

REF 201400 NeuMoDx™ CMV 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 System

 Za 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 CMV Quant Assay automatizirani je, *in vitro* test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za kvantifikaciju DNK citomegalovirusa (CMV) u ispitcima humane plazme za određivanje genotipa CMV-a od gB1 do gB4 kod osoba zaraženih CMV-om. Ispitivanje NeuMoDx CMV 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 ispitka i lančanu reakciju polimerazom (Polymerase Chain Reaction, PCR) u stvarnom vremenu radi ciljanja vrlo konzerviranih sekvenci u genomu citomegalovirusa.

Ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay namijenjeno je za *in vitro* kvantifikaciju DNK citomegalovirusa (CMV) u svježim i zamrznutim ispitcima humane plazme na sustavima NeuMoDx 288 i NeuMoDx 96 Molecular Systems. Ispitivanje je namijenjeno za uporabu u kombinaciji s kliničkom slikom i drugim laboratorijskim markerima napretka bolesti za kliničko zbrinjavanje i praćenje infekcije CMV-om. Ispitivanje nije namijenjeno za uporabu kao test probira na prisutnost CMV-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 ili EDTA ili ACD kao antikoagulacijsko sredstvo. Kako bi se pripremila za testiranje, plazma u epruveti za ispitke kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se na sustav NeuMoDx System u predviđeni nosač epruveta za ispitke za početak obrade. Za svaki se ispitak alikvot uzorka plazme volumena 550 µl miješa s puferom NeuMoDx Lysis Buffer 1 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 (šegmenti ciljane sekvence CMV genoma u vrlo konzerviranim regijama). Ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay uključuje kontrolu obrade uzorka (Sample Process Control, SPC1) DNK za pomoć s praćenjem prisutnosti potencijalno inhibirajućih tvari kao i pogrešaka sustava NeuMoDx System ili reagensa koje se mogu dogoditi tijekom postupka ekstrakcije i amplifikacije.

CMV je uobičajeni dvolančani DNK virus iz porodice humanih herpesvirusa kojim se mogu zaraziti osobe svih dobnih skupina. Procjenjuje se da je do dobi od 40 godina više od polovice populacije zaraženo CMV-om.¹ CMV se širi putem tjelesnih tekućina kao što su slina, urin, krv, suze, sperma i majčino mlijeko. Imunokompetentne osobe zaražene CMV-om obično su asimptomatske, ali infekcija virusom može biti ozbiljna kod beba i osoba s oslabljenim imunološkim sustavom. Trudnice mogu prenijeti CMV svojoj nerođenoj djeci i uzrokovati urođenu zarazu CMV-om što može rezultirati gubitkom sluha, zajedno s drugim zaostacima u razvoju i motoričkim sposobnostima. CMV je glavni uzročnik bolesti kod pacijenata s oslabljenim imunološkim sustavom, uključujući primatelje transplantacije čvrstih organa, primatelje transplantacija hematopoetskih stanica, pacijente zaražene HIV-om i pacijente koji se liječe imunomodulacijskim lijekovima.² Praćenje virusnog opterećenja CMV-a prvenstveno se primjenjuje kod populacije pacijenata s oslabljenim imunološkim sustavom, kod koje uzrokuje mnoga oboljenja, uključujući upalu pluća, bolesti gastrointestinalnog trakta, hepatitis i encefalitis te povećava mogućnost odbacivanja organa i drugih oportunističkih infekcija.

Postavljanje dijagnoze infekcije CMV-om ne temelji se samo na testiranju nukleinske kiseline (Nucleic Acid Testing, NAT); NAT testiranje upotrebljava se zajedno s testiranjem antigena koje uključuje bojenje polimorfonuklearnih leukocita (PMN) radi otkrivanja ranog strukturnog proteina donjeg matriksa CMV-a, a u obzir se uzimaju i drugi simptomi koje pacijent može imati. Testiranje virusnog opterećenja CMV-a rutinski se upotrebljava kako bi se utvrdilo kada je antivirusna terapija potrebna, kao i za praćenje učinkovitosti takvih terapija.³ Iako su trenutne smjernice za zbrinjavanje i liječenje infekcija CMV-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.

NAČELA POSTUPKA

Za ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay na sustavu NeuMoDx System upotrebljavaju se testne trake NeuMoDx CMV Quant Test Strip, kalibrator NeuMoDx CMV Calibrator, kontrole NeuMoDx CMV External Control, pufer NeuMoDx Lysis Buffer 1 i NeuMoDx reagensi za opću uporabu za izvođenje analize. Ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay kombinira automatiziranu ekstrakciju DNK, amplifikaciju i detekciju izvođenjem PCR-a u stvarnom vremenu. Ispitci pune krvi prikupljaju se u epruvete s EDTA ili ACD radi pripreme plazme. Ispitak plazme u epruveti za ispitke kompatibilnoj sa sustavom NeuMoDx System postavlja se u nosač epruveta za ispitke, koji se zatim postavlja u sustav 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 reagensa NeuDry™ za amplifikaciju koji sadrže sve elemente neophodne za PCR amplifikaciju ciljnih sekvenci specifičnih za CMV i ciljnih sekvenci za 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 području PCR komore uložka NeuMoDx Cartridge. Uložak NeuMoDx Cartridge također je osmišljen da zadrži amplikon nakon PCR-a u stvarnom vremenu i na taj način praktički ukloni rizik od kontaminacije nakon amplifikacije.

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' egzozonukleazna aktivnost DNK polimeraze Taq degradira probu sparnu s predložkom. Degradacijom probe oslobađa se fluorokrom i prekida se njegova neposredna blizina prigušivaču, čime se zbog FRET-a prevladava učinak prigušivanja i omogućava fluorescentna detekcija fluorokroma. Dobiveni fluorescentni signal detektiran u kvantitativnom PCR termocikleru sustava NeuMoDx System izravno je proporcionalan oslobođenom fluorokromu i može se korelirati s količinom prisutne ciljne DNK.

TaqMan proba označena fluorokromom (pobuda: 490 nm i emisija: 521 nm) na 5' kraju i tamnim prigušivačem na 3' kraju upotrebljava se za detekciju DNK bakterije CMV. Za detekciju SPC1, TaqMan proba označena je drugom fluorescentnom bojom (pobuda: 535 nm i emisija: 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 konačni 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 unutar granica kvantifikacije.

REAGENSI / POTROŠNI MATERIJAL

Isporučeni materijal

REF.	Sadržaj	Testova po jedinici	Testova po pakiranju
201400	Testna traka NeuMoDx CMV Quant Test Strip <i>Suhi reagensi za PCR koji sadrže TaqMan probe i početnice specifične za CMV te TaqMan probu i početnice specifične za SPC1.</i>	16	96

Reagensi i potrošni materijal 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>
800400	Kalibratori NeuMoDx CMV Calibrators <i>Kompleti CMV High i Low Calibrators za jednokratnu uporabu za utvrđivanje valjanosti standardne krivulje</i>
900401	Kontrole NeuMoDx CMV External Controls <i>Kompleti pozitivnih i negativnih kontrola za CMV za jednokratnu uporabu za utvrđivanje svakodnevne valjanosti ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay</i>
400400	Pufer NeuMoDx Lysis Buffer 1
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

- Testna traka NeuMoDx CMV Quant Test Strip namijenjena je samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu sa sustavima NeuMoDx Systems.
- Ne upotrebljavajte reagensne ili potrošni materijal nakon navedenog datuma isteka roka trajanja.
- Ne upotrebljavajte reagensne ako je zaštitna folija potrgana ili ako je pakiranje oštećeno po dolasku.
- Ne upotrebljavajte potrošni materijal ili reagensne ako je zaštitna vrećica otvorena ili oštećena pri dolasku.
- Valjana kalibracija testa (dobivena obradom kalibratora visoke i niske razine iz kompleta kalibratora NeuMoDx CMV Calibrators [REF. 800400]) mora biti dostupna prije dobivanja rezultata testa za kliničke uzorke.
- Kontrole NeuMoDx CMV External Controls [REF 900401] moraju se obraditi svaka 24 sata tijekom testiranja s pomoću ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay.
- Minimalni volumen ispitka iznosi 1 ml plazme s EDTA/ACD kada se upotrebljava nosač 32 epruvete; volumen manji od 1 ml može izazvati pogrešku na sustavu NeuMoDx System.
- Izvođenje ispitivanja na CMV na ispitcima koji se čuvaju na neodgovarajućim temperaturama ili dulje od navedenih vremena pohrane može dati nevažne ili pogrešne rezultate ako se upotrebljava testna traka NeuMoDx CMV Quant Test Strip.
- 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 CMV 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 CMV Quant Test Strip ili pločice NeuMoDx Extraction Plate te gornju površinu pufera NeuMoDx Lysis Buffer 1; 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.
- Ispitcima uvijek rukujte kao da su infektivni te u skladu sa sigurnim laboratorijskim postupcima poput onih opisanih u *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ i dokumentu M29-A4 instituta CLSI.⁵
- Odložite nekorištene reagensne i otpad u skladu s državnim, saveznim, pokrajinskim i lokalnim propisima.

POHRANA, RUKOVANJE I STABILNOST PROIZVODA

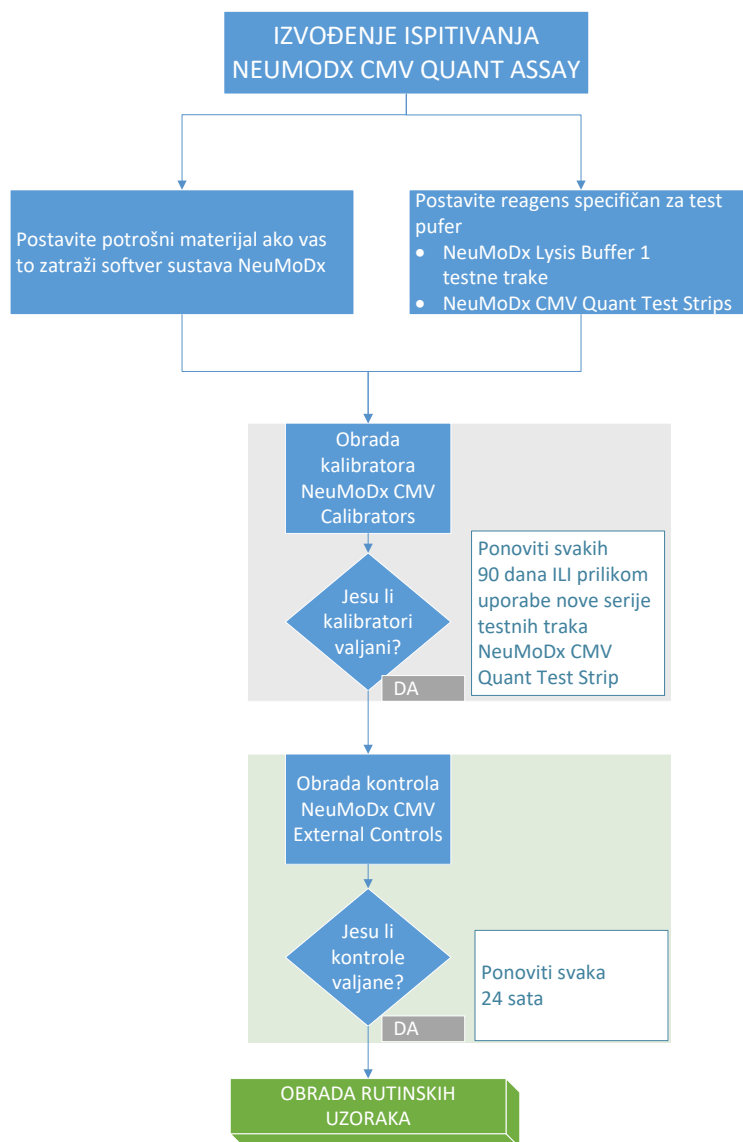
- Svi NeuMoDx reagensi i potrošni materijali (uz iznimku vanjskih kontrola i kalibratora) stabilni su u primarnom pakiranju na temperaturi od 18 do 23 °C do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci proizvoda.
- Testna traka NeuMoDx CMV Quant Test Strip postavljena na sustav NeuMoDx System stabilna je 14 dana; softver sustava NeuMoDx System će zatražiti uklanjanje testnih traka koje su se upotrebljavale na sustavu NeuMoDx System dulje od 14 dana te će biti potrebno otvoriti nove testne trake NeuMoDx CMV Quant Test Strips i postaviti ih na sustav NeuMoDx System.
- Kalibratori NeuMoDx calibrators i kontrole NeuMoDx controls nisu infektivni i treba ih odložiti u laboratorijski biološki otpad nakon uporabe jer će nakon obrade na sustavu sadržavati ciljani materijal koji može uzrokovati kontaminaciju ako se s njime ispravno ne postupa.

PRIKUPLJANJE, PRIJEVOZ I POHRANA ISPITAKA

1. Rukujte svim ispitcima kao da mogu prenijeti infektivne agense.
2. Nemojte zamrzavati punu krv ni bilo kakve ispitke pohranjene u primarnim epruvetama.
3. Za pripremu ispitaka plazme punu krv treba prikupiti u sterilne epruvete uz primjenu antikoagulansa EDTA ili ACD. Pridržavajte se uputa proizvođača epruvete za prikupljanje ispitka.
4. 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.
5. 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.

6. 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.
7. Pripremljeni ispitci plazme mogu se pohraniti na temperaturi ≤ -20 °C do 26 tjedana prije obrade; uzorci plazme ne bi trebali proći više od 2 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prije uporabe.
 - a. 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.
 - b. Nakon odmrzavanja uzoraka testiranje treba provesti u roku od 8 sati.
8. Ako se ispitci otpremaju, treba ih pakirati i označiti u skladu s primjenjivim državnim i/ili međunarodnim propisima.
9. Jasno označite ispitke i naznačite da su ispitci za testiranje na CMV.
10. Nastavite s odjeljkom *Priprema testa*.

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



Slika 1: Tijek rada izvođenja ispitivanja NeuMoDx CMV 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. Pipetom za prijenos prenesite ≥ 1 ml plazme u epruvetu za ispitak (sekundarnu) s crtičnim kodom ako upotrebljavate nosač 32 epruvete ili > 2 ml ako upotrebljavate nosač 24 epruvete. Pripazite da ne prenesete nikakve ugruške iz uzorka plazme u epruvetu za ispitke. Za svaki ispitak upotrebljavajte drugu pipetu za prijenos.
3. Sekundarna epruveta treba ispunjavati sljedeće specifikacije za epruvete kompatibilne sa sustavom NeuMoDx System ovisno o nosaču epruveta za ispitke koji se upotrebljava za obradu.
 - Nosač 32 epruvete: između 11 mm i 14 mm u promjeru i između 60 mm i 120 mm visine
 - Nosač 24 epruvete: između 14,5 mm i 18 mm u promjeru i između 60 mm i 120 mm visine

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 NeuMoDx System Test Strip carrier(s) testnim trakama NeuMoDx CMV 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 spremnik za biološki opasan otpad.
4. Ako vas softver sustava NeuMoDx System to zatraži, prema potrebi obradite kalibratore Calibrators [REF. 800400] i/ili kontrole External Controls [REF. 900401]. 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 CMV Quant Test Strip može se upotrebljavati samo na sustavima NeuMoDx Systems.
- Radni učinak testne trake NeuMoDx CMV Quant Test Strip utvrđen je za ispitke plazme pripremljene iz pune krvi prikupljene s antikoagulantom EDTA/ACD; uporaba testne trake NeuMoDx CMV Quant Test Strip s drugim kliničkim vrstama ispitaka nije procijenjena i radne značajke testa za druge vrste ispitaka nisu poznate.
- Budući da detekcija virusa CMV ovisi o broju organizama 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 ispitaka, tehničke pogreške ili zamjene epruveta za ispitke. Dodatno, lažno negativni rezultati javljaju se jer je broj virusnih čestica u uzorku niži od granice detekcije ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay.
- Rad na sustavu NeuMoDx System ograničen je na osoblje obučeno za uporabu sustava NeuMoDx System.
- Ako ne dođe do amplifikacije ciljne sekvence CMV-a i ciljne sekvence SPC1, prijavljuje se nevažeći rezultat (Indeterminate (Neodređeno) ili Unresolved (Nerazriješeno)) te je potrebno ponoviti test.
- Ako ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay ima rezultat Positive (Pozitivno), ali je vrijednost kvantifikacije izvan granica kvantifikacije, sustav NeuMoDx System prijavit će je li detektirani CMV *ispod* donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ili *iznad* gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- U slučaju da je detektirani CMV ispod donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay može se (po želji) ponoviti s drugim alikvotom ispitka.

- U slučaju da je detektirani CMV iznad gornje granice kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay može se ponoviti s razrijeđenim alikvotom originalnog ispitka. Preporučuje se razrjeđenje u omjeru 1:100 ili 1:1000 plazmom negativnom na CMV ili diluansom Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Koncentracija originalnog ispitka može se izračunati na sljedeći način:

$$\text{koncentracija originalnog ispitka} = \log_{10} (\text{faktor razrjeđivanja}) + \text{prijavljena koncentracija razrijeđenog uzorka.}$$

- 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.
- Positivan rezultat ne naznačava nužno prisutnost vijabilnih organizama. Međutim, pozitivan rezultat upućuje na vjerojatnu prisutnost DNK citomegalovirusa.
- Delecija ili mutacije u konzerviranim regijama koje su ciljane ispitivanjem NeuMoDx CMV Quant Assay mogu utjecati na detekciju ili mogu dovesti do pogrešnih rezultata kada se upotrebljava testna traka NeuMoDx CMV Quant Test Strip.
- Rezultati ispitivanja NeuMoDx CMV 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 CMV Quant Assay automatski generira softver sustava NeuMoDx System primjenom algoritma odlučivanja i parametara za obradu rezultata navedenih u datoteci definicije ispitivanja NeuMoDx CMV (CMV Assay Definition File, CMV ADF). Rezultat ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay može se prijaviti kao Negative (Negativno), Positive (Pozitivno) s prijavljenom koncentracijom CMV-a, Positive (Pozitivno) iznad ULoQ, Positive (Pozitivno) ispod LLoQ, Indetermined (Neodređeno) ili Unresolved (Nerazriješeno) na temelju statusa amplifikacije ciljane sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultati se prijavljuju na temelju algoritma odlučivanja u *tablici 1*.

Tablica 1: Algoritam odlučivanja ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay

Rezultat	CMV	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 (II) $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (I) } EP \geq 1500]$	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.) < 1,3 \log_{10} IU/ml, NO QUANT (NEMA KVANT.)	N/P
Negative (Negativno)	N/A (N/P) OR (II) $[2 \leq Ct < 9 \text{ AND (I) } EPR \leq 2]$ OR (II) $[9 \leq Ct \leq 41 \text{ AND (I) } EP < 1500]$ OR (II) $Ct > 41$	AMPLIFIED (AMPLIFICIRANO) ($28 \leq Ct \leq 34$) 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); Ct = Cycling threshold (Prag cikliranja);

Quant (Kvant.) = izračunata količina prisutnog CMV-a izražena u \log_{10} IU/ml. Pogledajte Izračun testa u nastavku.

Izračun testa

- Za uzorke unutar raspona kvantifikacije ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay koncentracija DNK CMV-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 CMV calibrators koji su obrađeni kako bi se utvrdila valjanost standardne krivulje za određenu seriju testne trake NeuMoDx CMV Quant Test Strip, na određenom sustavu NeuMoDx System.
 - Koeficijent kalibracije uključen je u konačno određivanje koncentracije DNK CMV-a.

2. Rezultati ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay izraženi su u \log_{10} IU/ml.
3. Dobivena kvantifikacija nepoznatih uzoraka sljediva je do 1. Međunarodnog standarda za CMV SZO-a.

Kalibracija testa

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

Vanjski kalibratori

1. Kalibratori NeuMoDx CMV Calibrators isporučuju se u kompletu [REF. 800400] i sadržavaju neinfektivnu enkapsuliranu ciljnu sekvencu CMV-a pripremljenu u diluensu Basematrix.
2. Komplet kalibratora za CMV treba obraditi sa svakom novom serijom testnih traka NeuMoDx CMV Quant Test Strips, ako se nova datoteka definicije ispitivanja za CMV učita na sustav NeuMoDx System ili ako je trenutačno postavljeni komplet kalibratora premašio razdoblje valjanosti (trenutačno postavljeno na 90 dana) ili ako je softver sustava NeuMoDx System izmijenjen.
3. 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 $3 \log_{10}$ IU/ml, a nominalna ciljna vrijednost kalibratora visoke razine iznosi $5 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Koeficijent kalibracije izračunat je kako bi se ispravila očekivana varijacija između serija testnih traka; taj koeficijent kalibracije upotrebljavao se za određivanje konačne koncentracije CMV-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 CMV-a u diluensu Basematrix za pozitivne kontrole, isporučuje tvrtka NeuMoDx Molecular, Inc. u sklopu kompleta koji sadrži NeuMoDx CMV External Controls [REF. 900401].
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 dosegnu sobnu temperaturu ($15 - 30$ °C) dok se u potpunosti ne odmrznu. 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 CMV, a negativna kontrola trebala bi dati rezultat Negative (Negativno) na CMV.
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 CMV external control(s) sa svježe odmrznutim bočicama kontrola čija provjera valjanosti nije uspjela.
 - d) Ako se za pozitivnu kontrolu NeuMoDx CMV external control i dalje dobiva rezultat Negative (Negativno), obratite se korisničkoj službi tvrtke NeuMoDx.
 - e) Ako se za negativnu kontrolu NeuMoDx CMV external control i dalje dobiva rezultat Positive (Pozitivno), pokušajte ukloniti sve izvore potencijalne kontaminacije, što uključuje zamjenu SVIH reagensa, 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 CMV Quant Test Strip što omogućuje detekciju prisutnosti SPC1 zajedno s ciljnom sekvencom DNK CMV-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.

Nevažeći rezultati

Ako ispitivanje NeuMoDx CMV 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 CMV-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

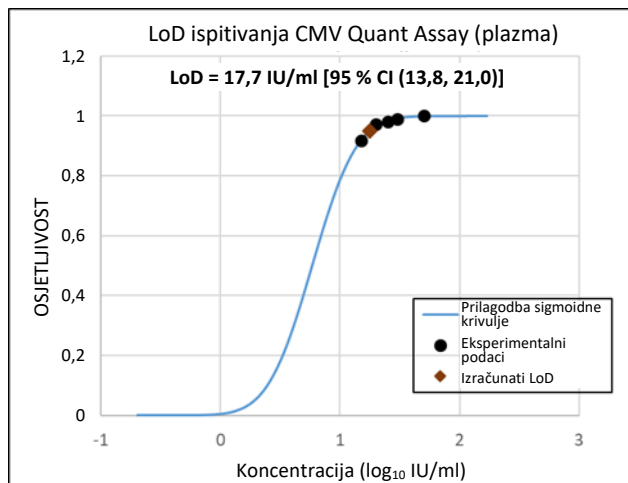
Analitička osjetljivost – granica detekcije primjenom standarda SZO-a

Analitička osjetljivost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay utvrđena je testiranjem negativnih ispitaka i serije razrjeđenja 1. međunarodnog standarda SZO-a u probranoj negativnoj humanoj plazmi za određivanje granice detekcije (Limit of Detection, LoD) na sustavima NeuMoDx Systems. LoD je definirana kao najniža ciljna razina detektirana pri stopi od 95 % određena Probit analizom. Ispitivanje je provedeno tijekom 3 dana na više sustava s više serija reagensa NeuMoDx. Svaki sustav obradio je 18 ponavljanja svake razine razrjeđivanja dnevno. Stope detekcije prikazane su u *tablici 2*.

Tablica 2: Pozitivne stope detekcije za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay

Ciljna koncentracija [IU/ml]	Ciljna koncentracija [\log_{10} IU/ml]	PLAZMA		
		Broj valjanih testova	Broj pozitivnih rezultata	Stopa detekcije
50	1,70	108	108	100,0 %
30	1,48	108	107	99,1 %
25	1,40	108	106	98,1 %
20	1,30	108	105	97,2 %
15	1,18	108	99	91,7 %
NEG.	---	108	0	0,0 %

Utvrđeno je da granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay u plazmi za varijantu gB1 iznosi 17,7 IU/ml ($1,25 \log_{10}$ IU/ml) s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (Confidence Interval, CI) od 13,8 – 21,0 IU/ml, ($1,14 - 1,32 \log_{10}$ IU/ml) [*slika 2*]. LoD među genotipovima iznosi 20,0 IU/ml ($1,30 \log_{10}$ IU/ml) kao što je utvrđeno analizom stope uspješnosti.



Slika 2: Probit analiza upotrebljava se za određivanje LoD-a ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay u uzorcima plazme

Analitička osjetljivost – donja granica kvantifikacije (LLOQ)

Donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) definira se kao donja ciljna razina pri kojoj se postiže stopa detekcije > 95 % I TAE $\leq 1,0$. Kako bi se odredio LLOQ, ukupna analitička pogreška (Total Analytical Error, TAE) izračunata je za svaku ciljnu razinu CMV-a za koju je dobivena detekcija > 95 % u sklopu izračuna LoD-a. TAE se definira 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.

Objedinjeni rezultati za 5 razina ispitaka plazme s CMV-om (varijanta gB1) koji su se upotrebljavali u ispitivanju donje granice kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) prikazani su u *tablici 3*. Na temelju tog skupa podataka i prethodno određene granice detekcije (Limit of Detection, LoD), utvrđeno je da donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) iznosi 20,0 IU/ml (1,30 \log_{10} IU/ml) i to je potvrđeno testiranjem više genotipova.

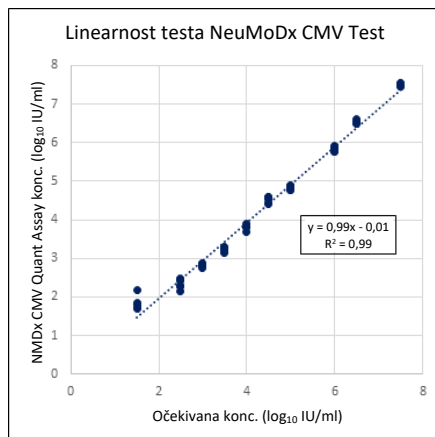
Tablica 3: LLOQ ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay s odstupanjem i TAE

Ciljna konc. [IU/ml]	Ciljna konc. [\log_{10} IU/ml]	Plazma				
		Prosječna konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekcija (%)	SD	Odstupanje	TAE
50	1,70	1,75	100,0	0,16	0,05	0,37
30	1,48	1,62	99,1	0,24	0,14	0,62
25	1,40	1,56	98,1	0,19	0,17	0,55
20	1,30	1,57	97,2	0,22	0,27	0,72
15	1,18	1,52	91,7	0,21	0,35	0,78

Na temelju rezultata tih ispitivanja, utvrdilo se da granica detekcije (Limit of Detekcije, LoD) kao i donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay iznose 20,0 IU/ml [1,30 \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 CMV Quant Assay utvrđeni su iz plazme pripremom serije razrjeđenja NeuMoDx enkapsulirane ciljne sekvence CMV-a i kontrole Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) uz utvrđenu slijedivost do 1. Međunarodnog standarda SZO-a. Panel s 9 sastavnica pripremljen je u poolu plazme negativne na CMV za izradu panela koji obuhvaća raspon koncentracije 8 – 1,7 \log_{10} IU/ml. Utvrđeno je da gornja granica kvantifikacije (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay iznosi 8,0 \log_{10} IU/ml. Koncentracije ispitivanja za CMV koje je prijavio sustav NeuMoDx System uspoređene s očekivanim vrijednostima prikazane su na *slici 3*.



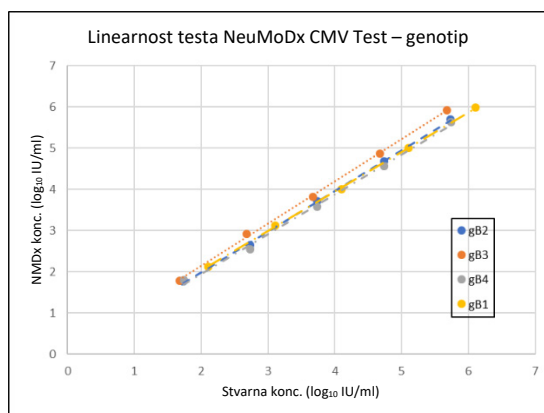
Slika 3: Linearnost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay

Linearnost za genotipove

Linearnost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay za četiri genotipa CMV-a (gB1, gB2, gB3 i gB4) određena je testiranjem pet različitih koncentracija svakog genotipa CMV-a pripremljenog u poolu plazme negativne na CMV. Razine ciljnih sekvenci CMV-a testiranih u ovom ispitivanju ovisile su o koncentraciji izvornog ispitka i stoga su se razlikovale za razne genotipove. Ispitivanje je provedeno testiranjem 6 ponavljanja svakog od 4 genotipova pri 5 koncentracija. Linearnost za šest genotipova CMV-a prikazana je u *tablici 4* i na *slici 4*.

Tablica 4: Linearnost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay za genotipove

Genotip	Jednadžba linearnosti y = kvantifikacija ispitivanja NeuMoDx CMV Assay x = očekivano određivanje	R ²
gB1	$y = 0,960x + 0,103$	0,994
gB2	$y = 0,989x + 0,009$	0,996
gB3	$y = 1,023x + 0,099$	0,967
gB4	$y = 0,968x + 0,004$	0,992



Slika 4: Linearnost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay za genotipove

Analitička specifičnost – križna reaktivnost

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

Tablica 5: 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>
Epstein-Barrov virus	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 CMV Quant Assay procijenjena je u prisutnosti organizama koji nisu ciljani ispitivanjem primjenom istih poolova organizama pripremljenih za testiranje križne reaktivnosti navedenih gore u *tablici 5*. U plazmu negativnu na CMV dodani su poolovi organizama u skupinama od 4 – 7 te ciljna sekvenca CMV-a pri koncentraciji od 3 log₁₀ IU/ml. Nije uočena značajna interferencija u prisutnosti tih komenzalnih organizama na što ukazuje minimalna devijacija kvantifikacije od kontrolnih ispitaka koji ne sadrže interferirajuće agense.

Analitička specifičnost – interferirajuće tvari, endogene i egzogene tvari

Ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay procijenjeno je u prisutnosti uobičajenih egzogenih i endogenih interferirajućih tvari pronađenih u kliničkim ispitcima plazme s CMV-om. To je uključivalo abnormalno visoke razine komponenti krvi te uobičajene antivirusne lijekove koji su klasificirani u *tablici 6*. Svaka tvar dodana je u probiranu humanu plazmu negativnu na CMV u koju je dodano 3 log₁₀ IU/ml CMV-a i uzorci su analizirani kako bi se utvrdila interferencija. Osim toga, plazme pacijenata s uobičajenim stanjima bolesti povezanim s infekcijom CMV-om također su testirane kako bi se utvrdila potencijalna interferencija. Prosječna koncentracija i odstupanje svih ispitanih tvari u usporedbi s kontrolnim uzorcima u koje je dodana jednaka razina CMV-a navedeni su u *tablici 7*. Nijedna od egzogenih i endogenih tvari nije utjecala na specifičnost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay.

Tablica 6: 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 (CMV)		Everolimus	Imunosupresiv
	Valganciklovir hidroklorid	Antivirusni (CMV)		Kalijev klavulanat	Antibiotik
Pool 2	Prednizon	Kortikosteroid/immunosupresiv	Pool 5	Famotidin	Antagonist receptora histamina
	Cidofovir	Antivirusni (CMV)		Sulfametoksazol	Antibiotik
	Cefotetan	Antibiotik (širokog spektra)		Valaciclovir	Antivirusni (Herpesviridae)
	Cefotaksim	Antibiotik (širokog spektra)		Letermovir	Antivirusni (CMV)
	Flukonazol	Antifungalni		Dinatrijev tikarcilin	Antibiotik
Pool 3	Mikofenolat mofetil	Imunosupresiv	Leflunomid	Imunosupresiv	
	Mikofenolat-natrij	Imunosupresiv			
	Piperacilin	Antibiotik			
	Sirolimus/rapamicin	Imunosupresiv			
	Tazobaktam	Modificirani antibiotik			

Tablica 7: Testiranje interferencije – egzogeni i endogeni agensi

Endogeni	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Hemoglobin	2,97	0,07
Trigliceridi	3,03	0,13
Bilirubin	3,01	0,11
Albumin	2,88	-0,02
Egzogeno (lijekovi)	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Pool 1: azatioprin, ciklosporin, foskarnet, ganciklovir, valganciklovir hidroklorid	2,88	-0,02
Pool 2: prednizon, cidofovir, cefotetan, cefotaksim, flukonazol	2,91	0,01
Pool 3: mikofenolat mofetil, mikofenolat-natrij, piperacilin, sirolimus/rapamicin, tazobaktam	2,98	0,08
Pool 4: trimetoprim, vankomicin, takrolimus, everolimus, kalijev klavulanat	3,05	0,15
Pool 5: famotidin, sulfametoksazol, letermovir, valaciklovir, dinatrijev tikarcilin, leflunomid	2,87	-0,03
Stanje bolesti	Prosječna konc.	Odstupanje
	log ₁₀ IU/ml	log ₁₀ IU/ml
Antinuklearno protutijelo (Antinuclear Antibody, ANA)	2,90	0,00
Sistemska eritemski lupus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	3,04	0,14
Reumatoidni artritis	2,99	0,09

Preciznost unutar laboratorija

Preciznost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay određena je testiranjem 3 ponavljanja panela ispitaka CMV-a s 4 sastavnice pripremljenih s kontrolom Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) dvaput dnevno, na dva sustava NeuMoDx 288 System i jednom sustavu NeuMoDx 96 System tijekom 12 dana. Određene su preciznosti unutar obrade, unutar dana i unutar sustava i utvrđena je sveukupna standardna devijacija od $\leq 0,15$ log₁₀ IU/ml. Dokazana je izvrsna preciznost na svim sustavima, tijekom svih dana ili tijekom svih obrada kao što je prikazano u *tablici 8*. Preciznost između korisnika nije određena jer korisnik ne igra značajnu ulogu u obradi uzoraka na sustavu NeuMoDx System.

Tablica 8: Preciznost unutar laboratorija – ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay na sustavima NeuMoDx Systems

Ciljna konc. CMV-a [log ₁₀ IU/ml]	Prosječna konc. CMV-a [log ₁₀ IU/ml]	SD unutar sustava	SD unutar dana	SD unutar obrade	Sveukupni SD (unutar laboratorija)
5,7	5,64	0,09	0,09	0,07	0,13
4,7	4,58	0,10	0,10	0,08	0,14
3,7	3,60	0,09	0,09	0,07	0,12
2,7	2,62	0,13	0,13	0,10	0,15

Obnovljivost među serijama

Obnovljivost ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay među serijama određena je s pomoću tri različite serije ključnih reagensa, pufera NeuMoDx Lysis Buffer 1, pločica NeuMoDx Extraction Plates i testnih traka NeuMoDx CMV Quant Test Strips. Panel za CMV s 4 sastavnice pripremljen s kontrolom Exact CMV Control upotrebljavao se za procjenu radnog učinka. Testiranje je provedeno s pomoću tri serije reagensa na tri sustava tijekom 6 dana. Varijacije unutar serija i među serijama analizirane su i rezultati su prikazani u *tablici 9*. Maksimalno sveukupno odstupanje iznosilo je 0,12 log₁₀ IU/ml, a maksimalna sveukupna standardna devijacija (SD) iznosila je 0,39 log₁₀ IU/ml. Ekvivalentan radni učinak dokazan je među serijama jer je kvantifikacija svih sastavnica panela bila unutar specifikacije tolerancije.

Tablica 9: Obnovljivost među serijama – ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay

Ciljna konc. CMV-a [log ₁₀ IU/ml]	Prosječna konc. CMV-a [log ₁₀ IU/ml]	N (valjani rezultati po seriji)	Odstupanje	SD među serijama	SD unutar serije	Sveukupni SD
5,7	5,65	36	0,05	0,27	0,15	0,31
4,7	4,63	36	0,07	0,22	0,13	0,26
3,7	3,58	36	0,12	0,34	0,18	0,39
2,7	2,64	36	0,06	0,12	0,14	0,18

Učinkovitost kontrole

SPC1 uključen je u ispitivanje NeuMoDx CMV Quant Assay za prijavljivanje neuspjelih koraka obrade ili inhibicija koje utječu na radni učinak ispitivanja. Učinkovitost je testirana 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. Pozitivni (od 3 log₁₀ IU/ml) i negativni ispiti ispitani su u prisutnosti kontrole 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 CMV-a 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 kvantifikaciju CMV-a. Stoga se pokazala uspješnost SPC1 u učinkovitom praćenju radnog učinka ispitivanja na sustavu NeuMoDx System.

Tablica 10: Učinkovitost kontrole obrade uzorka

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

Stopa valjanih rezultata

Retrospektivna analiza podataka dobivenih tijekom procjene radnog učinka ispitivanja NeuMoDx CMV Assay na sustavima NeuMoDx Systems upotrebljavala se za određivanje postotka valjanih rezultata. Valjani rezultati testa prijavljuju se kao Positive (Pozitivno) ili Negative (Negativno); nevažeci rezultati mogu se prijaviti kao Indeterminate (IND) (Neodređeno) ili Unresolved (UNR) (Nerazriješeno) na temelju statusa amplifikacije ciljne sekvence i kontrole obrade uzorka. Rezultat prijavljen kao IND (Neodređeno) obično uzrokuje pogreška instrumenta koja dovodi do neuspješne amplifikacije ciljne sekvence i/ili interne kontrole obrade. Rezultat UNR (Nerazriješeno) uzorcima se dodjeljuje u slučaju neuspješne amplifikacije i ciljne sekvence i unutarnje kontrole obrade ako nema detektiranog kvara instrumenta. U retrospektivnu analizu uključeno je 1100 pojedinačnih rezultata ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay, što je uključivalo podatke dobivene na sustavu NeuMoDx 288 System i sustavu NeuMoDx 96 System. Utvrđena je stopa rezultata UNR (Nerazriješeno) od 0,91 % (10/1100) i stopa rezultata IND (Neodređeno) od 0,36 % (4/1100); ti rezultati ispunjavaju kriterije prihvatljivosti analize. Stoga je određeno da konačna stopa valjanih rezultata ispitivanja NeuMoDx CMV Assay na sustavima NeuMoDx Systems iznosi 98,7 % s 95 %-tnim CI (97,9 – 99,2).

Križna kontaminacija

Stopa križne kontaminacije ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay određena je testiranjem tri kompleta CMV ispitaka uz naizmjenično testiranje visoko pozitivnih i negativnih ispitaka. Ukupno, to je uključivalo testiranje 108 ponavljanja plazme negativnih 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 nije došlo nikakve križne kontaminacije tijekom obrade uzoraka na sustavu NeuMoDx System.

Ekvivalentnost matrice ispitka

Testiranje je provedeno kako bi se dokazala ekvivalentnost matrice ispitka između pune krvi prikupljene u epruvetama za prikupljanje s etilendiamintetraoctenom kiselinom (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) i kiselom citratnom dekstrozom (Acid Citrate Dextrose, ACD) radi pripreme plazme. Dodatno testiranje je provedeno kako bi se utvrdila ekvivalentnost između svježih i zamrznutih ispitaka plazme (prikupljenih u dvije vrste epruveta). Svježi ispiti 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 ispiti su odmrznuti i ponovno testirani. Rezultati svježih i zamrznutih ispitaka plazme, kao i ispitaka plazme s antikoagulantima EDTA i ACD, uspoređeni su metodom regresijske analize kako bi se utvrdila ekvivalentnost. Podaci su pokazali izvrsnu ekvivalentnost između ispitaka plazme s EDTA i ACD-om te svježih i zamrznutih ispitaka plazme s nagibima unutar 0,02 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	ACD u odnosu na K2EDTA		Svježi u odnosu na zamrznute ispitke	
	Svježi	Zamrznuti	ACD	EDTA
Nagib [0,9 – 1,1]	1,000	0,982	1,014	1,000
Odsječak [$< 0,5 \log_{10}$ IU/ml]	-0,050	0,018	-0,061	0,020
p -vrijednost $> 0,05$	0,848	0,644	0,895	0,631

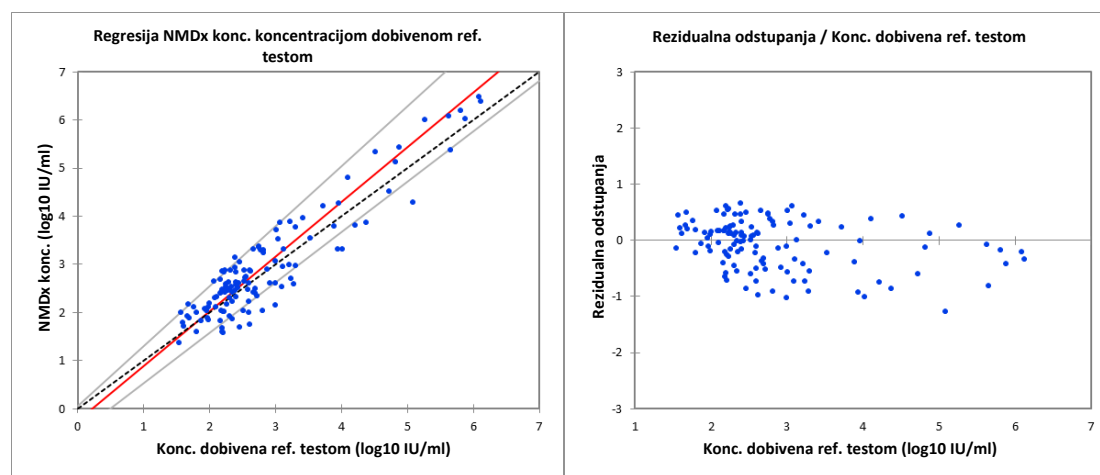
Usporedba kliničkih metoda

Kvantitativni radni učinak ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay procijenjen je usporedbom s komparativnim ispitivanjima koje je odobrila agencija FDA / koji nose oznaku CE testiranjem nerazrijeđenih kliničkih ispitaka pacijenata zaraženih CMV-om. Testiranje je provedeno interno u tvrtki NeuMoDx jednostruko slijepim ispitivanjem deidentificiranih preostalih kliničkih ispitaka dobivenih iz četiriju vanjskih referentnih laboratorija. Ukupno 284 ispitka plazme obrađeno je s pomoću ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay (jednostrukim) slijepim ispitivanjem na više sustava NeuMoDx Molecular Systems.

Pogreške obrade i sustava dobivene na sustavima NeuMoDx Molecular Systems bile su minimalne i ispunjavale su zadane kriterije. Za uzorke je dobiveno ukupno 3 rezultata Indeterminate (IND) (Neodređeno), što je dalo sveukupnu početnu stopu rezultata IND (Neodređeno) od 1 % s 95 %-tnim CI (0,27 – 3,32 %). Volumen je bio nedostatan za ponovnu obradu ta 3 ispitka u uobičajenom tijeku radu. Početno je dobiveno 10 rezultata Unresolved (UNR) (Nerazriješeno), ali nakon provođenja postupka preporučenog za ispitivanje CMV Quant Assay koji uključuje razrjeđivanje rezultata (UNR) (Nerazriješeno) u omjeru 1:10 diluansom Basematrix, valjani rezultati su dobiveni nakon ponovnog testiranja svih 10 uzoraka s rezultatom UNR (Nerazriješeno) razrijeđenih na odgovarajući način. Stoga je stopa ukupne pogreške obrade iznosila 1,06 % s 95 %-tnim CI (0,27 % – 3,3 %) zbog rezultata Indeterminate (Neodređeno) koji se nisu mogli ponovno testirati zbog nedovoljnog volumena.

Za 4 uzorka dobivena je oznaka Quantitation Error (Kvantifikacijska pogreška) i 3 od 4 mogla su se ponovno testirati u skladu s preporučenim postupkom koji uključuje razrjeđivanje uzorka u diluensu Basematrix u omjeru 1:10 kako bi se dobio valjani kvantitativni rezultat. Od 283 valjana rezultata dobivena u ispitivanju, za 129 uzoraka prijavljen je rezultat Positive (Pozitivno) ispitivanjem NeuMoDx CMV s odgovarajućim vrijednostima koncentracije koje su dobivene referentnim testovima. Za šest od tih uzoraka, referentnim testom za pet je prijavljen rezultat ispod LLoQ, a za jedan je prijavljen rezultat iznad ULoQ i stoga su ukupno 123 uzorka imala odgovarajuće vrijednosti koncentracije dobivene ispitivanjem NeuMoDx CMV Quant Assay i referentnim testovima s oznakom CE-IVD te su se oni upotrebljavali za kvantitativnu analizu korelacije. Demingova regresija i Passing-Bablokova regresijska analiza upotrebljavale su se za korelaciju između vrijednosti koncentracije dobivenih ispitivanjem NeuMoDx CMV Assay i vrijednosti dobivenih referentnim testovima.

Dijagrami ekvivalentnosti izrađeni su za prikaz korelacije između vrijednosti koncentracije dobivenih ispitivanjem NeuMoDx CMV Quant Assay i referentnim testovima za sve uzorke s pomoću prilagodbe Demingovom regresijom i prilagodbe Passing-Bablokovom metodom i prikazuju se na slici 5.



Slika 5: Dijagrami ekvivalentnosti (lijevo) i rezidualnog odstupanja (desno) – kumulativna analiza (na oba sustava NeuMoDx Systems) rezultata ispitivanja NeuMoDx CMV Quant Assay u usporedbi s rezultatima referentnog ispitivanja za SVE uzorke na temelju Passing-Bablokove regresijske analize.

Kvaliteta prilagodbe Demingovom regresijom ilustrirana je koeficijentom nagiba od 1,1 s 95 %-tnim CI (1,0, 1,2) i odsječka (odstupanja) od -0,18 s 95 %-tnim CI (-0,39, 0,03), što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx CMV Quant Assay i referentnim testovima imaju visoku korelaciju s prihvatljivim odstupanjem. Kvaliteta prilagodbe Passing-Bablokovom metodom linearne regresije ilustrirana je koeficijentom nagiba od 1,1 s 95 %-tnim CI (1,0, 1,2) i odsječkom (odstupanjem) od -0,24 s 95 %-tnim CI (-0,51, 0,06), što pokazuje da rezultati koncentracije dobiveni ispitivanjem NeuMoDx CMV Quant Assay i referentnim testovima imaju visoku korelaciju s prihvatljivim odstupanjem, kao što je prikazano u *tablici 12*.

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

Demingova analiza		Passing-Bablokova analiza	
Odsječak	Koeficijent nagiba	Odsječak	Koeficijent nagiba
-0,18 95 %-tni CI (-0,39, 0,03)	1,1 95 %-tni CI (1,0, 1,2)	-0,24 95 %-tni CI (-0,51, 0,06)	1,1 95 %-tni CI (1,0, 1,2)

REFERENCE

- Centers for Disease Control (CDC). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. (2018). Retrieved from <https://www.cdc.gov/cmV/clinical/features.html>
- Kraft, C. S., Armstrong, W. S., & Caliendo, A. M. (2012). Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clinical infectious diseases*, 54(12), 1793-1797.
- A Ross, S., Novak, Z., Pati, S., & B Boppana, S. (2011). Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 11(5), 466-474.
- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
- 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 ovom dokumentu u vlasništvu su svojih vlasnika.

SIMBOLI

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

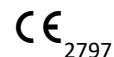


NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, USA

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