

REF 201300 NeuMoDx™ HBV Quant Test Strip

R only

ATTENZIONE: solo per l'esportazione negli Stati Uniti

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

Il NeuMoDx HBV Quant Assay è un test *in vitro* automatizzato di amplificazione dell'acido nucleico per la quantificazione del DNA del virus dell'epatite B (Hepatitis B Virus, HBV) nei campioni di plasma e siero umani per i genotipi HBV da A a H delle persone con infezione da HBV. Il NeuMoDx HBV Quant Assay implementato sul NeuMoDx 288 Molecular System e sul NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx System) comprende l'estrazione automatizzata del DNA per isolare l'acido nucleico target dal campione e la reazione a catena della polimerasi quantitativa (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) real-time, prendendo come target due regioni altamente conservate nel genoma virale dell'epatite B.

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

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Per la preparazione del plasma è possibile utilizzare sangue umano intero raccolto in provette sterili contenenti acido etilendiamminicotetrate (EDTA) o acido citrato destrosio (ACD) come agenti anticoagulanti o in provette per la preparazione del plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT), mentre il siero deve essere raccolto nelle provette per la raccolta del siero o nelle provette per la separazione del siero (Serum Separation Tubes, SST). Per la preparazione del test, il plasma o il siero in una provetta per campioni secondaria o il sangue frazionato in una provetta per campioni primaria compatibile con il NeuMoDx System viene caricato sul NeuMoDx System utilizzando un portaprovette per campioni. Per ciascun campione, un'aliquota di campione di plasma o di siero viene mescolata con NeuMoDx Lysis Buffer 1 e NeuMoDx System esegue automaticamente tutti i passaggi richiesti per estrarre l'acido nucleico target, preparare il DNA isolato per l'amplificazione della PCR real-time e, se presenti, amplificare e individuare i prodotti dell'amplificazione (sezioni del target del genoma HBV nella regione altamente conservata codificando la *proteina X* e la *proteina preC*). Il NeuMoDx HBV Quant Assay include un controllo di elaborazione dei campioni del DNA (Sample Process Control, SPC1) per aiutare a monitorare la presenza di potenziali sostanze inibitorie, nonché gli errori relativi al NeuMoDx System o ai reagenti, che si possono verificare durante i processi di estrazione e di amplificazione.

Il virus dell'epatite B (Hepatitis B Virus, HBV) è l'agente che causa l'infezione epatica dell'epatite B ed è un problema sanitario globale. L'epatite B può causare epatite acuta o sfociare in una condizione cronica che causa cirrosi o cancro al fegato. Il rischio dello sviluppo di una condizione cronica è legato principalmente all'età; se il virus viene trasmesso alla nascita, esiste una probabilità > 90% che si sviluppi una condizione cronica, mentre la possibilità che un adulto che diventa infetto sviluppi una condizione cronica è del 2-6%.¹ L'HBV viene trasmesso tramite contatto sangue con sangue con una persona infetta, per via sessuale, attraverso la condivisione di aghi con una persona infetta nell'uso di farmaci endovena o la trasmissione verticale dalla madre al bambino al momento della nascita. Negli Stati Uniti circa 850.000 persone convivono con un'infezione da HBV, e la maggior parte delle nuove infezioni è causata da trasmissione sessuale o uso di droghe iniettabili.² In Africa e nell'aria pacifica occidentale, il 5% della popolazione risulta essere infetto. Nel mondo, nel 2015 l'infezione da HBV ha causato 885.000 morti, causati per la maggior parte da cirrosi o carcinoma epatocellulare.³ Esiste un vaccino efficace al 95% nella prevenzione dell'infezione da HBV, per cui ogni anno i casi diagnosticati diminuiscono.⁴

Lo stato di cura attuale per il trattamento dell'infezione da HBV è la terapia antivirale, che richiede il monitoraggio costante per garantire che il trattamento proceda nel modo desiderato. Il monitoraggio della terapia tramite NeuMoDx HBV Quant Assay può fornire ai medici le informazioni necessarie per la gestione dei pazienti con infezioni da HBV.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il NeuMoDx HBV Quant Assay combina l'estrazione automatizzata, l'amplificazione e la rilevazione del DNA tramite PCR real-time. I campioni di sangue intero vengono raccolti in provette con EDTA, ACD o PPT per la preparazione del plasma e/o nelle provette SST per la preparazione del siero. Il campione di sangue principale (frazionato) o un'aliquota di plasma/siero in una provetta per campioni secondaria compatibile viene etichettata con codice a barre e collocata sul NeuMoDx System. Il NeuMoDx System aspira automaticamente un'aliquota del plasma/siero per miscelarlo con NeuMoDx Lysis Buffer 1 e gli agenti contenuti nella NeuMoDx Extraction Plate per iniziare l'elaborazione. Il NeuMoDx System automatizza e integra l'estrazione e la concentrazione del DNA, la preparazione dei reagenti, l'amplificazione e la rilevazione dell'acido nucleico delle sequenze target mediante PCR real-time. Il controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control, SPC1) incluso consente di monitorare la presenza di potenziali sostanze inibitorie nonché gli errori di sistema, processo o reagente. Una volta caricato il campione sul NeuMoDx System non è necessario alcun intervento dell'operatore.

Il NeuMoDx System utilizza una combinazione di calore, enzima litico e reagenti di estrazione per eseguire automaticamente la lisi, l'estrazione dell'DNA e l'eliminazione degli inibitori. Gli acidi nucleici rilasciati vengono catturati da microsferi paramagnetiche. Le particelle, con l'acido nucleico legato, sono caricate nella NeuMoDx Cartridge, dove gli elementi non legati vengono rimossi tramite lavaggio con NeuMoDx Wash Reagent. Il DNA legato viene quindi eluito utilizzando il NeuMoDx Release Reagent. Il NeuMoDx System utilizza quindi il DNA eluito per reidratare i reagenti di amplificazione di proprietà NeuDry™ contenenti tutti gli elementi necessari per l'amplificazione dei target di HBV e SPC1. Ciò consente l'amplificazione e il rilevamento simultanei dei target e delle sequenze di DNA di controllo. Dopo la ricostituzione dei reagenti PCR essiccati, il

NeuMoDx System dispensa la miscela pronta per la PCR in una camera PCR (per campioni) della NeuMoDx Cartridge. L'amplificazione e il rilevamento delle sequenze di DNA di controllo e target (se presenti) si verificano nella camera PCR. La NeuMoDx Cartridge è progettata per contenere l'amplicone dopo la PCR, eliminando in pratica il rischio della contaminazione post-amplificazione.

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

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

Una sonda TaqMan contrassegnata da un fluoroforo (Eccitazione: 490 nm ed Emissione: 521 nm) all'estremità 5' e un quencher scuro all'estremità 3' vengono utilizzati per rilevare il DNA dell'HBV. Per il rilevamento dell'SPC1, la sonda TaqMan è contrassegnata con un colorante fluorescente alternativo (Eccitazione: 535 nm ed Emissione: 556 nm) all'estremità 5' e un quencher scuro all'estremità 3'. Il software del NeuMoDx System monitora il segnale fluorescente emesso dalle sonde TaqMan alla fine di ogni ciclo di amplificazione. Quando l'amplificazione è completa, il software del NeuMoDx System analizza i dati e riporta un risultato finale POSITIVE (POSITIVO)/NEGATIVE (NEGATIVO)/INDETERMINATE (INDETERMINATO)/UNRESOLVED (IRRISOLTO)/NO RESULT (NESSUN RISULTATO). Se un risultato è positivo e la concentrazione calcolata rientra nei limiti della quantificazione, il software del NeuMoDx System fornisce anche un valore quantitativo associato al campione.

REAGENTI/MATERIALI DI CONSUMO

Materiali in dotazione

REF	Contenuto	Unità per confezione	Test per unità	Test per confezione
201300	NeuMoDx HBV Quant Test Strip <i>Reagenti PCR essiccati contenenti sonda e primer TaqMan specifici per HBV e SPC1</i>	6	16	96

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

REF	Contenuto
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Particelle paramagnetiche, enzima litico e controlli di elaborazione dei campioni essiccati</i>
800100 o 800102	NeuMoDx HBV Calibrator <i>Set monouso di calibratori HBV alto e basso per stabilire la validità della curva di calibrazione</i>
900101 o 900102	NeuMoDx HBV External Control <i>Set monouso di controlli positivi e negativi</i>
400400	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Puntali Hamilton® CO-RE/CO-RE II (300 µL) con filtri
235905	Puntali Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µL) con filtri

Strumentazione richiesta

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

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- La NeuMoDx HBV Quant Test Strip è per uso diagnostico *in vitro* solo con i NeuMoDx System.
- Non utilizzare i reagenti o i materiali di consumo dopo la data di scadenza indicata.
- Non utilizzare alcun reagente se il sigillo di sicurezza è rotto o se la confezione risulta danneggiata all'arrivo.
- Non utilizzare i materiali di consumo o i reagenti se il sacchetto di protezione appare aperto o rotto all'arrivo.

- Prima di poter generare i risultati dei test per i campioni clinici, è necessario avere a disposizione una calibrazione di test valida (generata elaborando i calibratori alto e basso dai NeuMoDx HBV Calibrator).
- È necessario elaborare i NeuMoDx HBV External Control ogni 24 ore per tutta la fase di test con il NeuMoDx HBV Quant Assay.
- Il volume minimo del campione dipende dalla dimensione della provetta, dal portaprovette per campioni e dall'elaborazione del volume del campione definita di seguito. Un volume al di sotto del minimo specificato può generare un errore "Quantity Not Sufficient" (Quantità non sufficiente).
- L'uso di campioni conservati a temperature non corrette oppure oltre i tempi di stoccaggio specificati può produrre risultati non validi o errati.
- Evitare la contaminazione microbica e da desossiribonucleasi (DNasi) di tutti i reagenti e i materiali di consumo in ogni momento. In caso di trasferimento del campione in provette secondarie si raccomanda l'uso di pipette di trasferimento monouso sterili prive di DNasi. Utilizzare una nuova pipetta per ciascun campione.
- Per evitare la contaminazione, non manipolare o spezzare nessuna NeuMoDx Cartridge dopo l'amplificazione. In nessun caso recuperare le NeuMoDx Cartridge dal contenitore dei materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 288 Molecular System) o dal recipiente materiali di scarto a rischio biologico (NeuMoDx 96 Molecular System). La cartuccia NeuMoDx Cartridge è stata progettata in modo da prevenire la contaminazione.
- Nei casi in cui dal laboratorio siano condotti anche test per PCR in provetta aperta, è necessario assicurarsi che NeuMoDx HBV Quant Test Strip, i materiali di consumo e i reagenti aggiuntivi necessari per i test, i dispositivi di protezione individuale come guanti e camici da laboratorio e il NeuMoDx System non siano contaminati.
- Durante la manipolazione dei reagenti e dei materiali di consumo NeuMoDx, è necessario indossare guanti in nitrile, puliti e privi di polvere. Prestare attenzione a non toccare la superficie superiore della NeuMoDx Cartridge, la superficie della pellicola sigillante della NeuMoDx HBV Quant Test Strip e della NeuMoDx Extraction Plate o la superficie superiore del NeuMoDx Lysis Buffer 1; i materiali di consumo e i reagenti devono essere maneggiati toccando solo le superfici laterali.
- Per ogni reagente vengono fornite le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) (se applicabile) su www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.
- Non pipettare con la bocca. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti.
- Maneggiare sempre i campioni come se fossero infettivi e in conformità con procedure di laboratorio sicure, come quelle descritte in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁵ e nel Documento M29-A4.⁶ del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto in conformità alle normative nazionali, federali, provinciali, regionali e locali.
- Non riutilizzare.



STOCCAGGIO, MANIPOLAZIONE E STABILITÀ DEL PRODOTTO

- Le NeuMoDx HBV Quant Test Strip sono stabili nell'imballaggio primario fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del prodotto, se conservate a una temperatura compresa tra 4 e 28 °C.
- Non utilizzare i materiali di consumo e i reagenti dopo la data di scadenza indicata.
- Non utilizzare alcun prodotto di test se la confezione primaria o quella secondaria è stata visivamente compromessa.
- Non ricaricare alcun prodotto di test che sia stato caricato in precedenza su un altro NeuMoDx System.
- Una volta caricata, la NeuMoDx HBV Quant Test Strip può restare a bordo del NeuMoDx System per 62 giorni. Il periodo di validità residuo delle strisce reattive caricate è tracciato dal software e segnalato all'utente in tempo reale. La rimozione di una striscia reattiva utilizzata oltre il periodo consentito sarà richiesta dal sistema.

PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

1. Trattare tutti i campioni, i calibratori e i controlli come se fossero potenziali mezzi di trasmissione di agenti infettivi.
2. Non congelare sangue intero né altri campioni conservati in provette primarie.
3. Per preparare di campioni di plasma, è necessario raccogliere il sangue intero in provette sterili utilizzando EDTA o ACD come anticoagulante. Seguire le istruzioni del produttore per la preparazione e la conservazione di provette per la raccolta di campioni.
4. Per preparare i campioni di siero, è necessario raccogliere il sangue intero nelle provette SST. Seguire le istruzioni del produttore per la preparazione e la conservazione di provette per la raccolta di campioni.
5. I campioni possono essere testati in provette per la raccolta primaria o in provette per campioni secondarie. Provette consigliate per il test con provette primarie:
 - a. Campioni di plasma: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD n. 368589) o BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD n. 362799).
 - b. Campioni di siero: BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD n. 367820) o BD Vacutainer SST™ Tube (BD n. 367988).
6. I campioni preparati possono essere conservati sul NeuMoDx System per un massimo di 8 ore per il plasma e di 24 ore per il siero prima dell'elaborazione. Se è necessario un tempo di conservazione maggiore, si raccomanda di mettere i campioni in frigorifero o di congelarli come aliquote secondarie.

7. I campioni preparati devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C per non più di 7 giorni prima dell'analisi e per un massimo di 8 ore per il plasma e di 24 ore per il siero a temperatura ambiente.
8. I campioni preparati possono essere conservati a una temperatura ≤ -20 °C per un massimo di 4 settimane (siero) o di 6 mesi (plasma) prima dell'elaborazione; i campioni congelati non devono essere sottoposti a più di 2 cicli di congelamento/scongelo per il plasma e di 4 cicli di congelamento/scongelo per il siero prima dell'uso.
 - a. Se i campioni vengono congelati, farli scongelare completamente a temperatura ambiente (15-30 °C); agitare con movimenti rotatori per ottenere un campione distribuito uniformemente.
 - b. Una volta scongelati i campioni congelati, l'analisi deve essere eseguita entro 24 ore.
 - c. Il congelamento del plasma/siero in provette di raccolta primarie non è consigliato.
9. Se i campioni vengono spediti, devono essere imballati ed etichettati in conformità alle normative locali e/o internazionali applicabili.
10. Etichettare i campioni in modo chiaro e indicare che i campioni sono destinati all'analisi dell'HBV.
11. Procedere con la sezione *Preparazione del test*.

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

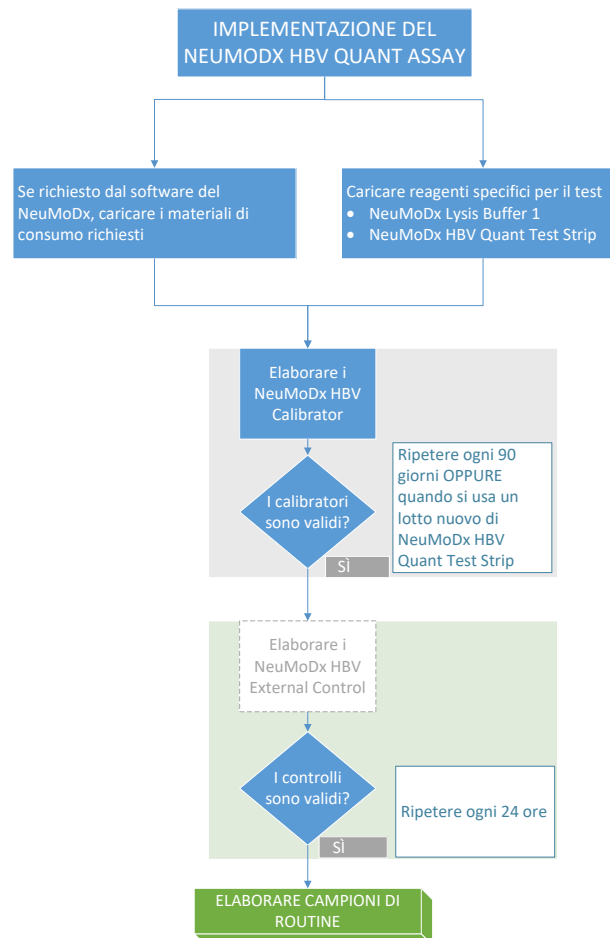


Figura 1: Flusso di lavoro di implementazione del NeuMoDx HBV Quant Assay

ISTRUZIONI PER L'USO

Preparazione del test

Il NeuMoDx HBV Quant Assay può essere eseguito direttamente dalle provette di raccolta primarie del sangue o dalle aliquote di campione nelle provette secondarie. L'elaborazione può essere eseguita utilizzando uno dei due flussi di lavoro di elaborazione dei volumi di campione, da 550 μ L o da 200 μ L. Applicare l'etichetta con codice a barre del campione su una provetta per campioni compatibile con NeuMoDx System.

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

Tipo provetta	Volume minimo di campione richiesto	
	Flusso di lavoro da 550 µL	Flusso di lavoro da 200 µL
SST – 3,5 mL	1550 µL	1200 µL
PPT/SST – 5,0 mL	1800 µL	1450 µL
PPT/SST – 8,5 mL	2500 µL	2200 µL
K ₂ EDTA/Serum – 4,0 mL	1050 µL	700 µL
K ₂ EDTA/Serum – 6,0 mL	1250 µL	900 µL
K ₂ EDTA/Serum – 10,0 mL	1600 µL	1250 µL

3. Se si utilizza una provetta secondaria, trasferire un'aliquota del plasma/siero nella provetta per campioni con codice a barre compatibile con il NeuMoDx System secondo i volumi definiti di seguito:

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

Funzionamento dei NeuMoDx System

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

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

7. Posizionare i portaprovette per campioni sul ripiano del caricatore automatico e utilizzare il touchscreen per caricare i portaprovette nel NeuMoDx System. In tal modo verrà avviata l'elaborazione dei campioni caricati per i test identificati, a condizione che nel sistema sia presente un ordine di test valido.

LIMITAZIONI

1. La NeuMoDx HBV Quant Test Strip può essere utilizzata solo sui NeuMoDx System.
2. Sono state definite le prestazioni del NeuMoDx HBV Quant Test Strip per i campioni di plasma preparati con EDTA/ACD come anticoagulante o i campioni di siero preparati nelle provette del separatore di siero. L'uso della NeuMoDx HBV Quant Test Strip con altre fonti non è stato valutato e le caratteristiche delle prestazioni non sono note per altri tipi di campioni.
3. Le prestazioni della NeuMoDx HBV Quant Test Strip sono state definite per il test con provette primarie utilizzando BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tubes, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube e BD Vacutainer SST Tube.
4. Quando si utilizza un flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL, è stato osservato un piccolo aumento nel limite di rilevamento e nel limite inferiore della quantificazione del NeuMoDx HBV Quant Assay.
5. Il NeuMoDx HBV Quant Assay viene utilizzato esclusivamente a fini di monitoraggio quantitativo. Non è destinato all'uso per il rilevamento qualitativo.
6. Il NeuMoDx HBV Quant Assay non deve essere utilizzato con campioni umani eparinizzati.
7. Poiché il rilevamento dell'HBV dipende dal numero di particelle di DNA target presenti nel campione, l'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza delle operazioni di prelievo, manipolazione e conservazione dei campioni.
8. I NeuMoDx HBV Calibrator e i NeuMoDx HBV External Control devono essere elaborati secondo le indicazioni contenute nei foglietti illustrativi presenti nella confezione e richiesti dal software del NeuMoDx System prima di elaborare i campioni clinici di routine.
9. Eventuali risultati errati potrebbero essere dovuti al fatto di non aver eseguito correttamente il prelievo, la manipolazione o la conservazione, a errori tecnici o a confusione tra provette per campioni. Inoltre potrebbero verificarsi falsi negativi se il numero di particelle virali nel campione è al di sotto del limite di rilevazione del NeuMoDx HBV Quant Assay.
10. Il NeuMoDx System è destinato a essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato all'uso del sistema.
11. Se non si amplificano sia il target HBV che il target SPC1, si otterrà un risultato non valido (Indeterminate (Indeterminato), No Result (Nessun risultato) o Unresolved (Irrisolto)) e sarà necessario ripetere il test.
12. Se il risultato del NeuMoDx HBV Quant Assay è Positive (Positivo), ma il valore di quantificazione è oltre i limiti di quantificazione, il NeuMoDx System indicherà se l'HBV rilevato era *al di sotto* del limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) o *al di sopra* del limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
13. Nel caso in cui l'HBV rilevato fosse *al di sotto* del limite di quantificazione inferiore, è possibile ripetere l'esame (se si desidera) con un'altra aliquota del campione.
14. Nel caso in cui l'HBV rilevato fosse *al di sopra* del limite di quantificazione superiore, è possibile ripetere il NeuMoDx HBV Quant Assay con un'aliquota diluita del campione originale. Si consiglia una diluizione di 1:1000 nel plasma HBV-negativo o nel Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare, Milford, MA). La concentrazione di campione originale può essere calcolata come indicato di seguito:

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

ELABORAZIONE DEI RISULTATI

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

Tabella 1: Riepilogo dell'algoritmo decisionale dell'HBV Quant Assay

RISULTATO	Target HBV	Controllo elaborazione campioni (Sample Process Control, SPC1)	Interpretazione dei risultati
Positive (Positivo) con indicazione della concentrazione	Amplified (Amplificato) $0,9 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/mL}$ (flusso di lavoro da 550 μL) $1,4 \leq [\text{HBV}] \leq 9,0 \log_{10} \text{ IU/mL}$ (flusso di lavoro da 200 μL)	Amplified (Amplificato) o Not Amplified (Non amplificato)	Rilevato DNA HBV entro l'intervallo quantitativo
Positive (Positivo), al di sopra dell'ULOQ	Amplified (Amplificato) $[\text{HBV}] > 9,0_{10} \text{ IU/mL}$	Amplified (Amplificato) o Not Amplified (Non amplificato)	Rilevato DNA HBV al di sopra dell'intervallo quantitativo
Positive (Positivo), al di sotto dell'LOQ	Amplified (Amplificato) $[\text{HBV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/mL}$ (flusso di lavoro da 550 μL) $[\text{HBV}] < 1,4 \log_{10} \text{ IU/mL}$ (flusso di lavoro da 200 μL)	Amplified (Amplificato) o Not Amplified (Non amplificato)	Rilevato DNA HBV al di sotto dell'intervallo quantitativo
Negative (Negativo)	Not Amplified (Non amplificato)	Amplified (Amplificato)	DNA HBV non rilevato
Indeterminate (Indeterminato)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Non amplificato, Rilevato errore di sistema, Elaborazione del campione completata)		Tutti i risultati target erano non validi; ripetere il test†
No Result* (Nessun risultato)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Non amplificato, Rilevato errore di sistema, Elaborazione del campione interrotta)		L'elaborazione dei campioni è stata interrotta; ripetere il test†
Unresolved (Irrisolto)	Not Amplified, No System Error Detected (Non amplificato, Nessun errore di sistema rilevato)		Tutti i risultati target erano non validi; ripetere il test†

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

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

Calcolo del test

- Per i campioni che rientrano nel range di quantificazione del NeuMoDx HBV Quant Assay, la concentrazione di DNA dell'HBV presente nei campioni viene calcolata tramite la curva standard memorizzata in combinazione con il coefficiente di calibrazione e il volume del campione.
 - In base ai risultati dei NeuMoDx HBV Calibrator elaborati per stabilire la validità della curva di standard, si calcola anche un coefficiente di calibrazione per ogni lotto di NeuMoDx HBV Quant Test Strip, su uno specifico NeuMoDx System.
 - Il coefficiente di calibrazione viene inserito automaticamente nella determinazione finale della concentrazione di DNA dell'HBV.
 - Il software del NeuMoDx tiene conto del volume di campione immesso al momento della determinazione della concentrazione del DNA dell'HBV per mL di campione.
- I risultati del NeuMoDx HBV Quant Assay sono espressi in \log_{10} IU/mL.
- La quantificazione dei campioni sconosciuti che ne risulta è tracciabile secondo il 4° Standard Internazionale dell'OMS sull'HBV.

Calibrazione del test

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

Calibratori

- È necessario elaborare un set di NeuMoDx HBV Calibrator con ogni nuovo lotto di NeuMoDx HBV Quant Test Strip, quando si carica un nuovo file di definizione esame Quant HBV nel NeuMoDx System, se il set di calibratori corrente ha superato il periodo di validità (attualmente impostato a 90 giorni) o se viene modificato il software del NeuMoDx System.
- Il software del NeuMoDx System notificherà l'utente quando è necessario elaborare i calibratori. Non è possibile utilizzare per i test un nuovo lotto di strisce reattive finché i calibratori non sono stati elaborati correttamente.
- La validità della calibrazione viene stabilita come segue:
 - Per stabilire la validità è necessario elaborare un set di due calibratori: uno (1) alto e uno (1) basso.
 - Almeno due (2) replicati su tre (3) devono dare risultati che rientrino nei parametri predefiniti. Il target nominale del calibratore basso è di $3,7 \log_{10}$ IU/mL e il target nominale del calibratore alto è di $5,7 \log_{10}$ IU/mL.
 - Viene calcolato un coefficiente di calibrazione per tenere conto della variazione attesa tra i lotti di strisce reattive. Tale coefficiente di calibrazione viene utilizzato per la determinazione della concentrazione finale di HBV.

4. Se uno o entrambi i calibratori non superano il controllo di validità, ripetere l'elaborazione dei calibratori che non hanno superato il controllo utilizzando una fiala nuova. Nel caso in cui un calibratore non superi il controllo di validità, è possibile ripetere l'elaborazione solo di quel calibratore, dato che il sistema non richiede all'utente di elaborare nuovamente entrambi i calibratori.
5. Se i calibratori non superano il controllo di validità consecutivamente, contattare NeuMoDx Molecular, Inc.

Controllo qualità

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

Controlli esterni

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

Controlli (interni) di elaborazione dei campioni

Nella NeuMoDx Extraction Plate è incorporato un Controllo di elaborazione dei campioni esogeno (Sample Process Control, SPC1), che si sottopone all'intero processo di estrazione dell'acido nucleico e amplificazione mediante PCR real-time con ogni campione. In ogni NeuMoDx HBV Quant Test Strip sono inclusi anche primer e sonda specifici per SPC1, consentendo il rilevamento della presenza dell'SPC1 insieme al DNA dell'HBV target (se presente) tramite PCR multiplex. Il rilevamento dell'amplificazione di SPC1 consente al software del NeuMoDx System di monitorare l'efficacia dei processi di estrazione e di amplificazione del DNA tramite PCR.

Risultati non validi

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

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

Quando non viene rilevata alcuna amplificazione valida del DNA dell'HBV o dell'SPC1 sarà riportato un risultato UNR, a indicare un possibile errore dovuto al reagente o la presenza di inibitori. Se viene riportato un risultato UNR, si consiglia in primo luogo di ripetere il test. Se ancora non si ottiene un risultato valido, è possibile usare un campione diluito per mitigare gli effetti di un'eventuale inibizione del campione.

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica – Limite di rilevazione con lo Standard OMS

La sensibilità analitica del NeuMoDx HBV Quant Assay è stata caratterizzata testando campioni negativi e una serie di diluizioni tracciabili secondo il 4° Standard Internazionale dell'OMS nel plasma negativo umano e nel siero sottoposti a screening per determinare il limite di rilevazione (Limit of detection, LoD) sui NeuMoDx System. Il LoD è stato definito come il livello target più basso rilevato a una percentuale del 95% in base a un'analisi con modello Probit. Gli studi sono stati realizzati nel corso di 3 giorni su vari NeuMoDx System con più lotti qualificati di reagenti NeuMoDx. È stato eseguito uno studio aggiuntivo per confermare il LoD del NeuMoDx HBV Quant Assay quando si utilizza il flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL. I tassi di rilevazione di entrambi gli studi sono mostrati nella *Tabella 2*.

Tabella 2: Tassi di rilevazione positivi per la determinazione del LoD del NeuMoDx HBV Quant Assay

	Concentrazione target [IU/mL]	Concentrazione target [\log_{10} IU/mL]	PLASMA			SIERO		
			Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione	Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione
550 μL	20	1,30	108	108	100%	107	107	100%
	10	1	108	107	99%	108	104	96%
	5	0,70	108	98	91%	108	95	88%
	2,5	0,40	108	97	90%	108	72	67%
	1,25	0,10	108	73	68%	108	44	42%
	NEG	N/A	108	0	0%	107	0	0%
200 μL	25	1,40	43	43	100%	44	44	100%

Il LoD del NeuMoDx HBV Quant Assay per HBV Genotipo A (4° standard internazionale dell'OMS) nel plasma è stato determinato nella quantità di 5,2 IU/mL (IC 95% 4,1-7,6 IU/mL) [(0,72 \log_{10} IU/mL) (IC 95% 0,61-0,88 \log_{10} IU/mL)] utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L (Figura 2). Il LoD del NeuMoDx HBV Quant Assay per i campioni di siero è stato determinato nella quantità di 8,0 IU/mL (IC 95% 6,5-10,8 IU/mL) [(0,9 \log_{10} IU/mL) (IC 95% 0,8-1,0 \log_{10} IU/mL)] utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L (Figura 2).

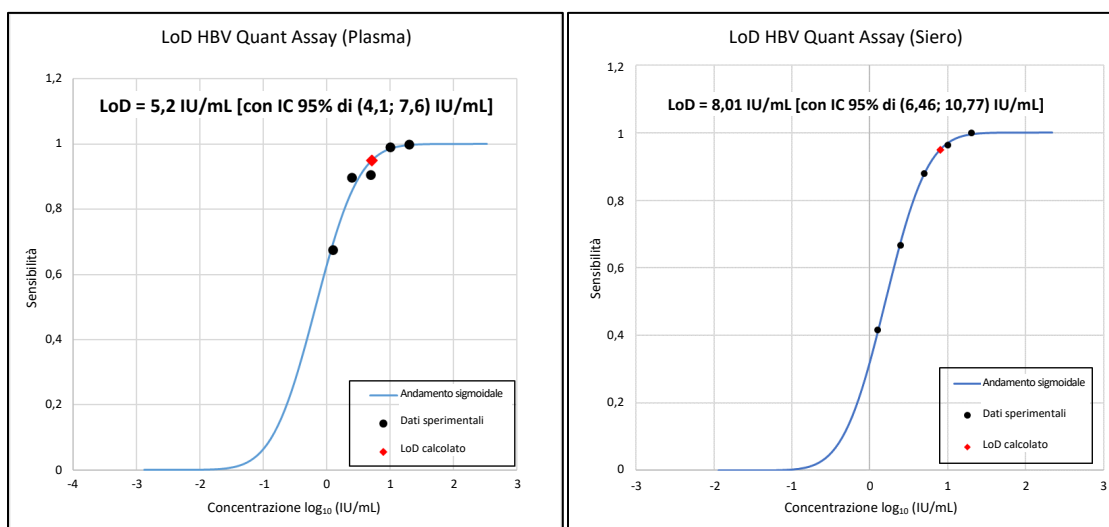


Figura 2: Analisi con modello Probit utilizzato per determinare il LoD del NeuMoDx HBV Quant Assay, plasma (sinistra) e siero (destra)

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

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

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

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

Nella Tabella 3 sono mostrati i risultati compilati per i 5 livelli di campioni HBV utilizzati nello studio LLoQ utilizzando il 4° Standard Internazionale dell'OMS. Il LLoQ determinato in base al 4° Standard Internazionale dell'OMS nel plasma utilizzando il NeuMoDx HBV Quant Assay (flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L) è stato determinato nella quantità di 5,5 IU/mL (0,74 \log_{10} IU/mL). È stato eseguito uno studio separato per confermare il LLoQ quando si utilizza il flusso di lavoro del volume di campione da 200 μ L, e questi risultati hanno dimostrato un LLoQ di 25 IU/mL, che è anche mostrato nella Tabella 3.

Il LLoQ del NeuMoDx HBV Quant Assay rilevato per i campioni di siero è stato determinato nella quantità di 6,0 IU/mL utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L, e 25 IU/mL per il flusso di lavoro del volume di campione a volume ridotto (200 μ L) come mostrato in Tabella 3.

Tabella 3: LLoQ di NeuMoDx HBV Quant Assay, con deviazione e TAE

	Conc. target [IU/mL]	Conc. target [\log_{10} IU/mL]	Plasma					Siero				
			Conc. media [\log_{10} IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE	Conc. media [\log_{10} IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE
550 μ L	20	1,30	1,29	100	0,23	0,16	0,63	1,43	100	0,20	0,13	0,52
	10	1,00	1,07	99	0,25	0,20	0,71	1,21	96	0,24	0,21	0,69
	5	0,70	0,89	91	0,35	0,34	1,04	1,00	88	0,40	0,30	1,09
	2,5	0,40	0,75	90	0,44	0,51	1,39	0,96	67	0,44	0,56	1,46
	1,25	0,10	0,73	68	0,41	0,68	1,50	0,95	42	0,38	0,85	1,61
200 μ L	25	1,40	1,61	100	0,35	0,21	0,91	1,81	100	0,18	0,41	0,78

Sensibilità analitica - LoD e LLoQ tra genotipi HBV

Il LoD è stato inizialmente stabilito per il genotipo A (4° Standard Internazionale dell'OMS) e successivamente sono stati eseguiti ulteriori test intorno al LoD stabilito utilizzando ciascuno degli altri 7 genotipi. Sono stati analizzati trentasei (36) replicati a livelli corrispondenti a 2X, 1X e 0,5X del limite superiore dell'IC del 95% del LoD (~7 IU/mL) con il NeuMoDx HBV Quant Assay utilizzando plasma con il flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L. Il tasso percentuale positivo per ciascun genotipo a ciascuno di questi livelli analizzati è stato riportato in tabella e utilizzato per calcolare il LoD mediante un'analisi con modello Probit.

È stato inoltre calcolato l'errore analitico totale (Total Analytical Error, TAE) a questi livelli analizzati. Il livello più basso con il 95% di rilevamento positivo e TAE calcolato $\leq 1,0$ è stato nuovamente considerato come LLoQ per il genotipo. Tra genotipi, il limite di rilevamento del NeuMoDx HBV Quant Assay per campioni di plasma utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L è risultato pari a 6,2 IU/mL (0,79 \log_{10} IU/mL) e il LLoQ a 7,6 IU/mL (0,88 \log_{10} IU/mL), come mostrato nella *Tabella 4*.

Tabella 4. Genotipi HBV analizzati nel plasma utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L

GENOTIPO	LoD [IU/mL]	LLoQ [IU/mL]
Genotipo A	5,2	5,2
Genotipo B	6,2	6,2
Genotipo C	3,5	6,2
Genotipo D	5,2	5,7
Genotipo E	3,5	3,5
Genotipo F	5,1	6,2
Genotipo G	3,5	3,5
Genotipo H	5,2	7,6

In base ai risultati di questi studi, NeuMoDx presume un **LoD e un LLoQ di 25 IU/mL (1,4 \log_{10} IU/mL)** per il NeuMoDx HBV Quant Assay in **plasma e siero** utilizzando il **flusso di lavoro del volume di campione da 200 μ L**.

NeuMoDx presume un **LoD e un LLoQ di 8,0 IU/mL (0,9 \log_{10} IU/mL)** per il NeuMoDx HBV Quant Assay in **plasma e siero** utilizzando il **flusso di lavoro del volume di campione da 550 μ L**.

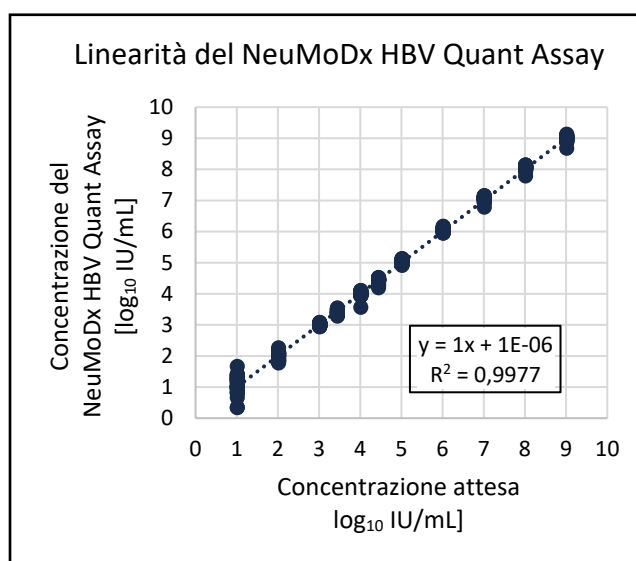
Sensibilità analitica – Linearità e determinazione del limite di quantificazione superiore (ULoQ)

La linearità e il limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) del NeuMoDx HBV Quant Assay sono stati stabiliti nel plasma preparando una serie di diluizioni usando il campione clinico HBV altamente positivo (Access Biologicals, Vista, CA) con tracciabilità stabilita secondo il 4° Standard Internazionale dell'OMS. È stato preparato un pannello di 11 componenti in plasma HBV-negativo raggruppato per creare un pannello che coprisse un range di concentrazione di 9,02- 1,02 \log_{10} IU/mL. Il pannello di test è stato elaborato con 6 replicati a ciascun livello su 2 NeuMoDx System e 3 lotti di reagenti clinici. Il NeuMoDx HBV Quant Assay ha dimostrato la capacità di quantificare l'HBV nell'intervallo lineare 8 \log_{10} (inclusi i punti decisionali medici critici) con una deviazione di $\pm 0,22 \log_{10}$ IU/mL. Utilizzando i modelli di regressione del 2° o del 3° ordine non sono stati ottenuti vantaggi significativi. Utilizzando i dati di questo studio, il valore di ULoQ è stato determinato in 9,02 \log_{10} IU/mL [*Tabella 5 e Figura 3*].

Tabella 5: Linearità del NeuMoDx HBV Quant Assay (valutata con il genotipo A)

Conc. target (IU/mL)	Conc. target (log ₁₀ IU/mL)	Conc. media (log ₁₀ IU/mL)	Deviazione standard	Deviazione	Andamento lineare previsto	Deviazione rispetto all'andamento lineare
1,05E+09	9,02	8,99	0,08	0,06	9,02	-0,04
1,05E+08	8,02	8,05	0,07	0,05	8,02	0,03
1,05E+07	7,02	7,05	0,07	0,06	7,02	0,04
1,05E+06*	6,02	6,05	0,05	0,05	6,02	0,03
1,05E+05	5,02	5,04	0,05	0,04	5,02	0,00
2,82E+04*	4,45	4,43	0,07	0,05	4,45	-0,01
1,05E+04	4,02	3,99	0,09	0,05	4,02	-0,02
2,82E+03*	3,45	3,41	0,07	0,06	3,45	-0,03
1,05E+03	3,02	3,00	0,04	0,04	3,02	-0,03
1,05E+02	2,02	1,99	0,11	0,09	2,02	-0,01
1,05E+01	1,02	1,09	0,29	0,23	1,02	0,06

*Punti decisionali medici vicini


Figura 3: Intervallo lineare del NeuMoDx HBV Quant Assay nel plasma

È stato eseguito uno studio successivo per dimostrare l'equivalenza delle matrici e l'analisi rispetto ai risultati quantitativi di NeuMoDx HBV per i campioni preparati nel plasma e nel siero utilizzando due modelli di andamento della regressione diversi, incluso lo strumento di regressione MS Excel e Passing-Bablok. I risultati hanno mostrato una forte correlazione rappresentata da valori di pendenza e intercetta molto vicini rispettivamente a 1,00 e 0,00 e un valore R² di 0,99 (strumento di regressione MS Excel) o un valore P di 0,270 (Passing-Bablok). Le concentrazioni dell'esame HBV Quant riportate dal NeuMoDx System per la matrice di plasma rispetto ai campioni di siero corrispondenti sono presentate nella *Figura 4*.

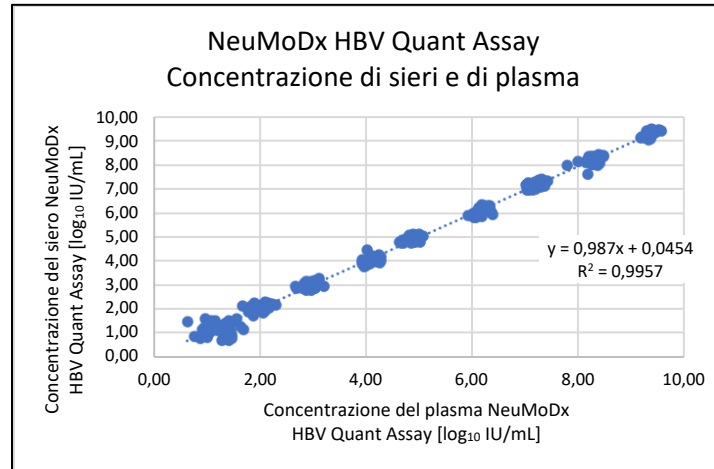


Figura 4: Intervallo lineare del NeuMoDx HBV Quant Assay tra matrici

Per il flusso di lavoro del campione da 200 µL sono state dunque confermate linearità e ULoQ in una gamma di 9,31–1,71 log₁₀ IU/mL. Sono stati eseguiti confronti di equivalenza tra le concentrazioni segnalate dal software del NeuMoDx per i flussi di lavoro da 200 µL e 550 µL. L'analisi della regressione di Deming e della regressione di Passing-Bablok hanno mostrato una correlazione eccellente e una pendenza vicina a 1 e delle intercette minime (deviazione) delle concentrazioni riportate per i campioni di plasma e siero nell'intervallo lineare. Un confronto Bland–Altman della concentrazione riportata per il flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL con la concentrazione media riportata per i flussi di lavoro per volume campione sia da 200 µL che da 550 µL ha mostrato una deviazione minima, attribuendo precisione all'algoritmo usato per generare i risultati dal flusso di lavoro da 200 µL. Inoltre, una semplice regressione lineare che mette a confronto la concentrazione attesa e quella riportata per il flusso di lavoro da 200 µL aveva una pendenza vicina a 1, dimostrando una correlazione eccellente (Figura 5). Considerati insieme, questi confronti dimostrano una quantificazione precisa dell'HBV nell'intervallo lineare del NeuMoDx HBV Quant Assay utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL.

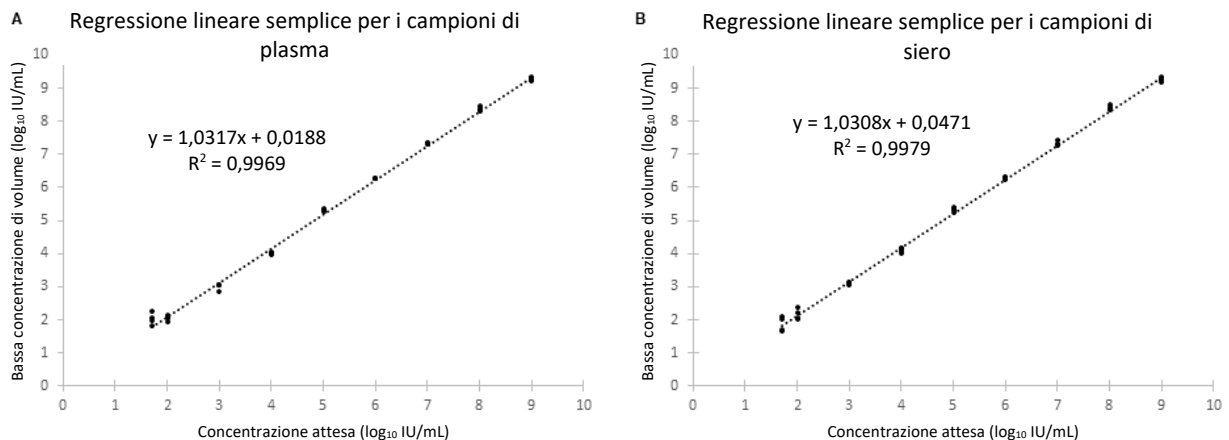


Figura 5: Rapporto lineare tra concentrazione attesa e concentrazione riportata da NeuMoDx per il flusso di lavoro da 200 µL in a) Plasma e b) Serum

Linearità tra genotipi

La linearità del NeuMoDx HBV Quant Assay in campioni di plasma per i genotipi HBV è stata caratterizzata analizzando almeno quattro (4) concentrazioni diverse di ciascun genotipo di HBV preparato in plasma HBV-negativo raggruppato. I livelli testati di target HBV utilizzati in questo studio sono dipesi dalla concentrazione del campione di origine, pertanto sono stati diversi tra genotipi. Lo studio è stato eseguito con ciascun genotipo utilizzando 6 replicati a ciascun livello. La linearità tra genotipi HBV viene presentata nella Tabella 6 e Figura 6.

Tabella 6: Linearità del NeuMoDx HBV Quant Assay tra genotipi

Genotipo	Equazione della linearità y = quantificazione del NeuMoDx HBV Quant Assay x = quantificazione attesa	R ²
A	$y = 1x + 1E-06$	0,9977
B	$y = 1,0129x - 0,0964$	0,9975
C	$y = 1,0250x - 0,0898$	0,998
D	$y = 1,0379x - 0,0896$	0,9975
E	$y = 1,0182x - 0,096$	0,9956
F	$y = 0,9736x + 0,276$	0,9906
G	$y = 1,0547x - 0,0835$	0,9813

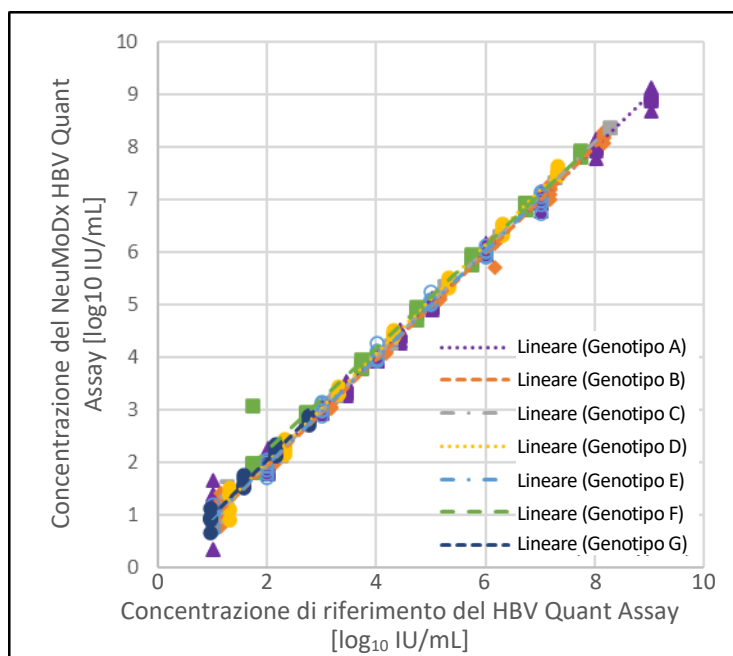


Figura6: Linearità del NeuMoDx HBV Quant Assay tra genotipi

Specificità analitica e reattività crociata

La specificità analitica è stata dimostrata sottoponendo a screening 32 organismi che si possono trovare in campioni di sangue/plasma, nonché in specie fitogeneticamente simili all'HBV per reattività crociata. Gli organismi sono stati preparati in gruppi di 4 – 6 organismi e analizzati ad alta concentrazione. Gli organismi analizzati sono mostrati nella *Tabella 7*. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con nessuno degli organismi analizzati, confermando la specificità analitica del 100% del NeuMoDx HBV Quant Assay.

Tabella 7: Patogeni impiegati per dimostrare la specificità analitica– reattività crociata

Adenovirus 2	Dengue V1	Epatite A	HPV 16	Ilheus (ILHV)	Febbre gialla
Adenovirus 5	Dengue V2	Epatite C	HPV 18	Influenza A	Virus Zika
Banzi Virus	Dengue V3	Virus dell'herpes umano 6a	HSV1	Parvo B19	
Virus BK	Dengue V4	Virus dell'herpes umano 8	HSV 2	Rubella	
Citomegalovirus	Virus di Epstein Barr	HIV 1	HTLV 1	Encefalite di Saint Louis	
VZV	Virus del vaccino	HIV 2	HTLV 2	Virus del Nilo occidentale	

Sostanze interferenti - Organismi commensali

Il NeuMoDx HBV Quant Assay è stato valutato per verificare l'interferenza nella presenza di organismi non target tramite gli stessi gruppi di organismi preparati per testare la specificità analitica. Gli organismi sono stati analizzati singolarmente o raccolti in gruppi di 4-6 organismi nel plasma negativo all'HBV e arricchito con controlli HBV a una concentrazione di 3,7 log₁₀ IU/mL. Non sono state osservate interferenze significative nella presenza di questi organismi, come indicato dalla deviazione minima della quantificazione dai campioni di controllo che non contenevano alcun agente interferente [Tabella 8].

Tabella 8: Test dell'interferenza – Organismi commensali

Organismi non target	Conc. media (log ₁₀ IU/mL)	Deviazione (log ₁₀ IU/mL)
Gruppo 1 [virus BK, citomegalovirus, virus di Epstein Barr, virus dell'herpes umano 6a, virus dell'herpes umano 8]	3,51	0,10
Gruppo 2 [adenovirus 2, adenovirus 5, Dengue V2, Dengue V3, Dengue V4]	3,38	0,22
Gruppo 3 [Parvo B19, HTLV 1, HTLV 2, Ilheus (ILHV), febbre gialla, virus Zika]	3,62	0,06
Gruppo 4 [HPV 16, HPV 18, HSV 1, HSV 2, Dengue V1]	3,57	0,04
Gruppo 5 [encef. di Saint Louis, VZV, virus del vaccino, virus del Nilo occidentale]	3,57	0,03
HAV	3,58	0,05
Banzi Virus	3,41	0,19
HIV-1	3,47	0,15
HIV-2	3,56	0,05
Rubella	3,16	0,44
Influenza A	3,60	0,03
HCV	3,58	0,04

Sostanze interferenti- Sostanze endogene ed esogene

Le prestazioni del NeuMoDx HBV Quant Test Strip sono state valutate in presenza di sostanze interferenti esogene ed endogene tipiche, trovate in campioni clinici di plasma con HBV. Questi includevano livelli insolitamente alti di componenti del sangue, nonché comuni farmaci antivirali, che sono stati classificati nella *Tabella 9*. Ciascuna delle sostanze endogene ed esogene elencate di seguito nella *Tabella 10* è stata aggiunta al plasma umano HBV negativo arricchito con HBV in una concentrazione di $3,7 \log_{10}$ IU/mL e sono stati osservati i dati per l'interferenza. Inoltre, è stato testato anche il plasma a uno stadio comune di malattia associato all'infezione da epatite B per valutare la potenziale interferenza.

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

Pool	Farmaco	Classificazione
1	Zidovudina (ZDV)	Inibitore della trascrittasi inversa
	Saquinavir	Inibitore della HIV proteasi
	Ritonavir	Inibitore della HIV proteasi
	Claritromicina	Antibiotico
	Interferone alfa-2a	Immunomodulatore
	Interferone alfa- 2b	Immunomodulatore
2	Abacavir solfato	Inibitore della trascrittasi inversa
	Amprenavir	Inibitore della proteasi
	Ribavirina	Immunomodulatore
	Entecavir	Antivirale HBV
	Fluoxetina	Antidepressivo SSRI
	Valaciclovir cloridrato	Antivirale
3	Tenofovir disoproxil	Antivirale HBV/HIV
	Lamivudina	Antivirale HBV/HIV
	Ganciclovir	Antivirale CMV
	Valganciclovir	Antivirale CMV
	Nevirapina	Inibitore della trascrittasi inversa
4	Efavirenz	Inibitore della trascrittasi inversa
	Lopinavir	Inibitore della proteasi
	Enfuvirtide	Inibitore della fusione dell'HIV
	Ciprofloxacina	Antibiotico
	Paroxetina	Antidepressivo SSRI
5	Adefovir (dipivoxil)	Antivirale
	Azitromicina	Antibiotico
	Indinavir solfato	Inibitore della HIV proteasi
	Sertralina	Antidepressivo SSRI

Tabella 10: Test di interferenza – Agenti esogeni ed endogeni

Endogena	Conc. media (log ₁₀ IU/mL)	Deviazione (log ₁₀ IU/mL)
Emoglobina	3,50	0,20
Trigliceridi	3,51	0,09
Bilirubina	3,56	0,13
Albumina	3,51	0,17
Esogene (farmaci)	Conc. media (log ₁₀ IU/mL)	Deviazione (log ₁₀ IU/mL)
Pool 1: zidovudina (ZDV), saquinavir, ritonavir, claritromicina, interferone alfa-2a, interferone alfa-2b	3,58	0,08
Pool 2: abacavir solfato, amprenavir, ribavirina, entecavir, fluoxetina, valaciclovir cloridrato	3,56	0,04
Pool 3: tenofovir disoproxil, lamivudina, ganciclovir, valganciclovir, nevirapina	3,59	0,06
Pool 4: efavirenz, lopinavir, enfuvirtide, ciprofloxacina, paroxetina,	3,60	0,07
Pool 5: adefovir (dipivoxil), azitromicina, indinavir solfato, sertralina	3,56	0,19
Stato della malattia	Conc. media (log ₁₀ IU/mL)	Deviazione (log ₁₀ IU/mL)
Anticorpo anti-nucleo (Antinuclear Antibody, ANA)	3,61	0,10
Lupus eritematoso sistemico (LES)	3,63	0,10
Artrite reumatoide (AR)	3,57	0,09
Anticorpi (HCV)	3,58	0,07
Anticorpi (HBV)	3,64	0,11
Cirrosi alcolica	3,68	0,15
Fattore reumatoide (RF)	3,63	0,10
Steatoepatite non alcolica (NASH)	3,49	0,06

Precisione intra-laboratorio

La precisione del NeuMoDx HBV Quant Test Strip è stata determinata analizzando un pannello di 8 componenti di campioni di HBV in modo da coprire i genotipi A e C utilizzando tre NeuMoDx System per 12 giorni. Sono state caratterizzate le precisioni intra-sessione, intra-giornata e intra-sistema ed è stata determinata la deviazione complessiva standard come $\leq 0,22$ log₁₀ IU/mL. La precisione fra operatori non è stata caratterizzata, in quanto l'operatore non riveste un ruolo significativo nell'elaborazione dei campioni con l'uso del NeuMoDx System. I risultati di precisione intra-laboratorio sono presentati nella *Tabella 11*.

Tabella 11: Risultati dello studio di precisione intra-laboratorio

COMPONENTE DEL PANNELLO	CONC. TARGET [log ₁₀ IU/mL]	CONC. MEDIA [log ₁₀ IU/mL]	N	Deviazione	DS intra-sessione	DS intra-giornata	DS intra-sistema	DS complessiva
Genotipo A	7,75	7,89	36	0,14	0,06	0,07	0,07	0,07
	5,75	5,83	36	0,11	0,07	0,10	0,10	0,10
	3,75	3,70	36	0,11	0,11	0,13	0,15	0,15
	1,75	1,54	36	0,23	0,16	0,22	0,22	0,22
Genotipo C	6,27	6,23	36	0,10	0,08	0,09	0,10	0,10
	4,27	4,18	36	0,08	0,08	0,10	0,10	0,10
	3,27	3,14	36	0,09	0,08	0,12	0,12	0,12
	2,27	2,08	36	0,12	0,12	0,15	0,16	0,16

Riproducibilità lotto a lotto

La riproducibilità lotto a lotto del NeuMoDx HBV Quant Test Strip è stata determinata utilizzando tre lotti diversi di reagenti chiave: NeuMoDx Lysis Buffer 1, NeuMoDx Extraction Plate e NeuMoDx HBV Quant Test Strip. Per valutare le prestazioni è stato usato un pannello di 8 componenti di genotipi di HBV A e C. L'analisi è stata eseguita utilizzando tre lotti di reagenti su tre NeuMoDx System in 6 giorni. È stata analizzata la variazione all'interno e fra lotti. La deviazione complessiva massima è stata di 0,12 log₁₀ IU/mL e la DS complessiva massima di 0,24 log₁₀ IU/mL. Non sono state trovate differenze significative fra i lotti in quanto la quantificazione di tutti i componenti del pannello è rientrata nella specifica di tolleranza. I risultati della riproducibilità lotto a lotto sono presentati di seguito nella *Tabella 12*.

Tabella 12: Risultati dello studio della riproducibilità lotto a lotto

COMPONENTE DEL PANNELLO	CONC. TARGET [log ₁₀ IU/mL]	CONC. MEDIA [log ₁₀ IU/mL]	N	Deviazione	DS intra-LOTTO	DS fra LOTTI	DS complessiva
Genotipo A	8,02	7,99	36	0,03	0,15	0,09	0,17
	6,02	5,96	36	0,06	0,17	0,06	0,18
	4,02	3,90	36	0,12	0,14	0,09	0,17
	2,02	1,92	36	0,10	0,21	0,12	0,24
Genotipo C	6,27	6,32	36	0,05	0,06	0,08	0,10
	4,27	4,31	36	0,04	0,22	0,09	0,24
	3,27	3,30	36	0,03	0,20	0,07	0,21
	2,27	2,32	36	0,05	0,13	0,13	0,18

Efficacia del controllo

L'efficacia dell'SPC1 incluso nel NeuMoDx HBV Quant Assay per riportare eventuali errori o inibizioni nelle fasi di processo che si ripercuotono sulle prestazioni del NeuMoDx HBV Quant Assay è stata valutata utilizzando due genotipi di HBV comuni (A e C). Le condizioni testate sono rappresentative di errori critici della fase di elaborazione che potrebbero verificarsi durante l'elaborazione del campione e *possono non essere rilevati* dai sensori di monitoraggio delle prestazioni del NeuMoDx System. L'efficacia dell'SPC1 è stata valutata simulando tali condizioni di errore. Le lacune di elaborazione che hanno prodotto un effetto avverso sulla rilevazione/quantificazione dell'HBV sono state rispecchiate dalle prestazioni del target SPC1 (presenza dell'inibitore e assenza della fase di lavaggio). Per le condizioni in base alle quali l'amplificazione SPC1 non è stata interessata, è stata mostrata anche l'amplificazione del target HBV all'interno di una quantificazione riportata di 0,2 log₁₀ IU/mL dei campioni di controllo.

Tabella 13: Efficacia del Controllo di elaborazione dei campioni

Errore della fase di processo testata	Stato di amplificazione del Controllo di elaborazione dei campioni	Stato di amplificazione del target HBV	Risultato dell'esame
Presence of Inhibitor (Presenza di inibitore)	Not Amplified (Non amplificato)	Not Amplified (Non amplificato)	Unresolved (Irrisolto)
No Wash Delivered (Lavaggio non effettuato)	Not Amplified (Non amplificato)	Not Amplified (Non amplificato)	Unresolved (Irrisolto)
No Wash Blowout (Nessun blow-out di lavaggio)	Amplified (Amplificato)	Amplified (Amplificato)	Positive (Positivo) con quantificazione entro 0,2 log ₁₀ IU/mL del controllo

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata per il NeuMoDx HBV Quant Assay è stato determinato testando tre set di campioni HBV composti da campioni altamente positivi e altamente negativi alternati. In totale, l'operazione ha coinvolto l'analisi di 144 replicati di un campione di plasma EDTA umano HBV negativo normale e di 144 replicati di un campione HBV ad alto titolo a 8,0 log₁₀ IU/mL. Tutti e 144 i replicati del campione negativo erano negativi, dimostrando che non si è verificata contaminazione crociata durante l'elaborazione del campione sul NeuMoDx System.

Equivalenza delle matrici di campioni

L'analisi è stata eseguita per dimostrare risultati equivalenti con i campioni di plasma raccolti in provette di raccolta contenenti acido etilendiamminicotetracetico (EDTA) e acido citrato destrosio (ACD). Inoltre, è stata eseguita l'analisi per dimostrare l'equivalenza tra campioni freschi e congelati. Sono stati raccolti quaranta campioni di singoli donatori in provette per la raccolta EDTA e ACD, utilizzando BioIVT. Tali campioni freschi sono stati arricchiti con quattro livelli di HBV genotipo A o C e analizzati per l'equivalenza. I campioni sono stati quindi congelati per un minimo di 24 ore, scongelati e rianalizzati. È stata dimostrata un'equivalenza eccellente tra campioni freschi e congelati e campioni EDTA e ACD mediante l'analisi della regressione.

Tabella 14: Risultati dell'analisi della regressione dell'equivalenza dei campioni

Parametro [Criterio di accettazione]	Fresco e congelato	ACD e K2EDTA
Pendenza [0,9-1,1]	1,002	0,996
Intercetta [<0,5]	-0,031	0,018
Coefficiente di determinazione [$R^2 > 0,95$]	0,995	0,993

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

È stata inoltre valutata l'equivalenza delle prestazioni del NeuMoDx HBV Quant Assay nei campioni di siero di donatori, freschi e congelati, arricchiti con HBV a concentrazioni che si estendono per la gamma lineare dell'esame. Dopo l'elaborazione dei campioni freschi, i campioni di siero sono stati congelati per almeno 24 ore a -20 °C. I campioni congelati sono stati quindi scongelati e analizzati nuovamente. È stata valutata l'equivalenza lineare tra campioni identici freschi e congelati utilizzando l'analisi della regressione di Passing-Bablok e di Deming. Il valore P della regressione di Passing-Bablok di 0,329 (maggior di 0,05) e il coefficiente di correlazione della regressione di Deming di 0,989 mostra un'equivalenza eccellente tra i campioni elaborati freschi e quelli congelati in precedenza. La deviazione tra lo stato fresco e congelato è stata determinata da Bland-Altman come un valore estremamente trascurabile di -0,002 log₁₀ IU/mL e dimostra ulteriormente l'equivalenza dell'elaborazione del campione fresco rispetto a quello congelato. Infine, è stata determinata la correlazione tra le concentrazioni di HBV riportate dal sistema e le concentrazioni attese sia per i campioni freschi che per quelli congelati, tramite la semplice regressione lineare con valori di R² riportati pari rispettivamente a 0,991 e 0,985.

Stabilità del campione

I campioni di plasma EDTA HBV negativo e di siero sono stati arricchiti con HBV a 3,7 log₁₀ IU/mL e analizzati in momenti diversi durante la conservazione sul NeuMoDx System, subito (tempo 0), dopo 4 ore, dopo 8 ore e dopo 24 ore. Non è stata osservata alcuna differenza significativa nelle prestazioni tra i diversi momenti, a indicare che un campione può essere caricato sul NeuMoDx System per un tempo fino a 24 ore senza influire sulle prestazioni dell'esame.

Un'analisi simile è stata eseguita anche con i campioni di plasma e siero conservati nel frigorifero del laboratorio (tra 2 e 8 °C) per un massimo di 7 giorni prima dell'analisi, senza che siano state osservate differenze significative nelle prestazioni.

Infine, sono stati analizzati i campioni conservati a ≤ -20 °C per un massimo di 6 mesi (plasma) e di 4 mesi (siero) prima dell'elaborazione e non hanno mostrato differenze significative rispetto ai campioni freschi. Il ciclo di congelamento/scongelo è stato ripetuto e ha mostrato nuovamente l'assenza di variazioni nelle prestazioni dopo due cicli di congelamento/scongelo (plasma) o 4 cicli di congelamento/scongelo (siero).

Correlazione del metodo

Campioni di plasma

Le prestazioni qualitative e quantitative del NeuMoDx HBV Quant Assay sono state valutate rispetto agli esami di confronto approvati da FDA/CE analizzando campioni clinici di plasma non diluiti di pazienti infettati da HBV. L'analisi è stata eseguita internamente sul NeuMoDx tramite uno studio in singolo cieco, utilizzando i campioni clinici ottenuti da tre laboratori di riferimento indipendenti. I risultati di un totale di 308 campioni HBV positivi e negativi sono stati compilati nell'analisi qualitativa per calcolare la sensibilità clinica e la specificità del NeuMoDx HBV Quant Assay. L'analisi qualitativa è stata completata includendo ed escludendo i campioni positivi sotto il LLoQ, in quanto la classificazione di tali campioni può variare tra i test. Per generare la regressione lineare per definire le prestazioni quantitative è stato utilizzato un totale di 97 campioni clinici HBV positivi entro l'intervallo lineare comune a entrambi i test. Oltre a fornire sensibilità e specificità eccellenti, la NeuMoDx HBV Quant Test Strip ha dimostrato un'eccellente correlazione quantitativa con l'esame di confronto. Sulla base di questi risultati, la sensibilità del NeuMoDx HBV Quant Assay è stata stimata al 100% (IC 96,4% - 100%) e la specificità al 95,6% (IC 91,9% - 97,7%). Tali intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati utilizzando il metodo per il calcolo dell'intervallo di confidenza al 95% per EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance, Approved Guideline, Vol 28, No 3.⁶

Tabella 15: Metriche relative alla sensibilità e alla specificità cliniche del NeuMoDx HBV Quant Assay per i campioni di plasma sul NeuMoDx 288 Molecular System

	Esame di riferimento (POS)	Esame di riferimento (NEG)	TOTALE
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	103	9	112
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
TOTALE	103	205	308
SENSIBILITÀ = 100% IC 95% (96,4% - 100%) SPECIFICITÀ = 95,6% IC 95% (91,9% - 97,7%)			

Tabella 16: Metriche relative alla sensibilità e alla specificità cliniche del NeuMoDx HBV Quant Assay sul NeuMoDx 288 Molecular System con campioni di plasma <LLoQ esclusi

	Esame di riferimento (POS)	Esame di riferimento (NEG)	TOTALE
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	99	5	104
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	0	196	196
TOTALE	99	201	300
SENSIBILITÀ = 100% IC 95% (96,3% - 100%) SPECIFICITÀ = 97,5% IC 95% (94,3% - 98,9%)			

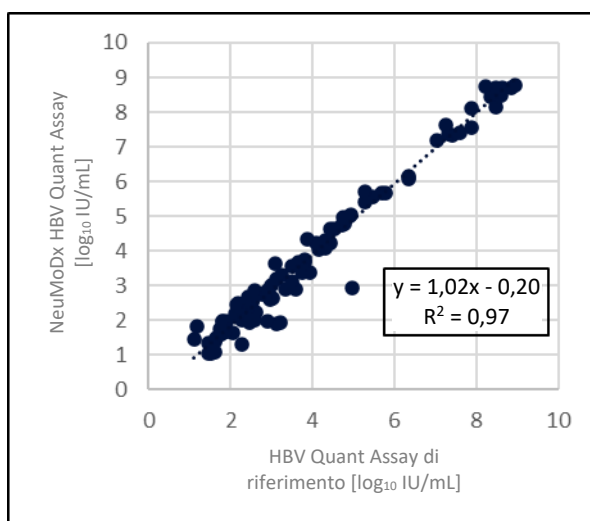


Figura7: Studio della correlazione del metodo quantitativo mediante il NeuMoDx HBV Quant Assay

È stata eseguita l'analisi aggiuntiva sul NeuMoDx 96 Molecular System utilizzando 159 campioni clinici di plasma residuo. Come per l'analisi precedente eseguita sul NeuMoDx 288, i risultati ottenuti dal NeuMoDx 96 sono stati confrontati con i risultati riportati dagli esami approvati dall'FDA e/o con marchio CE utilizzati dai laboratori di origine per l'analisi dello standard di cura. I risultati, inclusa la tabella di verità con la sensibilità e la specificità cliniche, sono presentati con un IC del 95% nella *Tabella 17*.

Tabella 17: Riepilogo delle prestazioni cliniche – NeuMoDx HBV Quant Assay sul NeuMoDx 96 Molecular System

	Esame di riferimento (POS)	Esame di riferimento (NEG)	TOTALE
NeuMoDx HBV Quant Assay (POS)	60	2	62
NeuMoDx HBV Quant Assay (NEG)	1	95	96
TOTALE	61	97	158
SENSIBILITÀ = 98% IC 95% (90% – 100%) SPECIFICITÀ = 98% IC 95% (92% - 100%)			

Campioni di siero

Le prestazioni quantitative del NeuMoDx HBV Quant Assay sono state valutate rispetto agli esami di confronto approvati da FDA/CE analizzando campioni di siero HBV positivo residui deidentificati di pazienti infettati da HBV. È stato analizzato un totale di 66 campioni di siero HBV positivo ottenuti da due laboratori di riferimento indipendenti NeuMoDx HBV Quant Assay, internamente in NeuMoDx. Dei campioni di siero positivo analizzati, 58 sono stati identificati come risultati positivi. Di questi, nove (9) risultati erano al di sotto del LLoQ e al di sopra dell'ULOQ per il NeuMoDx HBV Quant Assay e/o il test di riferimento. Per generare l'analisi della regressione per definire le prestazioni quantitative, è stato utilizzato un totale di 49 campioni clinici HBV positivi entro l'intervallo lineare comune a entrambi i test.

Sono stati generati i grafici di equivalenza e residui per rappresentare la correlazione tra le concentrazioni di NeuMoDx HBV Quant Assay e i valori di concentrazione del test di riferimento per tutti i campioni analizzati utilizzando l'analisi della regressione di Deming e Passing-Bablok, come illustrato nelle Figure 8 e 9. La qualità del modello di regressione di Deming è illustrata da un coefficiente di pendenza di 0,99, con un IC del 95% (0,93; 1,07) e da un'intercetta (deviazione) di -0,22 con un IC del 95% (-0,56; 0,12), dimostrando che i risultati di concentrazione ottenuti fra il NeuMoDx HBV Quant Assay e i test di riferimento sono altamente correlati e presentano una deviazione accettabile. La qualità del modello lineare di Passing-Bablok è illustrata da un coefficiente di pendenza di 0,99 con un IC del 95% (0,91; 1,06) e un'intercetta (deviazione) di -0,25 con un IC del 95% (-0,48; 0,06), dimostrando che i risultati di concentrazione ottenuti tra il NeuMoDx HBV Quant Assay e i test di riferimento sono altamente correlati e presentano una deviazione accettabile, come mostrato nella *Tabella 18*.

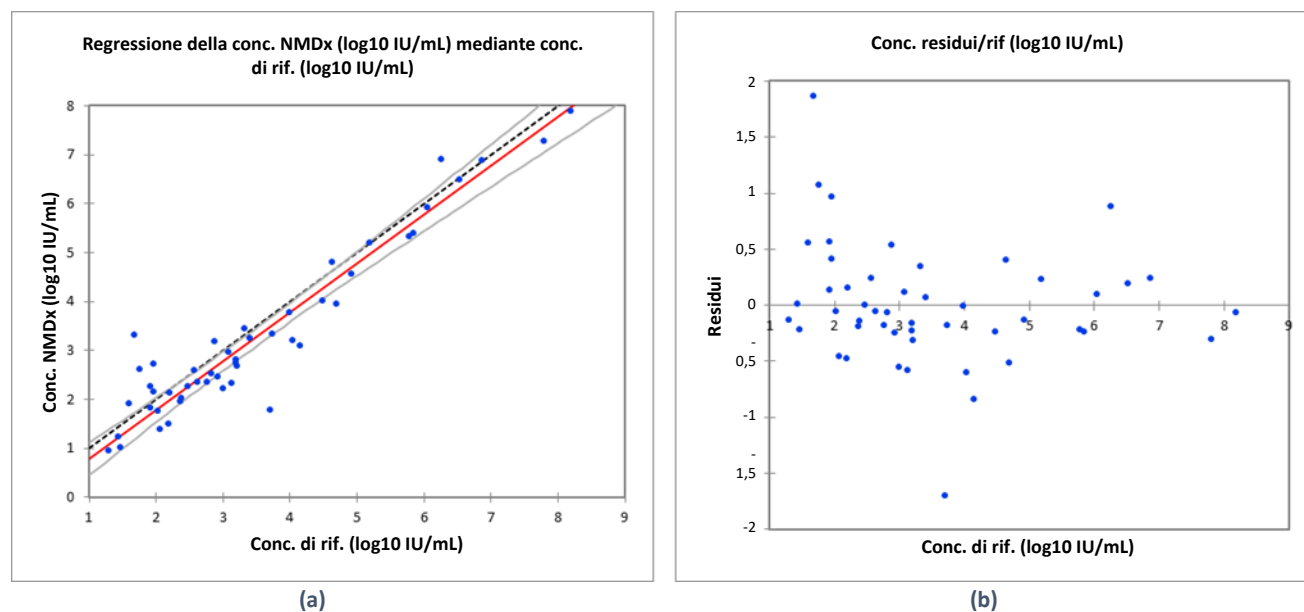


Figura 8: Grafici di equivalenza (a) e residui (b) – Analisi cumulativa dei risultati del test NeuMoDx HBV rispetto ai test di riferimento – Analisi di Deming.

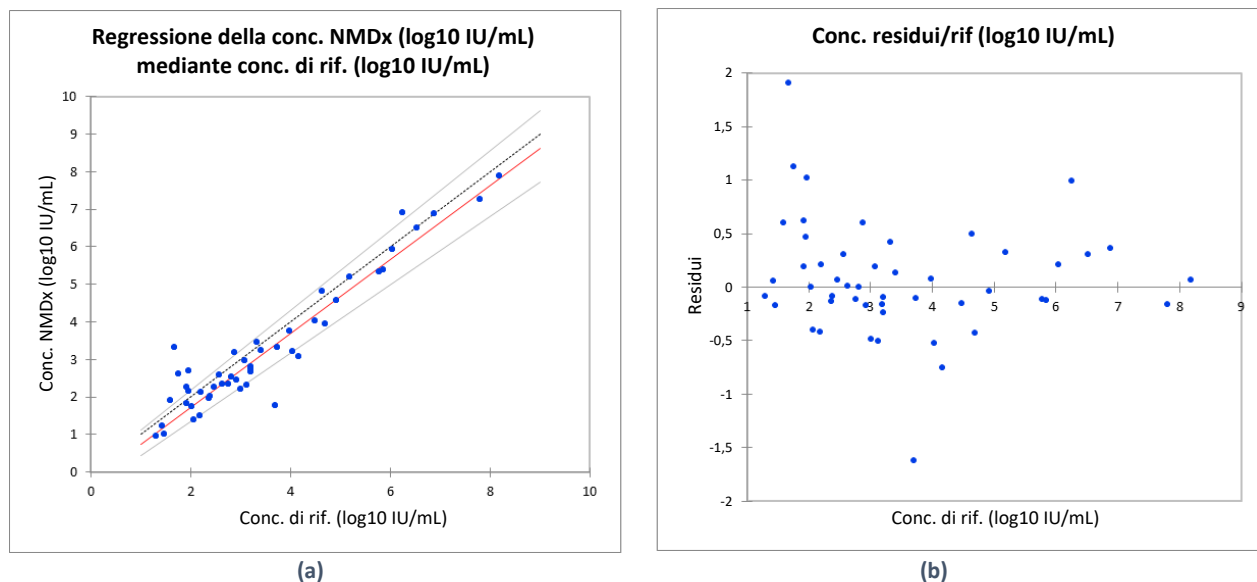


Figura 9: Grafici di equivalenza (a) e residui (b) – Analisi cumulativa dei risultati del NeuMoDx HBV Quant Assay rispetto ai test di riferimento – Analisi di Passing-Bablok.

Tabella 18. Riepilogo dell'analisi di regressione di Deming e lineare di Passing-Bablok per i campioni di siero

Analisi di Deming			Analisi di Passing-Bablok		
Intercetta	Coefficiente di pendenza	R2	Intercetta	Coefficiente di pendenza	Valore P
-0,22 IC 95% (-0,56/0,12)	0,99 IC 95% (0,93/1,07)	0,95	-0,25 IC 95% (-0,48/0,06)	0,99 IC 95% (0,91/1,06)	0,89

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

La correlazione quantitativa tra i flussi di lavoro del volume di campione da 200 µL e 550 µL è stata confermata utilizzando un pannello composto da singoli campioni di plasma HBV negativo e di siero arricchiti con quattro livelli noti di materiale di controllo HBV, tracciabili secondo il 4° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA HBV per i test dell'acido nucleico. Tali campioni singoli di plasma e siero sono stati elaborati utilizzando i 2 flussi di lavoro del volume di campione da 200 µL e da 550 µL, per un totale di 288 test eseguiti. I confronti di equivalenza tra la concentrazione riportata dal software del NeuMoDx per i flussi di lavoro per volume campione di 200 µL e 550 µL con pannello artificiale sono stati eseguiti sulla base dei singoli campioni. L'analisi della regressione di Deming e Passing-Bablok aveva una pendenza di 0,985 e 0,998 con intercette di -0,001 e 0,053, rispettivamente nel plasma, e di 1,024 e 1,018 con intercette di 0,095 e 0,070, rispettivamente nel siero, dimostrando una concordanza eccellente delle quantificazioni HBV tra i due volumi di elaborazione. Un confronto Bland-Altman ha mostrato una deviazione minima tra i due flussi di lavoro. Inoltre, l'analisi della regressione lineare semplice con la concentrazione attesa e la concentrazione riportata per il flusso di lavoro da 200 µL aveva una pendenza di 1,047 e un coefficiente di correlazione di 0,998 (plasma) e di 1,113 e 0,992 (siero), supportando prestazioni eccellenti utilizzando il flusso di lavoro del volume di campione da 200 µL per il NeuMoDx HBV Quant Assay. I risultati di questi studi sono riepilogati nella *Figura 10* e *Figura 11*.

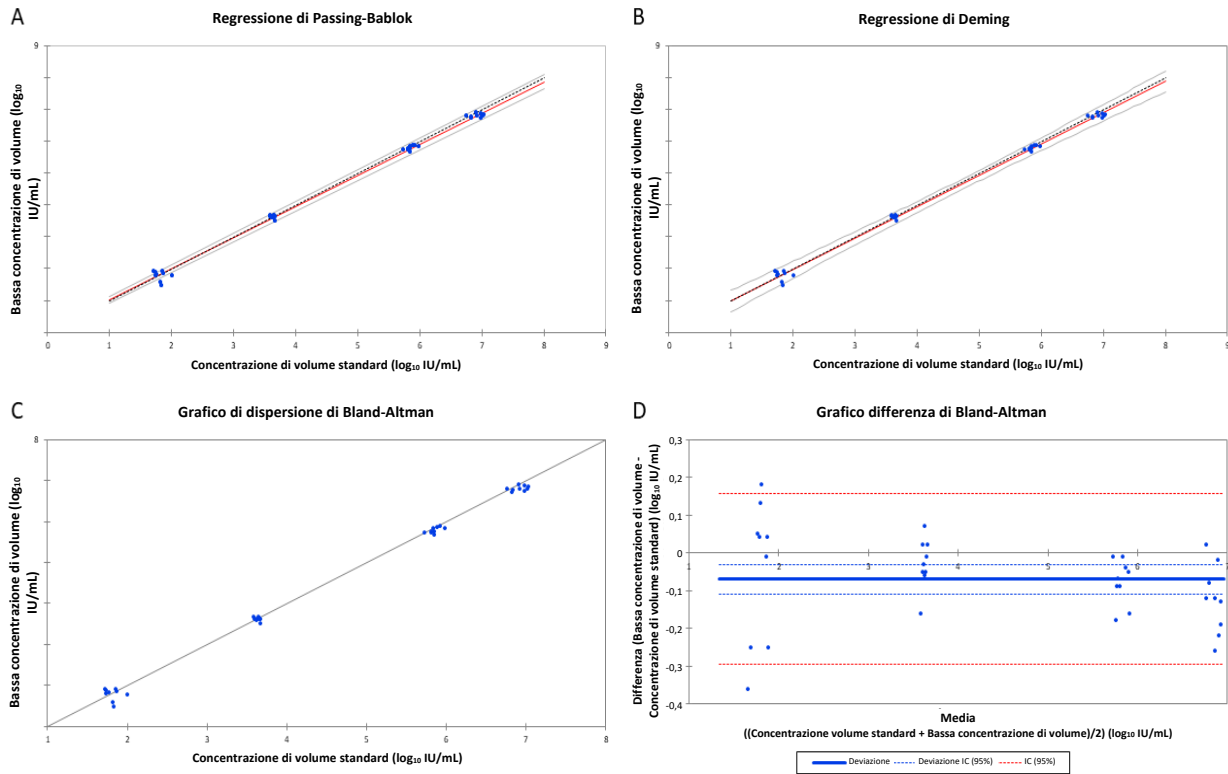


Figura 10: Confronto dei grafici di equivalenza delle concentrazioni di volume basse riportate rispetto alle concentrazioni di volume del campione standard riportate. A) Regressione di Passing-Bablok. B) Regressione di Deming. C) Grafico di dispersione di Bland–Altman D) Grafico di differenza di Bland–Altman – Campioni di plasma

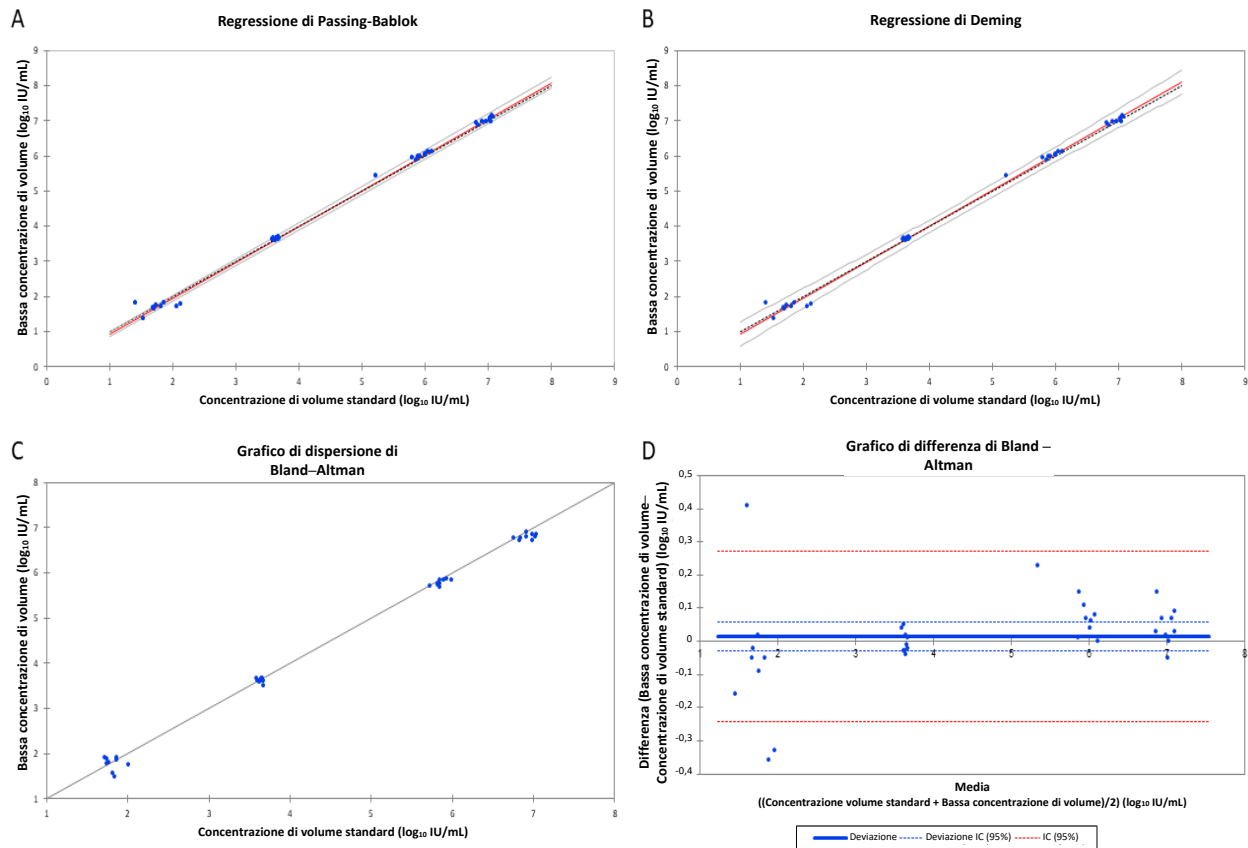


Figura 11: Confronto dei grafici di equivalenza delle concentrazioni di volume basse riportate rispetto alle concentrazioni di volume del campione standard riportate. A) Regressione di Passing-Bablok. B) Regressione di Deming. C) Grafico di dispersione di Bland–Altman D) Grafico di differenza di Bland–Altman – Campioni di siero

BIBLIOGRAFIA

1. Mother-to-child transmission of hepatitis B virus in sub-Saharan Africa: time to act. Andersson, Monique I et al. The Lancet Global Health, Volume 3, Issue 7, e358 - e359
2. Schillie S, Vellozzi C, Reingold A, et al. Prevention of Hepatitis B Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. MMWR Recomm Rep 2018;67(No. RR-1):1–31. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6701a1>.
3. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet. April 2017. <http://www.who.int> (last accessed 20 November 2017)
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. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARCHI COMMERCIALI


NeuMoDx™ è un marchio commerciale di NeuMoDx Molecular, Inc.
 NeuDry™ è un marchio commerciale di NeuMoDx Molecular, Inc.
 TaqMan® è un marchio commerciale registrato di Roche Molecular Systems, Inc.

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


LEGENDA DEI SIMBOLI


R only Solo su prescrizione medica


 Produttore


 Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*


 Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea


 Numero di catalogo


 Codice lotto

 Data di scadenza

 Limite di temperatura

 Non riutilizzare

 Contenuto sufficiente per <n> test

 Consultare le istruzioni per l'uso

 Attenzione

 Rischio biologico

 Marchio CE



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

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



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

 2797

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

Brevetto: www.neumodx.com/patents