimeraze Taq degradira probu sparenu s predložkom. Degradacijom probe oslobađa se fluorokrom i gubi se blizina prigušivaču, čime se zbog FRET-a prevladava učinak prigušivanja i omogućava fluorescentna detekcija fluorokroma. Dobiveni detektirani fluorescentni signal izravno je proporcionalan oslobođenom fluorokromu i može se korelirati s količinom prisutne ciljne DNK.

TaqMan proba označena fluorokromom (490/521 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju upotrebljava se za detekciju DNK bakterije EBV. Za detekciju kontrole SPC1 proba TaqMan obilježena je alternativnom fluorescentnom bojom (535/556 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju. Softver sustava NeuMoDx System prati fluorescentni signal koji emitiraju TaqMan probe na kraju svakog ciklusa amplifikacije. Kada amplifikacija završi, softver sustava NeuMoDx System analizira podatke i izvještava rezultat (POSITIVE (POZITIVNO) / NEGATIVE (NEGATIVNO) / INDETERMINATE (NEODREĐENO) / UNRESOLVED (NERAZRIJEŠENO)). Ako je rezultat POSITIVE (POZITIVNO), softver sustava NeuMoDx System također daje kvantitativnu vrijednost koja se odnosi na uzorak ili izvještava je li izračunata koncentracija izvan granica kvantifikacije.

REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
201500	Testna traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip <i>Suhi reagensi za PCR koji sadrže TaqMan probu i početnice specifične za EBV i SPC1.</i>	16	96

Dodatni materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni (mogu se naručiti zasebno od tvrtke NeuMoDx)

REF.	Sadržaj
100200	Pločica NeuMoDx Extraction Plate <i>Suhe paramagnetske čestice, litički enzim i kontrole obrade uzorka</i>
800500	Kalibratori NeuMoDx EBV Calibrators <i>Kompleti EBV kalibratora visoke i niske razine za jednokratnu uporabu za utvrđivanje valjanosti standardne krivulje</i>
900501	Kontrole NeuMoDx EBV External Controls <i>Kompleti pozitivnih i negativnih kontrola za EBV za jednokratnu uporabu za utvrđivanje svakodnevne valjanosti ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay</i>
400900	Pufer NeuMoDx Lysis Buffer 5
400100	Reagens NeuMoDx Wash Reagent
400200	Reagens NeuMoDx Release Reagent
100100	Uložak NeuMoDx Cartridge
235903	Vršci s filtrima (300 µl) Hamilton CO-RE / CO-RE II
235905	Vršci s filtrima (1000 µl) Hamilton CO-RE / CO-RE II

Potrebni instrumenti

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

UPOZORENJA I MJERE OPREZA

- Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay namijenjeno je samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx System.
- Ispitivanje se uvijek treba rukovati kao da su infektivni te u skladu sa sigurnim laboratorijskim postupcima poput onih opisanih u Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁵ te u dokumentu M29-A4 instituta CLSI.⁶
- Positivan rezultat upućuje na prisutnost DNK EBV-a.
- Radni učinak ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay ograničen je na osoblje obučeno za uporabu sustava NeuMoDx System i rukovanje infektivnim materijalom.
- Ne upotrebljavajte reagens ili potrošni materijal nakon navedenog datuma isteka roka trajanja.

- Ne upotrebljavajte reagens ako je zaštitna folija potrgana ili ako je pakiranje oštećeno po dolasku.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal ili reagens ako je zaštitna vrećica otvorena ili oštećena pri dolasku.
- Valjana kalibracija testa (dobivena obradom kalibratora visoke i niske razine NeuMoDx EBV Calibrators [REF. 800500]) mora biti dostupna prije dobivanja rezultata testa za kliničke uzorke.
- Vanjske kontrole NeuMoDx EBV External Controls [REF 900501] moraju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay.
- Minimalni volumen ispitka sekundarnih alikvota ovisi o veličini epruvete / nosaču epruveta za ispitke kako je navedeno u nastavku. Volumen manji od navedenog minimuma može rezultirati pogreškom „Quantity Not Sufficient” (Nedovoljna količina).
- Uporaba ispitaka koji su se čuvali pri neprikladnim temperaturama ili dulje od navedenog vremena pohrane može dati nevažne ili pogrešne rezultate.
- Uvijek izbjegavajte kontaminaciju svih reagensa i potrošnih materijala mikroorganizmima i deoksiribonukleazama (DNaza). Preporučuje se uporaba sterilnih jednokratnih pipeta za prijenos bez DNaze. Za svaki ispitak upotrebljavajte novu pipetu.
- Kako biste izbjegli kontaminaciju, ne rukujte uloškom NeuMoDx Cartridge i ne rastavljajte ga nakon amplifikacije. Nemojte vaditi uloške NeuMoDx Cartridges iz spremnika za biološki opasan otpad (NeuMoDx 288 Molecular System) ili koša za biološki otpad (NeuMoDx 96 Molecular System) ni u kojem slučaju. Uložak NeuMoDx Cartridge osmišljen je za sprječavanje kontaminacije.
- U slučajevima kada se u laboratoriju provode PCR testovi na otvorenim epruvetama, potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip, dodatnog potrošnog materijala i reagensa potrebnih za testiranje, osobne zaštitne opreme poput rukavica i laboratorijskih kuta te sustava NeuMoDx System.
- Pri rukovanju reagensima i potrošnim materijalom NeuMoDx potrebno je nositi čiste nitrilne rukavice bez pudera. Pazite da ne dodirujete gornju površinu uloška NeuMoDx Cartridge, površinu folije testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip ili pločice NeuMoDx Extraction Plate te gornju površinu spremnika pufera NeuMoDx Lysis Buffer 5; pri rukovanju potrošnim materijalom i reagensima smiju se dodirivati samo bočne površine.
- Sigurnosno-tehnički listovi (Safety Data Sheets, SDS) dostupni su na zahtjev.
- Nakon izvođenja testa temeljito operite ruke.
- Ne pipetirajte ustima. Ne pušite, ne konzumirajte hranu i piće u područjima u kojima se rukuje ispitcima ili reagensima.
- Odložite nekorištene reagens i otpad u skladu s državnim, savezним, pokrajinskim i lokalnim propisima.

POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

- Testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strips stabilne su u primarnom pakiranju do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci proizvoda kada se čuvaju na temperaturi od 18 do 23 °C.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal i reagens nakon datuma isteka roka trajanja.
- Ne upotrebljavajte bilo koji proizvod za testiranje ako je primarno ili sekundarno pakiranje vidljivo oštećeno.
- Nemojte ponovno postavljati nikakve proizvode za testiranje koji su prethodno bili postavljeni na drugi sustav NeuMoDx System.
- Nakon postavljanja testna traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip može ostati na sustavu NeuMoDx System 14 dana. Softver prati preostali uporabni vijek postavljenih testnih traka i obavještava korisnika u stvarnom vremenu. Sustav će zatražiti uklanjanje testne trake koja se upotrebljava dulje od dopuštenog razdoblja.
- Iako nisu infektivni, kalibratore NeuMoDx EBV Calibrators i kontrole NeuMoDx EBV External Controls nakon uporabe treba odložiti kao laboratorijski biološki opasan otpad kako bi se smanjio rizik od kontaminacije ciljnom nukleinskom kiselinom koju sadrže.

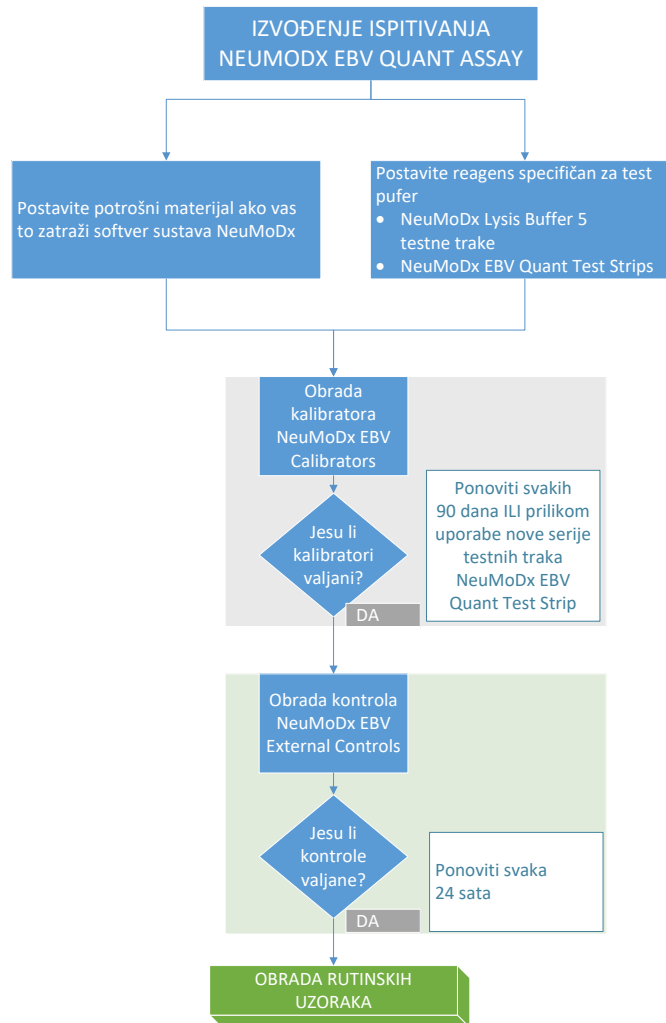
PRIKUPLJANJE, PRIJEVOZ I POHRANA ISPITAKA

Rukujte svim ispitcima kao da mogu prenijeti infektivne agense.

- Nemojte zamrzavati punu krv ni bilo kakve ispitke pohranjene u primarnim epruvetama.
- Za pripremu ispitaka plazme punu krv treba prikupiti u sterilne epruvete uz primjenu antikoagulansa EDTA. Pridržavajte se uputa proizvođača epruvete za prikupljanje ispitka.
- Puna krv prikupljena u gore navedenim proizvodima može se čuvati i/ili prenositi do 24 sata na temperaturi od 2 °C do 25 °C prije pripreme plazme. Priprema plazme treba se izvoditi u skladu s uputama proizvođača.
- Pripremljeni ispitci plazme mogu ostati na sustavu NeuMoDx System do 8 sati prije obrade. Ako je potrebno dodatno vrijeme pohrane, preporučuje se stavljanje ispitaka u hladnjak ili zamrzavanje.
- Pripremljeni ispitci plazme do testiranja moraju biti pohranjeni na temperaturi od 2 do 8 °C najviše 7 dana i na sobnoj temperaturi najviše 8 sati.
- Pripremljeni ispitci plazme mogu se pohraniti na temperaturi < -20 °C do 8 tjedana prije obrade; uzorci plazme ne bi trebali proći više od 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije uporabe.
 - Ako su uzorci zamrznuti, ostavite ih da se u potpunosti odmrznu dok ne dosegnu sobnu temperaturu (15 – 30 °C); promiješajte na vorteks miješalici za dobivanje ravnomjerno raspodijeljenog uzorka.
 - Nakon odmrzavanja uzoraka testiranje treba provesti u roku od 8 sati.
- Ako se ispitci otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.

- Jasno označite ispitke i naznačite da su ispitci za testiranje na EBV.
- Nastavite s odjeljkom Priprema testa.

Sažetak sveukupnog postupka izvođenja ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay prikazan je u nastavku na *slici 1*.



Slika 1: Tijek rada izvođenja ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay

UPUTE ZA UPOTREBU

Priprema za test

1. Nalijepite naljepnicu s crtičnim kodom za ispitak na epruvetu za ispitak kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System.
2. Prenesite alikvot plazme u epruvetu za ispitak s crtičnim kodom kompatibilnu sa sustavom NeuMoDx System u skladu s volumenima definiranim u nastavku:
 - Nosač epruveta za ispitke (32 epruvete): promjera 11 – 14 mm i visine 60 – 120 mm; minimalni volumen punjenja \geq 400 μ l
 - Nosač epruveta za ispitke (24 epruvete): promjera 14,5 – 18 mm i visine 60 – 120 mm; minimalni volumen punjenja \geq 850 μ l

Rad sustava NeuMoDx System

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

1. Popunite jedan ili više nosača testnih traka na sustavu NeuMoDx System testnim trakama NeuMoDx EBV Quant Test Strip(s) i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač/e testnih traka u sustav NeuMoDx System.
2. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, u nosače potrošnog materijala sustava NeuMoDx System dodajte potreban potrošni materijal i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač/e u sustav NeuMoDx System.
3. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, zamijenite reagense NeuMoDx Wash Reagent i NeuMoDx Release Reagent te prema potrebi ispraznite otpad od ispiranja ili koš za biološki opasan otpad.
4. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, prema potrebi obradite kalibratore Calibrators [REF. 800500] i/ili kontrole External Controls [REF. 900501]. Dodatne informacije o kalibratorima i kontrolama možete pronaći u odjeljku *Obrada rezultata*.
5. Postavite epruvetu/e s ispitkom/kalibratorom/kontrolom u standardni nosač 32 epruvete i pobrinite se da uklonite čepove sa svih epruveta za ispitke.
6. Postavite nosač epruveta za ispitke na bilo koji slobodan položaj na policu za automatsko postavljanje i s pomoću zaslona osjetljivog na dodir postavite nosač u sustav NeuMoDx System. Time će se pokrenuti obrada postavljenih ispitaka za identificirani/e test/ove.

OGRANIČENJA

- Testna traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx Systems.
- Radni učinak testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip utvrđen je za ispitke plazme pripremljene iz pune krvi prikupljene s antikoagulansom EDTA. Uporaba testne trake NeuMoDx EBV Quant Test Strip s drugim vrstama kliničkih ispitaka nije procijenjena i radne značajke testa za druge vrste ispitaka nisu poznate.
- Budući da detekcija virusa EBV ovisi o broju virusa prisutnih u uzorku, pouzdani rezultati ovise o propisnom prikupljanju, rukovanju i pohrani ispitaka.
- Kalibratori i vanjske kontrole moraju se obraditi prema preporukama na uputama proizvođača te, ako to zatraži sustav NeuMoDx System, prije obrade rutinskih kliničkih uzoraka.
- Pogrešni rezultati javljaju se zbog nepropisnog prikupljanja, rukovanja i pohrane uzoraka, tehničke pogreške ili pogrešne identifikacije epruvete za ispitke. Dodatno, lažno negativni rezultati javljaju se jer je broj virusnih čestica u uzorku niži od granice detekcije ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay.
- Rad na sustavu NeuMoDx System ograničen je na osoblje obučeno za uporabu sustava NeuMoDx System.
- Ako ne dođe do amplifikacije ciljane sekvence EBV-a i ciljane sekvence SPC1, prijavljuje se nevažeći rezultat (Indeterminate (Neodređeno) ili Unresolved (Nerazriješeno)) te je potrebno ponoviti test.
- Ako ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay ima rezultat Positive (Pozitivno), ali je vrijednost kvantifikacije izvan granica kvantifikacije, sustav NeuMoDx System prijavit će je li detektirani EBV *ispod* donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ili *iznad* gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- U slučaju da je detektirani EBV ispod LLoQ-a, ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay može se (po želji) ponoviti s drugim alikvotom ispitka.
- U slučaju da je detektirani EBV iznad ULoQ-a, ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay može se ponoviti s razrijeđenim alikvotom originalnog ispitka. Preporučuje se razrjeđenje u omjeru 1:100 ili 1:1000 plazmom negativnom na EBV ili diluansom Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare, Milford, MA). Sustav će automatski izračunati koncentraciju originalnog ispitka na sljedeći način: koncentracija originalnog ispitka = \log_{10} (faktor razrjeđivanja) + prijavljena koncentracija razrijeđenog uzorka, pod uvjetom da je faktor razrjeđivanja ispravno odabran u softveru prije ponavljanja.
- Povremena prisutnost inhibitora PCR-a u plazmi može uzrokovati kvantifikacijsku pogrešku sustava; ako do toga dođe, preporuča se ponoviti test s istim ispitkom razrijeđenim diluansom Basematrix u omjeru 1:10 ili 1:100.
- Pozitivan rezultat ne naznačava nužno prisutnost aktivne infekcije virusom. Točnije, pozitivan rezultat upućuje na vjerojatnu prisutnost DNK virusa Epstein-Barrova virusa.
- Iako je mogućnost vrlo niska, delecije ili mutacije u objema konzerviranim regijama genoma EBV-a koje su ciljane ispitivanjem NeuMoDx EBV Quant Assay mogu utjecati na detekciju ili mogu dovesti do pogrešnih rezultata kada se upotrebljava testna traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay trebaju se upotrebljavati kao dodatak kliničkim opažanjima i ostalim informacijama koje su liječniku dostupne; test nije namijenjen dijagnosticiranju infekcije.
- Preporučuje se dobra laboratorijska praksa, uključujući mijenjanje rukavica između rukovanja ispitcima pacijenata, kako bi se izbjegla kontaminacija.

OBRADA REZULTATA

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

Rezultate ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay automatski generira softver sustava NeuMoDx System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx EBV (EBV Assay Definition File, EBV ADF). Rezultat ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay može se prijaviti kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom EBV-a, Positive (Pozitivno) iznad ULoQ, Positive (Pozitivno) ispod LLoQ, Indeterminate (Neodređeno) ili Unresolved (Nerazriješeno) na temelju statusa amplifikacije ciljne sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultati se prijavljuju na temelju algoritma odlučivanja u *tablici 1*.

Tablica 1: Algoritam odlučivanja ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay

Rezultat	EBV	Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Pozitivno)	$[2 \leq Ct \leq 9 \text{ AND (I) } EPR > 2 \text{ AND (I) } EP \geq 1500]$ OR (ILI) $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND (I) } EP \geq 1500]$	N/P
Positive (Pozitivno), iznad gornje granice kvantifikacije [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (\log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONC.) $> 8,0 \log_{10}$ IU/ml, NO QUANT (NEMA KVANT.)	N/P
Positive (Pozitivno), ispod donje granice kvantifikacije [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (\log_{10} IU/ml)	[CONC] (KONC.) $< 2,3 \log_{10}$ IU/ml, NO QUANT (NEMA KVANT.)	N/P
Negative (Negativno)	N/A (N/P) OR (ILI) $[2 \leq Ct < 9 \text{ AND (I) } EPR \leq 2]$ OR (ILI) $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND (I) } EP < 1500]$ OR (ILI) $Ct > 38$	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) ($29 \leq Ct \leq 35$) and (i) $EP \geq 2000$
Indeterminate (Neodređeno)	NOT AMPLIFIED/ Systems Errors Noted (NIJE AMPLIFICIRANO / uočene pogreške sustava)	
Unresolved (Nerazriješeno)	NOT AMPLIFIED/ No System Errors Noted (NIJE AMPLIFICIRANO / Nema uočenih pogrešaka sustava)	

EP = End Point Fluorescence (Fluorescencija krajnje točke) (nakon korekcije osnovne vrijednosti); EPR = End Point Fluorescence Ratio (Omjer fluorescencija krajnjih točaka); C_t = Cycling threshold (Prag cikliranja); Quant (Kvant.) = izračunata količina prisutnog EBV-a izražena u \log_{10} IU/ml. Pogledajte Izračun testa u nastavku.

Izračun testa

- Za uzorke unutar raspona kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay koncentracija DNK EBV-a u uzorcima izračunata je s pomoću pohranjene standardne krivulje u kombinaciji s koeficijentom kalibracije.
 - „Koeficijent kalibracije” izračunava se na temelju rezultata dobivenih kalibratorima NeuMoDx EBV Calibrators koji su obrađeni kako bi se utvrdila valjanost standardne krivulje za svaku seriju testnih traka NeuMoDx EBV Quant Test Strips, na određenom sustavu NeuMoDx System.
 - Sustav automatski uključuje koeficijent kalibracije u konačno određivanje koncentracije DNK EBV-a.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay izraženi su u \log_{10} IU/ml.
- Dobivena kvantifikacija nepoznatih uzoraka sljediva je do 1. Međunarodnog standarda za tehnike amplifikacije nukleinske kiseline Epstein-Barrova virusa SZO-a.

Kalibracija testa

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

kalibratori

- Kalibratori NeuMoDx EBV Calibrators isporučuju se u kompletu [REF. 800500] i sadržavaju neinfektivnu enkapsuliranu ciljnu sekvencu EBV-a pripremljenu u diluensu Basematrix.
- Komplet kalibratora za EBV treba obraditi sa svakom novom serijom testnih traka NeuMoDx EBV Quant Test Strips, ako se nova datoteka definicije ispitivanja za EBV učita na sustav NeuMoDx System, ako je trenutno postavljeno kompletno kalibratora premašio razdoblje valjanosti (postavljeno na 90 dana) ili ako je softver sustava NeuMoDx System izmijenjen.
- Softver sustava NeuMoDx System obavijestit će korisnika kada treba obraditi kalibratore; nova serija testnih traka ne može se upotrebljavati dok kalibratori nisu uspješno obrađeni.

4. Valjanost kalibracije određuje se na sljedeći način:
 - a) Komplet koji sadrži dva kalibratora, visoke i niske razine, treba obraditi kako bi se utvrdila valjanost.
 - b) Za dobivanje valjanih rezultata barem 2 od 3 ponavljanja moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara. Nominalna ciljna vrijednost kalibratora niske razine iznosi $4 \log_{10}$ IU/ml, a nominalna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi $6 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Koeficijent kalibracije izračunat je kako bi se ispravila očekivane varijacija između serija testnih traka; taj koeficijent kalibracije upotrebljava se za određivanje konačne koncentracije EBV-a.
5. Ako provjera valjanosti nije uspjela za jedan ili oba kalibratora, ponovite obradu neuspjelog/ih kalibratora primjenom nove bočice. U slučaju neuspjele provjere valjanosti jednog kalibratora, moguće je ponoviti obradu samo neuspjelog kalibratora jer sustav od korisnika ne zahtijeva ponovnu obradu oba kalibratora.
6. Ako provjera valjanosti kalibratora ne uspije drugi uzastopni put, obratite se tvrtki NeuMoDx Molecular, Inc.

Kontrola kvalitete

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

Vanjske kontrole

1. Vanjske kontrolne materijale, koji sadrže neinfektivnu enkapsuliranu ciljnu sekvencu EBV-a u diluensu Basematrix za pozitivne kontrole, isporučuje tvrtka NeuMoDx Molecular, Inc. u sklopu kompleta koji sadrži NeuMoDx EBV External Controls [REF. 900501].
2. Pozitivne i negativne vanjske kontrole trebaju se obraditi jednom svaka 24 sata. Ako nema kompleta valjanih vanjskih kontrola, softver sustava NeuMoDx System od korisnika će zatražiti da obradi te kontrole prije nego što se rezultati za uzorak mogu prijaviti.
3. Ako su potrebne vanjske kontrole, uzmite komplet vanjskih kontrola iz zamrzivača i ostavite bočice da se odmrznu dok ne dosegnu sobnu temperaturu ($15 - 30$ °C). Nježno promiješajte na vorteks miješalici kako biste osigurali homogenost.
4. S pomoću zaslona osjetljivog na dodir i nosača epruveta za ispitke postavljenog na policu za automatsko postavljanje postavite bočice s pozitivnim i negativnim kontrolnim materijalom u sustav NeuMoDx System. Sustav NeuMoDx System prepoznaje crtični kod i započinje obradu epruveta s ispitcima, osim ako reagensi ili potrošni materijal nužni za testiranje nisu dostupni.
5. Valjanost vanjskih kontrola procijenit će se na sustavu NeuMoDx System na temelju očekivanih rezultata. Pozitivna kontrola trebala bi dati rezultat Positive (Pozitivno) na EBV, a negativna kontrola trebala bi dati rezultat Negative (Negativno) na EBV.
6. U slučaju nepodudarnih rezultata vanjskih kontrola treba postupiti na sljedeći način:
 - a) Rezultat testiranja Positive (Pozitivno) prijavljen za negativan kontrolni uzorak ukazuje na problem kontaminacije ispitka.
 - b) Rezultat testiranja Negative (Negativno) prijavljen za pozitivan kontrolni uzorak može ukazivati na problem povezan s reagensima ili instrumentom.
 - c) U bilo kojem od gore navedenih slučajeva ponovite obradu neuspjelih kontrola NeuMoDx EBV External Control(s) sa svježih odmrznutih bočicama kontrola čiji test valjanosti nije uspio.
 - d) Ako se za pozitivnu kontrolu NeuMoDx EBV External Control i dalje dobiva rezultat Negative (Negativno), obratite se korisničkoj službi tvrtke NeuMoDx.
 - e) Ako se za negativnu kontrolu NeuMoDx EBV External Control i dalje dobiva rezultat Positive (Pozitivno), pokušajte ukloniti sve izvorne potencijalne kontaminacije, što uključuje zamjenu SVIH reagensa i potrošnih materijala, prije nego što se obratite korisničkoj službi tvrtke NeuMoDx.

Kontrole obrade uzorka (unutarnje)

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

Ako ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay koje se izvodi na sustavu NeuMoDx System ne uspije dati valjani rezultat, prijavljuje se kao Indeterminate (IND) (Neodređeno) ili Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) ovisno o vrsti pogreške koja se pojavila.

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

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

RADNE ZNAČAJKE

Analitička osjetljivost – granica detekcije primjenom standarda SZO-a

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay potvrđena je testiranjem ispitaka plazme negativnih na EBV u koje je dodana slabo razrijeđena otopina 1. Međunarodnog standarda za tehnike amplifikacije nukleinske kiseline EBV-a SZO-a. Taj potvrdni test proveden je pri očekivanoj granici detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay na sustavima NeuMoDx Systems pri 200 IU/ml. LoD je definirana kao najniža ciljna razina koja se može detektirati pri stopi $\geq 95\%$. Ispitivanje je provedeno na više sustava s odobrenim serijama reagensa NeuMoDx. Stope detekcije prikazane su u *tablici 2*.

Tablica 2: Određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay; pozitivna stopa detekcije za ispitke plazme

Ciljna koncentracija [IU/ml]	PLAZMA		
	Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
200	120	117	97,5 %
0	60	0	0 %

Analitička osjetljivost – donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

Donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) definira se kao donja ciljna razina pri kojoj se postiže stopa detekcije $> 95\%$ i ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) $\leq 1,0$. Kako bi se potvrdilo da je LoD kao i LLoQ ispitivanja EBV Quant Assay iznosi 200 IU/ml, rezultati ispitivanja stope uspješnosti upotrebljavali su se kako bi se odredio TAE. TAE je izračunat na sljedeći način:

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

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

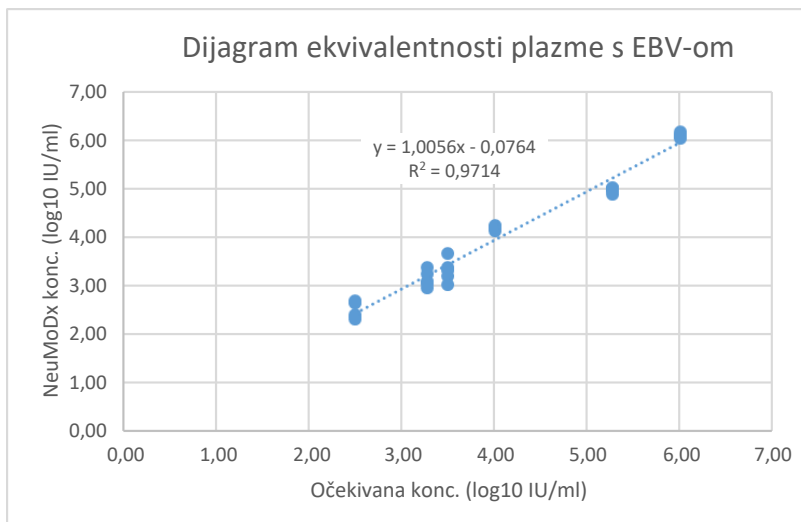
Tablica 3: LLoQ ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay s odstupanjem i TAE

Ciljna konc. [IU/ml]	Ciljna konc. [\log_{10} IU/ml]	Plazma				
		Prosječna konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE
200	2,30	2,35	97,5	0,28	0,05	0,61

Na temelju rezultata tih ispitivanja, utvrdilo se da LoD kao i LLoQ ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay iznose 200,0 IU/ml [$2,30 \log_{10}$ IU/ml].

Linearnost i određivanje gornje granice određivanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearnost i gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay utvrđeni su iz plazme pripremom serije razrijeđenja NeuMoDx enkapsulirane ciljne sekvence EBV-a i kontrole Exact EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) uz utvrđenu sljedivost do 1. međunarodnog standarda za EBV SZO-a. Panel s 10 sastavnica pripremljen je u poolu plazme negativne na EBV za izradu panela koji obuhvaća raspon koncentracije $2,0 - 8,0 \log_{10}$ IU/ml. Utvrđeno je da ULoQ ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay iznosi $8,0 \log_{10}$ IU/ml. Pripremljen je potvrdni panel za procjenu linearnosti standardne krivulje i koncentracije ispitivanja za EBV koje je prijavio sustav NeuMoDx System uspoređene s očekivanim vrijednostima prikazane su na *slici 2*.



Slika 2: Linearnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay

Analitička specifičnost – križna reaktivnost

Analitička specifičnost dokazana je probirom na 35 organizama koji se mogu pronaći u ispitcima krvi/plazme te na vrste filogenetski slične EBV-u radi utvrđivanja križne reaktivnosti. Organizmi pri visokim koncentracijama pripremljeni su u poolovima koji su sadržavali 5 – 6 organizama. Testirani organizmi prikazani su u *tablici 4*. Nije uočena križna reaktivnost s bilo kojim od testiranih organizama, čime je potvrđena 100 %-tna analitička specifičnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay.

Tablica 4: patogeni korišteni za dokazivanje analitičke specifičnosti

Organizmi koji nisu ciljani ispitivanjem					
BK poliomavirus	Adenovirus tipa 5	Virus herpesa simplex tipa 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Citomegalovirus	Virus hepatitisa C	Virus herpesa simplex tipa 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Humani herpes virus tipa 6	Parvovirus B19	Virus varicella-zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Humani herpes virus tipa 7	JC virus	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Humani herpes virus tipa 8	Humani papiloma virus tipa 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus hepatitisa B	Humani papiloma virus tipa 18	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, komenzalni organizmi

Interferencija ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay procijenjena je u prisutnosti organizama koji nisu ciljani ispitivanjem primjenom istih poolova organizama pripremljenih za testiranje križne reaktivnosti navedenih gore u *tablici 4*. U plazmu negativnu na EBV dodani su poolovi organizama u skupinama od 4 – 7; u te je poolove zatim dodana ciljna sekvenca EBV-a pri koncentraciji od 3 log₁₀ IU/ml. Nije uočena značajna interferencija u prisutnosti tih organizama na što ukazuje minimalna devijacija određivanja od kontrolnih ispitaka koji ne sadrže interferirajuće agense.

Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, endogene i egzogene tvari

Ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay procijenjeno je u prisutnosti uobičajenih egzogenih i endogenih interferirajućih tvari pronađenih u kliničkim ispitcima plazme s EBV-om. To je uključivalo abnormalno visoke razine komponenti krvi te uobičajene antivirusne i imunosupresivne lijekove, klasificirane u *tablici 5*. Svaka tvar dodana je u probranu humanu plazmu negativnu na EBV u koju je dodano 3 log₁₀ IU/ml EBV-a i uzorci su analizirani kako bi se utvrdila interferencija. Osim toga, plazme pacijenata s uobičajenim stanjima bolesti povezanim s infekcijom EBV-om također su testirane kako bi se utvrdila potencijalna interferencija. Prosječna koncentracija i odstupanje svih tvari ispitano je u usporedbi s kontrolnim uzorcima u koje je dodana jednaka razina EBV-a navedeni su u *tablici 6*. Nijedna od egzogenih i endogenih tvari nije utjecala na specifičnost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay.

Tablica 5: testiranje interferencije – egzogeni agensi (klasifikacija lijekova)

Pool	Naziv lijeka	Klasifikacija	Pool	Naziv lijeka	Klasifikacija
Pool 1	Azatioprin	Imunosupresiv	Pool 4	Trimetoprim	Antibiotik
	Ciklosporin	Imunosupresiv		Vankomicin	Antibiotik
	Foskarnet	Antivirusni (Herpesviridae)		Takrolimus	Imunosupresiv
	Ganciklovir	Antivirusni (EBV)		Everolimus	Imunosupresiv
	Valganciklovir hidroklorid	Antivirusni (EBV)		Kalijev klavulanat	Antibiotik
Pool 2	Prednizon	Kortikosteroid/imunosupresiv	Pool 5	Famotidin	Antagonist receptora histamina
	Cidofovir	Antivirusni (EBV)		Sulfametoksazol	Antibiotik
	Cefotetan	Antibiotik (širokog spektra)		Valaciklovir	Antivirusni (Herpesviridae)
	Cefotaksim	Antibiotik (širokog spektra)		Letermovir	Antivirusni (EBV)
	Flukonazol	Antifungalni		Dinatrijev tikarcilin	Antibiotik
Pool 3	Mikofenolat mofetil	Imunosupresiv	Leflunomid	Imunosupresiv	
	Mikofenolat-natrij	Imunosupresiv			
	Piperacilin	Antibiotik			
	Sirolimus/rapamicin	Imunosupresiv			
	Tazobaktam	Modificirani antibiotik			

Tablica 6: Testiranje interferencije – egzogeni i endogeni agensi

Endogeni	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Hemoglobin	3,20	0,23
Trigliceridi	3,15	0,28
Bilirubin	3,48	-0,05
Albumin	3,2	0,22
Egzogeno (lijekovi)	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Pool 1: azatioprin, ciklosporin, foskarnet, ganciklovir, valganciklovir hidroklorid	3,30	0,13
Pool 2: prednizon, cidofovir, cefotetan, cefotaksim, flukonazol	3,22	0,21
Pool 3: mikofenolat mofetil, mikofenolat-natrij, piperacilin, sirolimus/rapamicin, tazobaktam	3,36	0,07
Pool 4: trimetoprim, vankomicin, takrolimus, everolimus, kalijev klavulanat	3,32	0,11
Pool 5: famotidin, sulfametoksazol, letermovir, valaciklovir, dinatrijev tikarcilin, leflunomid	3,47	-0,10
Stanje bolesti	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Sistemski eritemski lupus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,23	0,20
Antinuklearno protutijelo (Antinuclear Antibody, ANA)	3,33	0,10
Reumatoidni artritis (Rheumatoid Arthritis, RA)	3,19	0,24

Preciznost unutar laboratorija

Preciznost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay određena je testiranjem 3 ponavljanja panela ispitaka EBV-a s 4 sastavnice pripremljenih s kontrolom EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) triput dnevno na dva sustava NeuMoDx 288 System i jednom sustavu NeuMoDx 96 System tijekom dva dana. Određene su preciznosti unutar obrade, unutar dana i unutar sustava i utvrđena je sveukupna standardna devijacija od $\leq 0,33 \log_{10}$ IU/ml. Dokazana je izvrsna preciznost na svim sustavima, tijekom svih dana i tijekom svih obrada kao što je prikazano u *tablici 7*. Preciznost između korisnika nije određena jer korisnik ne igra značajnu ulogu u obradi uzoraka na sustavu NeuMoDx System.

Tablica 7: Preciznost unutar laboratorija – ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay na sustavima NeuMoDx Systems

Ciljna konc. EBV-a [log ₁₀ IU/ml]	Prosječna konc. EBV-a [log ₁₀ IU/ml]	SD unutar sustava	SD unutar dana	SD unutar obrade	Sveukupni SD (unutar laboratorija)
5,2	5,30	0,27	0,25	0,25	0,27
4,2	4,25	0,21	0,21	0,12	0,21
3,2	3,38	0,22	0,20	0,20	0,22
2,7	3,03	0,30	0,30	0,30	0,33

Obnovljivost među serijama

Obnovljivost ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay među serijama određena je s pomoću tri serije ključnih reagensa, testnih traka NeuMoDx EBV Quant Test Strips i pufera Lysis Buffer 5, u sklopu kvalifikacijskog ispitivanja (Qualification Testing, QT). Panel plazme pozitivne na EBV s 4 sastavnice upotrebljavao se za procjenu radnog učinka (*tablica 8*). Varijacije unutar serija i među serijama analizirane su i rezultati su prikazani u *tablicama 8 – 9*. Maksimalno sveukupno odstupanje iznosilo je 0,03 log₁₀ IU/ml, a maksimalna sveukupna standardna devijacija (SD) iznosila je 0,20 log₁₀ IU/ml za testne trake NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strips. Maksimalno sveukupno odstupanje iznosilo je 0,12 log₁₀ IU/ml, a maksimalna sveukupna standardna devijacija (SD) iznosila je 0,41 log₁₀ IU/ml za pufer NeuMoDx Lysis Buffer 5. Ekvivalentan radni učinak dokazan je među serijama jer je određivanje svih sastavnica panela bilo unutar specifikacije tolerancije.

Tablica 8: Obnovljivost među serijama – testna traka NeuMoDx EBV Quant Assay, Test Strip

Ciljna konc. EBV-a [IU/ml]	Prosječna konc. EBV-a [log ₁₀ IU/ml]	N (valjani rezultati po seriji)	Odstupanje	SD među serijama	SD unutar serije	Sveukupni SD
5,0	4,98	18	0,02	0,06	0,08	0,10
4,0	3,98	18	0,02	0,08	0,09	0,12
3,0	3,02	18	0,02	0,06	0,10	0,12
2,0	2,03	18	0,03	0,05	0,20	0,20

Tablica 9: Obnovljivost među serijama – pufer NeuMoDx EBV Quant Assay Lysis Buffer 5

Ciljna konc. EBV-a [log ₁₀ IU/ml]	Prosječna konc. EBV-a [log ₁₀ IU/ml]	N (valjani rezultati po seriji)	Odstupanje	SD među serijama	SD unutar serije	Sveukupni SD
5,0	4,97	5	0,03	0,05	0,03	0,06
4,0	3,96	5	0,04	0,22	0,10	0,24
3,0	3,03	5	0,03	0,09	0,11	0,15
2,0	2,12	5	0,12	0,39	0,13	0,41

Učinkovitost kontrole obrade uzorka

Kontrola obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) uključena je u ispitivanje NeuMoDx EBV Quant Assay za prijavljivanje neuspjelih koraka obrade ili inhibicija koje utječu na radni učinak ispitivanja. Primjenom ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay kao modela, učinkovitost SPC1 testirana je za ispitke plazme pod uvjetima koji predstavljaju ključne neuspjele korake obrade koji bi se potencijalno mogli dogoditi tijekom obrade uzoraka i koje *možda nisu detektirali* senzori za praćenje radnog učinka sustava NeuMoDx System. Ispitci pozitivni na citomegalovirus (od 3 log₁₀ IU/ml) i negativni ispiti ispitani su pod sljedećim uvjetima: prisutnost inhibitora, nije dovedena otopina za ispiranje i nema ispuštanja reagensa za ispiranje. Neučinkovitosti obrade koje su imale negativan utjecaj na detekciju/određivanje ciljne sekvence virusa odražavale su učinkovitost detekcije ciljne sekvence SPC1 kao što je prikazano u *tablici 10*. U svim testiranim slučajevima, pokazalo se ili da su kontrolom obrade uzorka na odgovarajući način uočene neučinkovitosti obrade i prisutnost inhibitora ili da očekivana neučinkovitost u obradi nije imala značajan negativni učinak na detekciju SPC1 ni detekciju ili određivanje ciljne sekvence virusa. Stoga se pokazala uspješnost SPC1 u učinkovitom praćenju radnog učinka ispitivanja na sustavu NeuMoDx System.

Tablica 10: učinkovitost kontrole obrade uzorka na virusnu DNK u plazmi*

Testiran neuspjeli korak obrade	Status amplifikacije kontrole obrade uzorka 1	Status amplifikacije ciljne sekvence CMV-a	Rezultat ispitivanja
Presence of Inhibitor (Prisutnost inhibitora)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Unresolved (Nerazriješeno)
No Wash Delivered (Nije doveden reagens za ispiranje)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Not Amplified (Nije amplificirano)	Unresolved (Nerazriješeno)
No Wash Blowout (Nema ispuštanja reagensa za ispiranje)	Amplified (Amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	Positive (Pozitivno) s kvantifikacijom unutar 0,3 log ₁₀ IU/ml kontrole

*Citomegalovirus (Cytomegalovirus, CMV) u ispitcima plazme upotrebljavao se kao model za procjenu učinkovitosti kontrole obrade uzorka.

Križna kontaminacija

Stopa križne kontaminacije za ispitke plazme utvrđena je naizmjeničnom obradom uzoraka visoko pozitivnih i negativnih na sličan DNK virus koji se prenosi krvlju, citomegalovirus (CMV). Tri skupa takvih naizmjeničnih testiranja provedena su s ukupno 108 ponavljanja plazme negativne na CMV i 108 ponavljanja plazme u koju je dodan CMV pri koncentraciji od 6,0 log₁₀ IU/ml. Svih 108 ponavljanja obrade negativnog ispitka dala su negativan rezultat, što pokazuje da ne dolazi do nikakve križne kontaminacije tijekom obrade uzoraka plazme na sustavu NeuMoDx System.

Ekvivalentnost matrice ispitka

Testiranje je provedeno kako bi se dokazala ekvivalentnost između svježih i zamrznutih ispitaka plazme primjenom sličnog virusa koji se prenosi krvlju, CMV, kao modela. Svježi ispitci čuvali su se na 4 °C sve dok u njih nisu dodane tri razine CMV-a i dok nije provedeno testiranje ekvivalentnosti. Zatim su uzorci zamrznuti u trajanju od najmanje 24 sata na temperaturi od -20 °C. Nakon tog razdoblja pohrane u zamrznutom stanju ispitci su odmrznuti i ponovno testirani. Rezultati svježih i zamrznutih ispitaka plazme uspoređeni su metodom regresijske analize kako bi se utvrdila ekvivalentnost. Podaci su pokazali izvrsnu ekvivalentnost između svježih i zamrznutih ispitaka plazme s nagibom od 1,0 i vrlo niskim odstupanjem (odsječak), kao što je prikazano u *tablici 11* u nastavku.

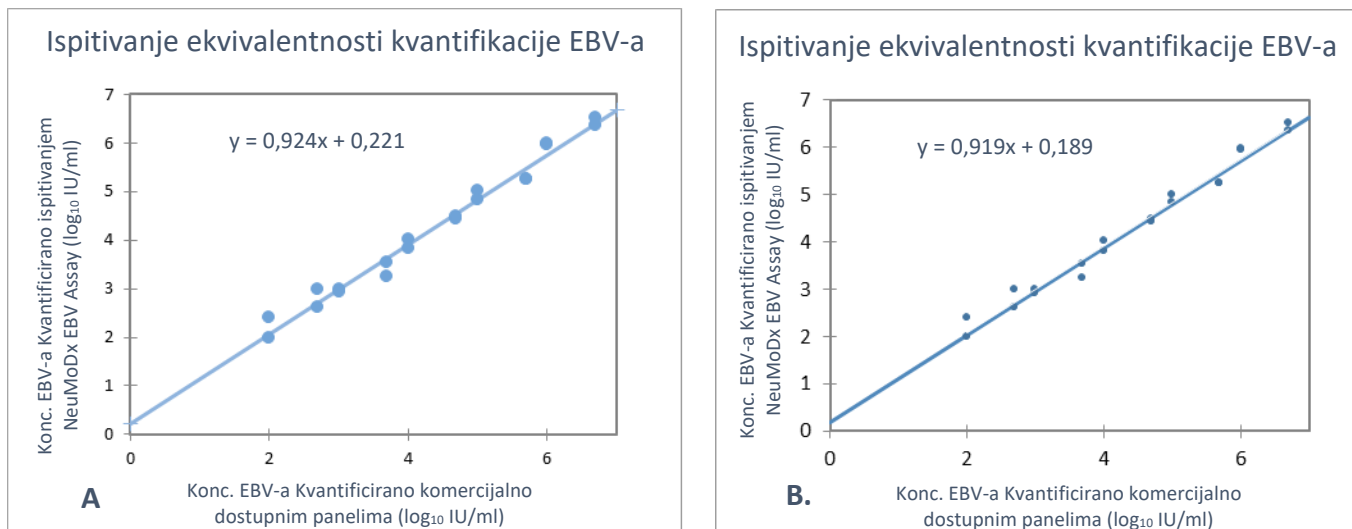
Tablica 11: ekvivalentnost matrice ispitka

Zahtjevi u pogledu parametara	Svježi u odnosu na zamrznute ispitke s EDTA
Nagib [0,9 – 1,1]	1,000
Odsječak < 0,5 log ₁₀ IU/ml	0,020
<i>p</i> -vrijednost > 0,05	0,631

Određivanje radnog učinka kvantifikacije

Kvantitativni radni učinak ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay određen je obradom dvaju komercijalno dostupnih panela za provjeru EBV-a proizvođača AcroMetrix i Exact Diagnostics (sljedivo do 1. Međunarodnog standarda za EBV SZO-a) na sustavima NeuMoDx Molecular Systems.

Pokazana je izvrsna korelacija između ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay i dvaju komercijalno dostupnih panela za provjeru EBV-a (*slika 3*) analizom Demingovom regresijom (*slika 3A*) ili Passing-Bablokovom metodom (*slika 3B*).



Slika 3. Dijagram ekvivalentnosti između panela za provjeru proizvođača AcroMetrix i Exact Diagnostics te ispitivanja NeuMoDx EBV Quant Assay.

A. Linearna regresijska analiza Demingovom metodom. B. Linearna regresijska analiza Passing-Bablokovom metodom.

Kvaliteta prilagodbe Demingovom regresijom ilustrirana je sveukupnim koeficijentom nagiba od 0,92 i odsječka (odstupanja) od 0,22, što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx EBV Quant Assay i panelima za provjeru EBV-a imaju korelaciju s prihvatljivim odstupanjem. Prilagodba Passing-Bablokovom metodom linearne regresije također pokazuje značajnu korelaciju između rezultata dobivenih ispitivanjem NeuMoDx EBV Quant Assay i panelima za provjeru EBV-a sa sveukupnim koeficijentom nagiba od 0,92 i odsječkom (odstupanjem) od 0,19. Izračunato je da je p -vrijednost Passing-Bablokove analize 0,40.

Tablica 12: sažetak linearne regresijske analize Demingovom i Passing-Bablokovom metodom

Demingova analiza		Passing-Bablokova analiza	
Odsječak	Koeficijent nagiba	Odsječak	Koeficijent nagiba
0,22	0,92	0,19	0,92
95 %-tni CI (-0,11, 0,55)	95 %-tni CI (0,86, 0,99)	95 %-tni CI (-0,08, 0,41)	95 %-tni CI (0,87, 0,99)

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. Evidence based clinical practice guideline for management of EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) in solid organ transplant. Cincinnati Children’s Hospital Medical Center. 2011- June, revised Jan, 2012.
<https://www.guidelinecentral.com/summaries/evidence-based-clinical-practice-guideline-for-management-of-ebv-associated-post-transplant-lymphoproliferative-disease-ptld-in-solid-organ-transplant/>
4. Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients. American Journal of Transplantation 2009; 9 (Suppl 4): S87–S96. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02898.x
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

ZAŠTITNI ZNAKOVI















NeuMoDx™ je zaštitni znak tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry™ je zaštitni znak tvrtke NeuMoDx Molecular, Inc.

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

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

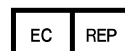
SIMBOLI

SIMBOL	ZNAČENJE
R only	Za uporabu samo uz recept
	Proizvođač
	Medicinski proizvod za <i>in vitro</i> dijagnostiku
	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici
	Kataloški broj
	Kôd šarže
	Upotrijebiti do
	Temperaturno ograničenje
	Ograničenje vlage
	Nije za ponovnu uporabu
	Sadrži dovoljno za <n> testova
	Pročitajte upute za upotrebu
	Oprez
	Biološke opasnosti
	Oznaka CE



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

Naručitelj (Australija):
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



Tehnička podrška / izvještaj o kontroli sigurnosti: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents