

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

HUOMIO: Vain vietäväksi Yhdysvaltojen ulkopuolelle

IVD Tarkoitettu NeuMoDx 288 Molecular System- ja NeuMoDx 96 Molecular System -järjestelmissä tehtävää *in vitro* -diagnostiikkaa vartenSelostepäivitykset ovat osoitteessa: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Lisätietoja on NeuMoDx 288 Molecular System -järjestelmän käyttöoppaassa, tuotenumero 40600108

Lisätietoja on NeuMoDx 96 Molecular System -järjestelmän käyttöoppaassa, tuotenumero 40600317

KÄYTTÖTARKOITUS

NeuMoDx EBV Quant Assay on automaattinen nukleiinihappojen *in vitro* -monistustesti ihmisen Epstein-Barr-viruksen (EBV) DNA:n kvantifiointiin plasmanäytteistä. NeuMoDx EBV Quant Assay käytettynä NeuMoDx 288 Molecular System- ja NeuMoDx 96 Molecular System -järjestelmissä (NeuMoDx System -järjestelmässä) sisältää automaattisen DNA:n eristämisen, jotta kohdenukleiinihappo voidaan erottaa plasmasta, sekä reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), jolla kohdistetaan erittäin konservoituneisiin Epstein-Barr-virusgenomin sekvensseihin.

NeuMoDx EBV Quant Assay on tarkoitettu Epstein-Barr-viruksen DNA:n tunnistukseen ja kvantifiointiin *in vitro* tuoreista ja pakastetuista ihmisen plasmanäytteistä NeuMoDx 288- ja NeuMoDx 96 Molecular System -järjestelmissä. NeuMoDx EBV Assay on tarkoitettu käytettäväksi EBV-infektioiden diagnosoinnissa ja seurannassa. Määrittystä voidaan käyttää EBV:n DNA:n mittaamiseen arvioitaessa vastetta virushoittoon. Tämä testi on tarkoitettu käytettäväksi yhdessä sairauden etenemisen kliinisten merkkien ja muiden laboratoriomerkkien kanssa EBV-infektioon kliiniseen hallintaan ja seurantaan. Tätä määrittystä ei ole tarkoitettu käytettäväksi EBV:n seuloantaan verestä tai verituotteista.

YHTEENVETO JA SELITYKSET

Steriileihin EDTAa antikoagulanttina sisältäviin verinäyteputkiin otettua ihmisen kokoverta voidaan käyttää plasman valmistamiseen. Testaus aloitetaan asettamalla NeuMoDx System -järjestelmän kanssa yhteensopivassa näyteputkessa oleva plasma näyteputkelineeseen ja lataamalla se NeuMoDx System -järjestelmän työpöydälle. Jokaista näytettä varten 250 µl plasman alikvoottia sekoitetaan NeuMoDx Lysis Buffer 5 -lyysauspuskurin kanssa. NeuMoDx System -järjestelmä suorittaa kaikki vaiheet automaattisesti: se eristää kohdenukleiinihapon, tekee eristetyt DNA:n valmistelut reaaliaikaisen PCR:n monistusvaihetta varten sekä monistaa ja tunnistaa monistamisen tuotteet, jos niitä on näytteessä (kaksi erittäin konservoitunutta aluetta EBV-genomissa). NeuMoDx EBV Quant Assay -määrittys sisältää DNA-näytteen prosessikontrollin (Sample Process Control 1, SPC1), jolla valvotaan mahdollisia estäviä aineita sekä eristämisen- ja monistamisprosessien aikaisia NeuMoDx System -järjestelmän ja reagenssien toimintahäiriöitä.

EBV on yleinen ihmisen herpesvirusperheeseen kuuluva kaksijuosteinen DNA-virus, joka tarttuu kaikenikäisiin ihmisiin. Arviolta > 90 % ihmisistä maailmanlaajuisesti on saanut EBV-tartunnan.¹ EBV leviää ruumiinnesteiden, kuten syljen, veren, siemennesteen ja elinsiirtojen välityksellä. Useat ihmiset saavat EBV-tartunnan lapsuudessa. Nämä henkilöt ovat yleensä oireettomia, vaikka heillä onkin EBV-tartunta. Immunitetiitään vaarantuneille henkilöille voi kehittyä vaikeampia oireita ja komplikaatioita EBV-infektiosta. Latentti EBV-infektio aiheuttaa suurimman vaaran elinsiirron saaville potilaille. Elinsiirron jälkeisiä lymfoproliferatiivisia häiriöitä (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLD) ovat EBV:n aiheuttama kasvaimen muodostuminen B-soluissa EBV:n immuunikontrollin immunosuppressioainoiden vaikutuksen vuoksi, mikä on eräs merkittävimmistä sairastumis- ja kuolleisuussyistä potilaille, joille tehdään jonkinlainen elinsiirto.²

EBV-viruskuorman seurannan käyttö helpottaa EBV:hen liittyvän PTLD:n diagnosointia ja hallintaa. EBV-nukleiinihappojen havaitseminen verestä ei kuitenkaan riitä EBV:hen liittyvän PTLD:n diagnosointiin. Nukleiinihappojen testausta (Nucleic Acid Testing, NAT) pitäisi käyttää vain yhdessä sairauden etenemisen kliinisten merkkien ja muiden laboratoriomerkkien kanssa EBV-tartunnan saaneiden potilaiden kliiniseen hoitoon ja seurantaan. Vaikka tämänhetkiset ohjeet immunitetiitään vaarantuneiden henkilöiden EBV-tartuntojen hallitsemisesta ja hoitamisesta ovat epäselviä sen osalta, *milloin* antivirushoito on aloitettava, ne kaikki edellyttävät jatkuvaa viruskuorman seurantaan sen jälkeen, kun antivirushoito on aloitettu. Tämä auttaa lieventämään lääkkeiden vaikeita haittavaikutuksia tässä kohderyhmässä.^{3,4}

MENETELMÄN TOIMINTAPERIAATE

NeuMoDx System -järjestelmässä NeuMoDx EBV Quant Assay -määrittys käyttää NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskaa, NeuMoDx EBV Calibrators -kalibraattoreita, NeuMoDx EBV External Controls -kontrolleja, NeuMoDx Lysis Buffer 5 -puskuria ja yleiskäyttöisiä NeuMoDx-järjestelmän reagensseja analyysin tekemiseen. NeuMoDx EBV Quant Assay -määrittäksessä yhdistyvät automaattinen DNA:n eristys, monistus ja tunnistus reaaliaikaisella PCR:llä. Kokoverinäytteet otetaan EDTA-putkiin plasman valmistelua varten. NeuMoDx System -järjestelmän kanssa yhteensopivassa näyteputkessa oleva plasmanäyte asetetaan näyteputkelineeseen, joka ladataan sitten NeuMoDx System -järjestelmän työpöydälle käsittelyä varten. Muita käyttäjän toimia ei tarvita.

NeuMoDx System -järjestelmät käyttävät lämmön, hajottavan entsyymin ja eristysreagenssien yhdistelmää solujen automaattisessa hajotuksessa, DNA:n eristämässä ja estäjien poistamisessa. Vapautuneet nukleiinihapot tarttuvat paramagneettisiin hiukkasiin. Hiukkaset ja niihin sitoutuneet nukleiinihapot siirretään NeuMoDx Cartridge -kasettiin, jossa sitoutumattomat, muut kuin DNA:n osat pestään pois NeuMoDx Wash Reagent -pesureagenssilla ja sitoutunut DNA eluoidaan NeuMoDx Release Reagent -irrotusreagenssilla. Eluoidun DNA:n avulla NeuMoDx System -järjestelmät rehydroivat erityisiä NeuDry™-monistusreagensseja, jotka sisältävät kaikki EBV-spesifisen kohteen PCR-monistamiseen tarvittavat osat sekä SPC1:n. Kun NeuDry-PCR-reagenssit on valmisteltu, NeuMoDx System -järjestelmä annostelee PCR-ajoa varten valmiin seoksen NeuMoDx Cartridge -kasettiin. Kontrolli- ja kohde-DNA-sekvenssit (jos niitä on) monistetaan ja tunnistetaan NeuMoDx Cartridge -kasetin PCR-kammiossa. Reaaliaikaisen PCR:n jälkeen amplikonin pysyy NeuMoDx Cartridge -kasetissa, mikä käytännössä poistaa monistamisen jälkeisen kontaminaatoriskin.

NeuMoDx EBV Quant Assay -määritys kohdistuu kahteen erittäin konservoituvaan alueeseen, BALF5:een ja BXFL1:een, EBV-genomissa. Kaksoiskohdemalli vähentää virheellisten negatiivisten tulosten vaaraa mutaatiotapauksissa, mikä parantaa määrityksen luotettavuutta. Monistetut kohteet tunnistetaan reaaliaikaisesti hydrolyysikoettimien avulla eli TaqMan®-tekniikalla, jossa käytetään amplikonikohtaisia fluoresoivia oligonukleotidikoettimien molekyyliä.

TaqMan-koettimet koostuvat fluoresoivasta aineesta, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt oligonukleotidikoettimen 5'päähän, ja 3'-päässä olevasta sammuttajasta. Koettimen ollessa ehjä fluoresoivan aineen ja sammuttajamolekyylin läheisyys tukahduttaa fluoresoivan aineen lähettämän fluoresenssin Förster-tyyppisellä energiansiirrolla (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

TaqMan-koettimet on suunniteltu kiinnittymään tietyn alukejoukon monistamalle DNA:n alueelle. Kun Taq DNA -polymeraasi pidentää aluketta ja syntetisoi uuden juosteen, Taq DNA -polymeraasin 5'-3'-eksonukleasiaktiivisuus hajottaa malliin kiinnittyneen koettimen. Koettimen hajoaminen vapauttaa fluoresoivan aineen ja koetin ja sammuttaja erkanevat toisistaan, jolloin FRET:n tukahduttamisvaikutus estyy ja fluoresoivan aineen fluoresenssin tunnistus voi kasvaa. Havaittu fluoresenssisignaali on suoraan verrannollinen vapautuneeseen fluoresoivaan aineeseen ja voi korreloida PCR:n kohde-DNA:n määrän kanssa.

TaqMan-koettimet, jotka on leimattu fluoresoivalla aineella (490/521 nm) 5'-pästä ja pimeällä sammuttajalla 3'-pästä, auttavat havaitsemaan EBV:n DNA:n. SPC1:n tunnistusta varten TaqMan-koetin on leimattu vaihtoehtoisella fluoresoivalla värillä (535/556 nm) 5'-päässä ja pimeällä sammuttajalla 3'-päässä. NeuMoDx System -järjestelmän ohjelmisto valvoo TaqMan-koettimien lähettämää fluoresenssisignaalia jokaisen monistamissyklin lopussa. Monistumisen päätyttyä NeuMoDx System -järjestelmän ohjelmisto analysoi tiedot ja laatii raportin tuloksista (POSITIVE [Positiivinen] / NEGATIVE [Negatiivinen] / INDETERMINATE [Epäselvä] / UNRESOLVED [Ratkaisematon]). Jos tulos on POSITIVE (Positiivinen), NeuMoDx System -järjestelmän ohjelmisto antaa myös näytteeseen tai raportteihin liittyvän kvantitatiivisen arvon, jos laskettu pitoisuus on kvantifiointirajojen ulkopuolella.

REAGENSIT/TARVIKKEET

Toimitetut materiaalit

REF	Sisältö	Testejä/yksikkö	Testejä/pakkaus
201500	NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuska <i>Kuivatut PCR-reagenssit, jotka sisältävät EBV- ja SPC1-spesifisen TaqMan-koettimen ja alukkeet.</i>	16	96

Tarvittavat lisämateriaalit, jotka eivät sisälly toimitukseen (saatavilla erikseen NeuMoDx-yhtiöltä)

REF	Sisältö
100200	NeuMoDx Extraction Plate -eristyslevy <i>Kuivatut paramagneettiset hiukkaset, hajottava entsyymi ja näytteiden prosessikontrollit</i>
800500	NeuMoDx EBV Calibrator -kalibraattorit <i>Kertakäyttöiset EBV korkean ja matalan kalibraattorin sarjat standardikäyrän validiteetin määrittämiseen</i>
900501	NeuMoDx EBV External Control -kontrollit <i>Kertakäyttöinen sarja, EBV-positiiviset ja -negatiiviset kontrollisetit (EBV:n positiiviset ja negatiiviset kontrollit) NeuMoDx CMV Quant Assay -kvantifointimäärityksen päivittäisen validiteetin määrittämiseen</i>
400900	NeuMoDx Lysis Buffer 5 -lyysauspuskuri
400100	NeuMoDx Wash Reagent -pesureagenssi
400200	NeuMoDx Release Reagent -irrotusagenssi
100100	NeuMoDx Cartridge -kasetti
235903	Hamilton CO-RE/CO-RE II -kärjet (300 µl) ja suodattimet
235905	Hamilton CO-RE/CO-RE II -kärjet (1 000 µl) ja suodattimet

Tarvittavat laitteet

NeuMoDx 288 Molecular System -järjestelmä [REF 500100] tai **NeuMoDx 96 Molecular System** -järjestelmä [REF 500200]

VAROITUKSET JA VAROTOIMET

- NeuMoDx EBV Quant Assay on tarkoitettu *in vitro* -diagnostiseen käyttöön vain NeuMoDx System -järjestelmissä.
- Näytteitä on aina käsiteltävä kuin ne olisivat tartuntavaarallisia ja on noudatettava laboratorion turvaohjeita: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁵ ja CLSI Document M29-A4.⁶
- Positiivinen tulos osoittaa EBV:n DNA:n läsnäoloa.
- NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tekeminen on rajattu henkilöihin, jotka ovat saaneet koulutuksen NeuMoDx System -järjestelmän käyttöön sekä tartuntavaarallisten materiaalien käsittelyyn.

- Älä käytä reagensseja tai tarvikkeita viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
- Reagensseja ei saa käyttää, jos suoja- tai tiivistys on rikki tai pakkaus on vahingoittunut vastaanotettaessa.
- Älä käytä tarvikkeita ja reagensseja, jos suoja- tai tiivistys on avautunut tai rikki vastaanotettaessa.
- Validin testikalibroinnin (jonka generoi NeuMoDx EBV Calibrator -sarjan korkean ja matalan kalibraattorin [REF 800500] käsittely) täytyy olla käytettävissä, ennen kuin kliinisistä näytteistä voidaan saada testituloksia.
- NeuMoDx EBV External Controls -kontrollit [REF 900501] on käsiteltävä aina 24 tunnin välein testaamalla ne NeuMoDx EBV Quant Assay -määrittelyksillä.
- Toissijaisten alikvoottien näytteen vähimmäismäärä riippuu näyteputken koosta ja näyteputkelineestä seuraavasti. Määritettyä minimiä pienempi määrä voi aiheuttaa virheen Quantity Not Sufficient (Määrä ei riitä).
- Väärissä lämpötiloissa tai liian pitkään säilytettyjen näytteiden käyttö voi aiheuttaa epäkelvöllisiä tai virheellisiä tuloksia.
- Vältä aina reagenssien ja tarvikkeiden mikrobi- ja deoksiribonukleasi (DNAasi) -kontaminaatiota. Steriilien DNAasittomien kertakäyttöisten siirtopipettien käyttö on suositeltavaa. Käytä jokaiselle näytteelle uutta pipettiä.
- Vältä kontaminaatio: älä käsittele äläkä irrota NeuMoDx Cartridge -kasettia monistamisen jälkeen. Älä missään tapauksessa ota NeuMoDx Cartridge -kasetteja biovaarallisen jätteen säiliöstä (NeuMoDx 288 Molecular System -järjestelmässä) tai biovaarallisen jätteen astiasta (NeuMoDx 96 Molecular System -järjestelmässä). NeuMoDx Cartridge -kasetti on suunniteltu estämään kontaminaatiota.
- Kun laboratoriossa tehdään PCR-testejä myös avoimella putkella, on varottava, etteivät NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuska, muut testissä tarvittavat tarvikkeet ja reagenssit, suojavaarusteet, kuten käsi- ja laboratoriohanskat, ja NeuMoDx System -järjestelmä kontaminoidu.
- NeuMoDx:n reagensseja ja tarvikkeita käsiteltäessä on käytettävä puhtaita, puuterittomia nitrilikäsineitä. Varo, ettet kosketa NeuMoDx Cartridge -kasetin yläpintaa tai NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskan NeuMoDx Extraction Plate -eristyslevyn foliointipintaa tai NeuMoDx Lysis Buffer 5 -lyysauspuskurisäiliön yläpintaa. Tarvikkeita ja reagensseja käsiteltäessä saa koskea vain sivupintoihin.
- Käyttöturvallisuustiedotteet (Safety Data Sheets, SDS) ovat saatavilla pyynnöstä.
- Pese kädet huolellisesti testin jälkeen.
- Älä pipetoi suun avulla. Älä tupakoi, syö tai juo tiloissa, joissa käsitellään näytteitä tai reagensseja.
- Hävitä käyttämättömät reagenssit ja jäte paikallisten, alueellisten ja kansallisten säädösten mukaisesti.

TUOTTEEN SÄILYTYS, KÄSITTELY JA VAKAUS

- NeuMoDx EBV Quant Test Strips -testiliuskat ovat stabiileja sisäpakkauksessa tuotteen etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti, kun niitä säilytetään 18–23 °C:n lämpötilassa.
- Tarvikkeita ja reagensseja ei saa käyttää viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
- Älä käytä testituotetta, jos sen sisä- tai ulkopakkaus näyttää vahingoittuneelta.
- Älä aseta uudelleen mitään testituotetta, joka on aiemmin asetettu toiseen NeuMoDx System -järjestelmään.
- Kun NeuMoDx EBV Quant Test Strip on asetettu, se voi olla NeuMoDx System -järjestelmän sisällä 14 vuorokautta. Ohjelmisto seuraa järjestelmään asetettujen testiliuskojen jäljellä olevaa käyttöikää ja ilmoittaa sen käyttäjälle reaaliaikaisesti. Järjestelmä kehottaa vaihtamaan testiliuskan, joka on ollut käytössä sallittua pidemmän ajan.
- Vaikka NeuMoDx EBV Calibrator -kalibraattorit ja NeuMoDx EBV External Control -kontrollit eivät ole tartuntavaarallisia, ne pitää hävittää käytön jälkeen laboratorion biovaarallisen jätteen mukana kuten biovaarallinen laboratoriojäte, jotta kohdenukleinihappojen aiheuttamaa kontaminaatorisriskiä voidaan pienentää.

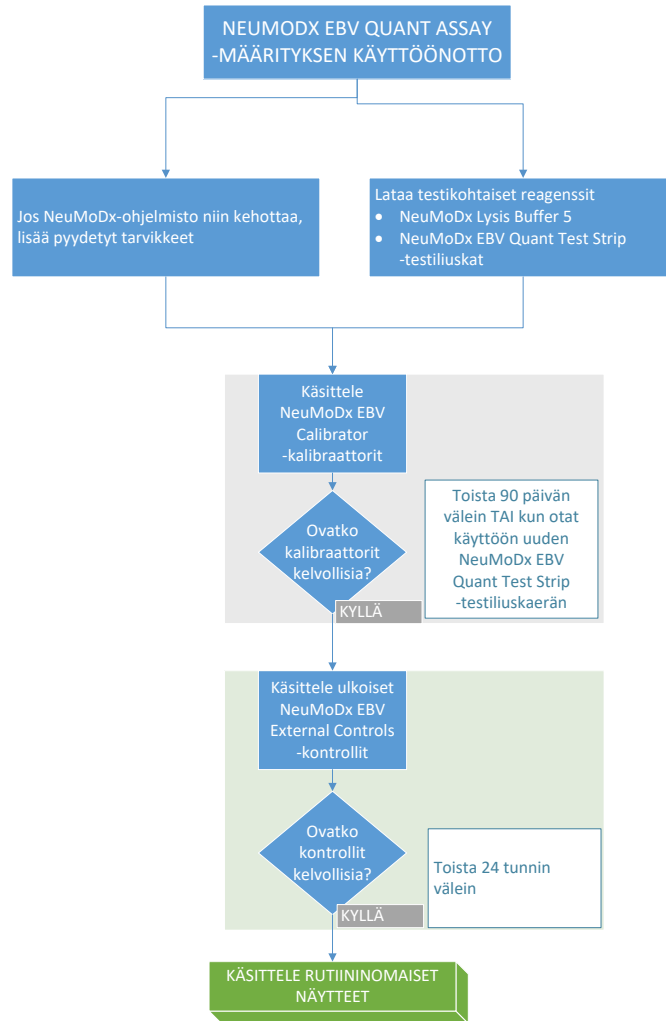
NÄYTEIDEN KERUU, KULJETUS JA SÄILYTYS

Käsittele kaikkia näytteitä kuin ne pystyisivät siirtämään eteenpäin tarttuvaa taudinaiheuttajaa.

- Älä pakasta kokoveria tai ensisijaisissa putkissa olevia näytteitä.
- Plasmanäytteiden valmistelua varten kokoveri on otettava steriileihin putkiin, joissa käytetään EDTA:ta antikoagulanttina. Noudata näytteenotto- ja valmistusohjeita.
- Edellä mainituilla laitteilla otetut kokoverinäytteet voidaan säilyttää ja/tai kuljettaa 24 tunnin ajan 2–25 °C:ssa ennen plasman valmistelua. Plasman valmistelu on tehtävä valmistajan ohjeiden mukaisesti.
- Valmisteltuja plasmanäytteitä voidaan säilyttää NeuMoDx System -järjestelmässä enintään 8 tuntia ennen käsittelyä. Jos tarvitaan pidempi säilytysaika, on suositeltavaa asettaa näytteet joko jääkaappiin tai pakastimeen.
- Valmisteltuja plasmanäytteitä saa säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 7 vuorokautta ennen testausta ja enintään 8 tuntia huoneenlämmössä.
- Valmisteltuja plasmanäytteitä voidaan säilyttää < -20 °C:ssa enintään 8 viikkoa ennen käsittelyä. Plasmanäytteitä ei saa pakastaa/sulattaa enempää kuin kaksi kertaa ennen käyttöä.

- Jos näytteet on pakastettu, niiden on annettava sulaa kokonaan huoneenlämmössä (15–30 °C). Vorteksoi näytteitä, jotta ne jakautuvat tasaisesti.
- Kun pakastetut näytteet on sulatettu, testaus on tehtävä 8 tunnin sisällä.
- Jos näytteitä kuljetetaan, ne on pakattava ja merkittävä sovellettavien maakohtaisten ja/tai kansainvälisten säädösten mukaisesti.
- Merkitse näytteet selvästi ja ilmoita, että näytteet ovat EBV-testaukseen.
- Siirry Testin valmistelut -kohtaan.

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen käyttöönottoprosessin yhteenveto on oheissa *kuvassa 1*.



Kuva 1: NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen käyttöönottotyönkulku

KÄYTTÖOHJEET

Testin valmistelut

1. Kiinnitä näytteen viivakoodietiketti NeuMoDx System -järjestelmän kanssa yhteensopivaan näyteputkeen.
2. Siirrä plasma-alikvootti viivakooditarralla varustettuun NeuMoDx System -järjestelmän kanssa yhteensopivaan näyteputkeen. Vähimmäistäyttömäärät on esitetty alla:
 - Näyteputkeline (32 putken): halkaisija 11–14 mm ja korkeus 60–120 mm; vähimmäistäyttömäärä ≥ 400 ml
 - Näyteputkeline (24 putken): halkaisija 14,5–18 mm ja korkeus 60–120 mm; vähimmäistäyttömäärä ≥ 850 ml

NeuMoDx System -järjestelmän käyttö

Lisätietoja on NeuMoDx 288/96 Molecular System -järjestelmän käyttöoppaassa (os numerot 40600108 ja 40600317)

1. Aseta vähintään yhteen NeuMoDx System -järjestelmän testiliuskatelineeseen NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskoja ja lisää testiliuskatelineet NeuMoDx System -järjestelmään kosketusnäytön avulla.
2. Jos NeuMoDx System -järjestelmän ohjelma pyytää lisäämään tarvikkeita, lisää tarvittavat tarvikkeet NeuMoDx System -järjestelmän tarviketelineisiin ja lisää telineet NeuMoDx System -järjestelmään kosketusnäytön avulla.
3. Jos NeuMoDx System -järjestelmän ohjelman näyttöön tulee sitä koskeva kehote, vaihda NeuMoDx Wash Reagent -pesureagenssi ja NeuMoDx Release Reagent -irrotusreagenssi tai tyhjä esitäytöjätteen tai biovaarallisen jätteen säiliö tarpeen mukaan.
4. Jos NeuMoDx System -järjestelmän ohjelmisto niin kehottaa, käsittele kalibraattorit [REF 800500] ja/tai ulkoiset kontrollit [REF 900501] tarpeen mukaan. Lisätietoa kalibraattoreista ja kontrolleista on *Tulosten käsittely* -osassa.
5. Aseta näyte-/kalibraattori-/kontrolliputket vakiomalliseen 32 putken telineeseen ja varmista, että kaikkien näyteputkien korkit on poistettu.
6. Aseta näyteputkeline automaattilataimen hyllyn avoimeen paikkaan ja lisää teline NeuMoDx System -järjestelmään kosketusnäytön avulla. Tämä käynnistää asetettujen näytteiden pyydyttyjen testien käsittelyn.

RAJOITUKSET

- NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskaa voidaan käyttää vain NeuMoDx System -järjestelmissä.
- NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskan suorituskyky on määritetty kokoverestä valmistettujen, EDTAa antikoagulanttina käyttävien plasmanäytteiden osalta. NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskan käyttöä muiden kliinisten näytetyyppien kanssa ei ole arvioitu, eikä tämän testin suorituskykyominaisuuksia muilla näytetyypeillä tunneta.
- Koska näytteessä olevien virusten määrä vaikuttaa EBV:n tunnistamiseen, näytteiden oikeanlainen kerääminen, käsittely ja säilytys vaikuttavat tulosten luotettavuuteen.
- Kalibraattorit ja ulkoiset kontrollit on käsiteltävä pakkauselosteen ohjeiden ja NeuMoDx System -järjestelmän mahdollisten kehotteiden mukaisesti ennen rutiinomaisten kliinisten näytteiden käsittelyä.
- Näytteiden virheellinen kerääminen, käsittely, säilytys, tekninen virhe tai näyteputkien väärinmerkintä voivat aiheuttaa virheellisiä testituloksia. Vääriä virheellisiä testituloksia voidaan saada myös silloin, kun näytteessä olevien virushiukkasten määrä on NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tunnistusrajan alapuolella.
- NeuMoDx System -järjestelmää saa käyttää ainoastaan NeuMoDx System -järjestelmän käyttökoulutusta saanut henkilöstö.
- Jos sekä EBV-kohde että SPC1-kohde eivät monistu, järjestelmä raportoi epäkelvollisen tuloksen (Indeterminate [Epäselvä] tai Unresolved [Ratkaisematon]) ja testi on toistettava.
- Jos NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tulos on Positive (Positiivinen), mutta kvantifiointiarvo on kvantifiointirajojen ulkopuolella, NeuMoDx System -järjestelmä raportoi, oliko havaittu EBV *alle* kvantifioinnin alarajan (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) vai *ylä* kvantifioinnin ylärajan (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- Mikäli havaittu EBV oli alle LLoQ-ajan, NeuMoDx EBV Quant Assay -määritys voidaan toistaa (tarvittaessa) toisella näytealivootilla.
- Mikäli havaittu EBV oli yli ULoQ-ajan, NeuMoDx EBV Quant Assay -määritys voidaan toistaa laimennetulla alkuperäisellä näytealivootilla. Laimennus EBV-negatiivisella plasmalla tai Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA) -liuoksella suhteessa 1:1 000 on suositeltavaa. Järjestelmä laskee automaattisesti alkuperäisen näytteen pitoisuuden seuraavasti: Alkuperäisen näytteen pitoisuus = log10 (laimennuskerroin) + laimennetun näytteen ilmoitettu pitoisuus, kunhan laimennuskerroin on valittu oikein ohjelmistosta ennen toistamista.
- Ajoittainen PCR-estäjien esiintyminen plasmassa voi aiheuttaa järjestelmässä kvantifiointivirheen. Jos näin käy, on suositeltavaa toistaa testi samalla näytteellä, joka on laimennettu Basematrix-aineella 1:10 tai 1:100.
- Positiivinen tulos ei välttämättä tarkoita, että näytteessä on aktiivinen virusinfektio. Positiivinen tulos kuitenkin viittaa Epstein-Barr-viruksen DNA:n todennäköiseen läsnäoloon.
- Vaikka niiden mahdollisuus on erittäin pieni, NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen kohdealueiden deleetit tai mutaatiot EBV-genomin konservoidulla alueella voivat vaikuttaa tunnistukseen tai johtaa virheelliseen tulokseen käytettäessä NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskaa.
- NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tuloksia tulisi käyttää kliinisten havaintojen ja muiden lääkärin käytettävissä olevien tietojen ohella. Testiä ei ole tarkoitettu infektion diagnosointiin.
- Kontaminoitumisen välttäminen edellyttää hyvän laboratoriokäytännön noudattamista, kuten käsineiden käyttämistä aina potilaiden näytteitä käsiteltäessä.

TULOSTEN KÄSITTELEMINEN

Tuloksia voidaan katsella ja tulostaa NeuMoDx System -järjestelmän kosketusnäytöstä, Results (Tulokset) -ikkunan Results (Tulokset) -välilehdestä.

NeuMoDx System -järjestelmän ohjelma generoi NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tulokset automaattisesti käyttämällä ratkaisualgoritmia ja NeuMoDx EBV -testin määritystiedoston (EBV ADF) sisältämiä käsittelyparametreja. NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tulos voi olla Negative (Negatiivinen), Positive (Positiivinen) ja ilmoitettu EBV-pitoisuus, Positive (Positiivinen) ULoQ-rajaa yläpuolella, Positive (Positiivinen) LLoQ-rajaa alapuolella, Indeterminate (Epäselvä) tai Unresolved (Ratkaisematon) kohteen monistustilan ja näytteen käsittelykontrollin perusteella. Tulokset raportoidaan taulukossa 1 esitetyn ratkaisualgoritmin perusteella.

Taulukko 1: NeuMoDx EBV Quant Assay -testin ratkaisualgoritmi

Tulos	EBV	Näytteen prosessikontrolli (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Positiivinen)	[2 ≤ Ct ≤ 9 JA EPR > 2 AND (JA) EP ≥ 1 500] OR (TAI) [9 ≤ Ct ≤ 38 AND (JA) EP ≥ 1 500]	Ei oleellinen
Positive (Positiivinen), kvantifioinnin ylärajan yläpuolella [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (Log ₁₀ IU/ml)	[CONC] (PIT.) > 8,0 log ₁₀ IU/ml, NO QUANT (EI KVANT)	Ei oleellinen
Positive (Positiivinen), alle kvantifioinnin alarajan [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (Log ₁₀ IU/ml)	[CONC] (PIT-) < 2,3 log ₁₀ IU/ml, NO QUANT (EI KVANT)	Ei oleellinen
Negative (Negatiivinen)	N/A (Ei oleellinen) OR (TAI) [2 ≤ Ct < 9 AND (JA) EPR ≤ 2] OR (TAI) [9 ≤ Ct ≤ 38 AND (JA) EP < 1 500] OR (TAI) Ct > 38	AMPLIFIED (Monistettu) (29 ≤ Ct ≤ 35) and (ja) EP ≥ 2 000
Indeterminate (Epäselvä)	NOT AMPLIFIED / System Errors Noted (Ei monistettu, järjestelmävirhe)	
Unresolved (Ratkaisematon)	NOT AMPLIFIED / No System Errors Noted (Ei monistettu, ei järjestelmävirhettä)	

EP = End Point Fluorescence (Päätepisteen fluoresenssi) (perustasokorjauksen jälkeen); EPR = End Point Fluorescence Ratio (Päätepisteen fluoresenssisuhde); Ct = Cycle threshold (Syklin kynnyksiarvo);

Quant (Kvantitatiivinen) = laskennallinen määrä EBV:tä, ilmoitetaan yksikössä Log₁₀ IU/ml. Katso seuraava Testilaskenta.

Testilaskenta

- NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen kvantifiointialueella olevien näytteiden EBV:n DNA -pitoisuus lasketaan käyttämällä tallennettua standardikäyrää ja kalibrointikerrointa.
 - Myös kalibrointikerroin lasketaan käsiteltyjen NeuMoDx EBV Calibrator -kalibraattoreiden tulosten perusteella, jotta voidaan määrittää standardikäyrän validiteetti kunkin NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskaerän osalta tietyssä NeuMoDx System -järjestelmässä.
 - Kalibrointikerroin sisältyy automaattisesti EBV DNA:n pitoisuuden lopulliseen määritykseen.
- NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tulokset ilmoitetaan arvoina Log₁₀ IU/ml.
- Tuntemattomien näytteiden saatu kvantifointi on jäljitettävissä WHO:n (Maailman terveysjärjestön) 1. kansainväliseen Epstein-Barr-viruksen nukleinihappojen monistustekniikoita koskevaan standardiin.

Testin kalibrointi

Standardikäyrään perustuva validi kalibrointi on tarpeen näytteiden EBV:n DNA:n kvantifioinnissa. Hyväksyttävien tulosten saaminen edellyttää testikalibroinnin tekemistä NeuMoDx Molecular -yhtiötoimittamilla kalibraattoreilla.

Kalibraattorit

- NeuMoDx EBV Calibrator -kalibraattorit toimitetaan sarjana [REF 800500], ja ne sisältävät ei-tarttuvia kapseloituja EBV-kohteita valmisteltuna Basematrixssa.
- EBV-kalibraattorisetti on käsiteltävä kunkin uuden NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskaerän yhteydessä tai jos uusi EBV-testin määritystiedosto ladataan NeuMoDx System -järjestelmään tai jos nykyinen kalibraattorisetti on validiteettiajan (parhaillaan määritetty 90 päivään) ulkopuolella tai jos NeuMoDx System -järjestelmän ohjelmaa on muokattu.
- NeuMoDx System -järjestelmäohjelmisto ilmoittaa käyttäjälle, milloin kalibraattorit on käsiteltävä. Uutta testiliuskaerää ei voi käyttää testaukseen, ennen kuin kalibraattorit on käsitelty onnistuneesti.
- Kalibraation validiteetti määritetään seuraavasti:

- a) Validiteetin määrittäminen edellyttää kahden kalibraattorin – korkean ja matalan – käsittelemistä.
 - b) Hyväksyttävien tulosten generoimista varten ainakin kahden (2) kolmesta (3) replikaatista täytyy tuottaa tuloksia, jotka ovat esimääritettyjen parametrien sisällä. Matalan kalibraattorin nimellinen tavoite on $4 \log_{10}$ IU/ml ja korkean kalibraattorin nimellinen tavoite $6 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Kalibraatiokerroin lasketaan testiliuskaerien välisen variaation ottamiseksi huomioon. Tätä kalibrintikerrointa käytetään lopullisen EBV-pitoisuuden määrittämisessä.
5. Jos toinen tai molemmat kalibraattorit eivät läpäise validiteettitarkistusta, toista hylätyn kalibraattorin käsittely uudella putkella. Mikäli toisen kalibraattorin validiteettia ei pystytä varmistamaan, on mahdollista toistaa vain tämän kalibraattorin testi, koska järjestelmä ei edellytä molempien kalibraattorien ajamista uudelleen.
6. Jos kalibraattorit eivät läpäise validiteettitarkistusta toisellakaan kertaa, ota yhteyttä NeuMoDx Molecular, Inc. -yhtiöön.

Laadunvarmistus

Paikallisissa säädöksissä määritetään yleensä, että laboratorio vastaa sellaisten kontrollimenetelmien käytöstä, joilla valvotaan koko analysointiprosessin virheettömyyttä ja tarkkuutta. Laboratorion on määritettävä myös kontrollimateriaalien testauksen toistoväli, tyyppi ja määrä käyttämällä muuttamattoman, hyväksytyt testijärjestelmän verifioituja suoritustasotietoja.

Ulkoiset kontrollit

1. Ulkoiset kontrollimateriaalit, jotka sisältävät ei-tarttuvaa kapseloitua EBV-kohdetta Basematrixissa positiivisiin kontrolleihin, toimittaa NeuMoDx Molecular, Inc. NeuMoDx EBV External Controls [REF 900501] -sarjassa.
2. Positiiviset ja negatiiviset ulkoiset kontrollit on käsiteltävä 24 tunnin välein. Jos valideja ulkoisia kontrolleja ei ole olemassa, NeuMoDx System -järjestelmäohjelmisto kehottaa käyttäjää käsittelemään nämä kontrollit, ennen kuin näytteistä voidaan raportoida tuloksia.
3. Jos ulkoisia kontrolleja tarvitaan, hae ulkoisten kontrollien sarja pakastimesta ja anna näyteputkien sulaa huoneenlämmössä ($15 - 30$ °C). Vorteksoi varovasti homogeenisuuden varmistamiseksi.
4. Aseta positiivisen ja negatiivisen kontrollin putket NeuMoDx System -järjestelmään kosketusnäytön ja automaattilataimen hyllylle asetetun näyteputkelineen avulla. NeuMoDx System -järjestelmä tunnistaa viivakoodin ja alkaa käsitellä näyteputkia, paitsi jos testissä tarvittavia reagensseja ja tarvikkeita ei ole käytettävissä.
5. NeuMoDx System arvioi ulkoisten kontrollien validiteetin odotetun tuloksen perusteella. Positiivisen kontrollin pitäisi antaa EBV Positive (EBV positiivinen) -tulos ja negatiivisen kontrollin EBV Negative (EBV negatiivinen) -tulos.
6. Ulkoisten kontrollien ristiriitaisia tuloksia on käsiteltävä seuraavasti:
 - a) Jos negatiivisella kontrollinäytteellä on raportissa Positive (Positiivinen) -testitulos, näyte voi olla kontaminoitunut.
 - b) Jos positiivisella kontrollinäytteellä on raportissa Negative (Negatiivinen) -testitulos, reagenssiin tai laitteeseen saattaa liittyä ongelmia.
 - c) Kummassakin tapauksessa validiteettitarkistuksessa hylätyn kontrollin testi on toistettava juuri sulatetuilla NeuMoDx EBV External Controls -kontrollien putkilla.
 - d) Jos NeuMoDx EBV External Control tuottaa jatkuvasti Negative (Negatiivinen) -tuloksen, ota yhteyttä NeuMoDx-yhtiön asiakaspalveluun.
 - e) Jos negatiivinen NeuMoDx EBV External Control tuottaa jatkuvasti Positive (Positiivisen) -tuloksen, yritä poistaa kaikki mahdollisen kontaminaation lähteet ja vaihda KAIKKI reagenssit ja kulutustarvikkeet, ennen kuin otat yhteyttä NeuMoDx-yhtiön asiakaspalveluun.

Näytteen käsittelyn (sisäiset) kontrollit

Eksogeeninen näytteenkäsittelykontrolli (Sample Process Control 1, SPC1) sisältyy NeuMoDx Extraction Plate -eristyslevyyn ja käy läpi koko prosessin nukleiinihappojen eristyksistä reaaliaikaiseen PCR-monistukseen jokaisen näytteen osalta. SPC1-spesifiset alukkeet ja koettimet sisältyvät myös jokaiseen NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskaan, joka mahdollistaa SPC1:n ja kohde-EBV DNA:n (jos sitä on) läsnäolon tunnistuksen moninkertaisen reaaliaikaisen PCR:n avulla. SPC1:n monistuksen tunnistuksen avulla NeuMoDx System -järjestelmä voi valvoa DNA:n eristämisen ja PCR:n monistamisprosessien tehokkuutta.

Jos NeuMoDx System -järjestelmällä tehdystä NeuMoDx EBV Quant Assay -testistä ei saada hyväksyttäviä tuloksia, sen kohdalla lukee raportissa Indeterminate (Epäselvä, IND) tai Unresolved (Ratkaisematon, UNR) virhetyypin mukaan.

Raportissa on tuloksena IND (Epäselvä), jos NeuMoDx System -järjestelmä huomaa näytteen käsittelyn aikana järjestelmävirheen. Jos raportissa on IND (Epäselvä) -tulos, uusintatestausta suositellaan.

UNR (Ratkaisematon) -tulos saadaan, jos kelvollista EBV DNA:n tai SPC1:n monistusta ei havaita, mikä osoittaa mahdollisen reagenssin virheen tai estäjien läsnäolon. Jos raportissa on UNR (Ratkaisematon) -tulos, uusintatestaus voidaan tehdä ensimmäisenä toimenä. Jos uusintatestaus epäonnistuu, laimennetulla näytteellä voidaan lieventää näytteen inhibition vaikutuksia.

SUORITUSKYKYOMINAISSUDET

Analyttinen herkkyys – havaitsemisraja WHO:n standardin perusteella

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen analyttinen herkkyys vahvistettiin testaamalla EBV-negatiivisia plasmanäytteitä, joihin oli lisätty laimennus WHO:n EBV:n nukleiinihappojen monistustekniikkaa koskevan 1. kansainvälisen standardin mukaan. Tämä vahvistustesti tehtiin NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen odotetulla havaitsemisrajalla (Limit of Detection, LoD) NeuMoDx System -järjestelmissä, 200 IU/ml. LoD määritettiin pienimmäksi havaittavaksi kohdetasoksi ≥ 95 %:n tasolla. Tutkimus tehtiin useilla järjestelmillä ja päteillä NeuMoDx-reagenssierillä. Taulukko 2 sisältää havaitsemisasteet.

Taulukko 2: NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen LoD-ajan määritys; plasmanäytteiden positiivinen havaitsemisaste

Tavoitepitoisuus [IU/ml]	PLASMA		
	Hyväksytyjen testien määrä	Positiivisten määrä	Havaitsemisaste
200	120	117	97,5 %
0	60	0	0 %

Analyttinen herkkyys – kvantifioinnin alaraja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

Kvantifioinnin alaraja (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) on määritelmän mukaan matalin kohdetaso, jolla 95 %:n tunnistus saavutetaan JA analyttinen virhe on yhteensä (Total Analytical Error, TAE) on $\leq 1,0$. Jotta voitiin vahvistaa 200 IU/ml EBV Quant Assay -määrityksen LoD- sekä LLoQ-rajaksi, osumisasteen tutkimustuloksia käytettiin TAE:n määrittämisessä. Tämä laskettu TAE oli määritelmän mukaan:

$$TAE = \text{vinouma} + 2 * SD \text{ [Westgard-tilasto]}$$

Vinouma on lasketun ja odotetun pitoisuuden välinen ero absoluuttisena arvona. SD tarkoittaa näytteen kvantifioitun arvon keskihajontaa.

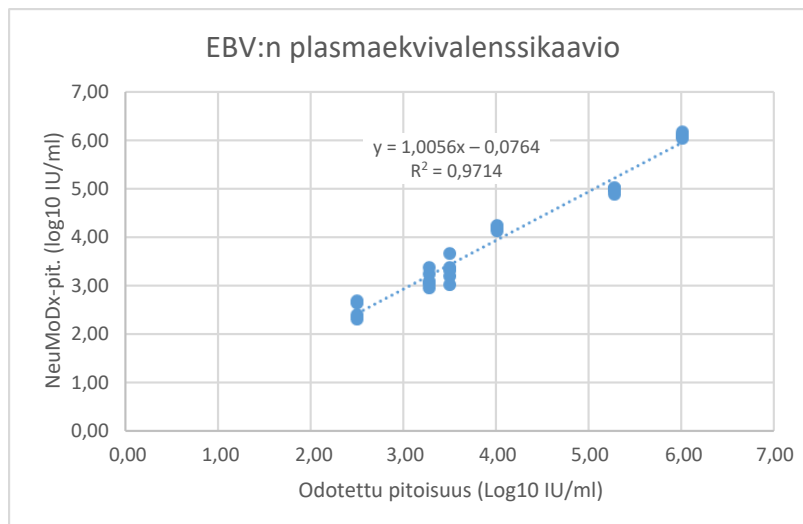
Taulukko 3: NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen LLoQ sekä vinouma ja TAE

Tavoitepit. [IU/ml]	Tavoitepit. [Log_{10} IU/ml]	Plasma				
		Keskimääräinen en pit. [Log_{10} IU/ml]	Havaitsemisen (%)	SD	Vinouma	TAE
200	2,30	2,35	97,5	0,28	0,05	0,61

Näiden tutkimusten tuloksen perusteella NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen LoD ja LLoQ olivat molemmat 200,0 IU/ml [$2,30 \text{ log}_{10}$ IU/ml].

Kvantifioinnin ylärajan (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) lineaarisuus ja määritys

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen lineaarisuus ja kvantifioinnin yläraja (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) määritettiin plasmasta valmistelemalla laimennussarjaa käyttämällä kapseloitua NeuMoDx EBV -kohdettaja Exact EBV Positive Control -kontrollia (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX), jolla oli määritetty jäljitettävyyden WHO:n 1. kansainväliseen EBV-standardiin. 10 osan paneeli valmistettiin yhdistetystä EBV-negatiivisesta plasmasta paneeliksi, joka kattoi pitoisuusalueen 2,0–8,0 Log_{10} IU/ml. NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen ULoQ-rajaksi määritettiin 8,0 log_{10} IU/ml. Standardikäyrän lineaarisuuden arviointiin valmistettiin vahvistuspaneeli, ja EBV-määrityksen pitoisuudet verrattuna NeuMoDx System -järjestelmän ilmoittamiin odotettuihin arvoihin on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2: NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen lineaarisuus

Analyttinen spesifisyys – ristireaktiivisuus

Analyttinen spesifisyys määritettiin seulomalla 35 organismin, joita löytyy veri-/plasmanäytteistä, sekä lajien, jotka ovat fylogeneettisesti EBV:n kaltaisia, ristireaktiiviteetti. Suuren pitoisuuden organismit valmistettiin 5–6 organismin pooleissa. Testatut organismit esitetään *taulukossa 4*. Ristireaktiiviteettia ei havaittu testattujen organismien osalta, mikä vahvisti NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen 100 prosentin analyttisen spesifisyyden.

Taulukko 4: Analyttisen spesifisyyden osoittamiseen käytetyt patogeenit

Ei-kohdeorganismit					
BK-polyoomavirus	Adenovirus, tyyppi 5	Herpes simplex -virus (HSV) 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Sytomegalovirus	Hepatiitti C -virus	Herpes simplex -virus (HSV) 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Ihmisen herpesvirus 6	Parvovirus B19	Varicella-Zoster -virus	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Ihmisen herpesvirus 7	JC-virus	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Ihmisen herpesvirus 8	Ihmisen papilloomavirus 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Hepatiitti B -virus	Ihmisen papilloomavirus 18	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Analyttinen spesifisyys – häiritsevät aineet, kommensaaliset organismit

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksestä arvioitiin interferenssi ei-kohde-organismien esiintyessä näytteessä. Arvioinnissa käytettiin samoja organismiryhmiä kuin ristireaktiiviteetin testauksessa (katso edellä oleva *taulukko 4*). Negatiiviseen EBV-plasmaan lisättiin organismit, jotka oli yhdistetty ryhmiin 4–7. Näihin ryhmiin lisättiin EBV-kohdetta pitoisuutena 3 log₁₀ IU/ml. Merkittäviä häiriöitä ei havaittu näiden organismien läsnäollessa, minkä osoitti minimaalinen kvantifointipikkeama kontrollinäytteistä, joissa häiritseviä aineita ei ollut.

Analyttinen spesifisyys – häiritsevät aineet, endogeeniset ja eksogeeniset aineet

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen suorituskyky arvioitiin sellaisten eksogeenisten ja endogeenisten häiritsevien aineiden läsnäollessa, joita tyypillisesti löytyy kliinisistä EBV-plasmanäytteistä. Nämä sisälsivät epänormaalin suuria pitoisuuksia veren komponentteja sekä yleisiä antivirusta ja immunosuppressiolääkkeitä, jotka on luokiteltu *taulukossa 5*. Kutakin ainetta lisättiin seulottuun EBV-negatiiviseen ihmisen plasmaan, johon oli lisätty 3 Log₁₀ IU/ml EBV:tä, ja näytteiden interferenssi analysoitiin. Lisäksi EBV-infektioon liittyvät yleiset sairaustilat testattiin plasmasta mahdollisten häiriöiden varalta. Kaikkien testattujen aineiden keskimääräinen pitoisuus ja vinouma verrattuna kontrollinäytteisiin, joihin oli lisätty sama taso EBV:tä, on ilmoitettu *taulukossa 6*. Mikään eksogeeninen tai endogeeninen aine ei vaikuttanut NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen spesifisyyteen.

Taulukko 5: Häiriöiden testaus – eksogeeniset aineet (lääkeluokitukset)

Ryhmä	Lääkkeen nimi	Luokitus	Ryhmä	Lääkkeen nimi	Luokitus
Ryhmä 1	Atsatiopriini	Immunosuppressantti	Ryhmä 4	Trimetopriimi	Antibiootti
	Syklosporiini	Immunosuppressantti		Vankomysiini	Antibiootti
	Foskarneetti	Viruslääke (Herpesviridae)		Takrolimuusi	Immunosuppressantti
	Gansikloviiri	Antivirus (EBV)		Everolimuusi	Immunosuppressantti
	Valgansikloviiri-hydrokloridi	Antivirus (EBV)		Klavulanaattikalium	Antibiootti
Ryhmä 2	Prednisoni	Kortikosteroidi/ immunosuppressantti	Ryhmä 5	Famotidiini	Histamiinireseptorin antagonisti
	Sidofoviiri	Antivirus (EBV)		Sulfametoksatsoli	Antibiootti
	Sefotetaani	Laajakirjoinen antibiootti		Valasikloviiri	Viruslääke (Herpesviridae)
	Kefotaksiimi	Laajakirjoinen antibiootti		Letermoviiri	Antivirus (EBV)
	Flukonatsoli	Sienilääke		Tikarsilliini-dinatrium	Antibiootti
Ryhmä 3	Mykofenolaatti-mofetiili	Immunosuppressantti	Leflunomidi	Immunosuppressantti	
	Mykofenolaattinatrium	Immunosuppressantti			
	Piperasilliini	Antibiootti			
	Sirolimuusi/rapamysiini	Immunosuppressantti)			
	Tatsobaktaami	Muunneltu antibiootti			

Taulukko 6: Häiritsevien aineiden testaus – eksogeeniset ja endogeeniset aineet

Endogeeninen	Keskimmääinen pit.	Vinouma
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Hemoglobiini	3,20	0,23
Triglyseridit	3,15	0,28
Bilirubiini	3,48	-0,05
Albumiini	3,2	0,22
Eksogeeniset (lääkkeet)	Keskimmääinen pit.	Vinouma
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Ryhmä 1: Atsatiopriini, siklosporiini, foskarneetti, gansikloviiri, valgansikloviiri-hydrokloridi	3,30	0,13
Ryhmä 2: Prednisoni, sidofoviiri, sefotetaani, sefotaksiimi, flukonatsoli	3,22	0,21
Ryhmä 3: Mykofenolaatti-mofetiili, mykofenolaattinatrium, piperasilliini, sirolimuusi/rapamysiini, tatsobaktaami	3,36	0,07
Ryhmä 4: Trimetopriimi, vankomysiini, takrolimuusi, everolimuusi, kaliumklavulanaatti	3,32	0,11
Ryhmä 5: Famotidiini, sulfametoksatsoli, letermoviiri, valasykloviiri, tikarsilliini-dinatrium, leflunomidi	3,47	-0,10
Sairaustila	Keskimmääinen pit.	Vinouma
	Log ₁₀ IU/ml	Log ₁₀ IU/ml
Systeeminen lupus erythematosus (SLE)	3,23	0,20
Tumavasta-aine (Antinuclear Antibody, ANA)	3,33	0,10
Nivelreuma (RA)	3,19	0,24

Laboratorion tarkkuus

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen tarkkuus määritettiin testaamalla 3 replikaattia 4-osaisesta paneelista, jossa EBV-näytteet oli valmisteltu EBV Positive Control -kontrollilla (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX). Testaus tehtiin kolme (3) kertaa päivässä käyttämällä kahta (2) NeuMoDx 288 System -järjestelmää ja yhtä (1) NeuMoDx 96 System -järjestelmää kahden päivän aikana. Ajon, päivän ja järjestelmän sisäiset tarkkuudet luokiteltiin ja keskihajonta yhteensä oli $\leq 0,33 \text{ Log}_{10} \text{ IU/ml}$. Erinomainen tarkkuus pystyttiin osoittamaan eri järjestelmissä, eri päivinä ja eri ajoissa taulukon 7 tietojen mukaisesti. Käyttäjien välistä tarkkuutta ei luokiteltu, koska käyttäjällä ei ole merkittävää roolia näytteiden käsittelemisessä NeuMoDx System -järjestelmällä.

Taulukko 7: Tarkkuus laboratorion sisällä – NeuMoDx EBV Quant Assay -määritys NeuMoDx System -järjestelmällä

EBV-tavoitepit. [Log ₁₀ IU/ml]	Keskimääräinen EBV-pit. [Log ₁₀ IU/ml]	SD järjestelmän sisällä	SD päivän sisällä	SD ajon sisällä	Yhteensä (laboratorion sisällä)
5,2	5,30	0,27	0,25	0,25	0,27
4,2	4,25	0,21	0,21	0,12	0,21
3,2	3,38	0,22	0,20	0,20	0,22
2,7	3,03	0,30	0,30	0,30	0,33

Erienvälinen uusittavuus

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen erienvälinen uusittavuus määritettiin arvioimalla kolme tärkeintä reagenssierää – NeuMoDx EBV Quant Test Strip -testiliuskat ja Lysis Buffer 5 -puskuri – osana kvaalifiointitestausta (Qualification Testing, QT). Neliosaista EBV-positiivisen plasman paneelia käytettiin suorituskyvyn arvioimisessa (Taulukko 8). Variaatio erien sisällä ja välillä analysoitiin, ja tulokset on esitetty taulukoissa 8–9. Suurin vinouma yhteensä oli 0,03 log₁₀ IU/ml ja suurin SD yhteensä oli 0,20 log₁₀ IU/ml NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strip -testiliuskojen osalta. Suurin vinouma yhteensä oli 0,12 log₁₀ IU/ml ja suurin SD yhteensä oli 0,41 log₁₀ IU/ml NeuMoDx Lysis Buffer 5 -puskurin osalta. Samanveroinen suorituskyky osoitettiin erien välillä, sillä kaikkien paneelin osien kvantifiointi oli toleranssimääritysten sisällä.

Taulukko 8: Erienvälinen toistettavuus – NeuMoDx EBV Quant Assay -määritys, Test Strip -testiliuska

EBV-tavoitepit. [IU/ml]	Keskimääräinen EBV-pit. [Log ₁₀ IU/ml]	N (hyväksyttäviä tuloksia per erä)	Vinouma	SD erien välillä	SD erän sisällä	SD yhteensä
5,0	4,98	18	0,02	0,06	0,08	0,10
4,0	3,98	18	0,02	0,08	0,09	0,12
3,0	3,02	18	0,02	0,06	0,10	0,12
2,0	2,03	18	0,03	0,05	0,20	0,20

Taulukko 9: Erienvälinen toistettavuus – NeuMoDx EBV Quant Assay -määritys, Lysis Buffer 5 -puskuri

EBV-tavoitepit. [Log ₁₀ IU/ml]	Keskimääräinen EBV-pit. [Log ₁₀ IU/ml]	N (hyväksyttäviä tuloksia per erä)	Vinouma	SD erien välillä	SD erän sisällä	SD yhteensä
5,0	4,97	5	0,03	0,05	0,03	0,06
4,0	3,96	5	0,04	0,22	0,10	0,24
3,0	3,03	5	0,03	0,09	0,11	0,15
2,0	2,12	5	0,12	0,39	0,13	0,41

Näytteen prosessikontrollin tehokkuus

Näytteen prosessikontrolli (Sample Process Control 1, SPC1) on sisällytetty NeuMoDx EBV Quant Assay -määritykseen, jotta voidaan ilmoittaa määrityksen suorituskyvyn vaikuttavista prosessivaiheen virheistä tai estymisestä. SPC1:n tehokkuutta plasmanäytteisiin testattiin käyttämällä NeuMoDx CMV Quant Assay -määritystä mallina olosuhteissa, jotka vastasivat prosessin kriittisten vaiheiden epäonnistumisia, joita voi tapahtua näytteenkäsittelyn aikana ja joita NeuMoDx System -järjestelmän toimintaa valvovat anturit *eivät välttämättä havaitse*. Sytomegaloviruspositiiviset (pitoisuudella 3 Log₁₀ IU/ml) ja negatiiviset näytteet testattiin seuraavissa olosuhteissa: estäjän läsnäolo, ei pesuliuksen käyttöä eikä pesun ulospuhallusta. Prosessin epätehokkuuksia, joilla oli haitallinen vaikutus viruskohteen havaitsemiseen/kvantifiointiin, heijasti SPC1-kohteen suorituskyky, kuten taulukossa 10 on esitetty. Kaikissa testatuissa tapauksissa osoitettiin, että joko näytteen prosessikontrolli tarkkaili prosessin epätehokkuuksia ja estäjien läsnäoloa riittävästi tai odotetulla prosessin epätehokkuudella ei ole merkittävää haittavaikutusta SPC1:n havaitsemiseen eikä viruskohteen havaitsemiseen ja kvantifiointiin. Siksi SPC1 osoittautui onnistuneesti seuraavan määrityksen toimintaa NeuMoDx System -järjestelmässä.

Taulukko 10: Näytteen prosessikontrollin tehokkuus plasman sisältämän viruksen DNA:n osalta*

Prosessin vaiheen testattu virhe	Näytteen prosessikontrollin 1 monistustila	CMV-kohteen monistustila	Määrittystulos
Presence of Inhibitor (Estäjän läsnäolo)	Not Amplified (Ei monistettu)	Not Amplified (Ei monistettu)	Unresolved (Ratkaisematon)
No Wash Delivered (Pesua ei tehty)	Not Amplified (Ei monistettu)	Not Amplified (Ei monistettu)	Unresolved (Ratkaisematon)
No Wash Blowout (Ei pesun tyhjennystä)	Amplified (Monistettu)	Amplified (Monistettu)	Positive with Quantitation within 0,3 log ₁₀ IU/ml of Control (Positiivinen ja kontrollin kvantifiointi arvon 0,3 log ₁₀ IU/ml:n sisällä)

*Plasmanäytteisiin lisättyä sytomegalovirusta (Cytomegalovirus, CMV) käytettiin mallijärjestelmänä näytteen prosessikontrollin tehokkuuden arvioimisessa.

Ristikontaminaatio

Plasmanäytteiden ristikutaminaatioaste määritettiin käsittelemällä vaihtelevia erittäin positiivisia ja negatiivisia näytteitä samankaltaisesta veressä olevasta DNA-viruksesta, sytomegaloviruksesta (Cytomegalovirus, CMV). Kolme tällaista shakkiruututestijoukkoa tehtiin, ja nämä sisälsivät 108 replikaattia CMV-negatiivista plasmata ja 108 replikaattia CMV-lisättyä plasmata pitoisuudella 6,0 Log₁₀ IU/ml. Negatiivisen näytteen kaikki 108 replikaattia raportoitiin negatiivisiksi, mikä osoittaa, että ristikutaminaatiota ei tapahtunut NeuMoDx System -järjestelmässä plasmanäytteen käsittelyn aikana.

Näytematriisin ekvivalenssi

Testauksella osoitettiin tuoreiden ja pakastettujen plasmanäytteiden ekvivalenssi käyttämällä samankaltaista veressä olevaa virusta, CMV:tä, mallina. Tuoreita näytteitä säilytettiin 4 °C:ssa, kunnes niihin lisättiin kolme CMV-tasoa, ja niiden ekvivalenssi testattiin. Seuraavaksi näytteet pakastettiin vähintään 24 tunniksi -20 °C:ssa. Tämän pakastevarastointijakson jälkeen näytteet sulatettiin ja testattiin uudelleen. Tuoreiden ja pakastettujen näytteiden tulosten vastaavuutta verrattiin regressioanalyysillä. Tiedot osoittivat erinomaista ekvivalenssia tuoreiden ja pakastettujen plasmanäytteiden osalta kulmakertoimella 1,0 ja erittäin heikolla vinoumalla (leikkauspiste), kuten *taulukko 11* jäljempänä osoittaa.

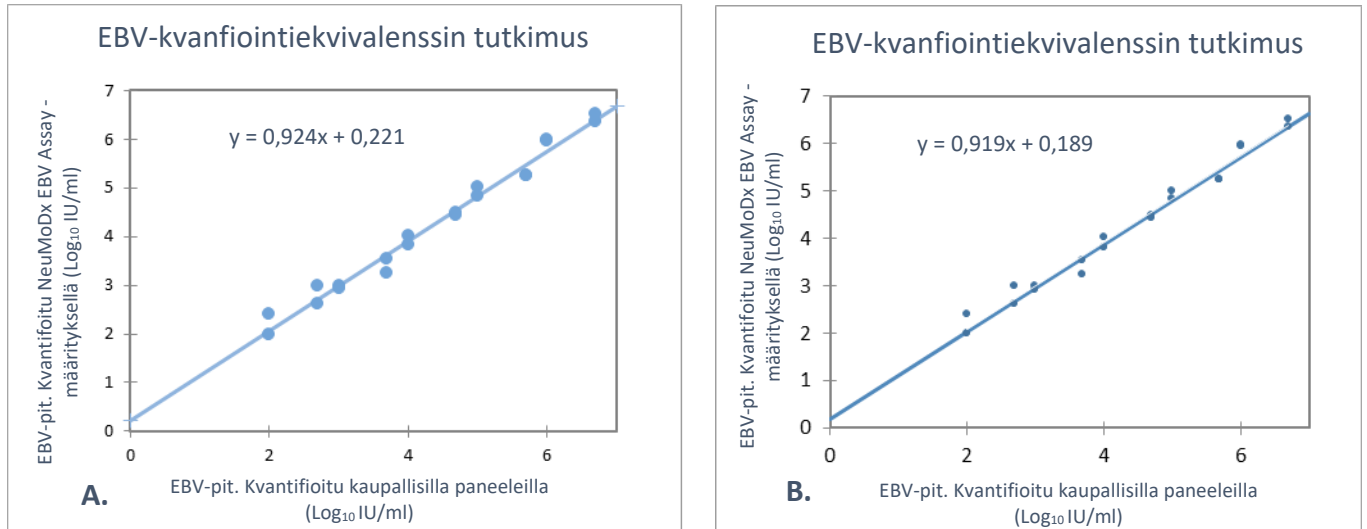
Taulukko 11: Näytematriisin ekvivalenssi

Parametrivaatimus	Tuore vs. pakastettu EDTA
Kulmakerroin [0,9–1,1]	1,000
Leikkauspiste < 0,5 Log ₁₀ IU/ml	0,020
<i>p</i> -arvo > 0,05	0,631

Kvantifiointisuorituskyvyn luokittelu

NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen kvantifiointisuorituskyky luokiteltiin käsittelemällä kaksi kaupallista EBV-verifiointipaneelia AcroMatrixiltä ja Exact Diagnosticsilta (jäljitettävissä WHO:n 1. kansainväliseen EBV-standardiin) NeuMoDx Molecular System -järjestelmillä.

Erinomainen korrelaatio saatiin NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen ja kahden kaupallisen EBV-verifiointipaneelin (*kuva 3*) välillä, kun analyysi tehtiin joko Demingin regressiolla (*kuva 3A*) tai Passing-Bablokin menetelmällä (*kuva 3B*).



Kuva 3. Ekvivalenssikaavio AcroMetrixin ja Exact Diagnosticsin verifiointipaneelien ja NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksen välillä. **A.** Lineaarinen regressioanalyysi Demingin menetelmällä. **B.** Lineaarinen regressioanalyysi Passing-Bablokin menetelmällä.

Deming-regressiosovituksen laatu on esitetty kulmakertoimella 0,92 ja leikkauspisteellä (vinouma) 0,22, mikä osoittaa, että NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksellä ja EBV-verifiointipaneeleilla saadut pitoisuustulokset ovat erittäin korreloivia ja hyväksyttävän vinouman sisällä. Myös Passing-Bablokin lineaarinen sovitus tukee korrelaation merkittävyyttä NeuMoDx EBV Quant Assay -määrityksestä ja EBV-verifiointipaneeleista saatujen tulosten välillä kulmakertoimen ollessa 0,92 ja leikkauspisteen (vinouman) 0,19. Passing-Bablok-analyysin *p*-arvoksi laskettiin 0,40.

Taulukko 12: Demingin ja Passing-Bablokin lineaarisen regressioanalyysin yhteenveto

Deming-analyysi		Passing-Bablok-analyysi	
Leikkaus	Kulmakerroin	Leikkaus	Kulmakerroin
0,22	0,92	0,19	0,92
95 %:n CI (-0,11; 0,55)	95 %:n CI (0,86; 0,99)	95 %:n CI (-0,08;0,41)	95 %:n CI (0,87; 0,99)

LÄHDEVIITTEET

1. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
2. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. Transplant Direct. 2016 Jan; 2(1): e48.
3. Evidence based clinical practice guideline for management of EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) in solid organ transplant. Cincinnati Children’s Hospital Medical Center. 2011- June, revised Jan, 2012.
<https://www.guidelinecentral.com/summaries/evidence-based-clinical-practice-guideline-for-management-of-ebv-associated-post-transplant-lymphoproliferative-disease-ptld-in-solid-organ-transplant/>
4. Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients. American Journal of Transplantation 2009; 9 (Suppl 4): S87–S96. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02898.x
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

TAVARAMERKIT















NeuMoDx[™] on NeuMoDx Molecular, Inc:n tavaramerkki.

NeuDry[™] on NeuMoDx Molecular, Inc:n tavaramerkki.

TaqMan[®] on Roche Molecular Systems, Inc:n rekisteröity tavaramerkki.

Kaikki muut tuotenimet, tavaramerkit ja rekisteröidyt tavaramerkit, joita mahdollisesti tässä asiakirjassa mainitaan, ovat omien omistajiensa omaisuutta.

SYMBOLIT

SYMBOLI	MERKITYS
R only	Vain lääkärin määräyksestä
	Valmistaja
	<i>In vitro</i> -diagnostinen lääkinällinen laite
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä
	Luettelonumero
	Eräkoodi
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Lämpötilarajoitus
	Ilmankosteuden rajoitus
	Ei saa käyttää uudelleen
	Sisältö riittää <n> testiin
	Lue käyttöohjeet
	Huomio
	Biologiset vaarat
	CE-merkki



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

Toimeksiantaja (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



Tekninen tuki / haittatapahtumaraportointi: support@qiagen.com

Patentti: www.neumodx.com/patents