



Testovací proužek NeuMoDx™ HCV Quant Test Strip 300300

R only

UPOZORNĚNÍ: Pouze pro export do USA



Pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System



Chcete-li vložit aktualizace, přejděte na internetové stránky: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 288 Molecular System, výr. č. 40600108.

Podrobné pokyny naleznete v návodu k obsluze soustavy NeuMoDx 96 Molecular System, výr. č. 40600317.

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Analýza The NeuMoDx HCV Quant Assay je automatizovaný, amplifikační *in vitro* test nukleové kyseliny pro stanovitelnost RNA viru hepatitidy C (hepatitis C virus, HCV) ve vzorcích krevní plazmy a séra na HCV pozitivní protilátky genotypů 1 až 6 u jedinců infikovaných virem HCV. Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay realizovaná na molekulárních soustavách NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System (soustava/soustavy NeuMoDx System) zahrnuje automatizovanou extrakci RNA pro izolaci cílové nukleové kyseliny ze vzorku a využívá polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí v reálném čase (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) k zacílení na vysoce konzervované sekvence ve virovém genomu hepatitidy C.

Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay je určena k použití jako pomůcka při léčbě pacientů s HCV infekcí. Výsledky analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay je nutné interpretovat v kontextu veškerých relevantních klinických a laboratorních nálezů. Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay není určena k použití jako screeningový test krve nebo krevních produktů nebo k diagnostice klinického stavu HCV infekce.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Plnou lidskou krev odebranou do sterilních zkumavek pro odběr krve, které obsahují buď kyselinu ethylendiamintetraoctovou (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA), nebo kyselinu-citrát-dextrózu (Acid Citrate Dextrose, ACD) jako antikoagulační činidla, případně odebranou do zkumavek pro přípravu plazmy (Plasma Preparation Tubes, PPT) lze použít pro přípravu plazmy, zatímco sérum by mělo být odebráno do zkumavek pro sérum nebo do zkumavek pro separaci séra (Serum Separation Tubes, SST). Při přípravě na testování se do soustavy NeuMoDx System vloží pomocí stojanu na zkumavky se vzorkem plazma nebo sérum v sekundární zkumavce se vzorkem nebo frakcionovaná krev v primární zkumavce se vzorkem, které jsou kompatibilní se soustavou NeuMoDx System. U každého vzorku se poměrné množství vzorku plazmy/séra smíchá s lyzačním puftrem NeuMoDx Lysis Buffer 3 a soustava NeuMoDx System automaticky provede všechny kroky nezbytné k získání cílové nukleové kyseliny, přípravě izolované RNA pro amplifikaci pomocí real-time RT-PCR a, pokud jsou přítomny, k množení a detekci produktů amplifikace. Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay se zaměřuje na dvě vysoce konzervované oblasti genomu HCV, aby byla zvýšena odolnost analýzy. Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay rovněž obsahuje kontrolu zpracování vzorků RNA (Sample Process Control, SPC2), která pomáhá sledovat přítomnost možných inhibičních látek a také selhání soustavy NeuMoDx System nebo reagentie, ke kterému může dojít během extrakce a amplifikace.

HCV je jednořetězcový pozitivní RNA virus schopný způsobit jak akutní, tak chronickou infekci.¹ V současnosti proti hepatitidě C neexistuje vakcína. Zatímco akutní infekce je obvykle asymptomatická a velice zřídka se pojí s život ohrožujícím onemocněním, u více než poloviny osob infikovaných virem HCV by se mohla vyvinout chronická infekce. U osob s chronickou HCV infekcí je do 20 let riziko rozvoje cirhózy jater mezi 15-30 %. Odhaduje se, že na celém světě je podezření na chronickou HCV infekci u 71 milionů lidí, z nichž se u značného množství očekává rozvoj cirhózy nebo rakoviny jater.²⁻⁴ Jelikož HCV je virus přenášený krví, rozšířil se primárně krví a krevními produkty. Rozsáhlé zavádění krevních screeningových testů výrazně snížilo výskyt infekcí z darované krve.¹

Detekce protilátek proti HCV nerozlišuje mezi aktivní nákazou a eliminovanou nákazou. V důsledku toho vyžadují algoritmy laboratorního testování HCV u jedinců s pozitivními protilátkami před zahájením léčby (pokud je nutná) diagnózu aktivní nákazy HCV prostřednictvím detekce RNA HCV v plazmě nebo séru. Nyní se stanovitelnost RNA HCV (virová zátěž) ke stanovení a monitorování úspěšné HCV léčby používá běžně.

Současné směrnice pro řízení a léčbu HCV infekcí doporučují před zahájením antivirové terapie kvantitativní testování RNA HCV za účelem stanovit základní úroveň a 12 týdnů po ukončení léčby nebo později. Někdy mohou být doporučeny další časové body. Setrvalá virologická odpověď (Sustained Virological Response, SVR) je cílem HCV terapie a je definována jako po ukončení léčby nezjistitelná RNA HCV (analýzou, která má mez detekce < 25 IU/ml).⁵⁻⁷ Nejnovější pokyny Americké asociace pro studium jaterních chorob naznačují testování HCV RNA nejen na počátku, ale také pravidelně během léčby (tj. 4 týdny) a 12 týdnů po ukončení léčby. K identifikaci aktivní nákazy virem HCV se používají testy pro detekci RNA HCV v kombinaci se sérologickými testy.⁶

PRINCIPY POSTUPU

Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay spojuje automatizovanou extrakci RNA a detekci pomocí RT-PCR v reálném čase. Vzorky plné krve jsou pro přípravu plazmy odebrány do zkumavek s EDTA, ACD nebo PPT a/nebo pro přípravu séra do zkumavek SST. Primární vzorek (frakcionované) krve nebo alikvotní podíl plazmy/séra v kompatibilní sekundární zkumavce se vzorkem je označen čárovým kódem a umístěn do soustavy NeuMoDx System. Soustava NeuMoDx System automaticky nasaje alikvotní podíl plazmy/séra, smíchá jej s puftrem NeuMoDx Lysis Buffer 3 a činidly obsaženými na destičce NeuMoDx Extraction Plate a zahájí zpracování. Soustava NeuMoDx System automatizuje a integruje extrakci a koncentrování RNA, přípravu reagentie a amplifikaci/detekci nukleové kyseliny cílových sekvencí pomocí RT-PCR v reálném čase. Zahrnutá kontrola zpracování vzorku (Sample Process Control, SPC2) pomáhá monitorovat přítomnost inhibičních látek, selhání soustavy, procesu nebo reagentie. Jakmile je vzorek vložen do soustavy NeuMoDx System, není nutný žádný zásah obsluhy.

Soustava NeuMoDx System k automatickému provedení lýzy, extrakce RNA a odstranění inhibitorů využívá kombinaci zahřívání, lytického enzymu a extrakčních reagensů. Uvolněné nukleové kyseliny jsou zachyceny paramagnetickými částicemi. Částice s navázanou nukleovou kyselinou jsou vloženy do kazety NeuMoDx Cartridge, kde jsou nenavázané prvky vymyty promývací reagensí NeuMoDx Wash Reagent. Navázaná RNA se potom eluuje za použití uvolňovací reagensie NeuMoDx Release Reagent. Soustava NeuMoDx System eluovanou RNA využije k rehydrataci amplifikačních reagensí NeuDry™, které obsahují všechny prvky nezbytné k amplifikaci cílů HCV a SPC2. Tímto je umožněna simultánní amplifikace a detekce jak cíle, tak kontrolních sekvencí RNA. Po rekonstituci suchých reagensí RT-PCR nadávkuje soustava NeuMoDx System připravenou RT-PCR-ready směs do jedné PCR komory (na každý vzorek) zásobníku NeuMoDx Cartridge. K reverzní transkripci, amplifikaci a detekci kontrolních a cílových (pokud jsou přítomné) sekvencí dochází v PCR komoře. Kazeta NeuMoDx Cartridge je zkonstruována tak, aby po PCR obsahovala amplikon, čímž se prakticky eliminuje riziko kontaminace po amplifikaci.

Amplifikované cíle jsou detekovány v reálném čase pomocí chemizmu hydrolyzační sondy (běžně označovaný jako chemizmus TaqMan®) pomocí fluorogenních oligonukleotidových molekul sondy, specifických pro amplikony jejich příslušných cílů. SONDY TaqMan sestávají z fluoroforu, kovalentněpřipojeného k 5' konci oligonukleotidové sondy, a ze zhášedla na 3' konci. Zatímco sonda je intaktní, fluorofor a zhášedlo jsou v blízkosti, čímž molekula zhášedla potlačuje fluorescenci emitovanou fluoroforem přes Försterův rezonanční přenos energie (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

SONDY TaqMan jsou určeny k reasociaci DNA v úseku amplifikovaném specifickou sadou primerů. Jak polymeráza Taq DNA prodlužuje primer a syntetizuje nové vlákno, 5' až 3' exonukleázová aktivita polymerázy Taq DNA degraduje sondu, která reasociovala na templát. Degradací sondy se uvolňuje fluorofor a narušuje její blízkost ke zhášedlu, takže účinek zhášení je v důsledku FRET překonán a detekce fluoroforu je možná. Výsledný fluorescenční signál detekovaný kvantitativní RT-PCR v termocykleru soustavy NeuMoDx System je přímo úměrný uvolněnému fluoroforu a může souviset s množstvím přítomného cíle.

Sonda TaqMan značená fluoroforem (excitace: 490 nm a emise: 521 nm) na 5'-konci a tmavým zhášedlem na 3'-konci se používá k detekci RNA HCV. Pro detekci SPC2 je TaqMan sonda označena alternativním fluorescenčním barvivem (excitace: 535 nm a emise: 556 nm) na 5' konci a tmavým zhášedlem na 3' konci. Software soustavy NeuMoDx System monitoruje fluorescenční signál vydávaný sondami TaqMan na konci každého amplifikačního cyklu. Když je amplifikace hotova, software soustavy NeuMoDx System údaje analyzuje a podá zprávu o konečném výsledku (POSITIVE (POZITIVNÍ) / NEGATIVE (NEGATIVNÍ) / INDETERMINATE (NEURČITÝ) / UNRESOLVED (NEROZLIŠENO) / NO RESULT (BEZ VÝSLEDKU)). Pokud je výsledek pozitivní a vypočítaná koncentrace je v mezích stanovitelnosti, software soustavy NeuMoDx System také poskytuje kvantitativní hodnotu spojenou se vzorkem.

REAGENCIE / SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Dodaný materiál

REF.	Obsah	Počet jednotek v balení	Počet testů na jednotku	Počet testů v balení
300300	Testovací proužek NeuMoDx HCV Quant Test Strip <i>Suché reagensie RT-PCR obsahující sondy TaqMan a primery specifické na HCV a SPC2.</i>	6	16	96

Požadované, ale nedodávané materiály (k dispozici samostatně od společnosti NeuMoDx)

REF.	Obsah
100200	Extrakční destička NeuMoDx Extraction Plate <i>Suché paramagnetické částice, lytický enzym a kontroly zpracování vzorků</i>
800200 nebo 800202	Kalibrátory NeuMoDx HCV Calibrator <i>Jednorázové sady kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot HCV pro stanovení validity kalibrační křivky</i>
900201 nebo 900202	Externí kontroly NeuMoDx HCV External Control <i>Jednorázové sady HCV pozitivních a negativních kontrol</i>
400600	Pufr NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	Promývací reagensie NeuMoDx Wash Reagent
400200	Uvolňovací reagensie NeuMoDx Release Reagent
100100	Zásobník NeuMoDx Cartridge
235903	Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (300 µl) s filtry
235905	Hroty Hamilton CO-RE / CO-RE II (1 000 µl) s filtry

Potřebné přístrojové vybavení

Molekulární soustava NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] nebo NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]



VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Testovací proužek NeuMoDx HCV Quant Test Strip je určen pouze pro diagnostiku *in vitro* se soustavami NeuMoDx System.
- Spotřební materiál ani reagensie po uvedené době expirace nepoužívejte.

- Nepoužívejte žádné reagentie, pokud je bezpečnostní těsnění rozbito nebo je při dodání poškozen obal.
- Spotřební materiál nebo reagentie nepoužívejte, pokud je ochranný váček při dodání otevřený nebo rozbitý.
- K dispozici musí být platná kalibrace testování (generovaná zpracováním kalibrátorů vysokých a nízkých hodnot z kalibrátorů NeuMoDx HCV Calibrators) předtím, než lze pro klinické vzorky generovat výsledky testu.
- Externí kontroly NeuMoDx HCV External Control musejí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay zpracovány každých 24 hodin.
- Minimální objem vzorku sekundárních alikvotních podílů závisí na velikosti zkumavky, stojanu na zkumavku se vzorkem a zpracování objemu vzorku, jak je definováno níže. Objem menší, než je specifikované minimum, může vést k chybě „Quantity Not Sufficient“ (Nedostatečné množství).
- Použití vzorků skladovaných při nesprávných teplotách nebo po uplynutí specifikovaných dob skladování může vést k neplatným nebo chybným výsledkům.
- Vždy u všech reagentií a spotřebního materiálu zabraňte mikrobiální a ribonukleázové (RNázové) kontaminaci. Při použití sekundárních zkumavek se vzorky se doporučuje používat sterilní jednorázové přenosové pipety bez RNázy. Na každý vzorek použijte novou pipetu.
- Abyste předešli kontaminaci, s kazetou NeuMoDx Cartridge po amplifikaci nemanipulujte ani ji nerozebírejte. Za žádných okolností nevyjímajte kazety NeuMoDx Cartridge z nádoby na biologicky nebezpečný odpad (NeuMoDx 288 Molecular System) nebo z koše na nebezpečný biologický odpad (NeuMoDx 96 Molecular System). Zásobník NeuMoDx Cartridge je zkonstruován tak, aby kontaminaci zabránil.
- V případě, že laboratoř provádí také testy PCR s otevřenými zkumavkami, musí být zajištěno, že testovací proužek NeuMoDx HCV Quant Test Strip, doplňkový spotřební materiál a reagentie nezbytné k testování, ochranné osobní prostředky, jako například rukavice a laboratorní pláště, a soustava NeuMoDx System nejsou kontaminovány.
- Při manipulaci s reagentiemi a spotřebním materiálem NeuMoDx byste měli nosit čisté nitrilové rukavice bez obsahu pudru. Měli byste dávat pozor, abyste se nedotýkali vrchního povrchu zásobníku NeuMoDx Cartridge, povrchu fóliového těsnění testovacího proužku NeuMoDx HCV Quant Test Strip a extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate ani vrchního povrchu lyzačního pufru NeuMoDx Lysis Buffer 3; při manipulaci se spotřebním materiálem a reagentiemi byste se měli dotýkat pouze bočních stran.
- Pro každou reagentii jsou, v příslušných případech, poskytnuty bezpečnostní listy (BL), které jsou k dispozici na internetové stránce www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy. Nekuřte, nepijte ani nejzte v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo reagentiemi.
- Se vzorky vždy zacházejte tak, jako by byly infekční. Postupujte v souladu s bezpečnými laboratorními postupy, například těmi popsanými v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁸ a v dokumentu M29-A4 institutu CLSI.⁹
- Nepoužité reagentie a odpad likvidujte podle státních, federálních, oblastních a místních předpisů.
- Nepoužívejte opakovaně.



UCHOVÁVÁNÍ, MANIPULACE A STABILITA PRODUKTU

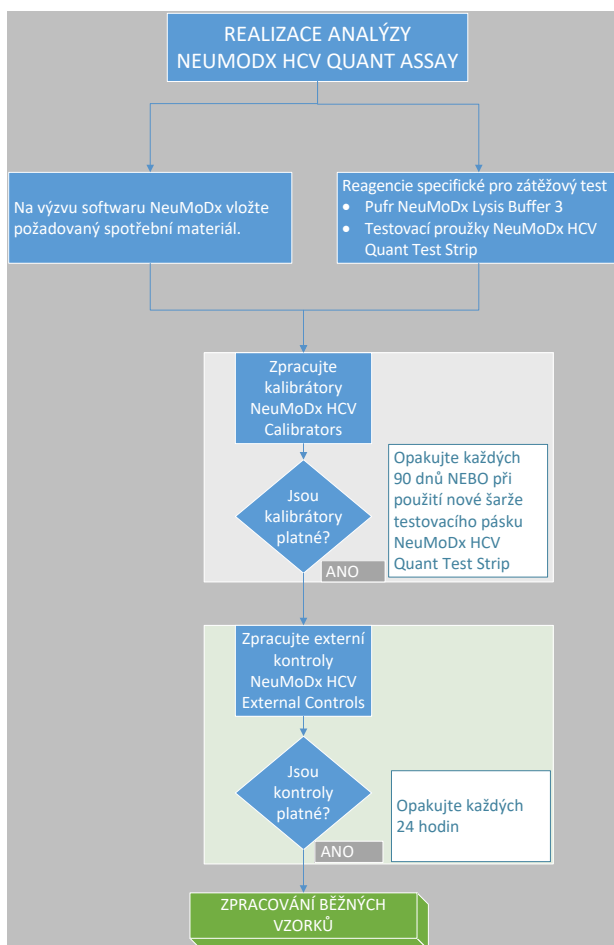
- Testovací proužky NeuMoDx HCV Quant Test Strip jsou stabilní v primárním obalu po dobu expirace, která je uvedena na štítku produktu, při uchovávání při teplotě mezi 4–28 °C.
- Po uplynutí uvedeného data expirace spotřební materiály ani reagentie nepoužívejte.
- Nepoužívejte žádný testovací produkt, pokud byl primární či sekundární obal viditelně narušen.
- Nevkládejte žádný produkt testu, který byl již dříve vložen do jiné soustavy NeuMoDx System.
- Testovací proužek NeuMoDx HCV Quant Test Strip může po vložení zůstat v přístroji soustavy NeuMoDx System po dobu až 14 dnů. Zbývající životnost vložených testovacích proužků je sledována pomocí softwaru a hlášena uživateli v reálném čase. Soustava vyzve k vyjmutí testovacího proužku, který byl používán po uplynutí povolené doby.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

1. Se všemi vzorky, kalibrátory a kontrolami zacházejte, jako kdyby byly schopné přenosu infekčních agens.
2. Plnou krev nebo jakékoli vzorky skladované v původních zkumavkách nezmrazujte.
3. Pro přípravu vzorků plazmy by měla být plná krev odebrána do sterilních zkumavek za použití EDTA nebo ACD jako antikoagulantů nebo ve zkumavkách pro přípravu plazmy (PPT). Při přípravě a skladování postupujte podle pokynů výrobce zkumavky pro odběr vzorků.
4. K přípravě vzorků séra je třeba odebrat plnou krev do zkumavek se sérem nebo zkumavek Sérum SST. Při přípravě a skladování postupujte podle pokynů výrobce zkumavky pro odběr vzorků.
5. Vzorky lze testovat v primárních odběrových zkumavkách nebo v sekundárních zkumavkách se vzorky. Doporučeno pro testování v primárních zkumavkách:
 - a. Vzorky plazmy: Zkumavka BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD č. 368589) nebo BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD č. 362799).
 - b. Vzorky séra: Zkumavka BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) nebo zkumavka BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).

6. Připravené vzorky mohou být před zpracováním uchovávány na soustavě NeuMoDx System po dobu až 8 hodin. Pokud je třeba delší doby skladování, doporučujeme vzorky buď zchladit, nebo zmrazit ve formě sekundárních alikvotních podílů.
7. Připravené vzorky by při 2 až -8°C neměly být před testováním skladovány déle než 7 dnů a maximálně 8 hodin při pokojové teplotě.
8. Připravené vzorky v sekundárních zkumavkách mohou být před zpracováním skladovány při ≤ -20 °C po dobu až 24 týdnů; zmrazené vzorky by před použitím neměly být vystaveny více než (2) cyklům zmrazení/rozmrazení.
 - a. Plazmatické vzorky, které jsou zmrazené a procházejí jedním (1) cyklem zmrazení a rozmrazení, mohou být na v rámci systému uloženy dalších 8 hodin.
 - b. Plazmatické vzorky, které jsou zmrazené a podstoupí dva (2) cykly zmrazení a rozmrazení, by neměly být v rámci systému skladovány déle než 4 hodiny.
 - c. Vzorky séra, které jsou podrobeny jednomu (1) nebo dvěma (2) cyklům zmrazení-rozmrazení se musí testovat ihned po rozmrazení.
 - d. Pokud jsou vzorky zmrazené, nechte je úplně rozmrazit při pokojové teplotě (15–30 °C); pro vytvoření rovnoměrně rozloženého vzorku vzorek zviřte.
 - e. Zmrazení plazmy/séra ve zkumavkách pro primární odběr se nedoporučuje.
9. Pokud jsou vzorky přepravovány, měly by být zabaleny a označeny v souladu s platnými předpisy země a/nebo mezinárodními předpisy.
10. Zřetelně vzorky označte a uveďte, že se jedná o vzorky k testování HCV.
11. Přejděte k části *Příprava testu*.

Celý proces realizace analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay je shrnut níže na *obrázku 1*.



Obrázek 1: Pracovní postup při realizaci analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava testu

Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay může proběhnout přímo v primárních zkumavkách pro odběr krve nebo u alikvotních podílů vzorků v sekundárních zkumavkách. Zpracování lze spustit pomocí jednoho ze dvou pracovních postupů zpracování objemů vzorků – pracovní postup pro zpracování vzorku o objemu 550 μ l a pracovní postup pro vzorek o objemu 200 μ l.

1. Na zkumavku se vzorkem, kompatibilní se soustavou NeuMoDx System, nalepte štítek s čárovým kódem na vzorky. Primární odběrová zkumavka na krev může být označena a po odstředění umístěna přímo do 32místného stojanu na zkumavky se vzorkem; viz pokyny výrobce. Alternativně může být alikvotní podíl plazmy přenesen do sekundární zkumavky pro zpracování v soustavě NeuMoDx System.
2. Pokud testujete vzorek v primární odběrové zkumavce, vložte zkumavku označenou čárovým kódem do stojanu na zkumavky se vzorkem a před vložením do soustavy NeuMoDx System se ujistěte, že je sejmuto víčko. Minimální objemy **nad** buffy coat jsou definovány níže a budou splněny, pokud budou vzorky odebrány a zpracovány podle pokynů výrobce zkumavek. U vzorků, které jsou odebrány nesprávně, není provedení testu zaručeno.

Typ zkumavky	Minimální požadovaný objem vzorku	
	Pracovní postup pro 550 μ l	Pracovní postup pro 200 μ l
SST – 3,5 ml	1550 μ l	1200 μ l
PPT/SST – 5,0 ml	1800 μ l	1450 μ l
PPT/SST – 8,5 ml	2500 μ l	2200 μ l
K ₂ EDTA/sérum – 4,0 ml	1050 μ l	700 μ l
K ₂ EDTA/sérum – 6,0 ml	1250 μ l	900 μ l
K ₂ EDTA/sérum – 10,0 ml	1600 μ l	1250 μ l

3. Při použití sekundární zkumavky:
 - a. Jemně vzorek zviřte, čímž dosáhnete rovnoměrného rozložení.
 - b. Pomocí nové přenosové pipety pro každý vzorek přeneste alikvotní podíl plazmy nebo séra do zkumavky se vzorkem s čárovým kódem, která je kompatibilní se soustavou NeuMoDx System podle objemů definovaných níže:

Stojan na zkumavky se vzorkem	Velikost zkumavky	Minimální požadovaný objem vzorku	
		Pracovní postup pro 550 μ l	Pracovní postup pro 200 μ l
32místný stojan na zkumavky se vzorkem	Průměr 11–14 mm a výška 60–120 mm	700 μ l	400 μ l
24-Tube Specimen Tube Carrier (24místný stojan na zkumavky se vzorkem)	Průměr 14,5-18 mm a výška 60–120 mm	1100 μ l	800 μ l
Low Volume Specimen Tube Carrier (Stojan na zkumavky se vzorkem o malém objemu)	1,5ml mikrocentrifugační zkumavka s kónickým dnem	650 μ l	300 μ l

- c. Dejte pozor, abyste do zkumavky se vzorkem nepřenesli ze vzorku žádné sraženiny.

Provoz soustavy NeuMoDx System

Podrobné pokyny jsou uvedeny v návodech k obsluze molekulárních soustav NeuMoDx 288 Molecular System a NeuMoDx 96 Molecular System (výr. č. 40600108 a 40600317).

1. Podle požadovaného postupu zpracování objemu a typu zkumavky se vzorkem načtete do soustavy NeuMoDx System objednávku testu.
 - Objem vzorku 550 µl je testován definováním typu vzorku jako „**Plasma**“ (Plazma) nebo „**Serum**“ (Sérum).
 - Objem vzorku 200 µl je testován definováním typu vzorku jako „**Plasma2**“ (Plazma 2) nebo „**Serum2**“ (Sérum 2).
 - Pokud to není v objednávce testu definováno, použije se jako výchozí typ vzorku **Plasma** (Plazma) v **Secondary Tube** (Sekundární zkumavka).
2. Osadte jeden nebo více nosičů na testovací pásky NeuMoDx System Test Strip testovacím páskem (pásky) NeuMoDx HCV Quant Test Strip a k založení testovacího pásku (pásků) do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku.
3. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, přidejte potřebné spotřební materiály ke stojanům na spotřební materiál soustavy NeuMoDx System nezbytný spotřební materiál a pomocí dotykové obrazovky vložte stojany do soustavy NeuMoDx System.
4. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, vyměňte podle potřeby promývací reagenty NeuMoDx Wash Reagent, uvolňovací reagenty NeuMoDx Release Reagent, vyprázdněte odpadní reagenty z plnění, nádobu na biologicky nebezpečný odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 288 Molecular System), odpadní koš na hroty (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System) nebo koš na nebezpečný biologický odpad (pouze molekulární soustava NeuMoDx 96 Molecular System).
5. Pokud vás software soustavy NeuMoDx System vyzve, zpracujte kalibrátory NeuMoDx HCV Calibrator a/nebo externí kontroly NeuMoDx HCV External Control. Další informace týkající se kalibrátorů a kontrol lze najít v části *Zpracování výsledků*.
6. Zkumavku (zkumavky) se vzorky/kalibrátory/kontrolami vložte do běžného stojanu na zkumavky se vzorkem a ujistěte se, že jsou ze všech zkumavek odstraněna víčka.
7. Stojan (stojany) na zkumavky se vzorky umístěte na přihrádku automatického podavače a k vložení stojanu (stojanů) do soustavy NeuMoDx System použijte dotykovou obrazovku. Tím se zahájí zpracování vložených vzorků pro určené testy, pokud je v systému nastaveno platné pořadí testů.

OMEZENÍ

1. Testovací pásek NeuMoDx HCV Quant Test Strip lze použít pouze na soustavách NeuMoDx System.
2. Účinnost testovacího proužku NeuMoDx HCV Quant Test Strip byla stanovena u vzorků plazmy připravených s EDTA/ACD jako antikoagulantem nebo u vzorků séra připravených ve zkumavkách pro separaci séra. Použití testovacího proužku NeuMoDx HCV Quant Test Strip nebylo u jiných zdrojů posuzováno a výkonové charakteristiky nejsou pro jiné typy vzorků známé.
3. Výkonnost testovacích proužků NeuMoDx HCV Quant Test Strip byla stanovena pro testování v primární zkumavce za použití zkumavek BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube a BD Vacutainer SST Tube.
4. Manipulace se vzorky mimo rámec podmínek skladování může negativně ovlivnit kvantitativní přesnost kvantitativní analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay, je však méně pravděpodobné, že ovlivní kvalitativní (pozitivní/negativní) určení přesnosti výsledku.
5. Skladování vzorků séra v rámci systému po delší dobu ve zmrazeném stavu a provedení dvou cyklů zmrazení a rozmrazení bez okamžitého testování může negativně ovlivnit kvantitativní přesnost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay.
6. Při použití pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl bylo pozorováno malé zvýšení meze detekce a dolní meze stanovitelnosti analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay.
7. Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay se nesmí používat se vzorky od osob užívajících heparin.
8. Vzhledem k tomu, že detekce HCV závisí na množství částic cílové virové RNA přítomných ve vzorku, závisí spolehlivost výsledků na správném odběru vzorků, zacházení s nimi a jejich skladování.
9. Kalibrátory NeuMoDx HCV Calibrators a externí kontroly NeuMoDx HCV External Control musejí být zpracovány podle doporučení vložených do balení a na výzvu softwaru soustavy NeuMoDx System před zpracováním běžných klinických vzorků.
10. K chybným výsledkům testů může dojít kvůli nesprávnému odběru vzorků, nevhodné manipulaci s nimi, jejich nevhodnému skladování, technické chybě nebo záměně zkumavky se vzorkem. Kromě toho by se mohly objevit falešně negativní výsledky kvůli tomu, že množství virových částic ve vzorku je pod mezí detekce analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay.
11. Obsluha soustavy NeuMoDx System je omezena pouze na personál vyškolený v používání soustavy NeuMoDx System.
12. Pokud se ani cílový HCV, ani cílová SPC2 neamplifikují, bude oznámen neplatný výsledek (Indeterminate (Neurčitý), No Result (Bez výsledku) nebo Unresolved (Nerozlišeno)) a test by měl být zopakován.
13. Pokud je výsledek analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay Positive (Pozitivní), ale hodnota stanovitelnosti je mimo meze stanovitelnosti, soustava NeuMoDx System oznámí, zda byl detekovaný HCV *pod* dolní mezí stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) nebo *nad* horní mezí stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
14. V případě, že detekovaný HCV byl *pod* LLoQ, může být analýza NeuMoDx HCV Quant Assay zopakována (podle přání) s jiným alikvotním podílem vzorku.
15. V případě, že detekovaný HCV je *nad* ULoQ, může být analýza NeuMoDx HCV Quant Assay zopakována se zředěným alikvotním podílem původního vzorku. Doporučujeme ředění 1 : 100 nebo 1 : 1 000 v HCV negativní plazmě nebo diluentu Basematrix 53 (Basematrix), (SeraCare, Milford, Massachusetts). Koncentrace původního vzorku se vypočítá takto:

$$\text{Původní koncentrace vzorku} = \log_{10}(\text{faktor ředění}) + \text{ohlášená koncentrace zředěného vzorku}.$$
16. Příležitostná přítomnost inhibitorů PCR v plazmě a séru může vést k chybě stanovení soustavy. Pokud k tomu dojde, doporučujeme opakovat test se stejným vzorkem naředěným v diluentu Basematrix v poměru 1 : 10 nebo 1 : 100.
17. Pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat přítomnost životaschopných organismů. Avšak pozitivní výsledek je pro přítomnost RNA viru hepatitidy C presumpivní.
18. Delece nebo mutace v konzervovaných oblastech zacílených analýzou NeuMoDx HCV Quant Assay může za použití testovacího proužku NeuMoDx HCV Quant Test Strip ovlivnit detekci nebo vést k chybnému výsledku.
19. Výsledky z analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay by měly být použity jako doplněk klinických pozorování a dalších informací, které má lékař k dispozici; test není určen k diagnostice infekce.
20. Aby nedošlo ke kontaminaci, doporučujeme správnou laboratorní praxi, včetně výměny rukavic mezi manipulacemi s patientskými vzorky.

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Dostupné výsledky lze zobrazit na kartě „Results“ (Výsledky) v okně Results (Výsledky) na dotykové obrazovce soustavy NeuMoDx System, případně je lze odtud vytisknout. Výsledky analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay automaticky generuje software soustavy NeuMoDx System používající algoritmus rozhodování a parametry zpracování výsledků popsané v souboru definic NeuMoDx HCV Assay Definition File (HCV ADF). Výsledek může být ohlášen jako Negative (Negativní), Positive (Pozitivní) s ohlášením koncentrace HCV, Positive (Pozitivní) nad ULoQ, Positive (Pozitivní) pod LLoQ, Indeterminate (IND; Neurčitý), Unresolved (UNR; Nerozlišeno) nebo No Result (NR; Bez výsledku) na základě stavu amplifikace cíle a kontroly zpracování vzorku. Výsledky jsou uváděny na základě rozhodovacího algoritmu ADF, shrnutého níže v *tabulce 1*.

Tabulka 1. Shrnutí rozhodovacího algoritmu pro analýzu NeuMoDx HCV Quant Assay

VÝSLEDEK	Cílový HCV	Kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC2)	Interpretace výsledků
Positive (Pozitivní) s ohlášenou koncentrací	Amplified (Amplifikováno) $0,9 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 550 ml) $1,5 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 200 ml)	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	RNA viru HCV detekována v kvantitativním rozmezí
Positive (Pozitivní), nad ULoQ	Amplified (Amplifikováno) $[\text{HCV}] > 8,2 \log_{10} \text{ IU/ml}$	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	RNA viru HCV detekována nad kvantitativním rozmezím
Positive (Pozitivní), pod LLoQ	Amplified (Amplifikováno) $[\text{HCV}] < 0,9 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 550 ml) $[\text{HCV}] < 1,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$ (pracovní postup pro 200 ml)	Amplified (Amplifikováno) nebo Not Amplified (Není amplifikováno)	RNA viru HCV detekována pod kvantitativním rozmezím
Negative (Negativní)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	RNA viru HCV nebyla detekována
Indeterminate (Neurčitý)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků dokončeno)		Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu†
No Result (Bez výsledku)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Není amplifikováno, Byla zjištěna chyba soustavy, Zpracování vzorků zrušeno)		Zpracování vzorku bylo přerušeno; otestujte vzorek znovu†
Unresolved (Nerozlišeno)	Not Amplified, No System Error Detected (Neamplifikováno, Nebyla zjištěna žádná chyba systému)		Všechny výsledky cíle byly neplatné; otestujte vzorek znovu†

* Příznak No Result (Bez výsledku) je hlášen pouze u softwaru soustavy NeuMoDx System verze 1.8 a vyšší.

†Soustava NeuMoDx System je opatřena automatickou funkcí Rerun (Nová analýza) / Repeat (Opakovat), kterou si může koncový uživatel zvolit k zajištění, že výsledek IND/UNR/NR bude automaticky znovu zpracován, a tak se minimalizovaly prodlevy v hlášení výsledků.

Výpočet testu

- U vzorků v mezích stanovitelnosti analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay se koncentrace RNA viru HCV ve vzorcích počítá za pomoci uložené standardní křivky ve spojení s koeficientem kalibrace a objemem vzorku.
 - Koeficient kalibrace se vypočítá na základě výsledků kalibrátorů NeuMoDx HCV Calibrator zpracovaných tak, aby byla zajištěna validita standardní křivky pro danou šarži testovacího proužku NeuMoDx HCV Quant Test Strip na konkrétní soustavě NeuMoDx System.
 - Koeficient kalibrace je do konečného stanovení koncentrace RNA HCV zahrnutý.
 - Software soustavy NeuMoDx zohledňuje při stanovování koncentrace RNA viru HCV v jednom ml vzorku vstupní objem vzorku.
- Výsledky analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay se udávají jako $\log_{10} \text{ IU/ml}$.
- Výsledná stanovitelnost u neznámých vzorků má návaznost na 5. mezinárodní standard HCV organizace WHO.

Kalibrace testu

Platná kalibrace na základě standardní křivky je pro kvantitativní vyjádření RNA HCV ve vzorcích nezbytná. Pro získání platných výsledků musí být kalibrace testu provedena pomocí externích kalibrátorů dodaných společností NeuMoDx Molecular, Inc.

Kalibrátory

- Sada kalibrátorů NeuMoDx HCV Calibrator musí být zpracována s každou novou šarží testovacích proužků NeuMoDx HCV Quant Test Strip, nebo pokud je do soustavy NeuMoDx System nahrán nový soubor definic analýzy HCV anebo pokud je aktuální sada kalibrátorů za dobou platnosti (v současnosti nastavenou na 90 dnů), případně pokud je software soustavy NeuMoDx System upraven.

2. Software soustavy NeuMoDx System uživatele uvědomí, kdy je třeba kalibrátory zpracovat. Novou šarži testovacích proužků nelze použít, dokud nebyly úspěšně zpracovány kalibrátory.
3. Validita kalibrace je zajištěna následovně:
 - a) Pro zajištění validity je třeba zpracovat sadu se dvěma kalibrátory – jeden (1) pro vysokou hodnotu a jeden (1) pro nízkou hodnotu.
 - b) Výsledky nejméně dvou (2) ze tří (3) replikátů musejí být v mezích předem stanovených parametrů. Nominální cíl kalibrátoru pro nízkou hladinu je $3 \log_{10}$ IU/ml a nominální cíl kalibrátoru pro vysokou hladinu je $5 \log_{10}$ IU/ml.
 - c) Kalibrační koeficient se vypočítá tak, aby zohlednil očekávanou změnu mezi šaržemi testovacích proužků. Tento koeficient kalibrace se používá při stanovení konečné koncentrace HCV.
4. Pokud jeden nebo oba kalibrátory kontrolou validity neprojdou, zpracování neúspěšného kalibrátoru (kalibrátorů) zopakujte za použití nové ampulky. V případě, že validitou neprojde jeden kalibrátor, je možné zopakovat pouze neúspěšný kalibrátor, jelikož soustava nevyžaduje, aby uživatel znovu kontroloval oba kalibrátory.
5. Pokud kalibrátor (kalibrátory) neprojdou kontrolou validity následovně po sobě, kontaktujte společnost NeuMoDx Molecular, Inc.

Kontrola kvality

Místní předpisy obvykle stanoví, že laboratoř je odpovědná za kontrolní postupy, které monitorují přesnost a preciznost celého analytického procesu, a musí stanovit počet, typ a četnost testů kontrolních materiálů pomocí ověřených specifikací výkonu pro nemodifikovaný a schválený testovací systém.

Externí kontroly

1. Pozitivní a negativní externí kontroly musejí být během testování pomocí analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay zpracovány každých 24 hodin. Pokud sada validních výsledků externích kontrol neexistuje, software soustavy NeuMoDx System vyzve uživatele k provedení těchto kontrol dříve, než budou moci být ohlášeny výsledky vzorků.
2. Validita externích kontrol bude vyhodnocena soustavou NeuMoDx System na základě očekávaného výsledku. Pozitivní kontrola by měla přinést HCV Positive (pozitivní) výsledek a negativní kontrola by měla přinést HCV Negative (negativní) výsledek.
3. S neshodným výsledkem externích kontrol by mělo být zacházeno následovně:
 - a) Pozitivní výsledek testu ohlášený u negativní kontroly vzorku ukazuje na problém s kontaminací vzorku.
 - b) Výsledek Negative (Negativní) testu u pozitivního kontrolního vzorku může naznačovat problém související s reagenty nebo přístrojem.
 - c) V každém výše uvedeném případě anebo v případě výsledku Indeterminate (IND; Neurčitý) či No Result (NR; Bez výsledku) externí kontroly NeuMoDx HCV External Controls zopakujte s čerstvými ampulkami kontroly/kontrol, které testem validity neprošly.
 - d) Pokud pozitivní externí kontrola NeuMoDx HCV External Control nepřestává hlásit výsledek Negative (Negativní), kontaktujte technický servis společnosti NeuMoDx.
 - e) Pokud negativní externí kontrola NeuMoDx HCV External Control nepřestává hlásit výsledek Positive (Pozitivní), pokuste se předtím, než kontaktujete technický servis společnosti NeuMoDx, eliminovat všechny zdroje možné kontaminace, včetně výměny všech reagentů.

Kontroly (interní) zpracování vzorků

Exogenní kontrola zpracování vzorků (Sample Process Control, SPC2) je zabudována do extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate a u každého vzorku prochází celým procesem extrakce nukleové kyseliny a amplifikace s real-time RT-PCR. Každý testovací pásek NeuMoDx HCV Quant Test Strip obsahuje SPC2 specifické primery a sondu, které umožňují detekci přítomnosti SPC2 spolu s cílovou RNA HCV (pokud je přítomna) prostřednictvím multiplex PCR v reálném čase RT. Detekce amplifikace SPC2 umožňuje soustavě NeuMoDx System sledovat účinnost extrakce RNA a procesy amplifikace pomocí RT-PCR.

Neplatné výsledky

Pokud se analýze NeuMoDx HCV Quant Assay prováděné na soustavě NeuMoDx System nepodaří po dokončení zpracování vzorku vyprodukovat platný výsledek, bude na základě typu chyby, ke které došlo, oznámen výsledek buď jako Indeterminate (IND, Neurčitý), No Result (NR, Bez výsledku), nebo Unresolved (UNR, Nerozlišeno).

Výsledek IND bude ohlášen tehdy, pokud je během zpracování vzorků detekována chyba soustavy NeuMoDx System. V případě ohlášení výsledku IND doporučujeme test zopakovat.

Pokud nebude detekována žádná validní amplifikace RNA HCV nebo SPC2, přičemž nedošlo k žádné chybě systému, bude oznámen výsledek UNR (nevyřešený), který ukazuje na možné selhání reagentie nebo na přítomnost inhibitorů. V případě oznámení výsledku UNR (nevyřešený) se jako první krok doporučuje opakování testu. Pokud test není úspěšný, lze použít zředěný vzorek pro snížení účinků jakékoli inhibice vzorku.

Pokud analýza NeuMoDx HCV Quant Assay provedená na soustavě NeuMoDx System nedokáže přinést platný výsledek a zpracování vzorku se před dokončením přeruší, bude ohlášen výsledek No Result (NR; Bez výsledku). V případě ohlášení výsledku NR doporučujeme test zopakovat.

VÝKONOVÁ CHARAKTERISTIKA

Analytická citlivost – mez detekce za použití standardu WHO

Analytická citlivost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byla charakterizována testováním negativních vzorků a série ředění 5. mezinárodního standardu WHO (genotyp 1) ve vyšetřené negativní lidské krevní plazmě a séru za účelem stanovit na soustavách NeuMoDx System mez detekce (Limit of Detection, LoD). LoD byla definována jako nejnižší detekovaná cílová hladina při poměru 95 % tak, jak byla stanovena analýzou Probit. Měření bylo prováděno po dobu 3 dnů napříč několika soustavami s několika šaržemi reagensů NeuMoDx. Každá soustava (N288 a N96) zpracovala u každé úrovně zředění 18 replikátů denně. Míry detekce jsou uvedeny v *tabulce 2*. Bylo provedeno další měření pro stanovení LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay při použití pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl, přičemž výsledky jsou zobrazeny v *tabulce 3*.

Tabulka 2. Pozitivní míry detekce u vzorků ke stanovení LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay – postup zpracování pro 550 µl

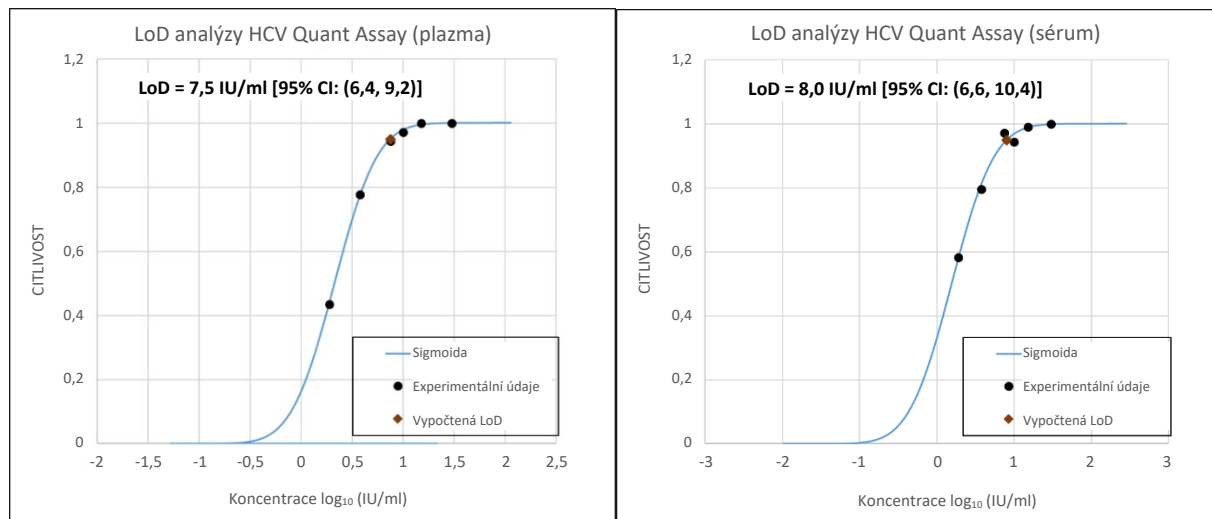
Cílová koncentrace [IU/ml]	Cílová koncentrace [\log_{10} IU/ml]	PLAZMA			SÉRUM		
		Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce	Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
30	1,48	108	108	100 %	108	108	100 %
15	1,18	108	108	100 %	108	107	99%
10	1,00	108	105	97%	108	102	94%
7,5	0,88	108	102	94%	108	105	97%
3,75	0,57	108	84	78%	108	86	80%
1,875	0,27	108	47	44%	108	63	58%
NEG	0	108	0	0%	107	1	0,93%

Tabulka 3. Pozitivní míry detekce u vzorků ke stanovení LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay – postup zpracování pro 200 µl

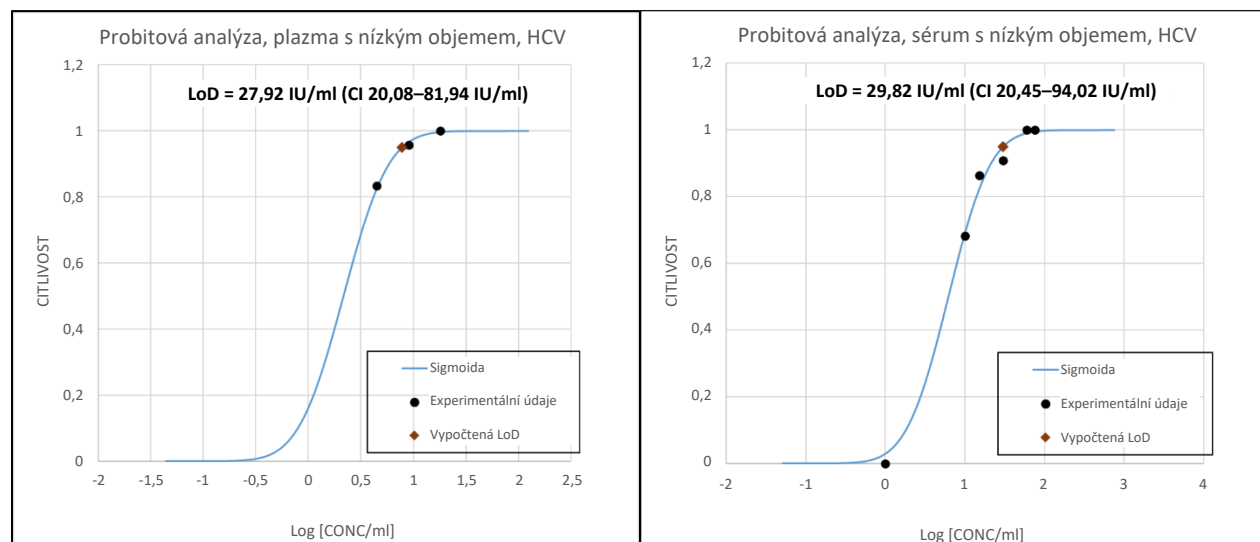
Cílová koncentrace [IU/ml]	Cílová koncentrace [\log_{10} IU/ml]	PLAZMA			SÉRUM		
		Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce	Počet platných testů	Počet pozitivních vzorků	Míra detekce
75	1,88	N/A	N/A	N/A	22	22	100 %
60	1,78	22	22	100 %	22	22	100 %
30	1,48	22	21	95,5%	22	20	90,9%
15	1,18	22	17	77,3%	22	19	86,4%
10	1,00	22	13	59,1%	22	15	68,2%
NEG	0	22	0	0%	22	0	0%

LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay v plazmě u všech genotypů byla stanovena na 7,5 IU/ml (95% CI 6,4 až 9,2 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95% CI 0,8 až 1,0 \log_{10} IU/ml)], jak bylo testováno na molekulární soustavě NeuMoDx 288 s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl (*obrázek 2*). LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay pro vzorky séra byla stanovena na 8,0 IU/ml (95% CI 6,6 až 10,4 IU/ml) [(0,9 \log_{10} IU/ml) (95% CI 0,8 až 1,0 \log_{10} IU/ml)] při použití pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl (*obrázek 2*); hodnota LoD pro oba typy vzorků zpracovávaných prostřednictvím postupu pro objem 550 µl je **8,0 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)**.

Bylo zjištěno, že hodnota LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay při použití pracovního postupu pro objem 200 µl je 27,9 IU/ml (95% CI 20,1–81,9) ve vzorcích plazmy a 29,8 IU/ml (95% CI 20,5–94,0) ve vzorcích séra (*obrázek 3*); hodnota LoD pro oba typy vzorků u pracovního postupu pro objem 200 µl je **30,0 IU/ml (1,5 \log_{10} IU/ml)**.



Obrázek 2: Probitová analýza použitá ke stanovení hodnoty LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (vlevo) a sérum (vpravo) – postup zpracování pro 550 µl



Obrázek 3: Probitová analýza použitá ke stanovení hodnoty LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay, plazma (vlevo) a sérum (vpravo) – postup zpracování pro 200 µl

Analytická citlivost – mez stanovitelnosti – dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) s použitím standardu WHO

Dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) je definována jako nejnižší cílová hladina, při které je dosaženo detekce > 95 % A hodnoty TAE ≤ 1,0. Za účelem stanovit LLoQ byla pro každou z cílových hladin HCV, které jako součást výpočtu LoD vykazovaly > 95 % detekce, spočítána celková analytická chyba (Total Analytical Error, TAE). TAE je stanovena následovně:

$$\text{TAE} = \text{odchylka} + 2 \times \text{SD (Westgardova pravidla)}$$

Odchylka je absolutní hodnota mezi průměrem vypočítané koncentrace a očekávanou koncentrací. SD odkazuje na standardní odchylku kvantitativně vyjádřené hodnoty vzorku.

Souhrnné výsledky pro 6 úrovní vzorků HCV plazmy a séra testovaných v rámci stanovení LLoQ s použitím genotypu 1 s použitím pracovním postupem pro objem vzorku 550 µl jsou uvedeny v *tabulce 4*. Výsledky z dalšího testování s použitím pracovním postupem pro objem 200 µl jsou uvedeny v *tabulce 5*.

Tabulka 4. LLoQ analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay, s odchylkou a TAE – postup zpracování pro 550 µl

Cílová konc. [IU/ml]	Cílová konc. [\log_{10} IU/ml]	Plazma					Sérum				
		Průměrná konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE	Průměrná konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE
30,00	1,48	1,41	100	0,32	0,07	0,71	1,39	100	0,30	0,08	0,69
15,00	1,18	1,24	100	0,36	0,06	0,79	1,23	99	0,32	0,06	0,70
10,00	1,00	1,07	97	0,35	0,07	0,77	1,14	94	0,36	0,14	0,85
7,50	0,88	1,01	94	0,44	0,13	1,02	1,12	97	0,25	0,25	1,09
3,75	0,57	1,08	78	0,43	0,51	1,38	1,17	80	0,58	0,59	1,76
1,88	0,27	1,11	44	0,36	0,83	1,55	1,11	58	0,69	0,84	2,22

Tabulka 5. LLoQ analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay, s odchylkou a TAE – postup zpracování pro 200 µl

Cílová konc. [IU/ml]	Cílová konc. [\log_{10} IU/ml]	Plazma					Sérum				
		Průměrná konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE	Průměrná konc. [\log_{10} IU/ml]	Detekce (%)	SD	Odchylka	TAE
75	1,88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1,56	100	0,23	0,32	0,78
60	1,78	1,93	100	0,39	0,15	0,93	1,56	100	0,27	0,22	0,76
30	1,48	1,35	96	0,44	0,11	0,99	1,45	91	0,41	0,03	0,85
15	1,18	1,37	77	0,42	0,18	1,03	1,36	86	0,53	0,18	1,25
10	1,00	1,26	59	0,56	0,25	1,36	1,15	68	0,53	0,15	1,21

LLoQ pro analýzu NeuMoDx HCV Quant Assay je stanovena na 7,7 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml) pro plazmu a 8,4 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml) pro sérum s použitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl; LLoQ pro plazmu i sérum je stanovena jako **8,4 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)** s použitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl.

LLoQ pro stanovení NeuMoDx HCV Quant Assay pomocí standardu WHO je stanovena na 30,0 IU/ml (1,5 \log_{10} IU/ml) pro plazmu a 29,8 IU/ml (1,37 \log_{10} IU/ml) pro sérum s použitím pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl; LLoQ jak pro plazmu, tak pro sérum je stanovena na **30,0 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)** s použitím pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl.

Analytická citlivost – LoD a LLoQ napříč genotypy HCV

Původně byla stanovena LoD pro genotyp 1 (5. mezinárodní standard WHO) a pak proběhlo další testování okolo stanovené LoD za použití každého z ostatních 5 genotypů. Bylo testováno třicet šest (36) replikátů při hladinách odpovídajících 2násobku, 1násobku a 0,5násobku horní meze LoD s 95 % CI (~ml) za použití analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl. Pozitivní procentní míra pro každý genotyp u každé z těchto testovaných hladin byla zpracována do tabulky a použita k výpočtu LoD pomocí probitové analýzy.

U těchto testovaných hladin byla také spočítána celková analytická chyba. Nejnižší hladina s pozitivní detekcí 95 % a spočítanou TAE $\leq 1,0$ byla pro genotyp znovu vyložena jako LLoQ. Tyto výsledky potvrzují, že analýza NeuMoDx HCV Quant Assay má vynikající a ekvivalentní detekční výkon u všech šesti genotypů s rozsahem 4,5 až 7,5 IU/ml, včetně výsledků získaných pro 5. mezinárodní standard WHO (genotyp 1). Celkově byla LoD analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay napříč genotypy stanovena na 7,5 IU/ml (0,88 \log_{10} IU/ml) a LLoQ byla stanovena jako nejvyšší hodnota, která je 7,7 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml), jak bylo stanoveno pro 5. Mezinárodní standard WHO (genotyp 1, viz výše). *Tabulka 6* ukazuje výsledky LoD a LLoQ pro testování napříč genotypy HCV stanovených v plazmě.

Tabulka 6. Genotypy HCV testované v plazmě s využitím pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl

GENOTYP	LoD [IU/ml]	LLoQ [IU/ml]
1	7,5	7,7
2	4,5	5,2
3	7,5	7,5
4	6,0	6,0
5	4,8	5,5
6	4,5	6,7

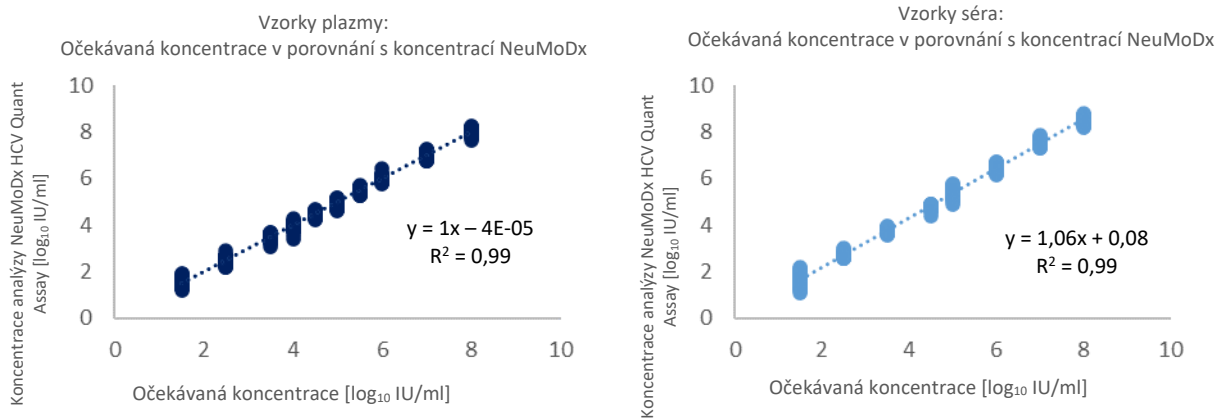
Na základě výsledku těchto měření společnost NeuMoDx prohlašuje, že **LoD je 8,0 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)** a **LLoQ je 8,4 IU/ml (0,9 \log_{10} IU/ml)** pro analýzu NeuMoDx HCV Quant Assay v **plazmě a séru** s použitím **pracovního postupu pro objem vzorku 550 µl**.

Hodnota **LoD** a **LLOq** pro analýzu NeuMoDx HCV Quant Assay **oba typy vzorků (plazma a sérum)** s použitím **pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl** činí **30,0 IU/ml (1,5 log₁₀ IU/ml)**.

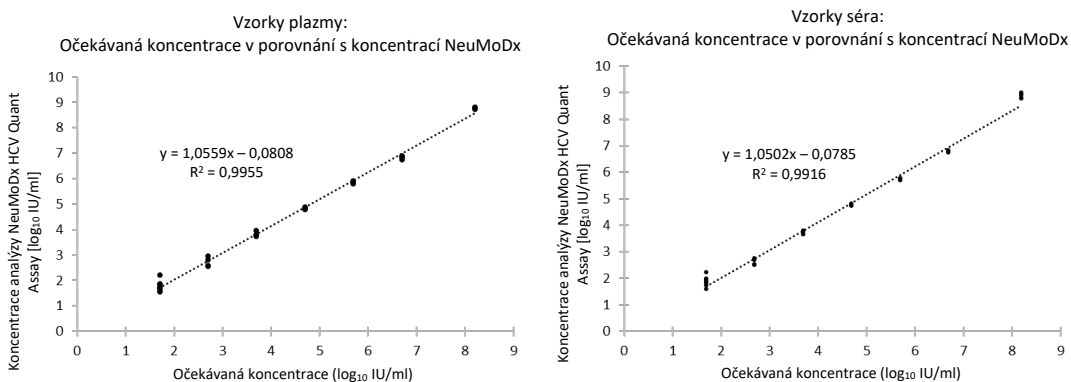
Analytická citlivost – linearita a stanovení horní meze stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULOQ)

Linearita a horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantitation, ULOQ) analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay u plazmy byly stanoveny přípravou série ředění za použití HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, Texas) a AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) se zajištěním návaznosti na 5. mezinárodní standard WHO. Ve smíšené HCV negativní plazmě byl připraven 11prvkový panel za účelem vytvořit panel, který by pokryl rozsah koncentrací 8,2–1,5 log₁₀ IU/ml. Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay prokázala schopnost kvantifikovat HCV v lineárním rozsahu 8 log₁₀ s přesností ±0,3 log₁₀ IU/ml na základě standardní chyby tak, jak byla vypočítána podle 95% intervalu spolehlivosti. Použití regresní metody 2. a 3. řádu nepřineslo žádnou výraznou výhodu. Hodnota ULOQ v plazmě byla stanovena jako 8,2 log₁₀ IU/ml. K prokázání ekvivalence matrice bylo provedeno další měření a analýza srovnala kvantitativní výsledky z NeuMoDx HCV u vzorků připravených v plazmě a séru za použití dvou různých modelů regrese, včetně nástroje pro regresní analýzu MS Excel a metody Passing-Bablok. Výsledky vykázaly silnou korelaci reprezentovanou hodnotami směrnice a průsečíku, které se velice blížily 1,00 a 0,00, a R² o hodnotě 0,99 (MS Excel nástroj Regrese) nebo p-hodnotu 0,600 (Passing-Bablok). Koncentrace analýzy HCV ohlášené soustavou NeuMoDx System ve srovnání s očekávanými hodnotami jsou uvedeny na *obrázku 4*.

Linearita a ULOQ byly poté hodnoceny pomocí pracovního postupu pro objem vzorku 200 ul. Byla provedena srovnání ekvivalence mezi koncentracemi udávanými softwarem NeuMoDx pro pracovní postupy pro 200 µl a 550 µl. Demingova a Passing-Bablokova regresní analýza ukázala vynikající korelaci a směrnici blízkou 1 a minimální průsečíky (odchylky) uváděných koncentrací u vzorků jak plazmy, tak i séra v lineárním rozmezí. Blandovo a Altmanovo srovnání hlášené koncentrace pro pracovní postup pro objem vzorku 200 µl se střední hlášenou koncentrací pro oba pracovní postupy pro objem vzorku 200 µl a 550 µl ukázalo minimální odchylku, což označuje přesnost algoritmu použitého ke generování výsledků z pracovního postupu pro 200 µl. Navíc jednoduchá lineární regrese srovnávající očekávanou koncentraci s hlášenou koncentrací pro pracovní postup pro 200 µl měla směrnici blízkou 1, což ukazuje vynikající korelaci (*obrázek 5*). Dohromady tato srovnání ukazují přesnou stanovitelnost HCV v celém lineárním rozsahu analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay za použití pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl.



Obrázek 4: Lineární rozsah analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay plazmy (vlevo) a séra (vpravo) – pracovní postup pro 550 µl



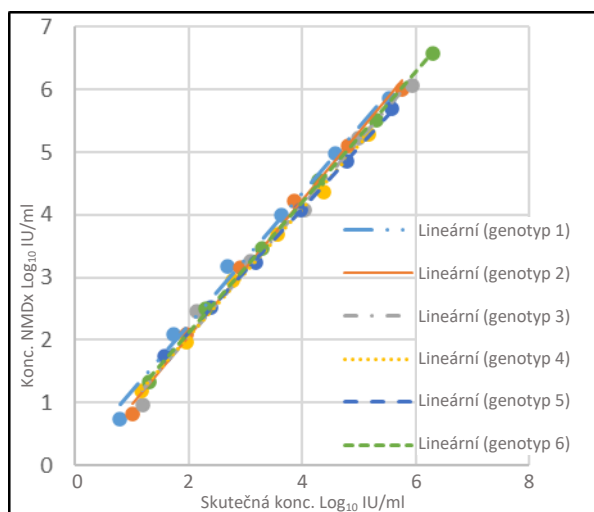
Obrázek 5: Lineární rozsah analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay plazmy (vlevo) a séra (vpravo) – pracovní postup pro 200 µl

Analytická citlivost – linearita napříč genotypy

Linearita analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay napříč šesti genotypy HCV byla charakterizována testováním minimálně čtyř (4) různých koncentrací u každého genotypu HCV připraveného ve smíšené HCV negativní plazmě. Testované hladiny cílového HCV použité v této studii závisely na koncentraci zdrojového vzorku, a tudíž se napříč genotypy lišily. Měření proběhlo u každého genotypu za použití 6 replikátů u každé hladiny. Linearita mezi šesti genotypy HCV je prezentována v *tabulce 7* a na *obrázku 6*.

Tabulka 7. Linearita analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay napříč genotypy

Genotyp	Rovnice linearity y = stanovitelnost analýzy NeuMoDx HCV Assay x = očekávaná stanovitelnost	R ²
1	$y = 1,054x + 0,1325$	0,979
2	$y = 1,0792x - 0,0748$	0,985
3	$y = 1,0423x - 0,0439$	0,981
4	$y = 1,0158x + 0,0292$	0,973
5	$y = 0,9873x + 0,1524$	0,994
6	$y = 1,0393x + 0,0396$	0,997



Obrázek 6: Linearita analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay napříč genotypy

Analytická specifičnost – zkřížená reaktivita

Analytická specifičnost byla prokázána screeningem zkřížené reaktivity 33 organismů, které se ve vzorcích krve/plazmy běžně nacházejí, a také druhů, které se HCV fylogeneticky podobají. Organismy byly připraveny ve směsích skládajících se ze 4 až 6 organismů testovaných při vysoké koncentraci. Testované organismy jsou uvedeny v *tabulce 8*. U žádného z testovaných organismů nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita, což potvrzuje 100% analytickou specifičnost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabulka 8. Patogeny použité k prokázání analytické specifičnosti

Necílové organismy						
Adenovirus 2	Dengue V1	Hepatitida A	Virus lidské imunitní nedostatečnosti – 2	Lidský virus leukémie T-lymfocytů 1	Propionibacterium acnes	Virus západonilské horečky
Adenovirus 5	Dengue V2	Hepatitida B	Lidský papillomavirus 16	Lidský virus leukémie T-lymfocytů 2	Zarděnky	Žlutá zimnice
Candida albicans	Dengue V3	Herpes simplex virus (HSV) 1	Lidský papillomavirus 18	Chřipka A	Virus encefalitidy St. Louis	Virus Zika
Chlamydia trachomatis	Dengue V4	Herpes simplex virus (HSV) 2	Lidský herpesvirus 6 typu B	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Cytomegalovirus	Virus Epstein-Barrová	Virus lidské imunitní nedostatečnosti – 1	Lidský herpesvirus 8	Parvovirus B19	Staphylococcus epidermidis	

Analytická specifčnost – interferující látky, komenzální organismy

Interference u analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byla vyhodnocena za přítomnosti necílových organismů, a to za použití stejných směsí organismů, jaké byly připraveny pro testování zkřížené reaktivity, viz *tabulka 8* výše. HCV negativní plazma byla uměle obohacena o organismy smíšené ve skupinách po 4–6 a také obohacena o HCV pozitivní kontrolu při koncentraci 1,4 log₁₀ IU/ml. Jak naznačila minimální odchylka kvantifikace z kontrolních vzorků, které neobsahovaly žádný interferující přípravek, nebyla za přítomnosti těchto komenzálů pozorována žádná významná interference.

Analytická specifčnost – interferující látky, endogenní a exogenní látky

Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay byla hodnocena za přítomnosti typických exogenních a endogenních interferujících látek, které se v klinických vzorcích plazmy s HCV objevily. Mezi tyto látky patřily neobvykle vysoké hladiny krevních složek a také běžné antivirové léky, které byly zařazeny do *tabulky 9*. Každá látka byla přidána k vyšetřené krevní plazmě negativní na HCV, obohacené o 1,7 log₁₀ IU/ml HCV a u vzorků byla zkoumána interference. Kromě toho byla na případnou interferenci testována i plazma při běžném onemocnění spojeném s nálezem hepatitidy C. Průměrná koncentrace a odchylka u všech testovaných látek jsou uvedeny v *tabulce 10*. Žádná z exogenních a endogenních látek specifčnost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay neovlivnila.

Tabulka 9. Testování interference – exogenní přípravky (klasifikace léků)

	Produkt	Klasifikace		Produkt	Klasifikace
Směs 1	Sofosbuvir	Přímé působení HCV antivirotika	Směs 2	Paritaprevir	Inhibitor HCV NS3/4A proteázy
	Ledipasvir	Inhibitor HCV		Ombitasvir	Antivirotikum proti HCV
	Velpatasvir	Inhibitor HCV NS5A		Ritonavir	Inhibitor HIV proteázy
	Klarithromycin	Antibiotikum		Abakavir-sulfát	Inhibitor reverzní transkriptázy
	Interferon alfa-2a	Modulátor imunity		Ribavirin	Modulátor imunity
Směs 3	Grazoprevir	Inhibitor HCV NS3/4A proteázy	Směs 4	Efavirenz	Inhibitor reverzní transkriptázy
	Elbasvir	Inhibitor HCV NS5A		Lopinavir	Inhibitor proteázy
	Tenofovir-disoproxil	HBV/HIV antivirotikum		Azithromycin	Antibiotikum
	Lamivudin	HBV/HIV antivirotikum		Dolutegravir	Antivirotikum proti HIV
	Valganciclovir	Antivirotikum proti CMV		Simeprevir	Inhibitor HCV NS3/4A proteázy
Směs 5	Emtricitabin	Antivirotikum proti HIV			
	Raltegravir	Antivirotikum proti HIV			
	Amoxicilin	Antibiotikum			
	Rilpivirine	Antivirotikum proti HIV			
	Dasabuvir	Přímé působení HCV antivirotika			
	Glecaprevir	Inhibitor HCV NS3/4A proteázy			

Tabulka 10. Testování interference – exogenní a endogenní přípravky

Endogenní	Průměrná konc. log ₁₀ IU/ml	Odchylka log ₁₀ IU/ml
Hemoglobin	1,61	0,28
Triglyceridy	1,31	-0,02
Bilirubin	1,47	0,14
Albumin	1,47	0,14
Exogenní (medikace)	Průměrná konc. log ₁₀ IU/ml	Odchylka log ₁₀ IU/ml
Směs 1: Zidovudin (ZDV), Saquinavir, Ritonavir, Klarithromycin, Interferon alfa-2a, Interferon alfa-2b	1,48	0,15
Směs 2: Abakavir-sulfát, Amprenavir, Ribavirin, Entecavir, Fluoxetin, Valaciclovir Hydrochlorid	1,40	0,07
Směs 3: Tenofovir disoproxil, Lamivudin, Ganciclovir, Valganciclovir, Nevirapin	1,40	0,07
Směs 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtid, Ciprofloxacín, Paroxetin,	1,51	0,18
Směs 5: Adefovir (dipivoxil), Azithromycin, Indinavir-sulfát, Sertralin	1,40	0,07
Stav onemocnění	Průměrná konc. log ₁₀ IU/ml	Odchylka log ₁₀ IU/ml
Antinukleární protilátka (Antinuclear Antibody, ANA)	1,53	0,18
Systémový lupus erythematosus (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	1,29	-0,06
Revmatoidní artritida	1,39	0,04
Protilátky anti-HBV	1,45	0,10
Alkoholická cirhóza	1,43	0,08
Revmatoidní faktor	1,43	0,08
Nealkoholická steatohepatitida (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	1,32	-0,03

Vnitrolaboratorní preciznost

Preciznost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byla stanovena testováním připraveného 7prvkového panelu se vzorky HCV (které zahrnovaly jak HCV Armored RNA, tak AcroMetrix HCV Control) za použití tří soustav NeuMoDx System po dobu 12 dnů. Preciznost byla charakterizována v rámci jednoho cyklu, jednoho dne a jedné soustavy a celková směrodatná odchylka byla stanovena jako $\leq 0,26 \log_{10}$ IU/ml. Žádný významný rozdíl v účinnosti nebyl zjištěn napříč soustavami, dny nebo cykly, jak ukazuje *tabulka 11*. Preciznost mezi pracovníky obsluhy charakterizována nebyla, jelikož obsluha při zpracování vzorků za použití soustavy NeuMoDx System nehraje žádnou významnou roli.

Tabulka 11. Vnitrolaboratorní preciznost – analýza NeuMoDx HCV Quant Assay na soustavách NeuMoDx System

	Cílová konc. (log ₁₀ IU/ml)	Prům. konc. (log ₁₀ IU/ml)	SD v rámci soustavy	SD v rámci dne	SD v rámci cyklu	SD v rámci laboratoře (celkem)
ARMORED	6	5,95	0,17	0,13	0,10	0,17
	5	4,87	0,20	0,14	0,12	0,20
	3	2,89	0,19	0,17	0,17	0,19
ACROMETRIX	4,4	4,45	0,12	0,10	0,08	0,13
	3,4	3,45	0,12	0,12	0,11	0,13
	2,4	2,41	0,17	0,15	0,15	0,17
	1,4	1,40	0,26	0,25	0,25	0,24

Reprodukovatelnost mezi šaržemi

Reprodukovatelnost mezi šaržemi u analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byla stanovena za použití tří různých šarží klíčových činidel-lýzového pufru NeuMoDx Lysis Buffer 3, extrakční destičky NeuMoDx Extraction Plate a testovacích pásků NeuMoDx HCV Quant Test Strip. K hodnocení účinnosti byl použit 7prvkový panel HCV (zahrnující jak HCV Armored RNA, tak AcroMetrix HCV Control). Testování bylo provedeno za použití tří šarží reagensů na třech soustavách po dobu 6 dnů. Byla zkoumána variace v rámci jedné šarže a mezi šaržemi a výsledky jsou prezentovány v *tabulce 12*. Maximální celková odchylka byla 0,24 log₁₀ IU/ml a celková maximální SD byla 0,33 log₁₀ IU/ml. Mezi šaržemi nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v účinnosti, jelikož stanovitelnost všech prvků panelu byla v mezích specifikované tolerance.

Tabulka 12. Reprodukovatelnost mezi šaržemi — analýza NeuMoDx HCV Quant Assay

	Cílová konc. [log ₁₀ IU/ml]	Střední konc. CELKEM [log ₁₀ IU/ml]	n (Platné výsledky pro šarži)	ABS. ODCHYLKA	SD mezi šaržemi	SD v rámci jedné šarže	Celková SD
ARMORED	6	5,76	36	0,24	0,35	0,13	0,37
	5	4,84	36	0,16	0,16	0,22	0,27
	3	2,81	36	0,19	0,31	0,16	0,35
ACROMETRIX	4,4	4,35	36	0,05	0,21	0,11	0,24
	3,4	3,31	36	0,09	0,17	0,11	0,20
	2,4	2,33	36	0,07	0,24	0,13	0,27
	1,4	1,38	36	0,02	0,23	0,13	0,33

Účinnost kontroly

Analýza NeuMoDx HCV Quant Assay obsahuje SPC2, která má ohlásit selhání jakéhokoli kroku zpracování nebo inhibici ovlivňující výkon analýzy. Účinnost byla testována za podmínek reprezentativních pro kritická selhání zpracování, ke kterým by během zpracování vzorku mohlo teoreticky dojít a která by *nemusela být odhalena čidly*, která výkon soustavy NeuMoDx System monitorují. Pozitivní (3 log₁₀ IU/ml) a negativní vzorky se musely za přítomnosti kontroly vypořádat s následujícími podmínkami: přítomností inhibitoru, absencí nedodaného promývacího činidla a absencí propláchnutí. Neúčinnost postupu, která měla na detekci/stanovitelnost HCV neblahý vliv, se odrazila v účinnosti cílové SPC2, jak znázorňuje *tabulka 13*. Ve všech testovaných případech bylo prokázáno, že buď kontrola zpracování vzorků dostatečně monitorovala neúčinnost procesu a přítomnost inhibitorů, nebo neblahý vliv předpokládané neúčinnosti procesu na detekci SPC2 ani na detekci a stanovitelnost HCV nebyl významný. Tudíž efektivní monitoring účinnosti analýzy na soustavě NeuMoDx System kontrolou SPC2 byl s úspěchem prokázán.

Tabulka 13. Účinnost kontroly zpracování vzorků

Testovaná selhání kroků zpracování	Stav amplifikace kontroly zpracování vzorků	Stav aplifikace cílového HCV	Výsledek analýzy
Presence of Inhibitor (Přítomnost inhibitoru)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Delivered (Promytí nebylo dodáno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Not Amplified (Není amplifikováno)	Unresolved (Nerozlišeno)
No Wash Blowout (Bez pročištění)	Amplified (Amplifikováno)	Amplified (Amplifikováno)	Positive (Pozitivní) se stanovitelností do 0,3 Log ₁₀ IU/ml kontroly

Míra platných výsledků

Ke stanovení podílu platných výsledků bylo použito retrospektivní analýzy dat získaných při hodnocení účinnosti analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay na soustavách NeuMoDx System. Platné výsledky testu budou nazvány Positive (Pozitivní) nebo Negative (Negativní); neplatné výsledky testu mohou být oznámeny buď jako Indeterminate (IND, Neurčitě) nebo jako Unresolved (UNR, Nerozlišeno) na základě stavu amplifikace cíle a kontroly zpracování vzorku. Oznámení výsledku IND je obvykle způsobeno chybou přístroje, která vede k selhání amplifikace cíle a/nebo vnitřní kontroly zpracování. Oznámení výsledku UNR se připisuje vzorkům, kdy amplifikace jak cíle, tak vnitřní kontroly zpracování selže při absenci detekovaného selhání přístroje. Retrospektivní analýza, zahrnující údaje získané jak ze vzorků séra, tak z plazmy na obou soustavách NeuMoDx 288 a NeuMoDx 96 System, zahrnovala 1 962 individuálních výsledků analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay. Poměr výsledků UNR byl stanoven jako 0,61% (12/1962) a poměr výsledků IND byl stanoven jako 0,41% (8/1962); tím jsou splněna kritéria přijatelnosti analýzy. Podíl platných výsledků analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay napříč klinickými matricemi a soustavami NeuMoDx System byl tudíž uzavřen na 99,0 % při 95% CI (98,4–99,3).

Křížová kontaminace

Míra křížové kontaminace analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byla stanovena testováním tří sad vzorků HCV, kde se střídaly vzorky vysoce pozitivní a negativní. Celkem bylo testováno 144 replikátů HCV negativních lidských vzorků a 144 replikátů HCV vzorku s vysokým titrem při 8,2 Log₁₀ IU/ml. Všechny 144 replikátů negativního vzorku bylo negativních, což je důkazem, že během zpracování vzorku na soustavě NeuMoDx System k žádné zkřížené kontaminaci nedošlo.

Ekvivalence matrice vzorků

Bylo provedeno testování k prokázání ekvivalence matrice vzorků mezi plnou krví odebranou jak v odběrných zkumavkách s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA), tak ve zkumavkách s kyselinou-citrátem-dextrózou (Acid Citrate Dextrose, ACD) pro přípravu plazmy. Pro stanovení ekvivalence mezi čerstvými a zmrazenými vzorky plazmy (odebraných do dvou typů zkumavek), a také mezi čerstvými a zmrazenými vzorky séra bylo provedeno další testování. Čerstvé vzorky byly uchovávány při 4 °C, dokud nebyly obohaceny čtyřmi hladinami HCV a otestovány na ekvivalenci. Vzorky byly dále zmrazeny při -20 °C po dobu minimálně 24 hodin. Po této době skladování v mrazu byly vzorky rozmrazeny a znovu testovány. Regresní analýzou byla u výsledků mezi čerstvými a zmrazenými vzorky, a také mezi EDTA a ACD vzorky plazmy porovnána ekvivalence. Tyto údaje vykazaly vynikající ekvivalenci mezi EDTA a ACD vzorky plazmy, čerstvými a zmrazenými vzorky plazmy a mezi čerstvými a zmrazenými vzorky séra.

Bylo provedeno další testování, aby se prokázala ekvivalence analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay u primárních vzorků proti sekundárním vzorkům. Panely HCV negativních dárcovských vzorků obohacených o cílový HCV (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) a HCV pozitivních dárcovských vzorků byly nejprve zpracovány z primárních zkumavek se vzorkem. Po zpracování primárních zkumavek byla zbývající plazma nebo sérum z každého vzorku rozdělena do sekundární zkumavky se vzorkem a znovu zpracována. Nebyl nalezen žádný významný rozdíl v uváděných výsledcích mezi zpracováním v primární a sekundární zkumavce se vzorkem.

Srovnání klinickou metodou

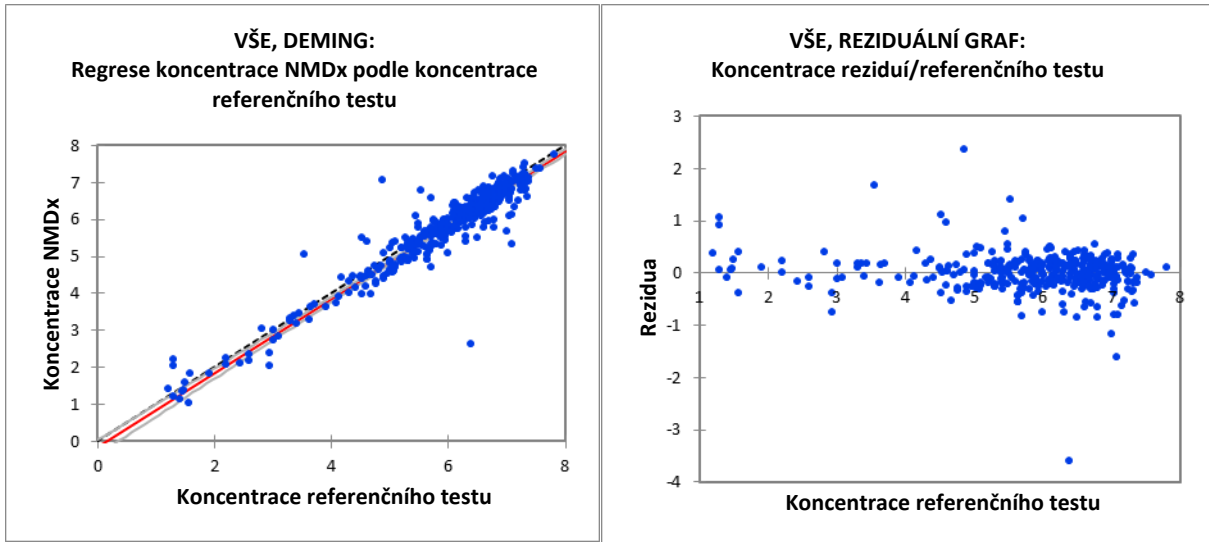
Kvalitativní a kvantitativní účinnost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byly hodnoceny ve srovnání s analýzami komparátorů schválenými úřadem FDA/s označením CE testováním nezřetězených klinických vzorků od pacientů infikovaných virem HCV. Testování interně provedla společnost NeuMoDx prostřednictvím jednoduše zaslepené studie anonymizovaných, reziduálních klinických vzorků získaných od šesti nezávislých referenčních laboratoří. Za použití analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay bylo na několika soustavách NeuMoDx Molecular System jednoduše zaslepeným způsobem zpracováno celkem 323 vzorků plazmy a 336 vzorků séra. Z těchto vzorků bylo 35 vzorků plazmy a 13 vzorků séra zpracováno na OBOU molekulárních soustavách NeuMoDx 288 Molecular System i NeuMoDx 96 Molecular System. Některé ze vzorků, jejichž výsledek byl NEPLATNÝ, nemohly být zpracovány znovu kvůli nedostupnosti dostačujícího vzorku.

Chyby zpracování a soustavy získané napříč soustavami NeuMoDx Molecular System byly minimální a splnily kritéria. Nejprve byly ze vzorků plazmy získány celkem 4 indeterminate (IND; Neurčitý), výsledky a 4 IND výsledky byly získány ze vzorků séra, v důsledku čehož byla celková míra počátečních IND výsledků u plazmy stanovena na 1 % (CI 95 % 0,5 %–3 %) a u séra 1 % (CI 95 % 0,4 %–3 %). Nejprve byly ze vzorků plazmy získány celkem 3 UNRESOLVED (UNR, Nerozlišeno) výsledky a 5 UNR výsledků bylo získáno ze vzorků séra, což přineslo celkovou míru 1 % (CI 95 % 0,2 %–3 %) u plazmy a 1 % (CI 95 % 0,6 %–4 %) u séra.

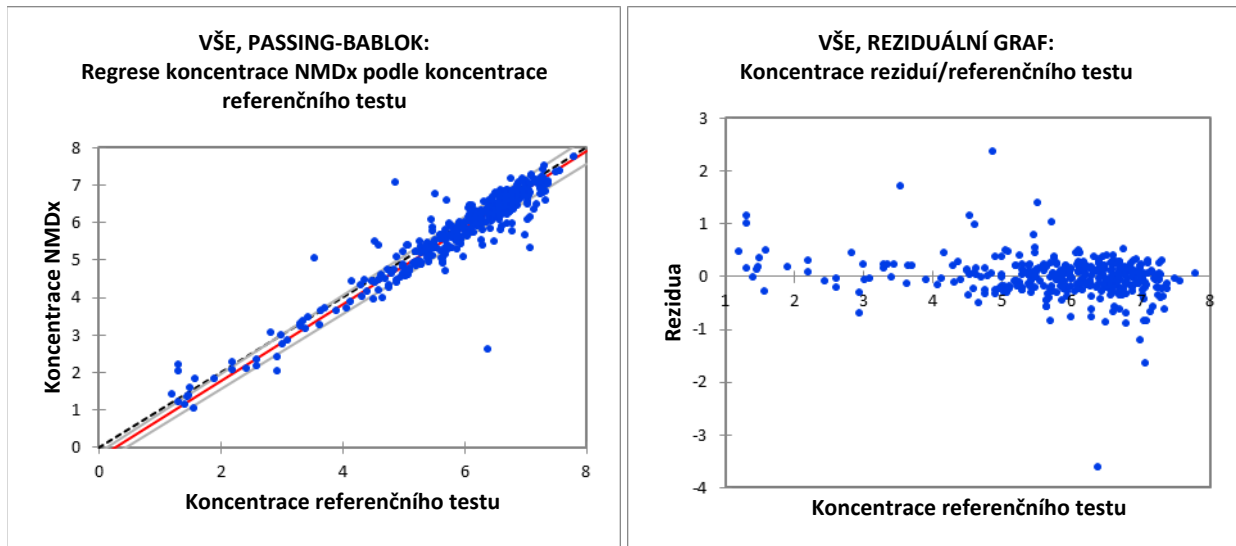
Vzorky, které přinesly neplatné výsledky (IND/UNR) nebo „kvantifikační chybu“, byly testovány opakovaně, když zůstal dostatečný objem; některé vzorky byly zředěny, aby přinesly platné výsledky. Platný výsledek byl získán u 13 vzorků, jejichž objem byl k opakování dostatečný (rozředitelných NEBO čistých).

Z 321 platných výsledků získaných ze vzorků plazmy a 334 platných výsledků získaných ze vzorků séra bylo 206 vzorků plazmy a 154 vzorků séra oznámeno analýzou NeuMoDx HCV Quant Assay jako POZITIVNÍCH s odpovídajícími hodnotami koncentrace přidělenými referenčními testy. Ke korelaci mezi hodnotami koncentrace z analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay a hodnotami udávanými referenčními testy pro vzorky plazmy a séra byly použity regresní analytické metody podle Deminga a Passinga-Babloka.

Pro znázornění korelace mezi koncentracemi analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay a hodnotami koncentrace referenčních testů u všech vzorků testovaných za pomoci metod podle Deminga a Passinga-Babloka byly vytvořeny grafy ekvivalence, které jsou uvedeny na *obrázku 7* a *obrázku 8*. Kvalita Demingovy regresní metody je ilustrována koeficientem směrnice 1,00 s 95% CI (0,97, 1,03) a průsečíkem (odchylkou) -0,16 s 95% CI (-0,37, 0,06), což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx HCV Quant Assay a referenčními testy jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou. Kvalita Passingovy-Bablokovy lineární metody je ilustrována koeficientem směrnice 1,02 s 95% CI (0,99, 1,05) a průsečíkem (odchylkou) -0,28 s 95% CI (-0,43, -0,14), což dokazuje, že výsledky koncentrace získané mezi analýzou NeuMoDx HCV Quant Assay a referenčními testy jsou víceméně stejné a s přijatelnou odchylkou, tak jak ukazuje *tabulka 14*.



Obrázek 7: Graf ekvivalence (vlevo) a reziduální graf (vpravo) – kumulativní analýza (napříč oběma soustavami NeuMoDx System) výsledků analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay ve srovnání s výsledky referenčních testů u VŠECH vzorků na základě Demingovy regresní analýzy.



Obrázek 8: Graf ekvivalence (vlevo) a reziduální graf (vpravo) – kumulativní analýza (napříč oběma soustavami NeuMoDx System) výsledků analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay ve srovnání s výsledky referenčních testů u VŠECH vzorků na základě Passingovy-Bablokovy regresní analýzy.

Tabulka 14. Shrnutí lineární regresní analýzy Demingovou a Passingovou-Bablokovou metodou

	Analýza Demingovou metodou		Analýza metodou Passing-Bablok	
	Průsečík	Koeficient směrnice	Průsečík	Koeficient směrnice
KUMULATIVNÍ (všechna plazma a sérum)	- 0,16 CI 95 % (-0,37, 0,06)	1,00 CI 95 % (0,97, 1,03)	- 0,28 CI 95 % (-0,43, -0,14)	1,02 CI 95 % (0,99, 1,05)

Z 655 platných výsledků získaných ze vzorků plazmy a séra bylo za použití analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay 361 výsledku referenčními testy pro HCV oznámeno jako pozitivních a 294 oznámeno jako negativních. Citlivost a specifčnost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byly vypočítány za použití údajů ze všech platných klinických vzorků porovnaných s referenčním testem, které jsou zpracovány a uvedeny v *tabulce 15*. 360 vzorků z 361 testovaných pozitivně bylo oznámeno jako pozitivní také analýzou NeuMoDx HCV Quant Assay, což dokazuje citlivost 99,7 % s 95% CI (98,2 % – 100 %). 271 vzorků z 294 testovaných negativně bylo ohlášeno jako negativní také analýzou NeuMoDx HCV Quant Assay, což dokazuje specifčnost 92,2 % s CI 95 % (88,3 %-94,9 %).

Ekvivalence analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay byla prokázána víceméně stejnými výsledky účinnosti analýzy mezi molekulární soustavou NeuMoDx 288 Molecular System, molekulární soustavou NeuMoDx 96 Molecular System a referenčním testem jak u vzorků plazmy, tak u vzorků séra.

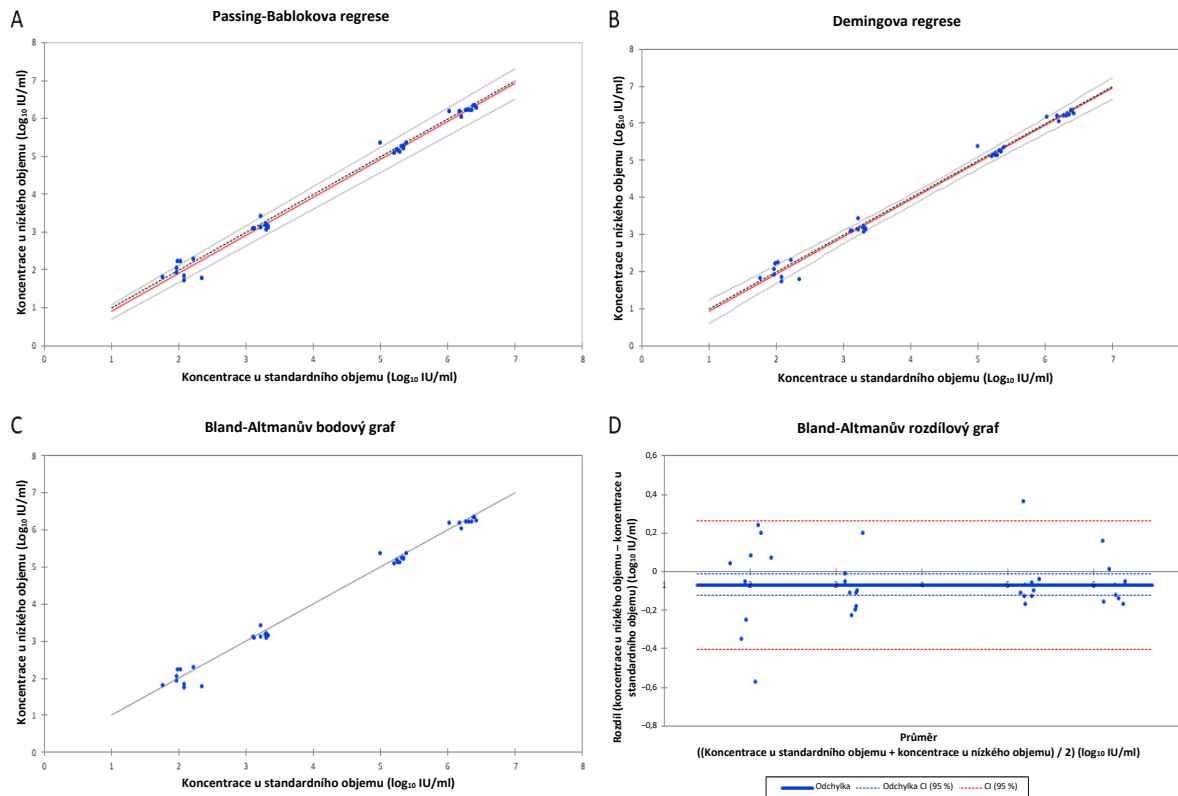
Tabulka 15. Výsledky srovnání analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay a referenčních testů kvalitativní metodou – plazma a sérum

	Referenční analýza (POZ.)	Referenční analýza (NEG.)	CELKEM
NeuMoDx HCV Quant Assay (POZ)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
CELKEM	361	294	655
CITLIVOST = 99,7% 95% CI (98,2%–100 %) *SPECIFICITA = 92,2 % CI 95 % (88,3 % - 94,9 %)			

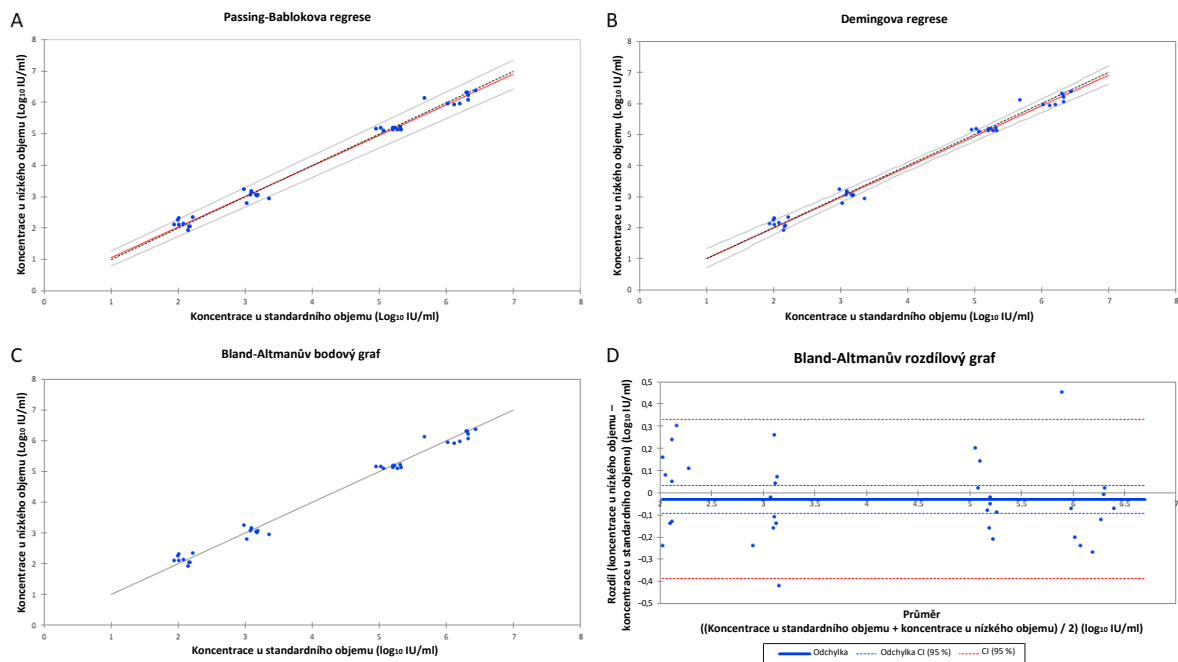
***POZNÁMKA:** *LLoQ pro analýzu NeuMoDx HCV Quant Assay je 0,9 Log₁₀ IU/ml, což je nižší než u analýzy komparátoru jako referenčního testu. Následná analýza byla provedena bez 9 vzorků, kde NeuMoDx detekoval HCV, ale které byly analýzou komparátoru označeny jako negativní. S vyloučením těchto 9 vzorků byla specifčnost analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay přepočítána na 95,1 % s CI 95 % (91,7–97,2).*

Testování uměle připravených vzorků – pracovní postup pro objem vzorku 200 µl

Kvantitativní korelace mezi pracovními postupy pro objem vzorku 200 µl a 550 µl byla potvrzena pomocí panelu sestávajícího z jednotlivých vzorků HCV negativní plazmy a séra obohacených čtyřmi známými hladinami kontrolního HCV materiálu Accuplex, navázaného na 5. mezinárodní standard WHO pro RNA HCV pro testování nukleových kyselin. Tyto jednotlivé vzorky plazmy a séra byly zpracovány pomocí pracovních postupů pro objem vzorku 550 µl i 200 µl u celkem 324 provedených testů. Porovnání ekvivalence mezi koncentrací hlášenou softwarem NeuMoDx pro pracovní postupy pro objem vzorku 200 µl a 550 µl s uměle vytvořeným panelem byly provedeny na základě individuálních vzorků. Demingova a Passing-Bablokova regresní analýza měla směrnici 1,003 a 1,000 s průsečíky -0,082 a -0,085, v daném pořadí, u plazmy, a 0,974 a 0,984 s průsečíky 0,086 a 0,037, v daném pořadí, u séra, což ukazuje vynikající shodu kvantifikace HCV mezi těmito dvěma objemy zpracování. Porovnání podle Blanda a Altmana ukázalo minimální odchylku mezi těmito dvěma pracovními postupy. Navíc jednoduché lineární regresní analýzy s očekávanou koncentrací a hlášenou koncentrací pro pracovní postup pro 200 µl měly směrnici 1,0432 a korelační koeficient 0,994 (plazma) a 1,0007 a 0,993 (sérum), což dále podporuje vynikající účinnost s použitím pracovního postupu pro objem vzorku 200 µl u analýzy NeuMoDx HCV Quant Assay. Výsledky těchto měření jsou shrnuty níže na *obrázku 9 a obrázku 10*.



Obrázek 9: Srovnání grafu ekvivalence – hlášené koncentrace pro pracovní postup s objemem vzorku 200 μl a hlášené koncentrace pro pracovní postup s objemem vzorku 550 μl . A) Passing-Bablokova regrese. B) Demingova regrese. C) Bland-Altmanův bodový graf D) Bland-Altmanův rozdílový graf – vzorky plazmy



Obrázek 10: Srovnání grafu ekvivalence – hlášené koncentrace pro pracovní postup s objemem vzorku 200 μl a hlášené koncentrace pro pracovní postup s objemem vzorku 550 μl . A) Passing-Bablokova regrese. B) Demingova regrese. C) Blandův-Altmanův bodový graf

D) Blandův-Altmanův rozdílový graf – vzorky séra

REFERENCE














1. Rachel H. Westbrook, Geoffrey Dusheiko. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology Update: Hepatitis C*, Volume 61, Issue 1, Supplement, November 2014, Pgs S58-S68.
2. Annual Epidemiological Report for 2016, Hepatitis C, European Centre for Disease Prevention and Control. *Hepatitis C*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018. (<https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/pdfs/2016HepSurveillanceRpt.pdf>)
3. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2: 161–76.
4. Surveillance for Viral Hepatitis – United States, 2016, CDC. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/index.htm>
5. Diagnosis and management of hepatitis C virus-infected children. Javeri R. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2011;30(11):983 – 985.
6. American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) and Infectious Disease Society of America (IDSA), HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C, Sept 21, 2017. (www.hcvguidelines.org)
7. Centers for Disease Control (CDC), Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians Recommendations and Reports MMWR / Vol. 62 / May 7, 2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014

OCHRANNÉ ZNÁMKY

NeuMoDx™ a NeuDry™ jsou ochranné známky společnosti NeuMoDx Molecular, Inc.
 AcroMetrix™ je ochranná známka společnosti Thermo Fisher Scientific.
 Armored RNA® je registrovaná obchodní značka společnosti Asuragen, Inc.
 BD Vacutainer® je registrovaná ochranná známka společnosti Becton, Dickinson and Company.
 BD, PPT™ a SST™ jsou ochranné známky společnosti Becton, Dickinson and Company.
 TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

Všechny ostatní názvy produktů, ochranné známky a registrované ochranné známky, které se mohou objevit v tomto dokumentu, jsou majetkem příslušných vlastníků.

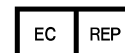
LEGENDA K SYMBOLŮM

R only	Pouze na lékařský předpis		Omezení teploty
	Výrobce		Nepoužívejte opakovaně
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku <i>in vitro</i>		Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství		Prostudujte si návod k použití
	Katalogové číslo		Upozornění
	Číslo šarže		Biologická rizika
	Datum spotřeby		Značka CE



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

Zadavatel (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



Technická podpora / vigilanční hlášení: support@qiagen.com

Patent: www.neumodx.com/patents