

REF 201501 NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip 2.0

R only

POZOR: Samo za izvoz v ZDA

IVD Za diagnostično uporabo *in vitro* s sistemoma NeuMoDx 288 in NeuMoDx 96 Molecular Systems

 Za posodobitve vstavkov obiščite: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 288 Molecular System; št. dela 40600108

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 96 Molecular System; št. dela 40600317

NAMEN UPORABE

NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je avtomatizirani *in vitro* amplifikacijski test nukleinske kisline za kvantifikacijo DNK humanega virusa Epstein-Barr (Epstein-Barr virus, EBV) v EDTA plazmi imunokompromitiranih pacientov po presaditvi.

NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, ki se izvaja v sistemih NeuMoDx 288 Molecular System in NeuMoDx 96 Molecular System, vključuje avtomatizirano ekstrakcijo DNK za izolacijo ciljnih nukleinskih kislin iz primerka ter PCR v realnem času, ki cilja na dve visoko ohranjeni regiji v genomu EBV.

Test je namenjen za uporabo kot pripomoček za spremljanje ravni DNK virusa EBV v periferni krvi za oceno virološkega odziva na zdravljenje. Ta test je namenjen za uporabo skupaj s klinično predstavitvijo in drugimi laboratorijskimi označevalci napredka bolezni za klinično vodenje in spremljanje okužbe s EBV.

Test ni namenjen kot presejalni test za prisotnost DNK virusa EBV v krvi ali krvnih proizvodih. NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je namenjen za uporabo s strani usposobljenega osebja v kliničnih laboratorijih, kjer so posebej izučeni in usposobljeni za tehnike PCR v realnem času ter *in vitro* diagnostične postopke in/ali sisteme NeuMoDx Molecular Systems. NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ni namenjen za samotestiranje ali za uporabo na kraju oskrbe.

POVZETEK IN RAZLAGA

Za pripravo plazme se lahko uporabi človeška polna kri, odvzeta v sterilne epruvete za odvzem krvi, ki vsebujejo EDTA kot antikoagulant. Za začetek testiranja se plazma v epruveti s primerki, združljivi s sistemom NeuMoDx System, položi v prenosnik za epruvete s primerki in naloži na delovno mizo sistema NeuMoDx System. Za vsak primerek se zmeša 550 µl alikvota vzorca plazme s pufrom NeuMoDx Lysis Buffer 1 in sistem NeuMoDx System samodejno izvede vse korake, potrebne za ekstrakcijo ciljnih nukleinske kisline, pripravo izolirane DNK za amplifikacijo PCR v realnem času ter amplifikacijo in zaznavo proizvodov amplifikacije, če so prisotni (dve visoko ohranjeni regiji v genomu EBV). NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 vključuje kontrolo obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) DNK, ki pomaga nadzorovati prisotnost potencialno inhibitornih snovi ter napak sistema NeuMoDx System ali reagenta, do katerih lahko pride med postopkom ekstrakcije in amplifikacije.

EBV je običajen DNK virus z dvojno vijačnico iz družine humanih herpesvirusov, ki napadajo ljudi vseh starosti. Ocenjeno je, da je bilo ali je z EBV okuženih > 90 % vseh ljudi na svetu.¹ EBV se širi s telesnimi tekočinami, kot so slina, kri in sperma, in pri presaditvah organov. Številni ljudje se z EBV okužijo v času otroštva. Ti posamezniki so običajno asimptomatski, čeprav so okuženi z EBV. Imunokompromitirani ljudje lahko ob okužbi z EBV razvijejo resnejše simptome z zapleti. Največje tveganje za paciente po presaditvi predstavlja latentna okužba z EBV. Posttransplantacijske limfoproliferativne bolezni (Post-transplant Lymphoproliferative Disorder, PTLD) vključujejo nastajanje tumorjev zaradi EBV v B celicah zaradi učinka imunosupresivnih agentov na imunski nadzor nad EBV, kar je eden najpomembnejših vzrokov obolevnosti in umrljivosti pri pacientih, ki so vključeni v karkršnokoli presaditev organa.²

Spremljanje virusnega bremena EBV se lahko uporablja v pomoč pri diagnozi in vodenju posttransplantacijskih limfoproliferativnih bolezni (Post-transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLD), povezanih z EBV. Vendar mora biti diagnoza potrjena z biopsijo. Spremljanje virusnega bremena EBV se lahko uporablja tudi za spremljanje odziva na zdravljenje posttransplantacijskih limfoproliferativnih bolezni (Post-transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLD), povezanih z EBV, običajno z rituksimabom in zmanjšanjem imunosupresivne terapije.³

NAČELA POSTOPKA

Za izvedbo analize s testnom NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 na sistemu NeuMoDx System se uporablja testne trakove NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, kalibratorje NeuMoDx EBV Calibrators, zunanje kontrole NeuMoDx EBV External Controls, pufer NeuMoDx Lysis Buffer 1 in reagente NeuMoDx za splošno uporabo. The NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 združuje samodejno ekstrakcijo, amplifikacijo in zaznavo DNK s PCR v realnem času. Primerki polne krvi za pripravo plazme se odvzamejo v epruvete z EDTA. Primerek plazme v epruveti za primerke, združljivi s sistemom NeuMoDx System, se za obdelavo vstavi v prenosnik za epruvete s primerki in naloži na delovno mizo sistema NeuMoDx System. Dodatno posredovanje upravljalca ni potrebno.

Sistem NeuMoDx System uporablja kombinacijo toplote, litičnih encimov in ekstrakcijskih reagentov, da samodejno izvede lizo celic, ekstrakcijo DNK in odstranjanje inhibitorjev. Sproščene nukleinske kisline se ujamejo v mikrosfere z magnetno afiniteto. Mikrosfere z vezanimi nukleinskimi kislinami se vstavijo v kartušo NeuMoDx Cartridge, kjer so nevezane komponente, ki niso DNK, dodatno izprane z reagentom za izpiranje NeuMoDx Wash Reagent, vezana DNK pa se eluira z reagentom za sprostitve NeuMoDx Release Reagent. Sistemi NeuMoDx Systems nato uporabijo eluirano DNK za rehidracijo lastniških reagentov za amplifikacijo NeuDry™, ki vsebujejo vse potrebne elemente za amplifikacijo PCR EBV-specifičnih tarč in SPC1. Pri rekonstituciji reagentov PCR NeuDry sistem NeuMoDx System izvrše pripravljeno mešanico za PCR v kartušo NeuMoDx Cartridge. Amplifikacija in zaznava kontrole in ciljnih sekvenc DNK (če so prisotne) se pojavi na območju komore PCR kartuše NeuMoDx Cartridge. Kartuša NeuMoDx Cartridge je zasnovana tako, da vsebuje tudi amplikon po PCR v realnem času, kar praktično prepreči tveganje kontaminacije po amplifikaciji.

NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 cilja na dve visoko ohranjeni regiji v genomu EBV–BALF5 in BXFL1. Zasnova z dvema tarčama zmanjša tveganje lažno negativnih rezultatov v primeru mutacij v eni od ciljnih regij, kar poveča robustnost testa. Amplificirane tarče so zaznane v realnem času s kemijo v šobi za hidrolizo (splošno imenovano kemija TaqMan®) z uporabo fluorogenih oligonukleotidnih molekul šobe, specifičnih za amplikone za njihove ustrezne tarče.

Šobe TaqMan vsebujejo fluorofor, ki je kovalentno vezan na 5'-koncu oligonukleotidne šobe, in dušilec na 3'-koncu. Medtem ko je šoba nedotaknjena, sta fluorofor in dušilec blizu, zato molekula dušilca zaduši fluorescenco, ki jo fluorofor oddaja prek Försterjevega resonančnega prenosa energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Šobe TaqMan so zasnovane tako, da se združijo znotraj regije DNK, ki jo amplificira specifični komplet primerjev. Ko polimeraza DNK Taq razširi primer in sintetizira nov trak, aktivnost eksonukleaze 5' do 3' polimeraze DNK Taq degradira šobo, ki se je prilegla v vzorec. Degradacija šobe sprosti fluorofor in oddalji dušilec ter tako premaga učinek dušenja zaradi Försterjevega resonančnega prenosa energije (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) ter omogoči zaznavo fluorescence v fluoroforu. Posledični zaznan fluorescentni signal je neposredno sorazmeren sproščnemu fluoroforu, zato je možna korelacija s količino prisotne ciljne DNK.

Šoba TaqMan, označena s fluoroforom (vzbujanje: 490 nm in emisija: 521 nm) na koncu 5' in s temnim dušilcem na koncu 3', se uporablja za zaznavanje obeh tarč DNK virusa EBV. Šoba TaqMan je za zaznavo kontrole obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) označena z drugim fluorescentnim barvilom (vzbujanje: 535 nm in emisija: 556 nm) na koncu 5' in s temnim dušilcem na koncu 3'. Programska oprema sistema NeuMoDx System nadzoruje fluorescentni signal, ki ga oddajajo šobe TaqMan na koncu vsakega amplifikacijskega cikla. Ko je amplifikacija končana, programska oprema NeuMoDx System analizira podatke in sporoči rezultat (POSITIVE (POZITIVEN)/NEGATIVE (NEGATIVEN)/INDETERMINATE (NEDOLOČEN)/NO RESULT (NI REZULTATA)/UNRESOLVED (NEREŠENO)). Če je rezultat POSITIVE (POZITIVEN), programska oprema sistema NeuMoDx System prav tako prikaže kvantitativno vrednost, povezano z vzorcem oziroma sporoči, če je izračunana koncentracija izven linearnega območja.



REAGENTI/POTROŠNI MATERIAL

Priloženi materiali

REF.	Vsebina	Enote na paket	Testi na enoto	Testi na paket
201501	NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 <i>Posušeni reagenti RT-PCR, ki vsebujejo specifično šobo in primerke TaqMan za EBV in SPC1.</i>	6	16	96

Potrebni materiali, ki niso priloženi (na voljo ločeno pri družbi QIAGEN)

REF.	Vsebina
800501	NeuMoDx EBV Calibrators <i>Kompleti visokih in nizkih kalibratorjev EBV za enkratno uporabo za določanje veljavnosti standardne krivulje (1 viala vsake kontrole = 1 komplet)</i>
900502	NeuMoDx EBV External Controls <i>Kompleti nizko pozitivnih, visoko pozitivnih in negativnih kontrol EBV za enkratno uporabo za določanje dnevne veljavnosti testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 (1 viala vsake kontrole = 1 komplet)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Posušeni paramagnetni delci, litični encim in kontrole obdelave vzorca</i>
400500	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Konice Hamilton® CO-RE/CO-RE II (300 µL) s filtri
235905	Konice Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µL) s filtri

Potrebni instrumenti

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] ali NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]

NeuMoDx System Software različice 1.9.2.6 ali novejša



OPOZORILA IN VARNOSTNI UKREPI

- NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 je namenjen samo za diagnostično uporabo *in vitro* s sistemi NeuMoDx Systems.
- Ne uporabljajte reagentov ali potrošnega materiala po navedenem roku uporabe.
- Ne uporabljajte reagentov, če je varnostni pečat prelomljen oziroma če je embalaža ob prejemu poškodovana.
- Ne uporabljajte potrošnega materiala ali reagentov, če je zaščitna vrečka ob prejemu odprta ali poškodovana.
- Veljavna testna kalibracija (ustvarjena z obdelavo visokih in nizkih kalibratorjev NeuMoDx EBV Calibrators [REF 800501]) mora biti na voljo, preden je možno ustvariti rezultate testa za klinične vzorce.
- Zunanje kontrole NeuMoDx EBV External Control [REF. 900502] je treba obdelati vsakih 24 ur pri testiranju s testom NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.
- Minimalni volumen primerka sekundarnih alivotov plazme z EDTA je podrobneje pojasnjen spodaj v razdelku Priprava testa. Če je volumen pod navedenim minimumom, se lahko pojavi napaka »Quantity Not Sufficient« (Količina ni zadostna).
- Če so primerki shranjeni pri nepravilnih temperaturah ali dlje od navedenega obdobja shranjevanja, so rezultati lahko neveljavni ali napačni.

- Izogibajte se onesaženju z mikrobi in deoksiribonukleazo (Dnaza) vseh reagentov in vsega potrošnega materiala. Priporočena je uporaba sterilnih pipet za prenos brez DNaz pri uporabi sekundarnih epruвет. Za vsak primerek uporabite novo pipeto.
- Da se izognete onesaženju, kartuše NeuMoDx Cartridge po amplifikaciji ne uporabljajte in ne ločujte. Kartuš NeuMoDx Cartridge v nobenem primeru ne odstranjujte iz zabojnikov za biološke odpadke (NeuMoDx 288 Molecular System) oziroma koša za biološke odpadke (NeuMoDx 96 Molecular System). Kartuša NeuMoDx Cartridge je zasnovana tako, da preprečuje kontaminacijo.
- V primerih, kjer laboratorij izvaja tudi teste PCR z odprtimi epruветami, je treba zagotoviti, da testni trakovi NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, dodatni potrošni material in reagenti, potrebni za testiranje, osebna zaščitna oprema, kot so rokavice in laboratorijskih plašči, ter sistem NeuMoDx System niso kontaminirani.
- Pri ravnanju z reagenti in potrošnim materialom NeuMoDx uporabljajte čiste nitrilne rokavice brez pudra. Pazite, da se ne dotaknete zgornje površine kartuše NeuMoDx Cartridge, tesnilne folije traka NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 in ekstrakcijske ploščice NeuMoDx Extraction Plate oziroma zgornje površine vsebnika za pufer NeuMoDx Lysis Buffer; s potrošnim materialom in reagenti ravnajte tako, da se dotikate samo stranskih površin.
- Varnostni listi (Safety Data Sheets, SDS) za vsak reagent (kot je primerno) so na voljo na spletni strani www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Po izvedbi testa si temeljito umijte roke.
- Pipete ne uporabljajte z usti. Ne kadite, pijte ali jejte v območjih, kjer ravnate s primerki ali reagenti.
- S primerki vedno ravnajte, kot da so kužni, in v skladu z varnimi postopki v laboratorijih, kot so tisti, opisani v *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ in dokumentu CLSI M29-A4.⁵
- Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih (Safety Data Sheets, SDS).
- Neuporabljene reagente in odpadke zavržite v skladu z državnimi, zveznimi, okrajnimi in lokalnimi predpisi. Upoštevajte priporočila v varnostnem listu (Safety Data Sheet, SDS).

NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0



Vsebuje: borova kislina. Nevarnost! Povzroča hudo draženje oči. Lahko škoduje plodnosti ali nerojenemu otroku. Pred uporabo pridobiti posebna navodila. Ne uporabljajte, dokler se ne seznanite z vsemi varnostnimi ukrepi. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščitno za oči/zaščitno za obraz. Pri izpostavljenosti ali sumu izpostavljenosti: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. Hraniti zaklenjeno. Odstraniti vsebino/posodo v odobreni center za odstranjevanje odpadkov.

Informacije za nujne primere

Organizacija CHEMTREC

Izven ZDA in Kanade: +1 703-527-3887



SHRANJEVANJE, RAVNANJE IN STABILNOST IZDELKA

1. Trakovi NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 so stabilni v prvotni embalaži do navedenega roka uporabe na etiketi izdelka, če so shranjeni pri temperaturi od 15 °C do 28 °C.
2. Ko je naložen, lahko testni trak NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 ostane v sistemu NeuMoDx System 14 dni. Programska oprema sledi preostalemu roku uporabnosti naloženih testnih trakov in ga sporoča uporabniku v realnem času. Sistem bo pozval k odstranitvi testnega traku, ki je v uporabi dlje, kot je dovoljeno.
3. Čeprav kalibratorji NeuMoDx EBV Calibrators in zunanje kontrole NeuMoDx EBV External Controls niso kužni, jih je treba po uporabi zavreči kot biološki odpadki, da se zmanjša tveganje kontaminacije.

ZBIRANJE, TRANSPORT IN SHRANJEVANJE PRIMERKOV

Z vsemi primerki ravnajte, kot da lahko prenašajo povzročitelje okužb.

1. V primarnih epruветah ne zamrzujte polne krvi ali katerihkoli primerkov.
2. Za pripravo primerkov plazme je treba polno kri odvzeti v sterilne epruветe z EDTA kot antikoagulantom. Upoštevajte navodila proizvajalca epruвет za odvzem primerkov.
3. Polna kri, odvzeta v zgoraj navedenih napravah, je lahko pred pripravo plazme shranjena in/ali v transportu do 24 ur pri temperaturi 2 °C do 25 °C. Pripravo plazme je treba izvesti v skladu z navodili proizvajalca.
4. Pripravljeni primerki plazme lahko ostanejo v sistemu NeuMoDx System do 8 ur pred pričetkom obdelave. Če je potrebno daljše obdobje shranjevanja, priporočamo, da primerke shranite v hladilniku ali zamrzovalniku.
5. Pripravljeni primerki plazme so lahko shranjeni pri temperaturi med 2 in 8 °C največ 7 dni pred testiranjem ter največ 8 ur pri sobni temperaturi.
6. Pripravljene primerke plazme je mogoče hraniti pri –20 °C do 8 tednov; vzorci plazme pred uporabo ne smejo iti skozi več kot 2 cikla zamrzovanja/odtavanja.
 1. Če so primerki zamrznjeni, se morajo najprej popolnoma odtaliti pri sobni temperaturi (15 °C do 30 °C); zmešajte jih z vibracijskim mešalnikom, da ustvarite enakomerno porazdeljen vzorec. Vzorci morajo biti pred testiranjem na sobni temperaturi.
 2. Ko so zamrznjeni vzorci odtajani, je testiranje treba izvesti v roku 8 ur.
7. Če bodo primerki poslani, jih je treba zapakirati in označiti v skladu z veljavnimi državnimi in/ali mednarodnimi predpisi.

NAVODILA ZA UPORABO

Priprava testa

1. Oznako s črtno kodo primerka nalepite na epruveto s primerkom, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System, kot je opisano v spodaj.
2. Alikvot primerka prenesite v epruveto s primerkom s črtno kodo, ki je združljiva s sistemom NeuMoDx System, v skladu s spodaj določenimi volumni:
3. *Za primerke plazme:*
 - Prenosnik za epruvete s primerki (za 32 epruvet): 11–14 mm premera ter 60–120 mm višine; minimalni volumen polnjenja $\geq 750 \mu\text{l}$
 - Prenosnik za epruvete s primerki (za 24 epruvet): 14,5–18 mm premera ter 60–120 mm višine; minimalni volumen polnjenja $\geq 1100 \mu\text{l}$
 - Prenosnik za epruvete s primerki z majhnim volumnom (za 32 epruvet): 1,5-ml epruveta za mikrocentrifugiranje s stožčastim dnom; minimalni volumen polnjenja $\geq 650 \mu\text{l}$

Delovanje sistema NeuMoDx System

Za podrobna navodila glejte Priročnik za uporabo sistemov NeuMoDx 288 in 96 Molecular Systems (št. dela 40600108 in 40600317)

1. Enega ali več prenosnikov testnih trakov za sistem NeuMoDx System Test Strip napolnite s kvant. testnimi trakovi NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 in uporabite zaslon na dotik, da naložite prenosnike testnih trakov v sistem NeuMoDx System.
2. Če to zahteva programska oprema NeuMoDx System, dodajte potrebno količino potrošnega materiala v vsebnike potrošnega materiala NeuMoDx System in uporabite zaslon na dotik, da naložite prenosnike v NeuMoDx System.
3. Če to zahteva programska oprema NeuMoDx System, zamenjajte reagenta NeuMoDx Wash Reagent in NeuMoDx Release Reagent ter izpraznite odpadke pri polnjenju, zabojnik za biološke odpadke (samo pri NeuMoDx 288 Molecular System), koš za odpadne konice (samo NeuMoDx 96 Molecular System) ali koš za biološke odpadke (samo NeuMoDx 96 Molecular System), kot je ustrezno.
4. Če to zahteva programska oprema sistema NeuMoDx System, obdelajte kalibratorje Calibrators [REF 800501] in/ali zunanje kontrole External Controls [REF 900502], kot je potrebno. Dodatne informacije glede kalibratorjev in kontrol so na voljo v razdelku *Obdelava rezultatov*.
5. Epruvete s primerki naložite v prenosnike za epruvete s primerki ter poskrbite, da bodo pokrovčki in morebitne paličice za bris odstranjeni iz vseh epruvet.
6. Prenosnike za epruvete s primerki postavite na katerikoli odprt položaj na polici samodejnega nalagalnika in uporabite zaslon na dotik, da jih naložite v NeuMoDx System. To bo sprožilo obdelavo naloženih primerkov za opredeljene teste, če je v sistemu veljavno naročilo testa.

OMEJITVE

1. NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 se lahko uporablja samo v sistemih NeuMoDx Systems.
2. Delovanje traku NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 je bilo ugotovljeno za primerke plazme, pripravljene iz polne krvi, ki je bila odvzeta z antikoagulantom EDTA. Uporaba testnega traku NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 z drugimi viri ni bila ocenjena, zato karakteristike delovanja za druge tipe primerkov niso znane.
3. Ker je zaznavanje EBV na splošno odvisno od števila virusnih delcev, prisotnih v vzorcu, so zanesljivi rezultati odvisni od ustreznega odvzema, obravnave in shranjevanja primerkov.
4. Do napačnih rezultatov lahko pride zaradi nepravilnega odvzema, obravnave ali shranjevanja primerkov, tehnične napake ali zamenjave epruvet s primerki. Poleg tega se lahko pojavijo lažno negativni rezultati, če je število virusnih delcev v vzorcu pod mejo zaznave testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.
5. Sistem NeuMoDx System lahko uporablja izključno osebje, ki je bilo usposobljeno za uporabo sistema NeuMoDx System.
6. Če se tako tarče EBV kot tarča SPC1 ne amplificirata, bo prikazan neveljaven rezultat (Indeterminate (Nedoločen) ali Unresolved (Nerešeno)), zato je test treba ponoviti.
7. Če pred dokončanjem obdelave vzorca pride do napake sistema, se bo prikazalo »No Result« (Ni rezultata) in test je treba ponoviti.
8. Če je DNK EBV zaznana nad zgornjo mejo kvantifikacije (Upper Limit of Quantification, ULoQ), je mogoče test NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ponoviti z razredčenim alikvotom prvotnega primerka. Priporočeno je razmerje redčenja 1 : 100 ali 1 : 1000 v EBV-negativni plazmi ali v razredčilu Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare®, Milford, MA). Sistem bo samodejno izračunal koncentracijo prvotnega primerka na naslednji način: Koncentracija prvotnega primerka = \log_{10} (faktor redčenja) + javljena koncentracija razredčenega vzorca, če je bil pred ponovitvijo v programski opremi pravilno izbran faktor redčenja.
9. Prisotnost inhibitorjev PCR v plazmi lahko povzroči napako pri količinskem določanju sistema; če se to zgodi, priporočamo ponovitev testa z istim primerkom, ki je razredčen v razredčilu Basematrix v razmerju 1 : 10 ali 1 : 100.
10. Pozitiven rezultat kaže na prisotnost DNK EBV.
11. Čeprav je verjetnost za to majhna, lahko izbriši ali mutacije v ohranjenih regijah, ki so tarča testa NeuMoDx EBV Quant Assay, vplivajo na zaznavo in/ali kvantifikacijo ter lahko povzročijo napačne rezultate.
12. Rezultate testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je treba uporabljati kot dodatek kliničnim opazovanjem in drugim podatkom, ki so na voljo zdravniku; test ni namenjen diagnozi okužbe.
13. Priporočene so dobre laboratorijske prakse, vključno z menjavo rokavic med ravnanjem s primerki pacientov, da preprečite kontaminacijo.

OBDELAVA REZULTATOV

Razpoložljive rezultate si je mogoče ogledati oziroma natisniti na zavihku »Results« (Rezultati) v oknu Results (Rezultati) na zaslonu na dotik sistema NeuMoDx System. Rezultate testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 samodejno ustvari programska oprema sistema NeuMoDx System z uporabo algoritma odločanja in parametrov za obdelavo rezultatov, navedenih v definicijski datoteki testa NeuMoDx EBV Assay (EBV Quant ADF različice 4.0.0 ali novejša). Rezultat testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je lahko Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prikazano koncentracijo DNK EBV, Indeterminate (Nedoločen), No Result (Ni rezultata) ali Unresolved (Nerešeno) na podlagi statusa amplifikacije tarče in kontrole obdelave vzorca. Rezultati so prikazani na podlagi algoritma odločanja o obdelavi rezultatov ADF, ki je povzet spodaj v preglednici 1.

Preglednica 1: Interpretacija rezultatov testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Rezultat	Tarče EBV	Kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Pozitivno)	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [2 ≤ Ct < 28 IN EPR > 1,3 IN EP > 1200] OR (ALI) [28 < Ct < 38 IN EP > 1200]	N/A (Ni na voljo)
Positive, above Upper Limit of Quantitation [ULoQ] (Log10 IU/mL) (Pozitivno, nad zgornjo mejo količinskega določanja [ULoQ] (log10 IE/ml))	[CONC] > 8.0 Log10 IU/mL, NO QUANT ([KONC.] > 8,0 log10 IE/ml, NI KOLIČ.)	N/A (Ni na voljo)
Positive, below Lower Limit of Quantitation [LLoQ] (Log10 IU/mL) (Pozitivno, pod spodnjo mejo količinskega določanja [LLoQ] (log10 IE/ml))	[CONC] < 1.48 Log10 IU/mL, NO QUANT ([KONC.] < 1,48 log10 IE/ml, NI KOLIČ.)	N/A (Ni na voljo)
Negative (Negativno)	NOT AMPLIFIED (NI AMPLIFICIRANO) N/A (Ni na voljo) OR (ALI) [2 ≤ Ct < 28 IN ERP ≤ 1,3 AND EP > 1200] OR (ALI) [28 ≤ Ct < 38 IN EP > 1200] OR (ALI) Ct > 38	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) [29 < Ct < 35 and (in) EP ≥ 2000]
No Result (Ni rezultata)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Ni amplificirano, zaznana napaka sistema, obdelava vzorca prekinjena)	
Indeterminate (Nedoločen)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Ni amplificirano, zaznana napaka sistema, obdelava vzorca končana)	
Unresolved (Nerešeno)*	Not Amplified, No System Error Detected (Ni amplificirano, ni zaznane napake sistema)	

EP = End Point Fluorescence (fluorescenca na končni točki); EPR = End Point Fluorescence Ratio (razmerje fluorescence na končni točki);

C_t = Cycling Threshold (Mejna točka cikla);

Quant = izračunana količina prisotnega EBV, izražena v log₁₀ IE/ml. Glejte testni izračun spodaj.

*Sistem omogoča izbirno možnost Rerun (Ponovno zaženi)/Repeat (ponovi) za samodejno ponovno obdelavo v primeru neveljavnega rezultata, kar minimizira zamude pri sporočanju rezultata.

Testni izračun: Vzorci

- Za vzorce znotraj linearnega območja testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je koncentracija DNK EBV v vzorcih izračunana z uporabo shranjene standardne krivulje skupaj s koeficientom kalibracije.
 - »Koeficient kalibracije« se izračuna na podlagi rezultatov kalibratorjev NeuMoDx EBV Calibrators, ki so obdelani za določanje veljavnosti standardne krivulje za vsako serijo trakov NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 na specifičnem sistemu NeuMoDx System.
 - Sistem samodejno vključi koeficient kalibracije pri končnem določanju koncentracije DNK EBV.
- Rezultati testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 so izraženi v IE/ml in log₁₀ IE/ml.
- Posledično količinsko določanje neznanih vzorcev je sledljiva v skladu s 1. mednarodnim standardom WHO za Epstein-Barr virus za tehnike amplifikacije nukleinskih kislin.

Testni izračun: Kalibratorji

Za kvantifikacijo DNK EBV v primerkih je potrebna veljavna kalibracija, ki temelji na standardni krivulji. Za ustvarjanje veljavnih rezultatov je treba izvesti testno kalibracijo z uporabo kalibratorjev, ki jih zagotavlja NeuMoDx Molecular, Inc.

- Kalibratorji NeuMoDx EBV Calibrators so na voljo v kompletu [REF 800501] in vsebujejo nekužne tarče EBV v kapsulah, ki so pripravljene v razredčilu Basematrix.
- Komplet kalibratorjev EBV je treba obdelati z vsako novo serijo trakov NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, če je v sistem NeuMoDx System naložena nova definicijska datoteka testa za EBV, če je trenutnemu kompletu kalibratorjev potekel rok veljavnosti (nastavljen na 90 dni) ali če je bila programska oprema sistema NeuMoDx System spremenjena.
- Programska oprema sistema NeuMoDx System bo uporabnika obvestila, ko bo treba obdelati kalibratorje; nova serija testnih trakov ne more biti uporabljena za testiranje, dokler niso kalibratorji uspešno obdelani.

4. Veljavnost kalibracije je določena na naslednji način:
 1. Za določanje veljavnosti mora biti obdelan komplet dveh kalibratorjev – visokega in nizkega.
 2. Za ustvarjanje veljavnih rezultatov morata vsaj 2 od 3 ponovljenih vzorcev prikazati rezultate znotraj predhodno določenih parametrov. Nazivna tarča nizkega kalibratorja je $3 \log_{10}$ IE/ml, nazivna tarča visokega kalibratorja pa $5 \log_{10}$ IE/ml.
 3. Koeficient kalibracije se izračuna za upoštevanje pričakovane variacije med serijami testnih trakov; ta koeficient kalibracije se uporabi pri določanju končne koncentracije DNK EBV.
5. Če en ali oba kalibratorja ne opravita preverjanja veljavnosti, ponovite obdelavo z novo vialo kalibratorjev, ki niso prestali preverjanja. Če en kalibrator ne opravi preverjanja veljavnosti, ga je možno ponoviti samo za ta kalibrator, saj sistem od uporabnika ne zahteva ponovnega preverjanja obeh kalibratorjev.
6. Če kalibratorji ne opravijo testa veljavnosti drugič zapored, se obrnite na tehnično podporo družbe QIAGEN.

Neveljavni rezultati

Če test NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, izveden na sistemu NeuMoDx System, ne proizvede veljavnega rezultata, bo prikazan rezultat Indeterminate (Nedoločen), No Results (Ni rezultata) ali Unresolved (Nerešeno); odvisno od vrste napake je treba ponoviti test za pridobitev veljavnega rezultata.

Rezultat Indeterminate (Nedoločen) bo prikazan, če bo med obdelavo vzorca zaznana napaka sistema NeuMoDx System. Pri rezultatu Indeterminate (Nedoločeno) je priporočen ponovni test.

Rezultat No Result (Ni rezultata) bo javljen, če bo med obdelavo vzorca zaznana napaka sistema NeuMoDx System in bo obdelava vzorca prekinjena. Pri rezultatu No Result (Ni rezultata) je priporočen ponovni test.

Rezultat Unresolved (Nerešeno) bo prikazan, če ne bo zaznana nobena tarča in če ni amplifikacije kontrole obdelave vzorca, kar kaže na morebitno napako reagenta ali prisotnost inhibitorjev. Pri rezultatu Unresolved (Nerešeno) je kot prvi korak priporočen ponovni test. Če ponovni test ni uspešen, lahko uporabite razredčen primerek, da ublažite učinke morebitne inhibicije (glejte razdelek o omejitvah za dodatna navodila).

Glejte priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 288 Molecular System (št. dela: 40600108) ali priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 96 Molecular System (št. dela: 40600317) za seznam kod napak, ki so lahko povezane z neveljavnimi rezultati.

Nadzor kakovosti

Lokalni predpisi običajno določajo, da je laboratorij odgovoren za nadzorne postopke, ki spremljajo točnost in preciznost celotnega analitičnega postopka, in mora določiti število, vrsto in pogostost preskušanja kontrolnih materialov z uporabo preverjenih specifikacij učinkovitosti za nespremenjen, odobren testni sistem.

Zunanje kontrole

1. Zunanje kontrole, ki vsebujejo nekužne tarče EBV v kapsulah v razredčilu Basematrix za pozitivne kontrole oziroma razredčilo Basematrix za negativne kontrole, dobavlja QIAGEN v kompletu, ki vsebuje NeuMoDx EBV External Controls [REF 900502].
2. Pozitivne in negativne zunanje kontrole je treba obdelati enkrat na 24 ur. Če komplet veljavnih zunanjih kontrol ne obstaja, bo programska oprema sistema NeuMoDx System od uporabnika zahtevala, da obdelata te kontrole, preden bo mogoče prikazati rezultate vzorca:

NeuMoDx EBV External Controls	Pričakovana koncentracija	Barvna shema oznak
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	$1,5E4$ IE/ml ($4,18 \log_{10}$ IE/ml)	Rdeča
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	150 IE/ml ($2,18 \log_{10}$ IE/ml)	Siva
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	Ni na voljo	Črna

3. Pri obdelavi zunanjih kontrol namestite kontrole na prenosnik za epruvete s primerki in uporabite zaslon na dotik, da naložite prenosnik v NeuMoDx System s police samodejnega nalagalnika. NeuMoDx System bo prepoznal črtne kode in pričel z obdelavo kontrol, razen če reagenti ali potrošni material, potrebni za testiranje, niso na voljo.

4. Veljavnost teh zunanjih kontrol bo sistem NeuMoDx System ocenil na podlagi pričakovanih rezultatov.

NeuMoDx EBV External Controls	Rezultat kvantifikacije EBV	Rezultat SPC1
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	EBV POSITIVE (EBV POZITIVEN) [Konc.] 3,68–4,68 log ₁₀ IE/ml	SPC1 pozitiven
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	EBV POSITIVE (EBV POZITIVEN) [Konc.] 1,58–2,78 log ₁₀ IE/ml	SPC1 pozitiven
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	EBV NEGATIVE (EBV NEGATIVEN)	SPC1 pozitiven

5. Odstopajoče rezultate glede zunanjih kontrol je treba obravnavati na naslednji način:

1. Pozitiven rezultat testa pri negativnem kontrolnem vzorcu lahko kaže na kontaminacijo; za odkritje temeljnega vzroka je treba preveriti postopke za nadzor kakovosti v laboratoriju. Zagotovite uporabo ločenih območij za pripravo vzorca, ravnanje s kontrolo in namestitve RT-PCR. Za dodatne napotke za odpravljanje težav glejte *Priročnik za uporabo sistema NeuMoDx 288 ali 96 Molecular System*.
2. Negativen rezultat pri pozitivnem kontrolnem vzorcu lahko kaže na težavo, povezano z reagentom ali instrumentom.
3. V kateremkoli od zgornjih primerov ali v primerih No Result (Brez rezultata) (NR), Unresolved (Nerešeno) (UNR) ali Indeterminate (Nedoločeno) (IND) ponovite neuspešno kontrolo s sveže odtajanimi vialami kontrol, ki niso opravile testa veljavnosti.
4. Če pozitivna zunanja kontrola še naprej javlja rezultat Negative (Negativno), se obrnite na tehnično službo družbe QIAGEN.
5. Če negativna zunanja kontrola še dalje javlja rezultat Positive (Pozitivno), poskusite odstraniti vse vire morebitne kontaminacije, vključno z zamenjavo vseh reagentov, ter ponovite izvedbo, preden se obrnete na tehnično podporo družbe QIAGEN.
6. Če zunanje kontrole ne dajejo pričakovanih rezultatov, morate ponoviti niz pozitivnih in negativnih kontrol. Rezultati za vzorec ne bodo prikazani, če kontrole ne dajejo pričakovanih rezultatov.
7. Sistem NeuMoDx System je opremljen s samodejno funkcijo Rerun (Ponovni zagon)/Repeat (Ponoviti), ki jo lahko uporabnik izbere za zagotovitev, da se rezultat INVALID (Neveljavno) samodejno ponovno obdelata, kar skrajša zamude pri poročanju o rezultatih.

(Notranje) kontrole za obdelavo vzorcev

Eksogena kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) je vključena v ekstrakcijsko ploščo NeuMoDx Extraction Plate in je del celotnega postopka ekstrakcije nukleinskih kislin ter amplifikacije RT-PCR v realnem času z vsakim vzorcem/kontrolo/kalibratorjem. Primerji in šobe, specifične za SPC1, so vključene v vsak trak NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0. Ta SPC1 omogoča, da sistem NeuMoDx System nadzoruje učinkovitost ekstrakcije DNK in postopkov amplifikacije RT-PCR.

KARAKTERISTIKE DELOVANJA

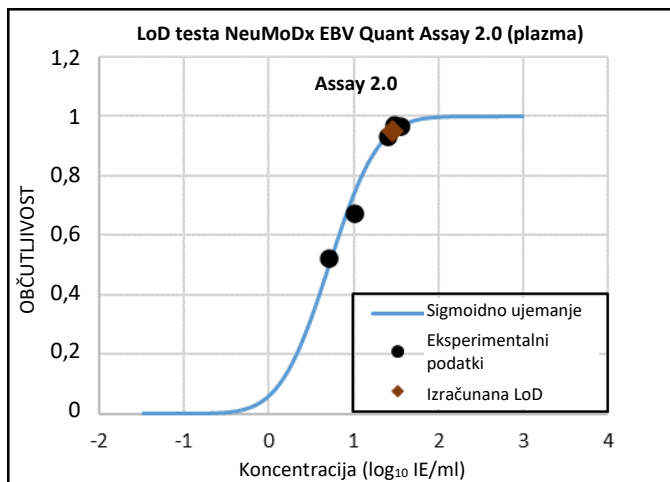
ANALITIČNA OBČUTLJIVOST – meja zaznave

Analična občutljivost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je bila karakterizirana v dveh zaporednih fazah: 1. Ocena predhodne meje zaznavanja (Limit of Detection, LoD) (probit analiza), čemur sledi 2. Potrditev LoD. V 1. delu so bili testirani negativni primerki in razredčena serija 1. mednarodnega standarda WHO v presejani EBV-negativni človeški plazmi za določitev predhodne meje zaznavanja (Limit of Detection, LoD) na sistemih NeuMoDx Systems. Predhodna LoD je bila definirana kot najnižja ciljna raven, zaznana pri stopnji 95 %, kot je bilo določeno s probit analizo. V 2. delu je bila predhodna LoD potrjena s testiranjem namišljene plošče na stopnji LoD. Obe fazi študije sta bili izvedeni v obdobju 3 dni na več sistemih in z več serijami reagentov NeuMoDx. V 1. delu je bilo skupno obdelanih 144 ponovitev na vsaki stopnji redčenja. Stopnje zaznave so prikazane v *Preglednici 2*.

Preglednica 2: Določitev predhodne LoD testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Ciljna koncentracija [IE/ml]	Ciljna koncentracija [log ₁₀ IE/ml]	PLAZMA		
		Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja
35	1,54	144	139	96,5 %
30	1,48	144	140	97,2 %
25	1,40	143	133	93,0 %
10	1,00	144	97	67,4 %
5	0,70	143	75	52,4 %
NEG	---	144	0	0,0 %

Meja zaznave (Limit of Detection, LoD) testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 v plazmi z uporabo 1. mednarodnega standarda WHO za EBV je bila določena pri 29,3 IE/ml (1,47 log₁₀ IE/ml) s 95-odstotnim intervalom zaupanja (Confidence Interval, CI) 24,4–37,1 IE/ml, (1,39–1,57 log₁₀ IE/ml) [*slika 1*]. Ta LoD je bila naknadno potrjena z analizo uspešnosti (hit-rate), ki je prikazana v *preglednici 3*.



Slika 1: Analiza vrste probit, uporabljena za določanje LoD testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 v vzorcih plazme

Preglednica 3: Potrditev LoD testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Sistem	Ciljna koncentracija [IE/ml]	Ciljna koncentracija [log ₁₀ IE/ml]	Število veljavnih testov	Število pozitivnih	Stopnja zaznavanja
N96	29,3	1,47	96	94	97,9 %
N288			96	92	95,8 %
Vsi			192	186	96,9 %

Potrjena LoD za genotip EBV 2 (GT2) je bila 29,3 IE/ml [1,47 log₁₀ IE/ml], kot je bilo ugotovljeno z analizo uspešnosti.

Na podlagi rezultatov obeh študij je bila LoD testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 določena pri 29,3 IE/ml [1,47 log₁₀ IE/ml].

ANALITIČNA OBČUTLJIVOST – spodnja meja količinskega določanja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) je definirana kot najnižja ciljna raven, pri kateri je dosežena > 95-odstotna zaznava IN kjer skupna analitična napaka (total analytical error, TAE) znaša ≤ 1,0. Za določitev LLOQ je bila izračunana TAE za vsako od ciljnih ravni EBV, pri katerih je kot del izračuna meje zaznave (Limit of Detection, LoD) zaznava znašala > 95 %. TAE je opredeljena na naslednji način:

$$\text{TAE} = \text{odstopanje} + 2 * \text{SD (Westgard Statistic)}$$

Odstopanje je absolutna vrednost razlike med povprečjem izračunane koncentracije in pričakovano koncentracijo. SD se nanaša na standardno deviacijo kvantificirane vrednosti vzorca.

Združeni rezultati za 5 stopenj 1. mednarodnega standarda WHO za primerke plazme z EBV, uporabljene v študiji LLoQ, so prikazane v preglednici 4. Na podlagi tega niza podatkov in predhodno določene LoD, je bila LLoQ določena pri 30,0 IE/ml (1,48 log₁₀ IE/ml) in naknadno potrjen za genotip EBV 2 (GT2).

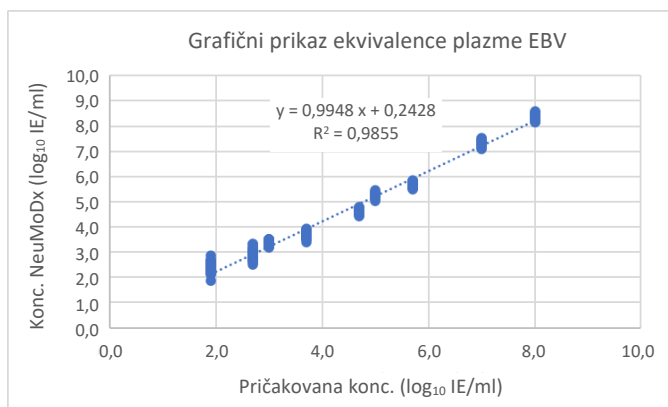
Preglednica 4: LLoQ testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 z odstopanjem in TAE

Ciljna konc. [IE/ml]	Ciljna konc. [log ₁₀ IE/ml]	Plazma				
		Povprečna konc. [log ₁₀ IE/ml]	Stopnja zaznavanja	SD	Odstopanje	TAE
35	1,54	2,05	96,5 %	0,23	0,50	0,96
30	1,48	1,97	97,2 %	0,24	0,49	0,98
25	1,40	1,93	93,0 %	0,24	0,53	1,02
10	1,00	1,96	67,4 %	0,31	0,96	1,59
5	0,70	1,83	52,4 %	0,27	1,13	1,68

Na podlagi rezultatov teh študij je bila LoD testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 določena pri 29,3 IE/ml (1,47 log₁₀ IE/ml), ugotovljena LLoQ pa je bila 30,0 IE/ml [1,48 log₁₀ IE/ml].

Linearnost in določanje zgornje meje količinskega določanja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

Linearnost in zgornja meja količinskega določanja (ULoQ) testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 sta bili ugotovljeni v plazmi, in sicer s pripravo serije razredčitev z uporabo 1. mednarodnega standarda WHO za EBV poleg dveh sekundarnih standardov: tarče EBV v kapsulah NeuMoDx in kulture EBV ATCC (ATCC, Manassas, VA). Sledljivost v skladu s 1. mednarodnim standardom WHO za EBV je bila ugotovljena za oba sekundarna standarda pred testiranjem. 10-mestna plošča je bila pripravljena z združeno EBV-negativno plazmo, s čimer je bila ustvarjena plošča z razponom koncentracije 1,48–8,0 log₁₀ IE/ml. Zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantification, ULoQ) testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je bila določena pri 8,0 log₁₀ IE/ml. Pripravljena je bila potrditvena plošča za oceno linearnosti standardne krivulje, koncentracije testa EBV, ki jih je sporočil sistem NeuMoDx System, v primerjavi s pričakovanimi vrednostmi, pa so predstavljene na sliki 2.



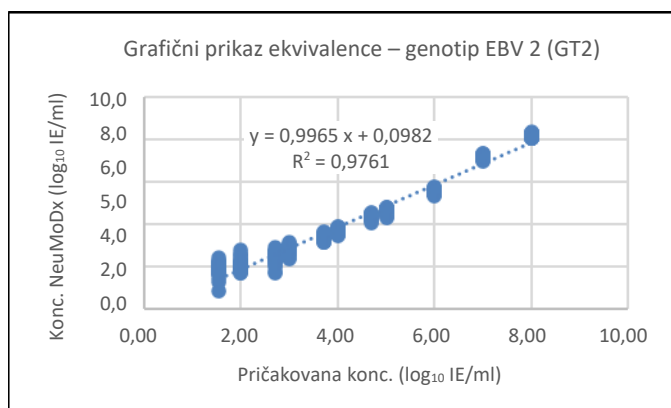
Slika 2: Linearnost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Linearnost genotipa EBV 2 (GT2)

Linearnost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 za genotip EBV 2 (GT2) je bila karakterizirana s testiranjem 11 različnih koncentracij EBV GT2, s potrjeno sledljivostjo v skladu s 1. mednarodnim standardom WHO za EBV, pripravljenih z združeno EBV-negativno plazmo. Študija je bila izvedena s testiranjem 36 ponovitev pri 11 koncentracijah na 2 sistemih NeuMoDx Systems in 3 serijah trakov EBV Quant Test Strips 2.0. Linearnost za genotip EBV 2 (GT2) je predstavljena v preglednici 5 in na sliki 3.

Preglednica 5: Linearnost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 za genotip EBV 2

Genotip	Enačba linearnosti y = količinsko določanje testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 x = pričakovano količinsko določanje	R ²
GT2	y = 0,9965 x – 0,0982	0,9761



Slika 3: Linearnost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 za genotip EBV 2

Analitična specifičnost – navzkrižna reaktivnost

Analitična specifičnost je bila prikazana s presejanjem 36 organizmov, ki jih je možno najti v primerkih krvi/plazme, kot tudi vrst, ki so filogenetsko podobne EBV, glede navzkrižne reaktivnosti. Organizmi pri visoki koncentraciji so bili pripravljene v skupinah 5–6 organizmov. Testirani organizmi so prikazani v preglednici 6. Navzkrižna reaktivnost ni bila ugotovljena pri nobenem od testiranih organizmov, kar potrjuje 100-odstotno analitično specifičnost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Preglednica 6: Patogeni, uporabljeni za prikaz analitične specifičnosti

Netarčni organizmi					
Poliomavirus (virus BK)	Adenovirus tipa 5	Virus herpes simpleks tipa 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Citomegalovirus	Virus hepatitisa C	Virus herpes simpleks tipa 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Človeški herpes virus tipa 6	Parvovirus B19	Virus varicella zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Človeški herpes virus tipa 7	JC virus	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Človeški herpes virus tipa 8	Človeški papiloma virus 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus hepatitisa B	Človeški papiloma virus 18	SV 40	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>

Analitična specifičnost – moteče snovi, komezalni organizmi

Test NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je bil ocenjen glede interferenc ob prisotnosti neciljnih organizmov z uporabo enakih skupin organizmov, kot so bile pripravljene za testiranje navzkrižne reaktivnosti v zgornji *preglednici 6*. EBV-negativna plazma je bila obogatena z organizmi, združeni v skupinah 4–7; te skupine so bile nato obogatene s ciljnim EBV s koncentracijo 90 IE/ml [$1,95 \log_{10}$ IE/ml]. V prisotnosti teh organizmov niso opazili nobenih pomembnih interferenc, kar kaže minimalni odklon količinskega določanja od kontrolnih primerkov, ki niso vsebovali motečega agenta.

Analitična specifičnost – moteče snovi, endogene in eksogene snovi

Test NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je bil ocenjen v prisotnosti tipičnih eksogenih in endogenih motečih snovi, ki so prisotne v kliničnih primerkih plazme z virusom EBV. To vključuje neobičajno visoke stopnje krvnih komponent kot tudi običajna protivirusna in imunosupresivna zdravila, ki so razvrščena v *preglednici 7*. Vsaka snov je bila dodana presejani EBV-negativni človeški plazmi, obogateni z EBV s koncentracijo 90 IE/ml [$1,95 \log_{10}$ IE/ml], vzorci pa so bili analizirani glede interferenc s primerjavo ugotovljene koncentracije glede na pozitivno kontrolo. Poleg tega je bila glede morebitnih interferenc testirana tudi običajna plazma bolnikov z okužbo z virusom EBV. Povprečna koncentracija in odstopanje vseh testiranih snovi v primerjavi s kontrolnimi vzorci, obogatenimi z isto ravno EBV, sta navedena v *preglednici 8*. Nobena od eksogenih in endogenih snovi ni vplivala na specifičnost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Preglednica 7: Testiranje interferenc – eksogene snovi (klasifikacije zdravil)

Skupina	Ime zdravila	Klasifikacija	Skupina	Ime zdravila	Klasifikacija
Skupina 1	Azatioprin	Imunosupresiv	Skupina 4	Trimetoprim	Antibiotik
	Ciklosporin	Imunosupresiv		Vankomicin	Antibiotik
	Foskarnet	Protivirusno zdravilo (Herpesviridae)		Takrolimus	Imunosupresiv
	Ganciklovir	Protivirusno zdravilo (EBV)		Everolimus	Imunosupresiv
	Valganciklovir hidroklorid	Protivirusno zdravilo (EBV)		Kalijev klavulanat	Antibiotik
Skupina 2	Prednizon	Kortikosteroid/imunosupresiv	Skupina 5	Famotidin	Antagonist histaminskih receptorjev
	Cidofovir	Protivirusno zdravilo (EBV)		Sulfametoksazol	Antibiotik
	Cefotetan	Antibiotik (širokega spektra)		Valaciclovir	Protivirusno zdravilo (Herpesviridae)
	Cefotaksim	Antibiotik (širokega spektra)		Letermovir	Protivirusno zdravilo (EBV)
	Flukonazol	Antimikotik		Dinatrijev tikarcilin	Antibiotik
Skupina 3	Mikofenolat mofetil	Imunosupresiv		Leflunomid	Imunosupresiv
	Natrijev mikofenolat	Imunosupresiv			
	Piperacilin	Antibiotik			
	Sirolim/rapamicin	Imunosupresiv			
	Tazobaktam	Modificiran antibiotik			

Preglednica 8: Testiranje interference – endogene in eksogene snovi

Endogeno + bolezensko stanje	Povprečna konc.	Odstopanje
	Log ₁₀ IE/ml	Log ₁₀ IE/ml
Hemoglobin	2,19	0,32
Trigliceridi	1,90	0,02
Bilirubin	2,12	0,24
Albumin	1,95	0,07
Sistemiški lupus erythematosus (SLE)	2,08	0,20
Antinuklearno protitelo (Antinuclear Antibody, ANA)	2,36	0,48
Revmatoidni artritis (RA)	1,89	0,01
Pozitivna kontrola	1,88	Ni na voljo
Eksogeni (zdravila)	Povprečna konc.	Odstopanje
	Log ₁₀ IE/ml	Log ₁₀ IE/ml
Skupina 1: Azatioprin, ciklosporin, foskarnet, ganciklovir, valganciklovir hidroklorid	2,19	0,09
Skupina 2: Prednizon, cidofovir, cefotetan, cefotaksim, flukonazol	2,11	0,01
Skupina 3: Mikofenolat mofetil, natrijev mikofenolat, piperacilin, sirolim/rapamicin, tazobaktam	2,16	0,06
Skupina 4: Trimetoprim, vankomicin, takrolimus, everolimus, kalijev klavulanat	2,24	0,14
Skupina 5: Famotidin, sulfametoksazol, letermovir, valaciclovir, dinatrijev tikarcilin, leflunomid	2,26	0,16
Pozitivna kontrola	2,10	Ni na voljo

Natančnost znotraj laboratorija

Natančnost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je bila določena s testiranjem 3 ponovitev 6-mestne plošče primerkov EBV, pripravljenih s pozitivno kontrolo NeuMoDx EBV Positive Control in kulturo EBV (ATCC, Fort Worth, VA), dvakrat dnevno z uporabo dveh sistemov NeuMoDx 288 System in dveh sistemov NeuMoDx 96 System v obdobju 12 dni. Opredeljena je bila natančnost znotraj serije, znotraj dneva in znotraj sistema, ugotovljena skupna standardna deviacija pa je bila $\leq 0,18 \log_{10}$ IE/ml. Med sistemi, dnevi ali izvedbami je bila prikazana odlična natančnost, kot je prikazano v *preglednici 9*. Natančnost med operaterji ni bila določena, saj upravljavac ne igra pomembne vloge pri obdelavi vzorcev z uporabo sistema NeuMoDx System.

Preglednica 9: Natančnost znotraj laboratorija – test NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 na sistemih NeuMoDx System

Ciljna konc. EBV [Log ₁₀ IE/ml]	Povprečna konc. EBV [Log ₁₀ IE/ml]	SD znotraj sistema	SD znotraj dneva	SD znotraj izvajanja	Skupna SD (znotraj laboratorija)
7,70	7,82	0,10	0,08	0,08	0,11
6,00	6,07	0,12	0,11	0,11	0,13
5,00	4,75	0,13	0,12	0,11	0,13
4,00	3,78	0,13	0,11	0,11	0,14
3,00	2,93	0,15	0,14	0,13	0,16
1,95	2,19	0,17	0,16	0,16	0,18

Ponovljivost med serijami

Ponovljivost testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 od serije do serije je bila določena z oceno 3 serij trakov NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 v okviru študije natančnosti znotraj laboratorija. Za oceno delovanja je bila uporabljena 6-mestna plošča z EBV-pozitivno plazmo (*preglednica 10*). Rezultati za vse serije so bili analizirani in so predstavljeni v *preglednici 10*. Za trakove NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strips 2.0 je največje odstopanje znašalo 0,29 log₁₀ IE/ml, največja SD pa je bila 0,18 log₁₀ IE/ml. Ekvivalentno delovanje je bilo prikazano v vseh serijah, saj je bilo količinsko določanje vseh mest na plošči znotraj specifikacije tolerance.

Preglednica 10: Ponovljivost med serijami – NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, Test Strip

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

Učinkovitost kontrole obdelave vzorca

Kontrola obdelave vzorca (Sample Process Control, SPC1) je vključena v NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 za poročanje o napakah korakov oziroma inhibiciji, ki vpliva na delovanje testa. Z uporabo NeuMoDx CMV Quant Assay kot modela je bila testirana učinkovitost SPC1 za primerke plazme v pogojih, ki predstavljajo kritične napake pri korakih obdelave, ki bi se lahko pojavili med obdelavo vzorca in ki jih senzori za nadzor delovanja sistema NeuMoDx System morda ne zaznajo. Primerki, pozitivni na citomegalovirus (pri 3 log₁₀ IE/ml), in negativni primerki so bili preverjeni v naslednjih pogojih: prisotnost inhibitorja, brez dovajanja raztopine za izpiranje in brez izpihanja po izpiranju. Neučinkovitosti v procesu, ki so negativno vplivale na zaznavo/količinsko določanje virusne tarče, so bile prezrcaljene z delovanjem tarče SPC1, kot je prikazano v *preglednici 11*. V vseh testiranih primerih se je izkazalo, da je kontrola obdelave vzorca zadostno nadzorovala neučinkovitosti pri postopku in prisotnost inhibitorjev oziroma da pričakovane neučinkovitosti pri postopku niso imele pomembnejšega negativnega učinka na zaznavo SPC1 ali zaznavo in količinsko določanje virusne tarče. Zato se je SPC1 izkazal kot uspešen pri učinkovitem nadzoru delovanja testa na sistemu NeuMoDx System.

Preglednica 11: Učinkovitosti kontrole obdelave vzorca za virusno DNK v plazmi*

Testirana napaka koraka procesa	Status amplifikacije kontrole obdelave vzorca 1	Status amplifikacije tarče CMV	Rezultat testa
Presence of Inhibitor (Prisotnost inhibitorja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Delivered (Brez izpiranja)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Not Amplified (Ni amplificirano)	Unresolved (Nerešeno)
No Wash Blowout (Brez izpihanja po izpiranju)	Amplified (Amplificirano)	Amplified (Amplificirano)	Positive with Quantitation within 0.3 Log ₁₀ IU/mL of Control (Pozitivno s kvantifikacijo znotraj 0,3 log ₁₀ IE/ml kontrole)

*Kot sistem modela za oceno učinkovitosti kontrole obdelave vzorca je bil uporabljen citomegalovirus (CMV) v primerkih plazme.

Navzkrižna kontaminacija

Stopnja navzkrižne kontaminacije za primerke plazme je bila določena z obdelavo izmenjujočih se visoko pozitivnih in negativnih vzorcev EBV. Izvedenih je bilo pet nizov takih testiranj z metodo šahovnice s skupno 60 ponovitvami EBV-negativne plazme in 60 ponovitvami plazme, obogatene z EBV s koncentracijo 6,0 log₁₀ IE/ml na sistemih NeuMoDx 288 in 96 Molecular Systems. Na obeh vrstah sistema je bilo vseh 120 ponovitev z negativnim primerkom prikazanih kot negativnih, kar je pokazalo, da ni prišlo do navzkrižne kontaminacije med obdelavo vzorca plazme na sistemih NeuMoDx Systems.

Ekvivalenca matrice primerka

Testiranje je bilo izvedeno za prikaz ekvivalence med primerki sveže in zamrznjene plazme z uporabo modela podobnega virusa, ki se prenaša s krvjo, tj. CMV. Sveži primerki so bili shranjeni pri 4 °C, dokler niso bili obogateni s tremi stopnjami CMV in testirani glede ekvivalence. Vzorci so bili zamrznjeni najmanj 24 ur pri -20 °C. Po tem obdobju zamrzovanja so bili primerki odmrznjeni in ponovno testirani. Rezultati svežih in zamrznjenih primerkov plazme so bili primerjani glede ekvivalence z regresijsko analizo. Podatki so prikazali odlično ekvivalenco med svežimi in zamrznjenimi primerki plazme z naklonom 1,0 in zelo nizkim odstopanjem (prestrežanje), kot je prikazano v *preglednici 12* spodaj.

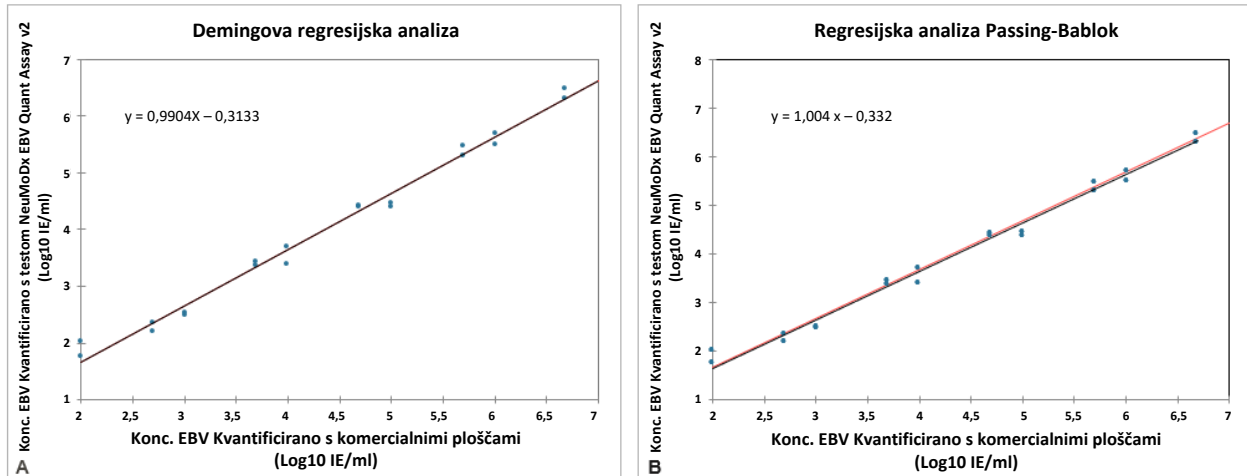
Preglednica 12: Ekvivalenca matrice primerka

Zahteva parametra	Sveža EDTA proti zamrznjeni
Naklon [0,9–1,1]	1,000
Prestrežanje < 0,5 log ₁₀ IE/ml	0,020
Vrednost <i>p</i> > 0,05	0,631

Karakteristike delovanja kvantifikacije

Kvantitativno delovanje testa NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 je bilo določeno z obdelavo dveh komercialnih plošč za verifikacijo EBV znamke AcroMatrix in Exact Diagnostics (sledljivo v skladu s 1. mednarodnim standardom WHO za EBV) na sistemih NeuMoDx Molecular Systems.

Odlična korelacija je bila ugotovljena med testom NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 in dvema komercialnima ploščama za preverjanje EBV (*slika 4*) tako pri analizi z Demingovo regresijo (*slika 4A*) ali po metodi Passing-Bablok (*slika 4B*).



Slika 4. Grafični prikaz ekvivalence med verifikacijskima ploščama AcroMatrix in Exact Diagnostics ter testom NeuMoDx EBV Quant Assay. A. Linearna regresijska analiza z uporabo Demingove metode. B. Linearna regresijska analiza z uporabo metode Passing-Bablok.

Kakovost ujemanja Demingove regresije je prikazana s skupnim koeficientom naklona 0,990 in prestrežanjem (odstopanjem) -0,313, kar kaže, da rezultati koncentracije, pridobljeni s testom NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 in verifikacijskimi ploščami EBV, korelirajo s sprejemljivim odstopanjem. Linearno ujemanje Passing-Bablok prav tako potrjuje pomen korelacije med rezultati, pridobljenimi s testom NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 in verifikacijskimi ploščami EBV, s skupnim koeficientom naklona 1,004 in prestrežanjem (odstopanjem) -0,332. Izračunana vrednost *p* analize Passing-Bablok je bila 0,988.

Preglednica 13: Povzetek analize linearne regresije Deming in Passing-Bablok

Demingova analiza		Analiza Passing-Bablok	
Prestrežanje	Koeficient naklona	Prestrežanje	Koeficient naklona
-0,313	0,990	-0,332	1,004
95-% CI (-0,620, -0,007)	95-% CI (0,928, 1,053)	95-% CI (-0,548, -0,116)	95-% CI (0,950, 1,047)

REFERENCE

1. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
2. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant Direct*. 2016 Jan; 2(1): e48.
3. About Epstein-Barr Virus (EBV).” Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, 28 Sept. 2020, www.cdc.gov/epstein-barr/about-ebv.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
5. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

BLAGOVNE ZNAMKE

NeuMoDx™ je blagovna znamka družbe NeuMoDx Molecular, Inc.










NeuDry™ je blagovna znamka družbe NeuMoDx Molecular, Inc.


Seracare® je registrirana blagovna znamka družbe Seracare Life Sciences, Inc.

TaqMan® je registrirana blagovna znamka družbe Roche Molecular Systems, Inc.

Vsa druga imena proizvodov, blagovnih znamk in registriranih blagovnih znamk, ki se morda pojavijo v tem dokumentu, so last njihovih zadevnih lastnikov.

POMEN SIMBOLOV

R only	Samo na recept		Vsebuje zadostno količino za <n> testov
	Proizvajalec		Glejte navodila za uporabo
IVD	Diagnostični medicinski pripomoček <i>in vitro</i>		Pozor
EC REP	Pooblaščen predstavnik v Evropski skupnosti		Nevarnost za zdravje
REF	Kataloška številka	CE	Oznaka CE
LOT	Koda serije	CONT	Vsebuje
	Rok uporabnosti		Vsebuje biološki material živalskega izvora
	Temperaturna meja	Boric acid	Borova kislina
	Ni za ponovno uporabo		

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

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

Tehnična podpora/poročanje v okviru vigilance: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents

