

REF 201500 NeuMoDx™ EBV 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 SystemPer 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 EBV Quant Assay è un test automatizzato *in vitro* di amplificazione degli acidi nucleici al fine di quantificare il DNA del virus umano di Epstein-Barr (EBV) nel plasma. Il NeuMoDx EBV Quant Assay implementato sul NeuMoDx 288 Molecular System e sul NeuMoDx 96 Molecular System (sistemi NeuMoDx System) comprende l'estrazione automatizzata del DNA per isolare l'acido nucleico target dal plasma e la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) real-time, prendendo come target due regioni altamente conservate nel genoma del virus di Epstein-Barr.

Il NeuMoDx EBV Quant Assay è destinato al rilevamento e alla quantificazione *in vitro* del DNA del virus di Epstein-Barr in campioni di plasma umano freschi e congelati tramite i sistemi NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular System. Il NeuMoDx EBV Assay è destinato all'uso nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni EBV. L'esame può essere usato per misurare i livelli di DNA dell'EBV per valutare la risposta al trattamento antivirale. Questo esame è destinato all'uso in abbinamento alla presentazione clinica e agli altri indicatori di laboratorio sul progresso della malattia, per la gestione clinica e il monitoraggio dell'infezione da EBV. L'esame non deve essere usato come test di screening per la presenza di EBV nel sangue o nei suoi derivati.

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Il sangue umano intero raccolto nelle apposite provette sterili contenenti EDTA come agente anticoagulante può essere usato per la preparazione del plasma. Per dare inizio al test, il plasma, all'interno di una provetta per campioni compatibile con il NeuMoDx System, viene posizionato in un apposito portaprovette e caricato sul piano di lavoro del NeuMoDx System. Per ciascun campione, viene miscelata un'aliquota di 250 µl di campione di plasma con il tampone di lisi NeuMoDx Lysis Buffer 5 e il NeuMoDx System esegue automaticamente tutti i passaggi necessari per estrarre l'acido nucleico target, preparare il DNA isolato per l'amplificazione mediante PCR real-time e, se presenti, amplificare e rilevare i prodotti di amplificazione (due regioni altamente conservate nel genoma EBV). Il NeuMoDx EBV Quant Assay include un Controllo di elaborazione dei campioni del DNA (Sample Process Control, SPC1) per aiutare a monitorare la presenza di sostanze potenzialmente inibitorie e gli eventuali errori relativi al NeuMoDx System o ai reagenti, che si possono verificare durante il processo di estrazione e di amplificazione.

L'EBV è un comune virus a DNA a doppio filamento della famiglia dell'herpesvirus umano, che infetta persone di tutte le età. Si stima che oltre il 90% degli individui di tutto il mondo sono o sono stati infettati con l'EBV.¹ L'EBV si diffonde tramite fluidi corporei come la saliva, il sangue e lo sperma e tramite trapianti di organi. Molte persone contraggono l'infezione da EBV durante l'infanzia. Di solito durante l'infezione da EBV questi individui non presentano sintomi. Le persone immunodepresse possono sviluppare sintomi e complicanze più gravi a causa dell'infezione da EBV. L'infezione da EBV latente rappresenta il rischio maggiore per i pazienti dopo un trapianto. Le malattie linfoproliferative post-trapianto (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder, PLTD) comprendono la formazione di tumori dovuti all'EBV nelle cellule B a causa dell'effetto degli agenti immunosoppressori sul controllo immunitario dell'EBV, una delle cause più rilevanti di morbilità e mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto di organi di qualunque tipo.²

L'utilizzo del monitoraggio del carico virale di EBV agevola la diagnosi e il monitoraggio delle PLTD associate a EBV. Tuttavia il rilevamento dell'acido nucleico dell'EBV nel sangue non è sufficiente per la diagnosi di una PLTD associata ad EBV. Il test dell'acido nucleico (Nucleic Acid Testing, NAT) dev'essere usato solo in abbinamento alla presentazione clinica e agli altri indicatori di laboratorio sul progresso della malattia, per la gestione clinica e il monitoraggio dei pazienti infettati da EBV. Mentre le linee guida attuali per la gestione e il trattamento delle infezioni da EBV nei soggetti immunodepressi sono ambigue in termini di *quando* cominciare la terapia antivirale, tutte prevedono il monitoraggio costante del carico virale dopo l'inizio della terapia antivirale, per contribuire a mitigare i gravi effetti collaterali dei farmaci in tali soggetti.^{3,4}

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il NeuMoDx EBV Quant Assay sul NeuMoDx System utilizza la NeuMoDx EBV Quant Test Strip, i NeuMoDx EBV Calibrator, i NeuMoDx EBV External Control, il NeuMoDx Lysis Buffer 5 e i reagenti NeuMoDx di uso generale per eseguire l'analisi. Il NeuMoDx EBV 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 per la preparazione del plasma. Il campione di plasma in una provetta per campioni compatibile con il NeuMoDx System viene posizionato in un apposito portaprovette e caricato sul piano di lavoro del NeuMoDx System per l'elaborazione. Non sono necessari ulteriori interventi da parte dell'operatore.

I NeuMoDx System utilizzano una combinazione di calore, enzima litico e reagenti di estrazione per eseguire automaticamente la lisi cellulare, l'estrazione del DNA e l'eliminazione degli inibitori. Gli acidi nucleici rilasciati vengono catturati da microsferi paramagnetiche. Le particelle, con gli acidi nucleici legati, sono caricate nella NeuMoDx Cartridge dove i componenti non legati e diversi dal DNA vengono ulteriormente rimossi con NeuMoDx Wash Reagent e il DNA legato viene eluito utilizzando NeuMoDx Release Reagent. I NeuMoDx System utilizzano quindi il DNA eluito per reidratare i reagenti di amplificazione di proprietà esclusiva NeuDry™ contenenti tutti gli elementi necessari per l'amplificazione PCR dei target specifici di EBV e per l'SPC1. Alla ricostituzione dei reagenti PCR NeuDry, il NeuMoDx System eroga la miscela pronta per la PCR presente nella NeuMoDx Cartridge. L'amplificazione e il rilevamento del controllo e delle sequenze di DNA target (se presenti) si svolgono nella camera PCR della NeuMoDx Cartridge. La NeuMoDx Cartridge è studiata anche per contenere l'amplicone dopo la PCR real-time ed eliminare fondamentalmente il rischio di contaminazione post-amplificazione.

Il NeuMoDx EBV Quant Assay prende come target due regioni altamente conservate, BALF5 e BXFL1, nel genoma EBV. Il design a doppio target riduce il rischio di falsi negativi in caso di mutazione, aumentando così l'efficacia dell'esame. I target amplificati vengono rilevati in tempo reale utilizzando la chimica delle sonde a idrolisi (comunemente nota come chimica TaqMan®) che si avvale di molecole di sonde oligonucleotidiche fluorogeniche specifiche per gli ampliconi per i 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, di conseguenza la molecola quencher estingue la fluorescenza emessa dal fluoroforo tramite il trasferimento di energia per risonanza descritto da Theodor 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 causa la perdita di prossimità con il quencher, superando quindi l'effetto di smorzamento dovuto al FRET e consentendo il rilevamento della fluorescenza del fluoroforo. Il segnale fluorescente risultante rilevato è direttamente proporzionale al fluoroforo rilasciato e può essere correlato alla quantità di DNA target presente.

Una sonda TaqMan etichettata con un fluoroforo (490/521 nm) all'estremità 5' e un quencher scuro all'estremità 3' vengono utilizzati per rilevare il DNA dell'EBV. Per il rilevamento dell'SPC1, la sonda TaqMan viene etichettata con un colorante fluorescente alternativo (535/556 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 (POSITIVE (POSITIVO)/NEGATIVE (NEGATIVO)/INDETERMINATE (INDETERMINATO)/UNRESOLVED (IRRISOLTO)). Se il risultato è POSITIVE (POSITIVO), il software del NeuMoDx System fornisce anche un valore quantitativo associato al campione oppure indica se la concentrazione calcolata è al di fuori dei limiti della quantificazione.

REAGENTI/MATERIALI DI CONSUMO

Materiali in dotazione

REF	Contenuto	Test per unità	Test per confezione
201500	NeuMoDx EBV Quant Test Strip <i>I reagenti PCR essiccati contenenti sonda e primer TaqMan specifici per EBV e SPC1.</i>	16	96

Altri 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>
800500	NeuMoDx EBV Calibrator <i>Set monouso di calibratori EBV alto e basso per stabilire la validità della curva di standard</i>
900501	NeuMoDx EBV External Control <i>Set monouso di controlli EBV positivi e negativi per stabilire la validità giornaliera di NeuMoDx EBV Quant Assay</i>
400900	NeuMoDx Lysis Buffer 5
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

- Il NeuMoDx EBV Quant Assay è per uso diagnostico *in vitro* solo con i NeuMoDx System.
- I campioni devono essere trattati sempre come se fossero infettivi e in conformità di procedure di laboratorio sicure, come quelle descritte in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁵ e nel Documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).⁶
- Un risultato positivo è indicativo della presenza del DNA dell'EBV.
- Le prestazioni del NeuMoDx EBV Quant Assay sono limitate all'uso da parte di personale formato sull'uso del NeuMoDx System e nella gestione dei materiali infetti.

- 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, occorre avere a disposizione una calibrazione di test valida (generata elaborando il calibratore alto e il calibratore basso dai NeuMoDx EBV Calibrator [RIF 800500]).
- È necessario elaborare i NeuMoDx EBV External Control [RIF 900501] ogni 24 ore per tutta la fase di test con il NeuMoDx EBV Quant Assay.
- Il volume minimo del campione dell'aliquota secondaria dipende dalle dimensioni della provetta/dal portaprovette per campioni come definiti 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 sempre la contaminazione microbica e da desossiribonucleasi (DNasi) di tutti i reagenti e i materiali di consumo. 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 EBV 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 cartuccia NeuMoDx Cartridge, la superficie del sigillo della striscia reattiva NeuMoDx EBV Quant Test Strip o della piastra di estrazione NeuMoDx Extraction Plate o la superficie superiore del contenitore del tampone di lisi NeuMoDx Lysis Buffer 5; la manipolazione dei materiali di consumo e dei reagenti deve essere effettuata toccando solo le superfici laterali.
- Le schede di sicurezza sono disponibili su richiesta.
- 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.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto in conformità alle normative nazionali, federali, provinciali, regionali e locali.

STOCCAGGIO, MANIPOLAZIONE E STABILITÀ DEL PRODOTTO

- Le NeuMoDx EBV 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 18 e 23 °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 EBV Quant Test Strip può restare a bordo del NeuMoDx System per 14 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.
- Sebbene non infettivi, dopo l'uso i NeuMoDx EBV Calibrator e i NeuMoDx EBV External Control devono essere smaltiti con i materiali di scarto a rischio biologico del laboratorio per ridurre il rischio di contaminazione da parte dell'acido nucleico target contenuto.

PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Trattare tutti i campioni come potenziali mezzi di trasmissione di agenti infettivi.

- Non congelare sangue intero né altri campioni conservati in provette primarie.
- Per preparare i campioni di plasma, è necessario raccogliere il sangue intero in provette sterili utilizzando EDTA come anticoagulante. Seguire le istruzioni fornite dal produttore delle provette per il prelievo dei campioni.
- Il sangue intero raccolto nei dispositivi sopra elencati può essere conservato e/o trasportato per un massimo di 24 ore a una temperatura compresa fra 2 e 25 °C prima della preparazione del plasma. La preparazione del plasma deve essere eseguita attenendosi alle istruzioni del produttore.
- I campioni di plasma preparati possono restare sul NeuMoDx System per un massimo di 8 ore prima dell'elaborazione. Se è necessario un tempo di conservazione maggiore, si raccomanda di mettere i campioni in frigorifero o di congelarli.
- I campioni di plasma preparato 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 a temperatura ambiente.
- I campioni preparati di plasma possono essere conservati a < -20 °C per un massimo di 8 settimane prima dell'elaborazione; i campioni di plasma non devono essere sottoposti a più di 2 cicli di congelamento/scongelo prima dell'uso.
 - Se i campioni vengono congelati, farli scongelare completamente a temperatura ambiente (15 – 30 °C); agitare con movimenti rotatori per ottenere un campione distribuito uniformemente.
 - Una volta scongelati i campioni congelati, l'analisi deve essere eseguita entro 8 ore.

- Se i campioni vengono spediti, devono essere imballati ed etichettati in conformità alle normative locali e/o internazionali applicabili.
- Etichettare i campioni in modo chiaro e indicare che i campioni sono per analisi dell'EBV.
- Procedere con la sezione Preparazione del test.

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

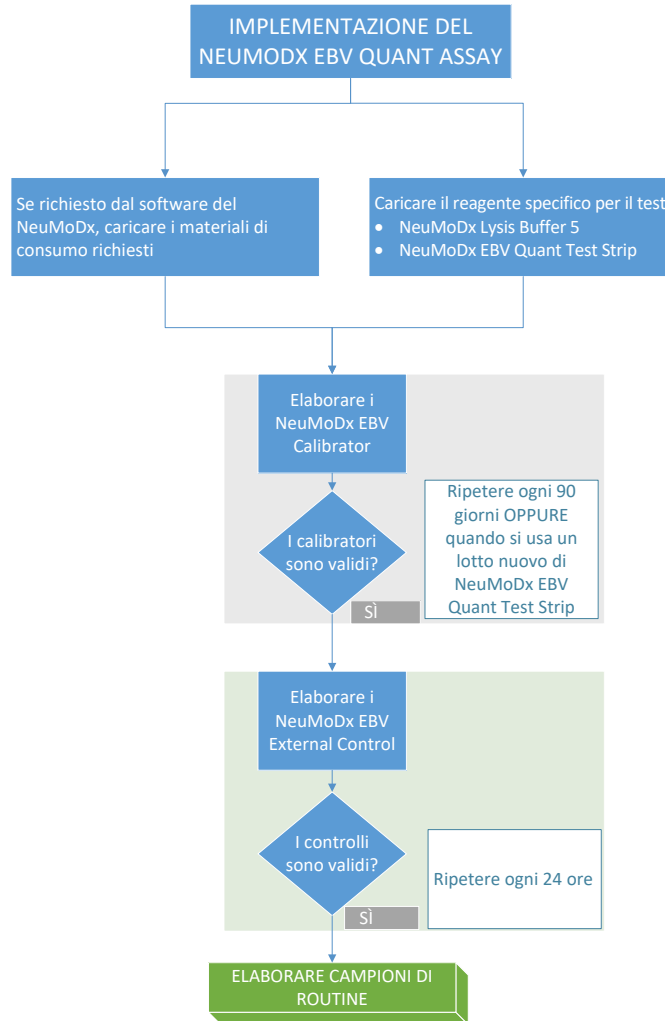


Figura 1: Flusso di lavoro di implementazione del NeuMoDx EBV Quant Assay

ISTRUZIONI PER L'USO

Preparazione del test

1. Applicare l'etichetta con codice a barre del campione su una provetta per campioni compatibile con NeuMoDx System.
2. Trasferire un'aliquota del plasma nella provetta per campioni con codice a barre compatibile con il NeuMoDx System secondo i volumi definiti di seguito:
 - Portaprovette per campioni (32 provette): 11 – 14 mm di diametro e 60 – 120 mm di altezza; volume di riempimento minimo = 400 mL
 - Portaprovette per campioni (24 provette): 14,5 – 18 mm di diametro e 60 – 120 mm di altezza; volume di riempimento minimo = 850 mL

Funzionamento del 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. Inserire le NeuMoDx EBV Quant Test Strip in uno o più supporti per strisce reattive NeuMoDx System e usare il touchscreen per caricare tali supporti nel NeuMoDx System.
2. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, aggiungere i materiali di consumo richiesti nei relativi supporti del NeuMoDx System e utilizzare il touchscreen per caricare i supporti nel NeuMoDx System.
3. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, sostituire NeuMoDx Wash Reagent e NeuMoDx Release Reagent e svuotare il contenitore dei rifiuti di adescamento o il recipiente dei materiali di scarto a rischio biologico, a seconda dei casi.
4. Se richiesto dal software del NeuMoDx System, elaborare i Calibrator [RIF 800500] e/o gli External Control [RIF 900501]. È possibile trovare ulteriori informazioni sui calibratori e sui controlli nella sezione *Elaborazione dei risultati*.
5. Caricare la provetta o le provette per campioni/calibratori/controlli in un portaprovette standard da 32 provette e assicurarsi che da tutte le provette siano stati rimossi i tappi.
6. Posizionare il portaprovette per campioni in qualunque posizione aperta sul ripiano del caricatore automatico e utilizzare il touchscreen per caricare il portaprovette nel NeuMoDx System. In questo modo si avvierà l'elaborazione dei campioni caricati per il/i test identificato/i.

LIMITAZIONI

- La NeuMoDx EBV Quant Test Strip può essere utilizzata solo sui NeuMoDx System.
- Le prestazioni della NeuMoDx EBV Quant Test Strip sono state stabilite per campioni di plasma preparati da sangue intero prelevato con EDTA come anticoagulante. L'uso della striscia NeuMoDx EBV Quant Test Strip con altri tipi di campioni clinici non è stato valutato e le caratteristiche prestazionali del test non sono note per altri tipi di campioni.
- Poiché il rilevamento dell'EBV dipende dal numero di virus presenti nel campione, l'affidabilità dei risultati dipende dal fatto che i campioni vengano prelevati, trattati e conservati correttamente.
- I calibratori e i controlli esterni 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.
- Eventuali risultati errati potrebbero essere dovuti al fatto di non aver eseguito correttamente il prelievo, il trattamento o la conservazione, a errori tecnici o a scambi di 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 EBV Quant Assay.
- Il NeuMoDx System è destinato a essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato all'uso del sistema.
- Se non si amplificano sia il target EBV che il target SPC1, si otterrà un risultato non valido (Indeterminate (Indeterminato) o Unresolved (Irrisolto)) e si dovrà ripetere il test.
- Se il risultato del NeuMoDx EBV Quant Assay è Positive (Positivo), ma il valore di quantificazione è oltre i limiti di quantificazione, il NeuMoDx System indicherà se l'EBV 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).
- Nel caso in cui l'EBV rilevato fosse al di sotto del limite di quantificazione inferiore, è possibile ripetere il NeuMoDx EBV Quant Assay (se si desidera) con un'altra aliquota del campione.
- Nel caso in cui l'EBV rilevato fosse al di sopra del limite di quantificazione superiore, è possibile ripetere il NeuMoDx EBV Quant Assay con un'aliquota diluita del campione originale. Si consiglia una diluizione di 1:100 o 1:1000 nel plasma EBV-negativo o Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare, Milford, MA). Il sistema calcolerà automaticamente la concentrazione del campione originale come segue:
concentrazione del campione originale = \log_{10} (fattore di diluizione) + concentrazione segnalata del campione diluito, purché il fattore di diluizione sia stato selezionato correttamente nel software prima della ripetizione.
- L'occasional presenza di inibitori della PCR nel plasma può causare un errore di quantificazione del sistema; in tal caso si consiglia di ripetere il test con lo stesso campione diluito in Basematrix a 1:10 o 1:100.
- Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di un'infezione virale attiva. Piuttosto, un risultato positivo è indice di possibile presenza di DNA del virus di Epstein-Barr.
- Anche se le possibilità sono estremamente basse, cancellazioni o mutazioni in entrambe le regioni conservate del genoma EBV prese come target dal NeuMoDx EBV Quant Assay possono influenzare il rilevamento o potrebbero portare a un risultato errato quando si utilizza la NeuMoDx EBV Quant Test Strip.
- I risultati del NeuMoDx EBV Quant Assay dovranno essere impiegati in aggiunta alle osservazioni cliniche e alle altre informazioni a disposizione del medico; il test non è destinato a diagnosticare l'infezione.
- 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 EBV Quant Assay vengono generati automaticamente dal software del NeuMoDx System utilizzando l'algoritmo decisionale e i parametri di elaborazione dei risultati sono specificati nel file di definizione esame NeuMoDx EBV (EBV Assay Definition File, EBV ADF). Il risultato del NeuMoDx EBV Quant Assay può essere: Negative (Negativo), Positive (Positivo) con indicazione di una concentrazione di EBV, Positive (Positivo) al di sopra del limite di quantificazione superiore, Positive (Positivo) al di sotto del limite di quantificazione inferiore, Indeterminate (Indeterminato) o Unresolved (Irrisolto), a seconda dello stato di amplificazione del controllo target e del controllo di elaborazione dei campioni. I risultati sono riportati nella *Tabella 1* in base all'algoritmo decisionale.

Tabella 1: Algoritmo decisionale del NeuMoDx EBV Quant Assay

Result (Risultato)	EBV	Controllo elaborazione campioni (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Positivo)	$[2 \leq Ct \leq 9 \text{ AND (ED) } EPR > 2 \text{ AND (ED) } EP \geq 1500]$ OR (OPPURE) $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND (ED) } EP \geq 1500]$	N/A
Positive (Positivo), al di sopra del limite di quantificazione superiore [Upper Limit of Quantitation, ULoQ] (\log_{10} IU/mL)	[CONC] > 8,0 \log_{10} IU/mL, NO QUANT	N/A
Positive (Positivo), al di sotto del limite di quantificazione inferiore [Lower Limit of Quantitation, LLoQ] (\log_{10} IU/mL)	[CONC] < 2,3 \log_{10} IU/mL, NO QUANT	N/A
Negative (Negativo)	N/A OR (OPPURE) $[2 \leq Ct < 9 \text{ AND (ED) } EPR \leq 2]$ OR (OPPURE) $[9 \leq Ct \leq 38 \text{ AND (ED) } EP < 1500]$ OR (OPPURE) Ct > 38	AMPLIFIED (AMPLIFICATO) ($29 \leq Ct \leq 35$) and (e) EP ≥ 2000
Indeterminate (Indeterminato)	NOT AMPLIFIED / System Errors Noted (NON AMPLIFICATO / Notati errori di sistema)	
Unresolved (Irrisolto)	NOT AMPLIFIED / No System Errors Noted (NON AMPLIFICATO / Nessun errore di sistema)	

EP = End Point Fluorescence (fluorescenza dell'endpoint) (dopo la correzione della linea basale); EPR = End Point Fluorescence Ratio (rapporto fluorescenza dell'endpoint); Ct = Cycling Threshold (soglia del ciclo);
Quant = quantità calcolata di EBV presente espressa in \log_{10} IU/mL. Vedi sotto Calcolo del test.

Calcolo del test

1. Per i campioni che rientrano nel range di quantificazione del NeuMoDx EBV Quant Assay, la concentrazione di DNA dell'EBV presente nei campioni viene calcolata tramite la curva standard memorizzata in combinazione con il coefficiente di calibrazione.
 - a. In base ai risultati dei NeuMoDx EBV Calibrator elaborati per stabilire la validità della curva standard, si calcola anche un "coefficiente di calibrazione" per ogni lotto di NeuMoDx EBV Quant Test Strip, su uno specifico NeuMoDx System.
 - b. Il coefficiente di calibrazione viene inserito automaticamente dal sistema nella determinazione finale della concentrazione di DNA dell'EBV.
2. I risultati del NeuMoDx EBV Quant Assay sono espressi in \log_{10} IU/mL.
3. La quantificazione risultante dei campioni non noti è tracciabile secondo il 1° Standard Internazionale della OMS per il virus di Epstein-Barr per quanto riguarda le tecniche di amplificazione dell'acido nucleico.

Calibrazione del test

Per quantificare il DNA dell'EBV 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 forniti da NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibratori

1. I NeuMoDx EBV Calibrator sono forniti in kit [RIF 800500] e contengono target di EBV incapsulato non infettivo preparato in Basematrix.
2. Occorre elaborare un set di calibratori EBV con ogni nuovo lotto di NeuMoDx EBV Quant Test Strip, quando si carica un nuovo file di definizione esame EBV nel NeuMoDx System, oppure quando il set attuale di calibratori ha superato il periodo di validità (impostato a 90 giorni), o quando viene modificato il software del NeuMoDx System.
3. Il software del NeuMoDx System notificherà all'utente quando i calibratori devono essere elaborati; non è possibile usare un nuovo lotto di strisce reattive per l'analisi finché i calibratori non sono stati elaborati correttamente.

4. La validità della calibrazione viene stabilita come segue:
 - a) Per stabilire la validità occorre elaborare un set di due calibratori (alto e basso).
 - b) Per ottenere risultati validi, almeno 2 replicati su 3 devono dare risultati che rientrino nei parametri predefiniti. Il target nominale del calibratore basso è di $4 \log_{10}$ IU/mL e il target nominale del calibratore alto è di $6 \log_{10}$ IU/mL.
 - c) Viene calcolato un coefficiente di calibrazione in modo da giustificare la variazione attesa fra i lotti di strisce reattive; tale coefficiente di calibrazione viene utilizzato nella determinazione della concentrazione finale di EBV.
5. 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 non superi il controllo di validità uno solo dei due calibratori, è possibile ripetere l'elaborazione solo di quel calibratore, dato che il sistema non richiede all'utente di elaborare nuovamente entrambi i calibratori.
6. Se il/i calibratore/i non supera/superano il controllo di validità due volte consecutive, 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. I materiali dei controlli esterni, che contengono il virus EBV target non infettivo incapsulato in Basematrix per i controlli positivi, sono forniti da NeuMoDx Molecular, Inc. in un kit contenente i NeuMoDx EBV External Control [RIF 900501].
2. I controlli esterni positivi e negativi devono essere elaborati una volta ogni 24 ore. 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.
3. Se sono richiesti i controlli esterni, estrarre un set di controlli esterni dal congelatore e far scongelare le fiale a temperatura ambiente (15-30 °C). Miscelare con vortex per garantire l'omogeneità.
4. Utilizzando il touchscreen e un portaprovette per campioni posizionato sul ripiano del caricatore automatico, caricare le fiale del controllo positivo e del controllo negativo nel NeuMoDx System. Il NeuMoDx System riconoscerà il codice a barre e inizierà l'elaborazione delle provette per campioni, a meno che i reagenti o i materiali di consumo adeguati necessari per i test siano non disponibili.
5. 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'EBV e il controllo negativo deve fornire un risultato Negative (Negativo) all'EBV.
6. 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 ciascuno degli esempi di cui sopra, ripetere i NeuMoDx EBV External Control(s) falliti con una fiala appena scongelata del controllo o dei controlli che non hanno superato il test di validità.
 - d) Se il NeuMoDx EBV External Control positivo continua a dare un risultato Negative (Negativo), contattare l'assistenza clienti NeuMoDx.
 - e) Se il NeuMoDx EBV External Control negativo continua a dare un risultato Positive (Positivo), cercare di eliminare tutte le fonti di potenziale contaminazione, anche sostituendo TUTTI i reagenti e i materiali di consumo, prima di contattare l'assistenza clienti 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 EBV Quant Test Strip sono inclusi anche primer e sonda specifici per SPC1, consentendo il rilevamento della presenza dell'SPC1 insieme al DNA dell'EBV target (se presente) tramite PCR multiplex real-time. 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.

Se un NeuMoDx EBV Quant Assay eseguito sul NeuMoDx System non è in grado di produrre un risultato valido, sarà riportato come Indeterminate (IND, Indeterminato) o Unresolved (UNR, Irrisolto) 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.

Il risultato sarà UNR quando non viene rilevata alcuna amplificazione valida del DNA dell'EBV o dell'SPC1, cosa che indica 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.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica – Limite di rilevazione con lo Standard OMS

La sensibilità analitica del NeuMoDx EBV Quant Assay è stata confermata testando campioni di plasma EBV-negativo arricchiti con una diluizione bassa del 1° Standard Internazionale della OMS per l'EBV per quanto riguarda le tecniche di amplificazione dell'acido nucleico. Tale test di conferma è stato eseguito al limite di rilevazione (Limit of Detection, LoD) del NeuMoDx EBV Quant Assay atteso sui sistemi NeuMoDx System a 200 IU/mL. Il LoD è stato definito come il livello target più basso da rilevare a una percentuale di $\geq 95\%$. Lo studio è stato realizzato su vari sistemi con lotti qualificati di reagenti NeuMoDx. I tassi di rilevazione sono illustrati nella *Tabella 2*.

Tabella 2: Determinazione del LoD del NeuMoDx EBV Quant Assay; tasso di rilevamento positivo per campioni di plasma

Concentrazione target [IU/mL]	PLASMA		
	Numero di test validi	Numero di positivi	Tasso di rilevazione
200	120	117	97,5%
0	60	0	0%

Sensibilità analitica – Limite di quantificazione inferiore (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

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 errore analitico totale (Total Analytical Error, TAE) $\leq 1,0$. Al fine di confermare il valore di 200 IU/mL sia come LoD che come LLoQ per l'EBV Quant Assay, sono stati usati i risultati dello studio del tasso di successo per determinare il TAE. Il TAE così calcolato è stato 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.

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

Conc. target [IU/mL]	Conc. target [\log_{10} IU/mL]	Plasma				
		Conc. media [\log_{10} IU/mL]	Rilevazione (%)	DS	Deviazione	TAE
200	2,30	2,35	97,5	0,28	0,05	0,61

In base ai risultati di questi studi, è stato determinato che il LoD e il LLoQ del NeuMoDx EBV Quant Assay sono entrambi a 200,0 IU/mL [$2,30 \log_{10}$ IU/mL].

Linearità e determinazione del limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

La linearità e il limite di quantificazione superiore (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) del NeuMoDx EBV Quant Assay sono stati stabiliti nel plasma preparando una serie di diluizioni tramite l'EBV target incapsulato NeuMoDx e l'Exact EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, Texas) con tracciabilità stabilita secondo il 1° Standard Internazionale della OMS per l'EBV. È stato preparato un pannello di 10 componenti in pool di plasma EBV-negativo per creare un pannello che coprisse un range di concentrazione di $2,0-8,0 \log_{10}$ IU/mL. È stato determinato che l'ULoQ del NeuMoDx EBV Quant Assay era pari a $8,0 \log_{10}$ IU/mL. È stato preparato un pannello di conferma per valutare la linearità della curva standard; le concentrazioni dell'esame dell'EBV riportate dal NeuMoDx System rispetto ai valori attesi sono illustrate nella *Figura 2*.

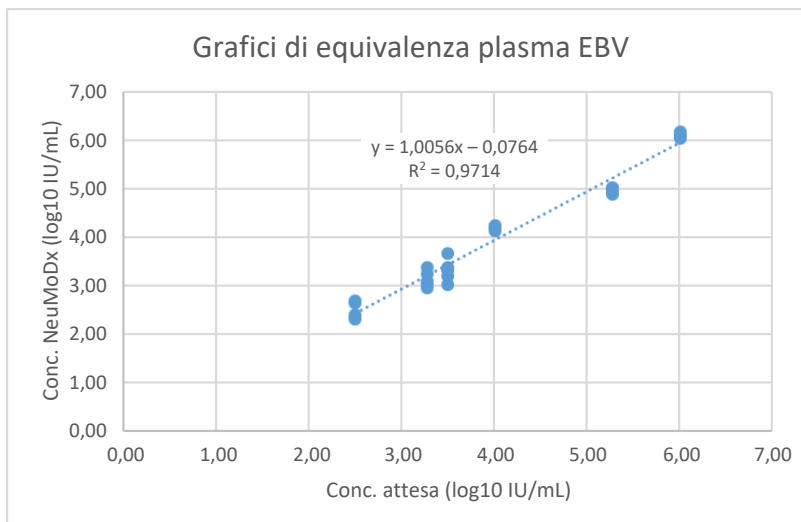


Figura 2: Linearità del NeuMoDx EBV Quant Assay

Specificità analitica – Reattività crociata

La specificità analitica è stata dimostrata sottoponendo a screening 35 organismi che si possono trovare in campioni di sangue/plasma, nonché in specie fitogeneticamente simili all'EBV per reattività crociata. Gli organismi ad alta concentrazione sono stati preparati in pool di 5-6 organismi. Gli organismi analizzati sono mostrati nella *Tabella 4*. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con nessuno degli organismi analizzati, confermando la specificità analitica del 100% del NeuMoDx EBV Quant Assay.

Tabella 4: Patogeni utilizzati per dimostrare la specificità analitica

Organismi non target					
Polyomavirus BK	Adenovirus tipo 5	Virus dell'herpes simplex tipo 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Citomegalovirus	Virus dell'epatite C	Virus dell'herpes simplex tipo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Virus dell'herpes umano tipo 6	Parvovirus B19	Virus varicella-zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Virus dell'herpes umano tipo 7	Virus JC	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Virus dell'herpes umano tipo 8	Papillomavirus umano 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus dell'epatite B	Papillomavirus umano 18	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Specificità analitica – Sostanze interferenti, organismi commensali

Il NeuMoDx EBV Quant Assay è stato valutato per verificare l'interferenza nella presenza di organismi non target tramite gli stessi pool di organismi preparati per testare la reattività crociata elencati sopra nella *Tabella 4*. Il plasma EBV-negativo è stato arricchito con gli organismi raccolti in gruppi di 4-7; questi gruppi sono stati quindi arricchiti con EBV target a una concentrazione di $3 \log_{10}$ IU/mL. Non sono state osservate interferenze significative in presenza di questi organismi, come indicato dalla deviazione minima della quantificazione dai campioni di controllo che non contenevano alcun agente interferente.

Specificità analitica – Sostanze interferenti, sostanze endogene ed esogene

Il NeuMoDx EBV Quant Assay è stato valutato in presenza di sostanze interferenti esogene ed endogene tipiche, trovate in campioni clinici di plasma con EBV. Questi includevano livelli insolitamente alti di componenti del sangue, nonché comuni farmaci antivirali e immunosoppressori, che sono stati classificati nella *Tabella 5*. Ciascuna sostanza è stata aggiunta al plasma umano EBV-negativo sottoposto a screening, arricchito con $3 \log_{10}$ IU/mL EBV, e i campioni sono stati analizzati per valutare l'interferenza. Inoltre, è stato testato anche il plasma proveniente da stati patologici comunemente associati all'infezione da EBV per valutare la potenziale interferenza. La concentrazione e la deviazione medie di tutte le sostanze testate in confronto ai campioni di controllo arricchiti con lo stesso livello di EBV sono illustrate nella *Tabella 6*. Nessuna delle sostanze esogene ed endogene ha avuto ripercussioni sulla specificità del NeuMoDx EBV Quant Assay.

Tabella 5: Test di interferenza – Agenti esogeni (classificazioni dei farmaci)

Pool	Nome farmaco	Classificazione	Pool	Nome farmaco	Classificazione
Pool 1	Azatioprina	Immunosoppressore	Pool 4	Trimetoprim	Antibiotico
	Ciclosporina	Immunosoppressore		Vancomicina	Antibiotico
	Foscarnet	Antivirale (Herpesviridae)		Tacrolimus	Immunosoppressore
	Ganciclovir	Antivirale (EBV)		Everolimus	Immunosoppressore
	Valganciclovir cloridrato	Antivirale (EBV)		Clavulanato di potassio	Antibiotico
Pool 2	Prednisone	Corticosteroide/ Immunosoppressore	Pool 5	Famotidina	Antagonista dei ricettori dell'istamina
	Cidofovir	Antivirale (EBV)		Sulfametossazolo	Antibiotico
	Cefotetan	Antibiotico (ad ampio spettro)		Valaciclovir	Antivirale (Herpesviridae)
	Cefotaxima	Antibiotico (ad ampio spettro)		Letermovir	Antivirale (EBV)
	Fluconazolo	Antifungino		Ticarcillina disodica	Antibiotico
Pool 3	Micofenolato mofetile	Immunosoppressore	Leflunomide	Immunosoppressore	
	Micofenolato sodico	Immunosoppressore			
	Piperacillina	Antibiotico			
	Sirolimus/Rapamicina	Immunosoppressore			
	Tazobactam	Antibiotico modificato			

Tabella 6: Test di interferenza – Agenti esogeni ed endogeni

Endogena	Conc. media	Deviazione
	log ₁₀ IU/mL	log ₁₀ IU/mL
Emoglobina	3,20	0,23
Trigliceridi	3,15	0,28
Bilirubina	3,48	-0,05
Albumina	3,2	0,22
Esogeno (farmaci)	Conc. media	Deviazione
	log ₁₀ IU/mL	log ₁₀ IU/mL
Pool 1: Azatioprina, Ciclosporina, Foscarnet, Ganciclovir, Valganciclovir cloridrato	3,30	0,13
Pool 2: Prednisone, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxima, Fluconazolo	3,22	0,21
Pool 3: Micofenolato mofetile, Micofenolato sodico, Piperacillina, Sirolimus/Rapamicina, Tazobactam	3,36	0,07
Pool 4: Trimetoprim, Vancomicina, Tacrolimus, Everolimus, Clavulanato di potassio	3,32	0,11
Pool 5: Famotidina, Sulfametossazolo, Letermovir, Valaciclovir, Ticarcillina disodica, Leflunomide	3,47	-0,10
Stato della malattia	Conc. media	Deviazione
	log ₁₀ IU/mL	log ₁₀ IU/mL
Lupus eritematoso sistemico (LES)	3,23	0,20
Anticorpo anti-nucleo (Antinuclear Antibody, ANA)	3,33	0,10
Artrite reumatoide (AR)	3,19	0,24

Precisione intra-laboratorio

La precisione del NeuMoDx EBV Quant Assay è stata determinata testando 3 replicati di un pannello di 4 componenti di campioni di EBV preparati con EBV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, Texas) tre volte al giorno, utilizzando due sistemi NeuMoDx 288 System e un sistema NeuMoDx 96 System nell'arco di due giorni. Sono state caratterizzate le precisioni intra-sessione, intra-giornata e intra-sistema ed è stata determinata la deviazione complessiva standard come $\leq 0,33 \log_{10}$ IU/mL. È stata dimostrata una precisione eccellente in sistemi, giorni e processi, come illustrato nella *Tabella 7*. 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.

Tabella 7: Precisione intra-laboratorio – NeuMoDx EBV Quant Assay su NeuMoDx System

Conc. EBV target [log ₁₀ IU/mL]	Conc. EBV media [log ₁₀ IU/mL]	DS intra- sistema	DS intra- giornata	DS intra- sessione	DS complessiva (intra- laboratorio)
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

Riproducibilità lotto a lotto

La riproducibilità lotto a lotto del NeuMoDx EBV Quant Assay è stata determinata valutando tre lotti di reagenti principali – NeuMoDx EBV Quant Test Strip e Lysis Buffer 5 – come parte del test di qualificazione (Qualification Testing, QT). Per valutare le prestazioni è stato usato un pannello di 4 componenti di plasma EBV-positivo (*Tabella 8*). È stata analizzata la variazione all'interno dei lotti e fra i lotti e i risultati sono presentati nelle *Table 8-9*. La massima deviazione complessiva era di $0,03 \log_{10}$ IU/mL e la massima DS complessiva era di $0,20 \log_{10}$ IU/mL per le NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strip. La massima deviazione complessiva era di $0,12 \log_{10}$ IU/mL e la massima DS complessiva era di $0,41 \log_{10}$ IU/mL per il NeuMoDx Lysis Buffer 5. Sono state dimostrate prestazioni equivalenti fra i lotti, poiché la quantificazione di tutti i componenti del pannello rientrava della specifica di tolleranza.

Tabella 8: Riproducibilità lotto a lotto – NeuMoDx EBV Quant Assay, Test Strip

Conc. EBV target [IU/mL]	Conc. EBV media [log ₁₀ IU/mL]	N (Risultati validi per lotto)	Deviazione	DS fra lotti	DS intra- lotto	DS complessiva
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

Tabella 9: Riproducibilità lotto a lotto – NeuMoDx EBV Quant Assay, Lysis Buffer 5

Conc. EBV target [log ₁₀ IU/mL]	Conc. EBV media [log ₁₀ IU/mL]	N (Risultati validi per lotto)	Deviazione	DS fra lotti	DS intra- lotto	DS complessiva
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

Efficacia del Controllo di elaborazione dei campioni

Il Controllo di elaborazione dei campioni (Sample Process Control, SPC1) è incluso nel NeuMoDx EBV Quant Assay per segnalare errori o inibizioni nelle fasi di processo che si ripercuotono sulle prestazioni dell'esame. Utilizzando il NeuMoDx CMV Quant Assay come modello, è stata testata l'efficacia dell'SPC1 per i campioni di plasma in condizioni rappresentative di errori critici delle fasi di elaborazione, che si potrebbero verificare durante l'elaborazione dei campioni e che *potrebbero non essere rilevati* dai sensori di monitoraggio delle prestazioni del NeuMoDx System. Campioni positivi al citomegalovirus (a $3 \log_{10}$ IU/mL) e campioni negativi sono stati messi alla prova nelle seguenti condizioni: presenza di inibitore, nessuna soluzione di lavaggio fornita e nessun blow-out di lavaggio. Le lacune di elaborazione che hanno prodotto un effetto avverso sulla rilevazione/quantificazione del target virale sono state rispecchiate dalle prestazioni dell'SPC1 target, come da *Tabella 10*. In tutti gli esempi testati è stato dimostrato che: il controllo di elaborazione dei campioni monitorava adeguatamente le lacune di elaborazione e la presenza di inibitori, oppure la lacuna di elaborazione prevista non produceva un effetto avverso significativo sulla rilevazione dell'SPC1 o sulla rilevazione e quantificazione del target virale. Perciò l'SPC1 si è dimostrato efficace nel monitoraggio delle prestazioni dell'esame sul NeuMoDx System.

Tabella 10: Efficacia del Controllo di elaborazione dei campioni per il DNA virale nel plasma*

Errore della fase di processo testata	Stato di amplificazione del Controllo di elaborazione dei campioni 1	Stato di amplificazione del CMV Target	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 0,3 log ₁₀ IU/mL del controllo

*Come sistema modello per la valutazione dell'efficacia del controllo di elaborazione dei campioni è stato usato citomegalovirus (CMV) in campioni di plasma.

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata per i campioni di plasma è stato determinato elaborando campioni alternati altamente positivi e altamente negativi di un virus del DNA a trasmissione ematica simile, il citomegalovirus (CMV). Sono stati eseguiti tre set di tale test a scacchiera, con un totale di 108 replicati di plasma CMV-negativo e 108 replicati di plasma arricchito con CMV a 6,0 log₁₀ IU/mL. Tutti e 108 i replicati del campione negativo sono stati indicati come negativi, dimostrando che non si è verificata contaminazione crociata durante l'elaborazione del campione di plasma sul NeuMoDx System.

Equivalenza delle matrici di campioni

I test sono stati eseguiti per dimostrare l'equivalenza fra campioni di plasma freschi e congelati, utilizzando come modello un virus a trasmissione ematica simile, il CMV. I campioni freschi sono stati conservati a 4 °C finché non sono stati arricchiti con tre livelli di CMV e testati per valutare l'equivalenza. Successivamente i campioni sono stati congelati per un minimo di 24 ore a -20 °C. Dopo questo periodo di conservazione in condizioni di congelamento, i campioni sono stati scongelati e nuovamente analizzati. Sono stati confrontati i risultati dei campioni di plasma freschi rispetto a quelli congelati, per valutare l'equivalenza tramite l'analisi della regressione. I dati hanno dimostrato un'equivalenza eccellente fra campioni di plasma freschi e congelati, con una pendenza a 1,0 e una deviazione (intercettazione) estremamente bassa, come da *Tabella 11* sottostante.

Tabella 11: Equivalenza delle matrici di campioni

Requisito parametro	EDTA fresco e congelato
Pendenza [0,9-1,1]	1,000
Intercettazione < 0,5 log ₁₀ IU/mL	0,020
valore- <i>p</i> > 0,05	0,631

Caratterizzazione prestazioni quantificazione

Le prestazioni quantitative del NeuMoDx EBV Quant Assay sono state caratterizzate elaborando due pannelli di verifica EBV commerciali prodotti da AcroMetrix e da Exact Diagnostics (tracciabili secondo il 1° Standard Internazionale della OMS per l'EBV) sui sistemi NeuMoDx Molecular System.

È stata ottenuta una correlazione eccellente fra il NeuMoDx EBV Quant Assay e i due pannelli di verifica EBV commerciali (*Figura 3*) quando analizzati sia con il metodo di regressione di Deming (*Figura 3A*), sia con il metodo di Passing-Bablok (*Figura 3B*).

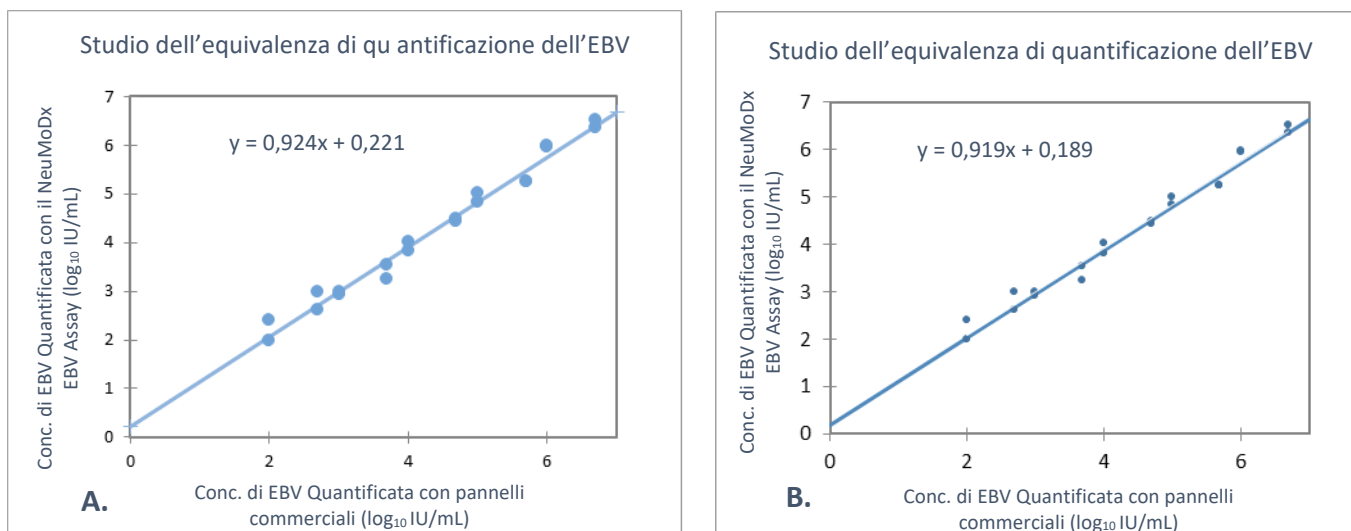


Figura 3. Grafico di equivalenza fra i pannelli di verifica AcroMetrix ed Exact Diagnostics e il NeuMoDx EBV Quant Assay. A. Analisi della regressione lineare con il metodo Deming. B. Analisi della regressione lineare con il metodo Passing-Bablok.

La qualità del modello di regressione di Deming è illustrata da un coefficiente di pendenza complessivo di 0,92 e da un'intercettazione (deviazione) di 0,22, dimostrando che i risultati di concentrazione ottenuti fra il NeuMoDx EBV Quant Assay e i pannelli di verifica EBV sono correlati a una deviazione accettabile. Anche il modello lineare di Passing-Bablok supporta la rilevanza della correlazione fra i risultati ottenuti dal NeuMoDx EBV Quant Assay e dai pannelli di verifica EBV, con un coefficiente di pendenza complessivo di 0,92 e un'intercettazione (deviazione) di 0,19. Il valore-*p* calcolato dell'analisi di Passing-Bablok è pari a 0,40.

Tabella 12: Riepilogo dell'analisi di regressione lineare con metodo di Deming e di Passing-Bablok

Analisi di Deming		Analisi di Passing-Bablok	
Intercetta	Coefficiente di pendenza	Intercetta	Coefficiente di pendenza
0,22	0,92	0,19	0,92
IC 95% (-0,11/0,55)	IC 95% (0,86/0,99)	IC 95% (-0,08/0,41)	IC 95% (0,87/0,99)

BIBLIOGRAFIA

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.

MARCHI COMMERCIALI


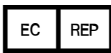








NeuMoDx[™] è un marchio commerciale di NeuMoDx Molecular, Inc.

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.

SIMBOLI

SIMBOLO	SIGNIFICATO
Rx only	Solo su prescrizione medica
	Produttore
IVD	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
REF	Numero di catalogo
LOT	Codice lotto
	Data di scadenza
	Limite di temperatura
	Limiti di umidità
	Non riutilizzare
	Contenuto sufficiente per $<n>$ test
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Rischio biologico
CE	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



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

Brevetto: www.neumodx.com/patents