

REF 300300 NeuMoDx™ HCV Quant Test Strip
R only

ATENȚIE: Doar pentru export din S.U.A.

IVD A se utiliza pentru diagnosticarea *in vitro* cu NeuMoDx 288 și NeuMoDx 96 Molecular System

 Pentru actualizări ale prospectului, accesați: www.qiagen.com/neumodx-ifu

Pentru instrucțiuni detaliate, consultați Manualul de operare NeuMoDx 288 Molecular System; Nr.P. 40600108

Pentru instrucțiuni detaliate, consultați Manualul de operare NeuMoDx 96 Molecular System; Nr.P. 40600317

DOMENIUL DE UTILIZARE

NeuMoDx HCV Quant Assay este o testare automată, *in vitro* de amplificare a acidului nucleic, pentru cuantificarea ARN-ului virusului hepatitei C (hepatitis C virus, HCV) în eșantioanele de plasmă și ser umane pentru genotipurile 1 până la 6 pozitive la anticorpi pentru HCV la indivizii infectați cu HCV. Analiza NeuMoDx HCV Quant Assay aplicată pe NeuMoDx 288 Molecular System și NeuMoDx 96 Molecular System (sistemele NeuMoDx System) încorporează extracția automatizată a ARN-ului pentru a izola acidul nucleic țintă de eșantion, și reacția de polimerizare în lanț revers-transcriptază în timp real (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) pentru a viza secvențele puternic conservate în genomul viral al hepatitei C.

NeuMoDx HCV Quant Assay este destinat utilizării ca ajutor în gestionarea pacienților cu infecții cu HCV. Rezultatele obținute de la NeuMoDx HCV Quant Assay trebuie interpretate în contextul tuturor concluziilor clinice și de laborator relevante. NeuMoDx HCV Quant Assay nu este destinat utilizării ca testare de screening pentru sânge sau produse pe bază de sânge sau pentru diagnosticarea stării clinice a infecției cu HCV.

REZUMAT ȘI EXPLICAȚII

Sângele integral uman recoltat în eprubete sterile de recoltare a sângelui, care conțin acid etilendiaminetetraacetic (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) sau acid-citrat-dextroză (Acid Citrate-Dextrose, ACD) ca agenți de anticoagulare sau în eprubete pentru pregătirea plasmei (Plasma Preparation Tubes, PPT) poate fi folosit pentru pregătirea plasmei, în timp ce serul trebuie recoltat în eprubete pentru ser sau în eprubete pentru separarea serului (Serum Separation Tubes, SST). Pentru pregătirea pentru testare, plasma sau serul dintr-o eprubetă secundară pentru eșantioane sau sângele fracționat într-o eprubetă primară pentru eșantioane compatibilă cu NeuMoDx System este încărcat(ă) pe NeuMoDx System utilizând un suport dedicat de eprubete pentru eșantioane. Pentru fiecare eșantion, o parte alicotă de probă plasmatică/serică este amestecată cu NeuMoDx Lysis Buffer 3, iar NeuMoDx System parcurge automat toate etapele necesare pentru extracția acidului nucleic țintă, pregătește ARN-ul izolat pentru amplificare RT-PCR în timp real și, dacă aceștia sunt prezenți, amplifică și detectează produșii de amplificare. NeuMoDx HCV Quant Assay vizează două regiuni puternic conservate din genomul HCV pentru a crește soliditatea analizei. NeuMoDx HCV Quant Assay include, de asemenea, o substanță de control pentru procesarea probei de ARN (Sample Process Control, SPC2), care să ajute la monitorizarea prezenței unor substanțe potențial inhibitoare, precum și a erorilor NeuMoDx System sau de reactiv, care pot fi întâlnite în timpul proceselor de extracție și amplificare.

HCV este un virus ARN cu o singură tulpină, în sens pozitiv, capabil să cauzeze infecții acute și cronice.¹ În prezent nu există niciun vaccin pentru hepatita C. Deși infecția acută este, de obicei, asimptomatică și foarte rar asociată cu boala care pune viața în pericol, mai mult de jumătate din persoanele infectate cu HCV pot dezvolta infecții cronice. Dintre cei cu infecție cronică cu HCV, riscul de ciroză hepatică este cuprins între 15-30% în 20 de ani. La nivel global, aproximativ 71 de milioane de persoane sunt suspectate a avea infecție cronică cu HCV, cu un număr semnificativ al celor pentru care se preconizează a dezvolta ciroză sau cancer hepatic.²⁻⁴ Fiind un virus transmis prin sânge, HCV a fost transmis în principal prin sânge și produse pe bază de sânge. Adoptarea pe scară largă a testărilor de screening sanguin a redus considerabil incidența infecțiilor din sângele donat.¹

Detecția anticorpilor pentru HCV nu diferențiază între infecțiile active și cele eliminate. În consecință, algoritmi de testare HCV în laborator necesită diagnosticarea infecțiilor cu HCV active la indivizii pozitivi la anticorpi, prin detecția ARN-ului HCV în plasmă sau ser înainte de inițierea tratamentului (dacă este necesar). Cuantificarea ARN-ului HCV (încărcătura virală) este utilizată acum în mod obișnuit în definirea și monitorizarea unui tratament reușit pentru HCV.

Orientările actuale pentru gestionarea și tratamentul infecțiilor cu HCV recomandă testarea cantitativă a ARN-ului HCV înainte de începerea tratamentului antiviral pentru a stabili linia de bază, și după cel puțin 12 săptămâni de la terminarea tratamentului. Uneori pot fi recomandate momente în timp suplimentare. Răspunsul virologic susținut (Sustained Virological Response, SVR) este scopul tratamentului pentru HCV și definit ca ARN HCV nedetectabil (cu o analiză care are o limită de detecție < 25 UI/ml) după tratament.⁵⁻⁷ Orientările recente elaborate de Asociația Americană pentru Studiul Bolilor Ficatului (American Association for the Study of Liver Diseases) sugerează testarea ARN-ului HCV nu doar la linia de bază, ci și periodic în timpul tratamentului (adică la 4 săptămâni) și la 12 săptămâni după terminarea tratamentului. Testările pentru detecția ARN-ului HCV, împreună cu testările serologice, sunt utilizate pentru identificarea unei infecții cu HCV active.⁶

PRINCIPIILE PROCEDURII

Analiza NeuMoDx HCV Quant Assay combină extracția automatizată a ARN-ului, amplificarea și detecția prin RT-PCR în timp real. Eșantioanele de sânge integral sunt recoltate în eprubete cu EDTA, ACD sau PPT pentru pregătirea plasmei și/sau în eprubete SST pentru pregătirea serului. Eșantionul primar de sânge (fracționat) sau o parte alicotă de plasmă/ser într-o eprubetă secundară pentru eșantioane compatibilă este codificat(ă) cu cod de bare și amplasat(ă) pe NeuMoDx System. NeuMoDx System aspiră automat o parte alicotă din plasmă/ser pentru a o amesteca cu NeuMoDx Lysis Buffer 3 și cu agenții incluși în NeuMoDx Extraction Plate, pentru începerea procesării. NeuMoDx System automatizează și integrează extracția și concentrarea ARN-ului, pregătirea reactivilor, precum și amplificarea/detecția acidului nucleic aferente secvențelor țintă, utilizând RT-PCR în timp real. Substanța de control pentru procesarea probei (Sample Process Control, SPC2) inclusă ajută la monitorizarea prezenței substanțelor inhibitoare, precum și a erorilor de sistem, de proces sau de reactiv. După încărcarea eșantionului pe NeuMoDx System nu mai este necesară intervenția operatorului.

NeuMoDx System utilizează o combinație de căldură, enzimă litică și reactivi de extracție pentru a efectua automat liza, extracția ARN-ului și eliminarea inhibitorilor. Acizii nucleici degajați sunt captați de particule paramagnetice. Particulele, împreună cu acidul nucleic legat, sunt încărcate în NeuMoDx Cartridge, unde elementele nelegate sunt spălate cu NeuMoDx Wash Reagent. ARN-ul legat este apoi eluat folosind NeuMoDx Release Reagent. NeuMoDx System utilizează ARN-ul eluat pentru rehidratarea reactivilor brevetați de amplificare NeuDry™, care conțin toate elementele necesare pentru amplificarea țintelor HCV și SPC2. Acest proces permite amplificarea și detecția simultană a ambelor secvențe ale țintei și ale ARN-ului substanței de control. La reconstituirea reactivilor RT-PCR deshidratați, NeuMoDx System distribuie amestecul pregătit compatibil cu RT-PCR într-o cameră PCR (pe eșantion) a NeuMoDx Cartridge. Revers-transcrierea, amplificarea și detecția secvențelor substanței de control și ale țintei (dacă există) au loc în camera PCR. NeuMoDx Cartridge este conceput pentru a îngloba ampliconul după PCR, eliminând practic riscul contaminării post-amplificare.

Țintele amplificate sunt detectate în timp real, utilizând chimia sondei de hidroliză (denumită în mod popular drept chimie TaqMan®) cu molecule depistate cu sonda de testare fluorogenică specifică oligonucleotidelor, specifică ampliconilor țintelor respective. Sondele TaqMan constau în fluorofor legat covalent de capătul 5' al tulpinii sondei specifice oligonucleotidelor și într-o substanță extintoare de fosforescență la capătul 3'. Deși sonda este intactă, fluoroforul și substanța extintoare de fosforescență sunt în apropiere, ceea ce face ca molecula de substanță extintoare de fosforescență să suprimă fluorescența emisă de fluorofor prin transfer de energie Förster rezonantă (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Sondele TaqMan sunt destinate temperaturii într-o regiune ADN amplificată printr-un set specific de soluții de amorsare. Pe măsură ce Taq ADN-polimeraza extinde soluția de amorsare și sintetizează noua tulpină, activitatea exonucleazică 5'-3' a Taq ADN-polimerazei degradează sonda care a fost temperată la șablon. Degradarea sondei degajă fluorofor și își întrerupe proximitatea față de substanța extintoare de fosforescență, astfel prevenind efectul de temperare cauzat de FRET și permițând detecția fluoroforului. Semnalul fluorescent rezultat, detectat în ciclul termic pentru RT-PCR cantitativ NeuMoDx System este direct proporțional cu fluoroforul degajat și poate fi corelat cu cantitatea prezentă de țintă.

O sondă TaqMan etichetată cu un fluorofor (Excitație: 490 nm și Emisie: 521 nm) la capătul 5', și o substanță extintoare de fosforescență de culoare închisă la capătul 3', este utilizată pentru detecția ARN-ului HCV. Pentru detecția SPC2, sonda TaqMan este etichetată cu o vopsea fluorescentă alternativă (Excitație: 535 nm și Emisie: 556 nm) la capătul 5', și o substanță extintoare de fosforescență de culoare închisă la capătul 3'. Software-ul sistemului NeuMoDx System monitorizează semnalul fluorescent emis de sondele TaqMan la sfârșitul fiecărui ciclu de amplificare. Când amplificarea este completă, software-ul NeuMoDx System analizează datele și raportează un rezultat final (POSITIVE (POZITIV)/NEGATIVE (NEGATIV)/INDETERMINATE (NECONCLUDENT)/UNRESOLVED (NEREZOLVAT)/NO RESULT (NICIUN REZULTAT)). Dacă un rezultat este pozitiv și concentrația calculată este în limitele de cuantificare, software-ul NeuMoDx System oferă, de asemenea, o valoare cantitativă asociată cu proba.

REACTIVI/CONSUMABILE

Materiale furnizate

REF	Conținut	Unități per pachet	Testări pe unitate	Teste per pachet
300300	NeuMoDx HCV Quant Test Strip <i>Reactivi RT-PCR deshidratați, care conțin sonde și soluții de amorsare TaqMan specifice HCV și SPC2</i>	6	16	96

Materiale necesare, dar nefurnizate (disponibile separat de la NeuMoDx)

REF	Conținut
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Particule paramagnetice deshidratate, enzimă litică și substanțe de control pentru procesarea probei</i>
800200 sau 800202	NeuMoDx HCV Calibrators <i>Seturi de unică folosință de calibratoare puternice și slabe pentru HCV, pentru a stabili validitatea curbei de calibrare</i>
900201 sau 900202	NeuMoDx HCV External Controls <i>Seturi de unică folosință de substanțe de control pozitive și negative pentru HCV</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hamilton CO-RE/CO-RE II Tips (300 µL) with Filters
235905	Hamilton CO-RE/CO-RE II Tips (1000 µL) with Filters

Instrumentar necesar

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] sau NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]



AVERTISMENTE ȘI PRECAUȚII

- NeuMoDx HCV Quant Test Strip este destinat exclusiv diagnosticării *in vitro* cu sistemele NeuMoDx System.
- Nu utilizați reactivii sau consumabilele după data de expirare menționată.
- Nu utilizați reactivi în cazul în care sigiliul de siguranță este rupt sau dacă ambalajul este deteriorat la sosire.
- Nu utilizați consumabilele sau reactivii dacă punga de protecție este deschisă sau ruptă la sosire.
- Înainte ca rezultatele testării să poată fi generate pentru probele clinice trebuie să fie disponibilă o calibrare validă a testării (generată prin procesarea calibratoarelor puternice și slabe din calibratoarele NeuMoDx HCV Calibrator).
- NeuMoDx HCV External Controls trebuie procesate la fiecare 24 de ore pe parcursul testării cu NeuMoDx HCV Quant Assay.
- Volumul minim al eșantionului de părți alicote secundare depinde de dimensiunea eprubetei, de suportul de eprubete pentru eșantioane și de procesarea volumului eșantionului, conform definiției de mai jos. Un volum mai mic decât minimul specificat poate duce la o eroare „Quantity Not Sufficient” (Cantitate insuficientă).
- Utilizarea eșantioanelor depozitate la temperaturi improprie sau în afara timpilor de depozitare specificați poate produce rezultate nevalide sau eronate.
- Evitați în permanență contaminarea microbiană și ribonucleazică (RNază) a tuturor reactivilor și consumabilelor. La utilizarea eprubetelor secundare pentru eșantioane, se recomandă folosirea pipetelor de transfer sterile de unică folosință, fără RNază. Utilizați câte o pipetă nouă pentru fiecare eșantion.
- Pentru a evita contaminarea nu manipulați și nu desfaceți niciun cartuș NeuMoDx Cartridge după amplificarea. În niciun caz nu recuperați cartușele NeuMoDx Cartridge din recipientul pentru deșeuri biopericuloase (NeuMoDx 288 Molecular System) sau din coșul de gunoi pentru deșeuri biopericuloase (NeuMoDx 96 Molecular System). NeuMoDx Cartridge este conceput pentru a preveni contaminarea.
- În cazurile în care testările PCR cu eprubete deschise sunt realizate în laborator, aveți grijă să vă asigurați că NeuMoDx HCV Quant Test Strip, consumabilele și reactivii suplimentari necesari pentru testare, echipamentul individual de protecție, precum mănuși și halate de laborator, și the NeuMoDx System nu sunt contaminate.
- În timpul manipulării reactivilor și a consumabilelor NeuMoDx trebuie purtate mănuși curate din nitril, fără pulbere. Aveți grijă să nu atingeți suprafața superioară a NeuMoDx Cartridge, suprafața de etanșare cu folie a NeuMoDx HCV Quant Test Strip și NeuMoDx Extraction Plate, ori suprafața superioară a NeuMoDx Lysis Buffer 3; manipularea consumabilelor și a reactivilor trebuie făcută doar prin atingerea suprafețelor laterale.
- Fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) sunt puse la dispoziție pentru fiecare reactiv (după caz), la www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Spălați-vă bine pe mâini după efectuarea testării.
- Nu pipetați prin intermediul cavității bucale. Nu fumați, nu consumați băuturi sau alimente în zonele în care se manipulează eșantioane sau reactivi.
- Manipulați întotdeauna eșantioanele ca și cum ar fi infecțioase și în conformitate cu procedurile sigure de laborator, cum ar fi cele descrise în *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁸ și în Documentul CLSI M29-A4.⁹
- Eliminați reactivii nefolosiți și deșeurile în conformitate cu reglementările naționale, federale, regionale, statale și locale.
- A nu se reutiliza.



DEPOZITAREA, MANIPULAREA ȘI STABILITATEA PRODUSULUI

- Bandelele NeuMoDx HCV Quant Test Strip sunt stabile în ambalajul primar până la data de expirare menționată pe eticheta aplicată direct pe produs, dacă sunt depozitate la o temperatură cuprinsă între 4 și 28 °C.
- Nu utilizați consumabilele și reactivii după data de expirare menționată.
- Nu utilizați niciun produs de testare dacă ambalajul primar sau cel secundar a fost compromis vizual.
- Nu reîncărcați niciun produs de testare care a fost încărcat anterior pe un alt NeuMoDx System.
- Odată încărcată, NeuMoDx HCV Quant Test Strip poate rămâne pe NeuMoDx System timp de până la 14 zile. Termenul de valabilitate rămas al bandelelor de testare încărcate este urmărit de software și raportat utilizatorului în timp real. Eliminarea unei bandele de testare care a fost utilizată după perioada admisibilă va fi solicitată de sistem.

RECOLTAREA, TRANSPORTUL ȘI DEPOZITAREA EȘANTIOANELOR

1. Manipulați toate eșantioanele, calibratoarele și substanțele de control ca și cum ar fi capabile să transmită agenți infecțioși.
2. Nu congelați eșantioanele de sânge integral sau alte eșantioane depozitate în eprubete primare.

3. Pentru pregătirea eșantioanelor de plasmă, sângele integral trebuie recoltat în eprubete sterile, utilizând EDTA sau ACD drept anticoagulanți sau în eprubete pentru pregătirea plasmei (Plasma Preparation Tubes, PPT). Urmați instrucțiunile producătorului eprubetelor de recoltare a eșantioanelor pentru pregătire și depozitare.
 4. Pentru pregătirea eșantioanelor de ser, sângele integral trebuie recoltat în eprubete pentru ser sau în eprubete SST. Urmați instrucțiunile producătorului eprubetelor de recoltare a eșantioanelor pentru pregătire și depozitare.
 5. Eșantioanele pot fi testate în eprubete de recoltare primare sau în eprubete pentru eșantioane secundare. Recomandate pentru testarea în eprubete primare:
 - a. Eșantioane de plasmă: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD #368589) sau BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
 - b. Eșantioane de ser: BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) sau BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
 6. Eșantioanele pregătite pot fi depozitate pe NeuMoDx System timp de până la 8 ore înainte de procesare. Dacă este necesar un timp suplimentar de depozitare, se recomandă ca eșantioanele să fie refrigerate sau congelate în părți alicote secundare.
 7. Eșantioanele pregătite trebuie depozitate între 2 și 8 °C timp de maximum 7 zile înainte de testare și maximum 8 ore la temperatura camerei.
 8. Eșantioanele pregătite în eprubete secundare pot fi depozitate la ≤ -20 °C timp de până la 24 de săptămâni înainte de procesare; eșantioanele congelate nu trebuie supuse la mai mult de două (2) cicluri de congelare/decongelare înainte de utilizare.
 - a. Eșantioanele de plasmă care sunt congelate și care trec printr-un (1) ciclu de congelare/decongelare pot fi depozitate pe sistem timp de încă 8 ore.
 - b. Eșantioanele de plasmă care sunt congelate și care trec prin două (2) cicluri de congelare/decongelare nu trebuie depozitate pe sistem mai mult de 4 ore.
 - c. Eșantioanele de ser care sunt congelate și care trec prin unul (1) sau două (2) cicluri de congelare/decongelare trebuie testate imediat după decongelare.
 - d. Dacă probele sunt congelate, lăsați-le să se decongeleze complet la temperatura camerei (15-30 °C); vortexați pentru a genera o probă cu distribuție uniformă.
 - e. Nu se recomandă congelarea plasmei/serului în eprubete de recoltare primare.
 9. Dacă eșantioanele sunt expediate, acestea trebuie să fie ambalate și etichetate în conformitate cu reglementările naționale ale țării respective și/sau cu reglementările internaționale.
 10. Etichetați clar eșantioanele și indicați faptul că acestea sunt dedicate testării HCV.
 11. Accesați secțiunea *Pregătirea testării*.
- Procesul global de punere în aplicare a analizei NeuMoDx HCV Quant Assay este sintetizat mai jos, în *Figura 1*.

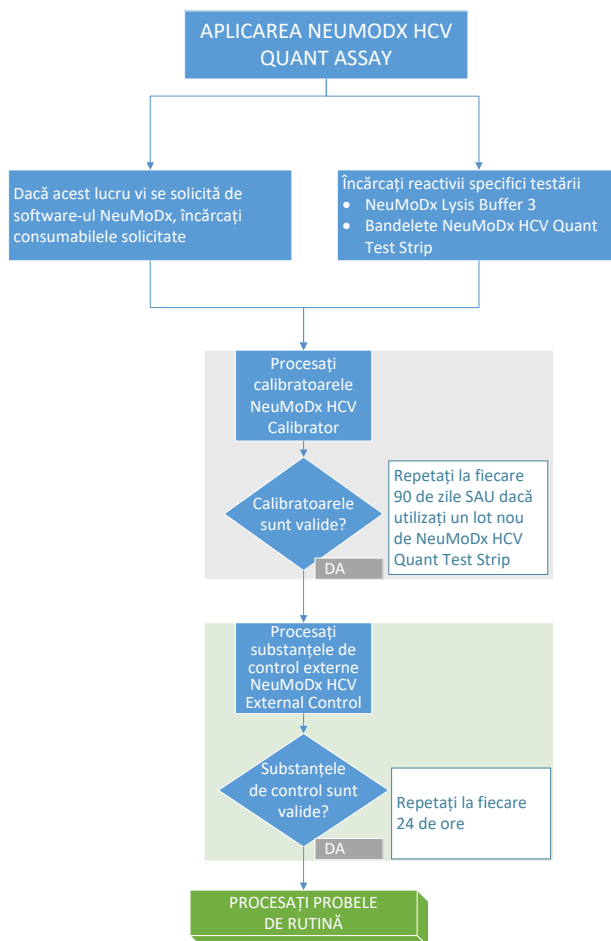


Figura 1: Flux de lucru pentru aplicarea NeuMoDx HCV Quant Assay

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Pregătirea testării

NeuMoDx HCV Quant Assay poate fi rulat direct din eprubetele primare de recoltare a sângelui sau din părți alicote ale eșantionului, în eprubete secundare. Procesarea poate fi rulată utilizând unul din două fluxuri de lucru pentru procesarea volumelor de eșantion – fluxul de lucru pentru un volum al eșantionului de 550 μ l sau fluxul de lucru pentru un volum al eșantionului de 200 μ l.

1. Aplicați eticheta cu cod de bare a eșantionului pe o eprubetă pentru eșantioane compatibile cu NeuMoDx System. Eprubeta primară de recoltare a sângelui poate fi etichetată și introdusă direct într-un suport de eprubete pentru eșantioane cu 32 de eprubete, după centrifugare, conform instrucțiunilor producătorului. Alternativ, o parte alicotă de plasmă poate fi transferată într-o eprubetă secundară pentru procesare pe NeuMoDx System.
2. Dacă efectuați testarea eșantionului în eprubeta principală de recoltare, amplasați eprubeta cu cod de bare într-un suport de eprubete pentru eșantioane și asigurați-vă că ați scos capacul înainte de încărcarea pe NeuMoDx System. Volumele minime **de deasupra** stratului leuco-trombocitar sunt definite mai jos și vor fi atinse dacă eșantioanele sunt recoltate și procesate în conformitate cu instrucțiunile producătorului de eprubete. Nu este garantată performanța pentru eșantioanele recoltate în mod necorespunzător.

Tip de eprubetă	Volum minim necesar eșantion	
	Flux de lucru 550 μ L	Flux de lucru 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/ser – 4,0 ml	1050 μ L	700 μ L
K ₂ EDTA/ser – 6,0 ml	1250 μ L	900 μ L
K ₂ EDTA/ser – 10,0 ml	1600 μ L	1250 μ L

3. Dacă utilizați o eprubetă secundară:
 - a. Vortexați ușor eșantionul pentru a obține o distribuție uniformă
 - b. Dacă utilizați o pipetă de transfer nouă pentru fiecare eșantion, transferați o parte alicotă de plasmă sau ser în eprubeta pentru eșantioane marcată cu cod de bare compatibilă cu NeuMoDx System, în funcție de volumele definite mai jos:

Suport de eprubete pentru eșantioane	Dimensiune eprubetă	Volum minim necesar eșantion	
		Flux de lucru 550 μ L	Flux de lucru 200 μ L
32-Tube Specimen Tube Carrier (Suport de eprubete pentru eșantioane pentru 32 de eprubete)	Diametru 11-14 mm cu înălțimea 60-120 mm	700 μ L	400 μ L
24-Tube Specimen Tube Carrier (Suport de eprubete pentru eșantioane pentru 24 de eprubete)	Diametru 14,5-18 mm cu înălțimea 60-120 mm	1100 μ L	800 μ L
Low Volume Specimen Tube Carrier (Suport de eprubete cu volum redus pentru eșantioane)	Eprubetă de 1,5 ml cu fundul conic, pentru microcentrifugă	650 μ L	300 μ L

- c. Aveți grijă să nu transferați cheaguri din probă în eprubeta pentru eșantioane.

Utilizarea NeuMoDx System

Pentru instrucțiuni detaliate, consultați Manualul de operare NeuMoDx 288 și 96 Molecular System (Nr.P. 40600108 și 40600317)

1. Încărcați comanda de testare pe NeuMoDx System în conformitate cu fluxul de lucru dorit pentru volumul de eșantion și cu tipul eprubetei pentru eșantioane dorit.
 - Volumul eșantionului de 550 μ L este testat prin definirea tipului de eșantion ca „**Plasma**” (Plasmă) sau „**Serum**” (Ser)
 - Volumul eșantionului de 200 μ L este testat prin definirea tipului de eșantion ca „**Plasma2**” (Plasmă 2) sau „**Serum2**” (Ser 2)
 - Dacă nu este definit în comanda de testare, tipul de eșantion **Plasma** (Plasmă) într-o **Secondary Tube** (Eprubetă secundară) va fi folosit implicit.
2. Populați unul sau mai multe suporturi pentru bandele de testare NeuMoDx System cu bandele NeuMoDx HCV Quant Test Strip și utilizați ecranul tactil pentru încărcarea suporturilor pentru bandele de testare în NeuMoDx System.
3. Dacă acest lucru vi se solicită din partea software-ului NeuMoDx System, adăugați consumabilele necesare în suporturile de consumabile NeuMoDx System și folosiți ecranul tactil pentru încărcarea suporturilor în NeuMoDx System.
4. Dacă acest lucru vi se solicită din partea software-ului NeuMoDx System, înlocuiți NeuMoDx Wash Reagent, NeuMoDx Release Reagent, goliți deșeurile de amorsare, recipientul pentru deșeuri biopericuloase (doar la NeuMoDx 288 Molecular System), coșul de gunoi pentru aruncarea vârfurilor (doar la NeuMoDx 96 Molecular System) sau coșul de gunoi pentru deșeuri biopericuloase (doar la NeuMoDx 96 Molecular System), după caz.
5. Dacă acest lucru vi se solicită din partea software-ului NeuMoDx System, procesați calibratoarele NeuMoDx HCV Calibrator și/sau substanțele de control externe NeuMoDx HCV External Control. Informații suplimentare privind calibratoarele și substanțele de control pot fi găsite în secțiunea *Procesarea rezultatelor*.
6. Încărcați eprubetele pentru eșantioane/calibratoare/substanțe de control într-un suport de eprubete pentru eșantioane și asigurați-vă că ați scos capacele din toate eprubetele.

- Amplasați suportul (suporturile) de eprubete pentru eșantioane pe raftul încărcătorului automat și utilizați ecranul tactil pentru încărcarea suportului (suporturilor) în NeuMoDx System. Această acțiune va iniția procesarea eșantioanelor încărcate pentru testările identificate, cu condiția ca în sistem să existe o comandă de testare validă.

LIMITĂRI

- NeuMoDx HCV Quant Test Strip poate fi utilizată doar pe sistemele NeuMoDx System.
- Performanța NeuMoDx HCV Quant Test Strip a fost stabilită pentru eșantioanele de plasmă pregătite cu EDTA/ACD pe post de anticoagulant sau eșantioane de ser pregătite în eprubete pentru separatoare de ser. Nu a fost evaluată utilizarea NeuMoDx HCV Quant Test Strip împreună cu alte surse, iar caracteristicile de performanță sunt necunoscute pentru alte tipuri de eșantioane.
- Performanța NeuMoDx HCV Quant Test Strip a fost stabilită pentru testarea în eprubete primare, utilizând eprubetele BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tube, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube și BD Vacutainer SST Tube.
- Manipularea eșantioanelor în afara condițiilor de depozitare poate afecta negativ precizia cantitativă a NeuMoDx HCV Quant Assay, dar este mai puțin probabil să afecteze rata calitativă de apariție (Positive (Pozitiv)/Negative (Negativ)).
- Depozitarea eșantioanelor de ser pe sistem după o depozitare prelungită în stare congelată și după trecerea prin două cicluri de congelare/decongelare fără testarea imediată a acestora poate afecta negativ precizia cantitativă a NeuMoDx HCV Quant Assay.
- A fost observată o creștere mică a limitei de detecție și a limitei inferioare de cuantificare ale NeuMoDx HCV Quant Assay la utilizarea fluxului de lucru pentru volumul de eșantion de 200 μl.
- Testul NeuMoDx HCV Quant Assay nu trebuie utilizat cu probe de la oameni heparinizați.
- Deoarece detecția HCV depinde de numărul de particule virale de ARN țintă prezente în probă, rezultatele de încredere depind de recoltarea, manipularea și depozitarea adecvate ale eșantioanelor.
- Calibratoarele NeuMoDx HCV Calibrator și substanțele de control externe NeuMoDx HCV External Control trebuie să fie procesate conform recomandărilor din prospecte, atunci când vi se solicită de către software-ul NeuMoDx System înainte de procesarea probelor clinice de rutină.
- Rezultatele eronate pot apărea din recoltarea, manipularea și depozitarea inadecvate ale eșantioanelor, din erori tehnice sau din confundarea eprubetelor pentru eșantioane. În plus, pot apărea rezultate fals negative din cauză că numărul de particule virale din probă este sub limita de detecție a NeuMoDx HCV Quant Assay.
- Utilizarea sistemului NeuMoDx System se limitează la utilizarea de către personalul instruit în utilizarea NeuMoDx System.
- Dacă ținta HCV și ținta SPC2 nu se amplifică, va fi raportat un rezultat nevalid (Indeterminate (Neconcludent), No Result (Niciun rezultat) sau Unresolved (Nerezolvat)), iar testarea trebuie repetată.
- Dacă rezultatul NeuMoDx HCV Quant Assay este Positive (Pozitiv), dar valoarea de cuantificare depășește limitele de cuantificare, NeuMoDx System va raporta dacă HCV detectat a fost *mai mic decât* limita inferioară de cuantificare (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) sau *mai mare decât* limita superioară de cuantificare (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
- În eventualitatea în care HCV detectat este *mai mic decât* LLoQ, NeuMoDx HCV Quant Assay poate fi repetat (dacă se dorește) cu o altă parte alicotă a eșantionului.
- În eventualitatea în care HCV detectat este mai mare decât ULoQ, NeuMoDx HCV Quant Assay poate fi repetat cu o parte alicotă diluată a eșantionului original. Se recomandă o diluare 1:100 sau 1:1000 în plasmă negativă la HCV sau în diluant Basematrix 53 (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). Concentrația eșantionului original este calculată după cum urmează:

$$\text{concentrația eșantionului original} = \log_{10} (\text{factor de diluție}) + \text{concentrația raportată a probei diluate}$$
- Prezența ocazională a inhibitorilor PCR în plasmă și ser poate duce la o eroare de cuantificare a sistemului. Dacă se întâmplă acest lucru, se recomandă ca testarea să fie repetată cu același eșantion diluat în Basematrix la 1:10 sau 1:100.
- Un rezultat pozitiv nu indică neapărat prezența organismelor viabile. Cu toate acestea, un rezultat pozitiv presupune prezența ARN-ului virusului hepatitei C.
- Deleția sau mutațiile din regiunile conservate vizate de NeuMoDx HCV Quant Assay poate afecta detecția sau poate genera un rezultat eronat folosind NeuMoDx HCV Quant Test Strip.
- Rezultatele obținute din NeuMoDx HCV Quant Assay trebuie utilizate ca anexe la observațiile clinice și la alte informații disponibile medicului; testul nu este destinat diagnosticării infecției.
- Bunele practici de laborator, inclusiv schimbarea mănușilor între manipulările eșantioanelor pacienților, se recomandă pentru evitarea contaminării.

PROCESAREA REZULTATELOR

Rezultatele disponibile pot fi vizualizate sau tipărite din fila „Results” („Rezultate”) în fereastra Results (Rezultate) pe ecranul tactil al NeuMoDx System. Rezultatele NeuMoDx HCV Quant Assay sunt generate automat de software-ul sistemului NeuMoDx System utilizând algoritmul de decizie și parametrii de procesare a rezultatelor specificați în fișierul de definiție a testului NeuMoDx HCV (HCV Assay Definition File, ADF). Un rezultat poate fi raportat ca Negative (Negativ), Positive (Pozitiv) cu o concentrație HCV raportată, Positive (Pozitiv) mai mare decât ULoQ, Positive (Pozitiv) mai mic decât LLoQ, Indeterminate (Neconcludent) (IND) sau Unresolved (Nerezolvat) (UNR) sau No Result (Niciun rezultat) (NR), în funcție de stadiul de amplificare al țintei și al substanței de control pentru procesarea probei. Rezultatele sunt raportate pe baza algoritmului de decizie ADF, sintetizate mai jos în Tabelul 1.

Tabelul 1. Sumarul algoritmului de decizie NeuMoDx HCV Quant Assay

REZULTAT	Țintă HCV	Substanță de control pentru procesarea probei (Sample Process Control, SPC2)	Interpretarea rezultatelor
Positive (Pozitiv) cu concentrație raportată	Amplified (Amplificat) $0,9 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ UI/ml}$ (flux de lucru 550 μl) $1,5 \leq [\text{HCV}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ UI/ml}$ (flux de lucru 200 μl)	Amplified (Amplificat) sau Not Amplified (Neamplificat)	ARN HCV detectat în intervalul cantitativ
Positive (Pozitiv), mai mare decât ULoQ	Amplified (Amplificat) $[\text{HCV}] > 8,2 \log_{10} \text{ UI/ml}$	Amplified (Amplificat) sau Not Amplified (Neamplificat)	ARN HCV detectat peste intervalul cantitativ
Positive (Pozitiv), mai mic decât LLoQ	Amplified (Amplificat) $[\text{HCV}] < 0,9 \log_{10} \text{ UI/ml}$ (flux de lucru 550 μl) $[\text{HCV}] < 1,5 \log_{10} \text{ UI/ml}$ (flux de lucru 200 μl)	Amplified (Amplificat) sau Not Amplified (Neamplificat)	ARN HCV detectat sub intervalul cantitativ
Negative (Negativ)	Not Amplified (Neamplificat)	Amplified (Amplificat)	ARN HCV nedetectat
Indeterminate (Neconcludent)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Neamplificat, Eroare de sistem detectată, Procesarea probelor finalizată)		Toate rezultatele țintei au fost nevalide; retestați proba†
No Result (Niciun rezultat)*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Neamplificat, Eroare de sistem detectată, Procesarea probelor abandonată)		Procesarea probei a fost abandonată; retestați proba†
Unresolved (Nerezolvat)	Not Amplified, No System Error Detected (Neamplificat, Nu s-au observat erori de sistem)		Toate rezultatele țintei au fost nevalide; retestați proba†

*Semnalizarea No Result (Niciun rezultat) este raportată doar în software-ul NeuMoDx System versiunile 1.8 și mai recente.

†NeuMoDx System este echipat cu funcția automată Rerun/Repeat (Repetarea execuției/Repetare) pe care utilizatorul final poate alege să o folosească pentru a se asigura că un rezultat IND/UNR/NR (NECONCLUDENT/NEREZOLVAT/NICIUN REZULTAT) este reprocesat automat pentru a reduce la minimum întârzierile în raportarea rezultatelor.

Calculul pentru testare

- Pentru probele aflate în intervalul de cuantificare al NeuMoDx HCV Quant Assay, concentrația de ARN HCV din probe este calculată utilizând curba standard stocată împreună cu coeficientul de calibrare și cu volumul eșantionului.
 - Un coeficient de calibrare se calculează pe baza rezultatelor calibratoarelor NeuMoDx HCV Calibrator procesate, pentru a stabili validitatea curbei standard, pentru un anumit lot de NeuMoDx HCV Quant Test Strip, pe un anumit sistem NeuMoDx System.
 - Coeficientul de calibrare este încorporat în determinarea finală a concentrației de ARN HCV.
 - Software-ul NeuMoDx ia în calcul volumul de intrare al eșantionului la determinarea concentrației de ARN HCV pe ml de eșantion.
- Rezultatele NeuMoDx HCV Quant Assay sunt raportate în $\log_{10} \text{ UI/ml}$.
- Cuantificarea rezultată a probelor necunoscute poate fi urmărită în conformitate cu AI 5^{lea} standard internațional al OMS pentru HCV.

Calibrarea testării

Este necesară o calibrare validă, pe baza curbei standard, pentru a cuantifica ARN-ul HCV în eșantioane. Pentru generarea unor rezultate valide, trebuie efectuată o calibrare a testării, utilizând calibratoarele externe furnizate de NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibratoare

- Cu fiecare lot nou de bandete NeuMoDx HCV Quant Test Strip trebuie procesat câte un set de calibratoare NeuMoDx HCV Calibrator, dacă un fișier de definiție a testului HCV nou este încărcat în NeuMoDx System, dacă setul curent de calibratoare a depășit perioada de validitate (setată în prezent la 90 de zile) sau dacă software-ul sistemului NeuMoDx System este modificat.
- Software-ul NeuMoDx System va anunța utilizatorul când trebuie procesate calibratoarele. Un lot nou de bandete de testare nu poate fi folosit pentru testare dacă procesarea calibratoarelor nu a reușit.

3. Validitatea pentru calibrare se stabilește după cum urmează:
 - a) Un set de două calibratoare – unul (1) puternic și unul (1) slab – trebuie procesat pentru stabilirea validității.
 - b) Cel puțin două (2) din cele trei (3) replicate trebuie să ofere rezultate în parametrii predefiniți. Ținta nominală cu calibrator slab este $3 \log_{10}$ UI/ml, iar ținta nominală cu calibrator puternic este $5 \log_{10}$ UI/ml.
 - c) Un coeficient de calibrare este calculat pentru a ține cont de variația preconizată între loturile de bandete de testare. Acest coeficient de calibrare este utilizat pentru determinarea concentrației finale de HCV.
4. Dacă unul sau ambele calibratoare eșuează în verificarea validității, repetați procesarea calibratorului eșuat (calibratoarelor eșuate) utilizând un flacon nou. În eventualitatea în care un calibrator eșuează în verificarea validității, este posibilă doar repetarea calibratorului eșuat, deoarece sistemul nu impune ca utilizatorul să execute din nou ambele calibratoare.
5. În cazul în care calibratorul (calibratoarele) eșuează consecutiv în verificarea validității, contactați NeuMoDx Molecular, Inc.

Controlul calității

Reglementările locale specifică de obicei faptul că laboratorul este responsabil pentru procedurile de control care monitorizează acuratețea și precizia procesului analitic complet, și trebuie să stabilească numărul, tipul și frecvența testării materialelor de control utilizând specificații de performanță verificate pentru un sistem de testare aprobat și nemodificat.

Substanțe de control externe

1. Substanțele de control externe pozitive și negative trebuie procesate la fiecare 24 de ore pe parcursul testării cu NeuMoDx HCV Quant Assay. Dacă nu există un set de rezultate valide ale substanțelor de control externe, software-ul NeuMoDx System îi va solicita utilizatorului procesarea acestor substanțe de control înainte să poată fi raportate rezultatele probelor.
2. Validitatea substanțelor de control externe va fi evaluată de NeuMoDx System în funcție de rezultatul preconizat. Substanța de control pozitivă trebuie să genereze un rezultat pozitiv la HCV, iar substanța de control negativă trebuie să genereze un rezultat negativ la HCV.
3. Manipularea rezultatelor contradictorii pentru substanțele de control externe trebuie făcută astfel:
 - a) Un rezultat Pozitiv (Pozitiv) al testării raportat pentru o probă cu substanță de control negativă indică o problemă de contaminare a eșantionului.
 - b) Un rezultat Negativ (Negativ) al testării raportat pentru o probă cu substanță de control pozitivă poate indica faptul că există o problemă legată de reactiv sau de instrument.
 - c) În oricare dintre situațiile de mai sus sau în cazul unui rezultat Indeterminate (Neconcludent) (IND) sau No Result (Niciun rezultat) (NR), repetați procesul pentru substanțele de control externe NeuMoDx HCV External Control cu flacoane proaspete pentru substanțele de control care au eșuat în testarea validității.
 - d) Dacă substanța de control externă NeuMoDx HCV External Control pozitivă continuă să raporteze un rezultat Negativ (Negativ), contactați Serviciile tehnice NeuMoDx.
 - e) Dacă substanța de control externă NeuMoDx HCV External Control negativă continuă să raporteze un rezultat Pozitiv (Pozitiv), încercați să eliminați toate sursele de posibilă contaminare, inclusiv înlocuirea tuturor reactivilor, înainte de a contacta Serviciile tehnice NeuMoDx.

Substanțe de control (interne) pentru procesarea probei

O substanță de control exogenă pentru procesarea probei (Sample Process Control, SPC2) este încorporată în NeuMoDx Extraction Plate și suferă întregul proces de extracție a acidului nucleic și amplificarea RT-PCR în timp real cu fiecare probă. Soluțiile de amorsare și sonda specifice pentru SPC2 sunt, de asemenea, incluse în fiecare NeuMoDx HCV Quant Test Strip permițând detecția prezenței SPC2 împreună ARN-ul HCV țintă (dacă există) prin RT-PCR multiplex în timp real. Detecția amplificării SPC2 îi permite software-ului sistemului NeuMoDx System să monitorizeze eficacitatea proceselor de extracție ARN și amplificare RT-PCR.

Rezultate nevalide

Dacă o analiză NeuMoDx HCV Quant Assay efectuată pe NeuMoDx System nu produce un rezultat valid în urma finalizării procesării probei, acesta va fi raportat ca Indeterminate (Neconcludent) (IND), No Result (Niciun rezultat) (NR) sau Unresolved (Nerezolvat) (UNR), în funcție de tipul erorii survenite.

Un rezultat IND (Neconcludent) va fi raportat dacă este detectată o eroare NeuMoDx System în timpul procesării probelor. În cazul în care este raportat un rezultat IND (Neconcludent), se recomandă repetarea testării.

Un rezultat UNR (Nerezolvat) va fi raportat dacă nu este detectată nicio amplificare validă a ARN-ului HCV sau a SPC2 în absența erorilor de sistem, ceea ce indică posibilul eșec al reactivului sau prezența inhibitorilor. În cazul în care este raportat un rezultat UNR (Nerezolvat), se recomandă repetarea testării, ca prim pas. Dacă repetarea testării eșuează, poate fi folosit un eșantion diluat pentru a atenua efectele oricărei inhibări a probei.

Dacă o analiză NeuMoDx HCV Quant Assay efectuată pe NeuMoDx System nu produce un rezultat valid și procesarea probei este abandonată înainte de finalizare, acesta va fi raportat ca No Result (Niciun rezultat) (NR). În cazul în care este raportat un rezultat NR (Niciun rezultat), se recomandă repetarea testării.

CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ

Sensibilitate analitică – Limita de detecție utilizând standardul OMS

Sensibilitatea analitică a NeuMoDx HCV Quant Assay a fost caracterizată prin testarea eșantioanelor negative și a unei serii de diluție conforme cu Al 5^{-lea} standard internațional al OMS (genotip 1) în plasma și serul umane negative testate prin screening, pentru a determina limita de detecție (Limit of Detection, LoD) pe sistemele NeuMoDx System. Limita de detecție a fost definită drept cel mai scăzut nivel țintă detectat la o rată de 95%, determinată prin analiza de tip Probit. Studiul a fost efectuat timp de 3 zile pe mai multe sisteme cu loturi multiple de reactivi NeuMoDx. Fiecare sistem (N288 și N96) a procesat câte 18 replicare, la fiecare nivel de diluție, pe zi. Ratele de detecție sunt prezentate în *Tabelul 2*. A fost executat un studiu suplimentar pentru a determina LoD a NeuMoDx HCV Quant Assay la utilizarea fluxului de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μ l, rezultate care sunt prezentate în *Tabelul 3*.

Tabelul 2. Rate de detecție pozitive pentru determinarea LoD a NeuMoDx HCV Quant Assay – flux de lucru 550 μ l

Concentrația țintei [UI/ml]	Concentrația țintei [$\log_{10}$ UI/ml]	PLASMĂ			SER		
		Număr de testări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de detecție	Număr de testări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de detecție
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%

Tabelul 3. Rate de detecție pozitive pentru determinarea LoD a NeuMoDx HCV Quant Assay – flux de lucru 200 μ l

Concentrația țintei [UI/ml]	Concentrația țintei [$\log_{10}$ UI/ml]	PLASMĂ			SER		
		Număr de testări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de detecție	Număr de testări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de detecție
75	1,88	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	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%

S-a determinat că LoD pentru NeuMoDx HCV Quant Assay în plasmă, la nivelul tuturor genotipurilor, este de 7,5 UI/ml (îl 95% între 6,4 și 9,2 UI/ml) [(0,9 $\log_{10}$ UI/ml) (îl 95% între 0,8 și 1,0 $\log_{10}$ UI/ml)], în urma testării pe NeuMoDx 288 Molecular System utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μ l (*Figura 2*). S-a determinat că LoD pentru NeuMoDx HCV Quant Assay pentru eșantioanele de ser este de 8,0 UI/ml (îl 95% între 6,6 și 10,4 UI/ml) [(0,9 $\log_{10}$ UI/ml) (îl 95% între 0,8 și 1,0 $\log_{10}$ UI/ml)] utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μ l (*Figura 2*); valoarea LoD pretinsă pentru ambele tipuri de eșantioane utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μ l este **8,0 UI/ml (0,9 $\log_{10}$ UI/ml)**.

S-a determinat că LoD pentru NeuMoDx HCV Quant Assay utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μ l este de 27,9 UI/ml (îl 95% 20,1-81,9) în eșantioanele de plasmă și de 29,8 UI/ml (îl 95% 20,5-94,0) în eșantioanele de ser (*Figura 3*); valoarea LoD pretinsă pentru ambele tipuri de eșantioane utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μ l este **30,0 UI/ml (1,5 $\log_{10}$ UI/ml)**.

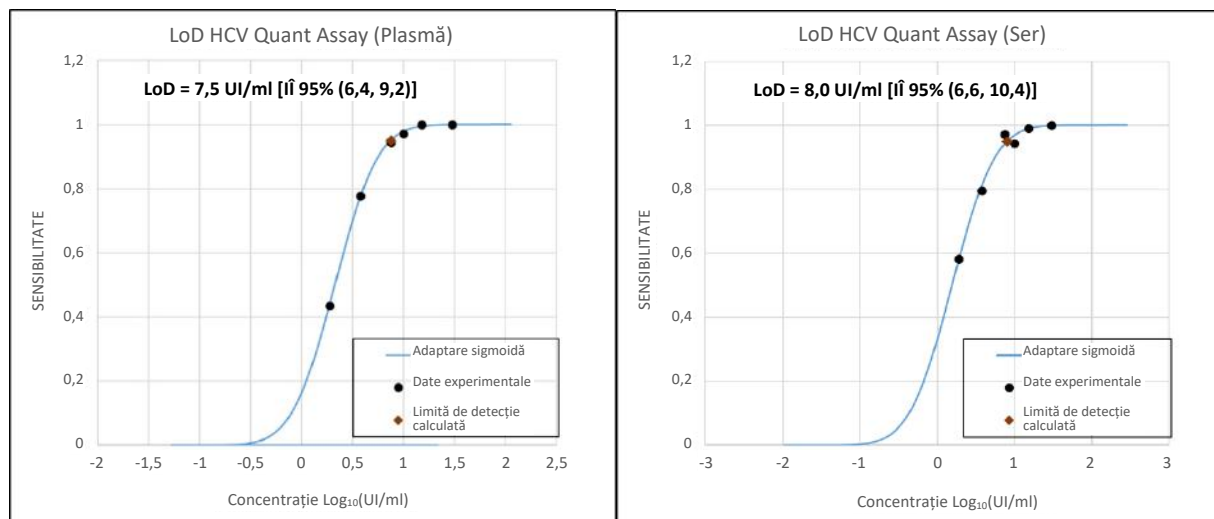


Figura 2: Analiză de tip Probit utilizată pentru determinarea LoD a NeuMoDx HCV Quant Assay, Plasmă (stânga) și Ser (dreapta) – flux de lucru 550 μ l

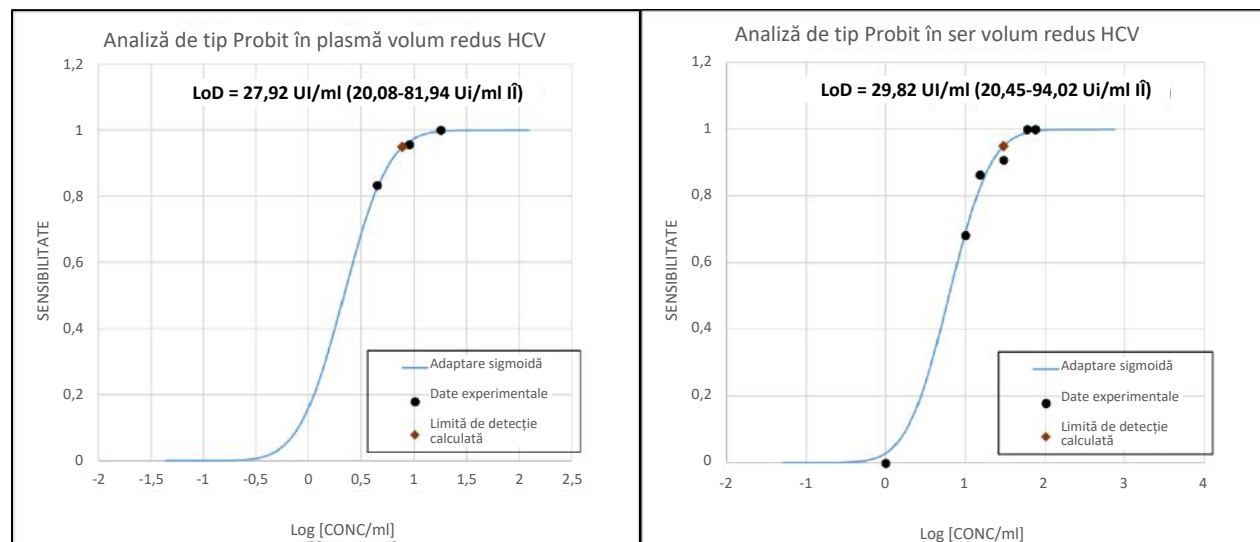


Figura 3: Analiză de tip Probit utilizată pentru determinarea LoD a NeuMoDx HCV Quant Assay, Plasmă (stânga) și Ser (dreapta) – flux de lucru 200 μ l

Sensibilitate analitică – Limită de cuantificare – Limită inferioară de cuantificare (Lower Limit of Quantitation, LLoQ), utilizând Standardul OMS

Limita inferioară de cuantificare (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) este definită ca cel mai mic nivel al țintei la care se obține o detecție > 95% și TAE $\leq 1,0$. Pentru a determina LLoQ, eroarea analitică totală (Total Analytical Error, TAE) a fost calculată pentru fiecare dintre nivelurile țintei HCV pentru care s-a demonstrat că raportează o detecție > 95% ca parte a calculului LoD. TAE este definită după cum urmează:

$$\text{TAE} = \text{abatere} + 2 * \text{SD} \quad [\text{Statistică Westgard}]$$

Abaterea este valoarea absolută a diferenței dintre media concentrației calculate și a concentrației preconizate. SD se referă la abaterea standard a valorii cuantificate a probei.

Rezultatele compilate pentru cele 6 niveluri de eșantioane de plasmă și ser HCV testate în studiul LLoQ, utilizând genotipul 1 cu fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μ l sunt prezentate în *Tabelul 4*. Rezultatele obținute din testarea suplimentară utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μ l sunt prezentate în *Tabelul 5*.

Tabelul 4. NeuMoDx HCV Quant Assay LLoQ, cu abaterea și TAE – flux de lucru 550 µl

Conc. țintă [UI/ml]	Conc. țintă [log ₁₀ UI/ml]	Plasmă					Ser				
		Conc. medie [log ₁₀ UI/ml]	Detectie (%)	SD	Abatere	TAE	Conc. medie [log ₁₀ UI/ml]	Detectie (%)	SD	Abatere	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

Tabelul 5. NeuMoDx HCV Quant Assay LLoQ, cu abaterea și TAE – flux de lucru 200 µl

Conc. țintă [UI/ml]	Conc. țintă [log ₁₀ UI/ml]	Plasmă					Ser				
		Conc. medie [log ₁₀ UI/ml]	Detectie (%)	SD	Abatere	TAE	Conc. medie [log ₁₀ UI/ml]	Detectie (%)	SD	Abatere	TAE
75	1,88	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	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

S-a determinat că LLoQ pentru NeuMoDx HCV Quant Assay este de 7,7 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml) pentru plasmă și de 8,4 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml) pentru ser, utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 µl; LLoQ atât pentru plasmă, cât și pentru ser, s-a determinat a fi **8,4 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml)** utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 µl.

S-a determinat că LLoQ pentru NeuMoDx HCV Quant Assay utilizând standardul OMS este de 30,0 UI/ml (1,5 log₁₀ UI/ml) pentru plasmă și de 29,8 UI/ml (1,37 log₁₀ UI/ml) pentru ser, utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 µl; LLoQ atât pentru plasmă, cât și pentru ser s-a determinat a fi **30,0 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml)**, utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 µl.

Sensibilitate analitică – LoD și LLoQ la nivelul genotipurilor de HCV

Inițial, LoD a fost stabilită pentru genotipul 1 (AI 5^{-lea} standard internațional al OMS), apoi s-au efectuat testări suplimentare în jurul LoD stabilite, utilizând fiecare dintre celelalte 5 genotipuri. Treizeci și șase (36) de replicate la niveluri corespunzătoare unor valori de 2X, 1X și 0,5X din limita superioară ÎI 95% pentru LoD au fost testate utilizând NeuMoDx HCV Quant Assay, utilizând plasmă cu fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 µl. Ratele procentuale pozitive pentru fiecare genotip la fiecare dintre aceste niveluri testate au fost incluse într-un tabel și utilizate pentru a calcula LoD, utilizând o analiză de tip Probit.

De asemenea, a fost calculată eroarea analitică totală la aceste niveluri testate. Cel mai mic nivel cu detecție pozitivă de 95% și TAE calculată ≤ 1,0 a fost din nou considerat a fi LLoQ pentru genotip. Aceste rezultate confirmă că NeuMoDx HCV Quant Assay are o performanță excelentă de detecție, echivalentă la nivelul tuturor celor șase genotipuri, cu un interval de 4,5-7,5 UI/ml, inclusiv rezultatele obținute cu AI 5^{-lea} standard internațional al OMS (Genotipul 1). La nivel global, s-a determinat că LoD pentru NeuMoDx HCV Quant Assay la nivel de genotipuri este de 7,5 UI/ml (0,88 Log₁₀ UI/ml), iar LLoQ s-a determinat a fi cea mai mare valoare, adică 7,7 UI/ml (0,9 Log₁₀ UI/ml), conform raportărilor pentru AI 5^{-lea} standard internațional al OMS (Genotipul 1 de mai sus). *Tabelul 6 prezintă rezultatele LoD și LLoQ pentru testarea la nivelul genotipurilor HCV determinate în plasmă.*

Tabelul 6. Genotipurile de HCV testate în plasmă utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 µl

GENOTIP	LoD [UI/ml]	LLoQ [UI/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

Pe baza rezultatului studiilor menționate mai sus, NeuMoDx pretinde o LoD de 8,0 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml) și o LLoQ de 8,4 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml) pentru NeuMoDx HCV Quant Assay în **plasmă și ser**, utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μl.

Valoarea LoD și LLoQ pretinsă pentru NeuMoDx HCV Quant Assay pentru ambele tipuri de eșantioane (**plasmă și ser**) utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl este 30,0 UI/ml (1,5 log₁₀ UI/ml).

Sensibilitate analitică – Liniaritatea și determinarea limitei superioare de cuantificare (ULoQ)

Liniaritatea și limita superioară de cuantificare (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) ale NeuMoDx HCV Quant Assay au fost stabilite în plasmă, prin pregătirea unei serii de diluție folosind HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX) și AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) cu trasabilitate stabilită în conformitate cu AI 5^{lea} standard internațional al OMS. Un grup cu 11 elemente a fost pregătit în plasma comasată negativă la HCV pentru a crea un grup care să se întindă pe un interval de concentrații de 8,2-1,5 log₁₀ UI/ml. NeuMoDx HCV Quant Assay a demonstrat capacitatea de a cuantifica HCV în intervalul liniar 8 log₁₀ cu o precizie de ±0,3 log₁₀ UI/ml, pe baza erorii standard calculate după intervalul de încredere 95%. Nu s-au obținut avantaje semnificative prin utilizarea adaptării prin regresie de ordinul 2 și 3. S-a determinat că ULoQ în plasmă este 8,2 log₁₀ UI/ml. A fost efectuat un studiu ulterior pentru a demonstra echivalența matricei, și analiza a comparat rezultatele cantitative ale NeuMoDx HCV pentru probe pregătite în plasmă și ser, utilizând două modele diferite de adaptare prin regresie, inclusiv instrumentul de regresie MS Excel și Passing-Bablok. Rezultatele au demonstrat o corelare puternică reprezentată de valorile pantei și ale intersecției, foarte apropiate de 1,00 și, respectiv, 0,00, și o valoare R² egală cu 0,99 (instrumentul de regresie MS Excel) sau o valoare p de 0,600 (Passing-Bablok). Concentrațiile analizei HCV raportate de NeuMoDx System comparativ cu valorile preconizate sunt prezentate în **Figura 4**.

După aceea, liniaritatea și ULoQ au fost evaluate cu fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl. Comparările pentru echivalență au fost realizate între concentrațiile raportate de software-ul NeuMoDx pentru fluxurile de lucru de 200 și de 550 μl. Analizele de regresie Deming și Passing-Bablok au demonstrat o corelare excelentă și o pantă apropiată de 1, precum și intersecții (abateri) minime ale concentrațiilor probelor plasmatică și serice pe întregul interval liniar. O comparație Bland and Altman a concentrației raportate pentru fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl cu concentrația raportată medie pentru fluxurile de lucru pentru volume ale eșantionului de 200 și de 550 μl a prezentat o abatere minimă, atribuind precizia algoritmului utilizat pentru generarea rezultatelor din fluxul de lucru de 200 μl. În plus, o regresie liniară simplă care a comparat concentrația preconizată cu concentrația raportată pentru fluxul de lucru de 200 μl a avut o pantă apropiată de 1, demonstrând o corelare excelentă (**Figura 5**). Luate împreună, aceste comparații demonstrează cuantificarea exactă a HCV pe intervalul liniar al NeuMoDx HCV Quant Assay utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl.

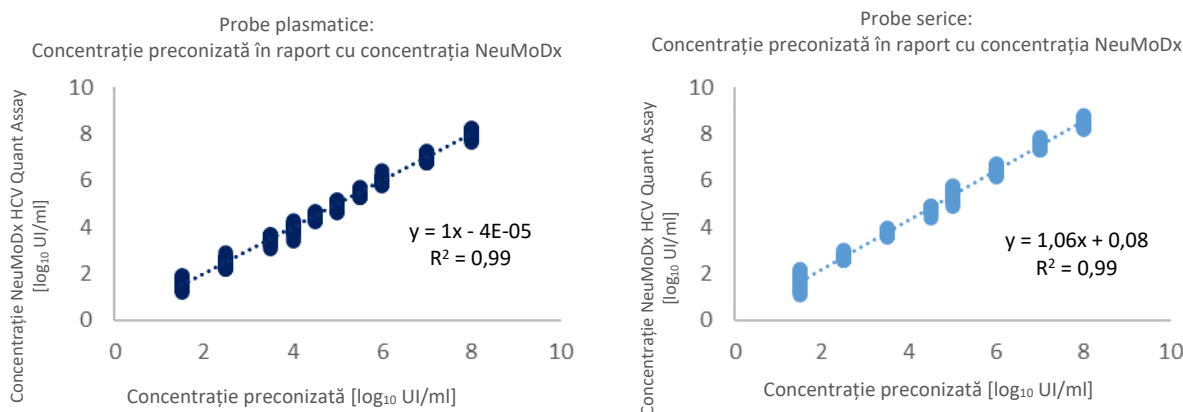


Figura 4: Interval liniar al NeuMoDx HCV Quant Assay Plasmă (stânga) și Ser (dreapta) – flux de lucru 550 μl

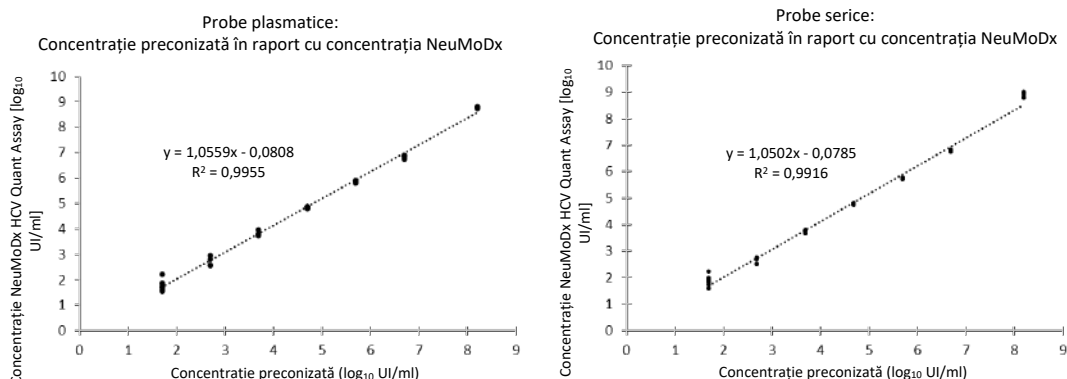


Figura 5: Interval liniar al NeuMoDx HCV Quant Assay Plasmă (stânga) și Ser (dreapta) – flux de lucru 200 μl

Sensibilitate analitică – Liniaritatea între genotipuri

Liniaritatea NeuMoDx HCV Quant Assay între șase genotipuri de HCV a fost caracterizată prin testarea a cel puțin patru (4) concentrații diferite din fiecare genotip de HCV, preparate în plasmă comasată negativă la HCV. Nivelurile țintelor HCV testate în cadrul acestui studiu au depins de concentrația eșantionului sursă și, astfel, au fost diferite între genotipuri. Studiul a fost efectuat cu fiecare genotip utilizând câte 6 replicare la fiecare nivel. Liniaritatea între șase genotipuri de HCV este prezentată în Tabelul 7 și Figura 6.

Tabelul 7. Liniaritatea NeuMoDx HCV Quant Assay între genotipuri

Genotip	Ecuția liniarității $y = \text{cuantificarea analizei HCV NeuMoDx}$ $x = \text{cuantificare preconizată}$	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

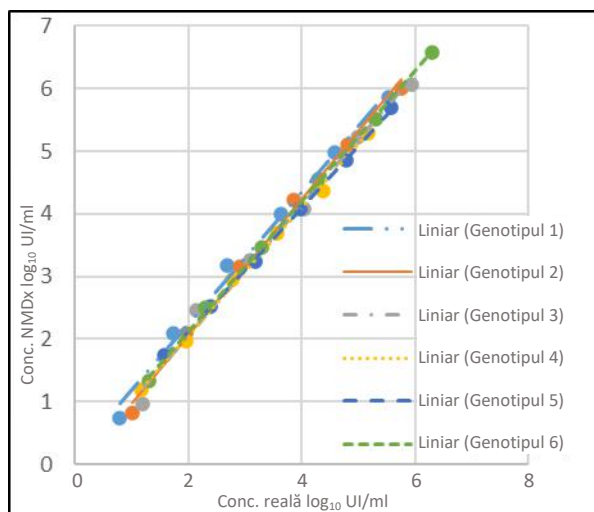


Figura 6: Liniaritatea NeuMoDx HCV Quant Assay între genotipuri

Specificitate analitică – Reactivitate încrucișată

Specificitatea analitică a fost demonstrată prin screeningul a 33 de organisme frecvent întâlnite în eșantioane de sânge/plasmă, precum și a unor specii asemănătoare filogenetic cu HCV pentru reactivitate încrucișată. Organismele au fost pregătite în surse de câte 4 până la 6 organisme și testate la o concentrație ridicată. Organismele testate sunt prezentate în *Tabelul 8*. Nu s-a observat reactivitate încrucișată la niciunul dintre organismele testate, confirmând o specificitate analitică 100% pentru NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabelul 8. Agenți patogeni utilizați pentru a demonstra specificitatea analitică

Organisme non-țintă						
Adenovirus 2	Dengue V1	Hepatită A	Virusul imunodeficienței umane 2	Virusul T-limfotropic uman 1	Propionibacterium acnes	Virusul West Nile
Adenovirus 5	Dengue V2	Hepatită B	Virus papiloma uman 16	Virusul T-limfotropic uman 2	Rubeolă	Febră galbenă
Candida albicans	Dengue V3	Virusul Herpes Simplex (HSV) 1	Virus papiloma uman 18	Gripă de tip A	Encefalită St. Louis	Virusul Zika
Chlamydia trachomatis	Dengue V4	Virusul Herpes Simplex (HSV) 2	Virusul herpetic uman 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Citomegalovirus	Virusul Epstein-Barr	Virusul imunodeficienței umane 1	Virusul herpetic uman 8	Parvovirus B19	Staphylococcus epidermidis	

Specificitate analitică – Substanțe de interferență, organisme comensale

NeuMoDx HCV Quant Assay a fost evaluat pentru interferență în prezența organismelor non-țintă, utilizând aceleași surse de organisme pregătite pentru testarea reactivității încrucișate, enumerate mai sus, în *Tabelul 8*. Plasma negativă la HCV a fost îmbogățită cu organismele comensale în grupuri de 4-6, fiind îmbogățite și cu o substanță de control pozitivă la HCV, la o concentrație de 1,4 log₁₀ UI/ml. Nu s-a observat nici o interferență semnificativă în prezența acestor organisme comensale, așa cum este indicat de abaterea minimă de cuantificare față de eșantioanele de substanță de control care nu au conținut niciun agent de interferență.

Specificitate analitică – Substanțe de interferență, substanțe endogene și exogene

NeuMoDx HCV Quant Assay a fost evaluat în prezența substanțelor de interferență exogene și endogene tipice întâlnite la eșantioanele clinice de plasmă HCV. Acestea au inclus niveluri anormal de ridicate ale componentelor sanguini, precum și medicamente antivirale comune, care au fost clasificate în *Tabelul 9*. Fiecare substanță a fost adăugată în plasma umană testată prin screening negativă la HCV îmbogățită cu 1,7 Log₁₀ UI/ml HCV și probele au fost analizate pentru interferență. În plus, a fost testată plasma comună stadiului bolii, asociată cu infecția cu Hepatită C, pentru o posibilă interferență. Concentrația medie și abaterea tuturor substanțelor testate sunt raportate în *Tabelul 10*. Niciuna dintre substanțele exogene și endogene nu a afectat specificitatea NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabelul 9. Testarea interferenței – Agenți exogeni (clasificări pentru medicamente)

	Produs	Clasificare		Produs	Clasificare
Sursa 1	Sofosbuvir	Antiviral HCV cu acțiune directă	Sursa 2	Paritaprevir	Inhibitor de protează HCV NS3/4A
	Ledipasvir	Inhibitor HCV		Ombitasvir	Antiviral HCV
	Velpatasvir	Inhibitor HCV NS5A		Ritonavir	Inhibitor de protează HIV
	Claritromicină	Antibiotic		Abacavir sulfat	Inhibitor de revers-transcriptază
	Interferon alfa-2a	Imunomodulator		Ribavirină	Imunomodulator
Sursa 3	Grazoprevir	Inhibitor de protează HCV NS3/4A	Sursa 4	Efavirenz	Inhibitor de revers-transcriptază
	Elbasvir	Inhibitor HCV NS5A		Lopinavir	Inhibitor de protează
	Tenofovir disoproxil	Antiviral HBV/HIV		Azitromicină	Antibiotic
	Lamivudină	Antiviral HBV/HIV		Dolutegravir	Antiviral HIV
	Valganciclovir	Antiviral CMV		Simeprevir	Inhibitor de protează HCV NS3/4A
Sursa 5	Emtricitabină	Antiviral HIV			
	Raltegravir	Antiviral HIV			
	Amoxicilină	Antibiotic			
	Rilpivirină	Antiviral HIV			
	Dasabuvir	Antiviral HCV cu acțiune directă			
	Glecaprevir	Inhibitor de protează HCV NS3/4A			

Tabelul 10. Testarea interferenței - Agenți exogeni și endogeni

Endogenă	Conc. medie log ₁₀ UI/ml	Abatere log ₁₀ UI/ml
Hemoglobină	1,61	0,28
Trigliceride	1,31	-0,02
Bilirubină	1,47	0,14
Albumină	1,47	0,14
Exogen (medicamente)	Conc. medie log ₁₀ UI/ml	Abatere log ₁₀ UI/ml
Sursa 1: Zidovudină (ZDV), Saquinavir, Ritonavir, Claritromicină, Interferon alfa-2a, Interferon alfa-2b	1,48	0,15
Sursa 2: Abacavir sulfat, Amprenavir, Ribavirină, Entecavir, Fluoxetină, Valganciclovir clorhidrat	1,40	0,07
Sursa 3: Tenofovir disoproxil, Lamivudină, Ganciclovir, Valganciclovir, Nevirapină	1,40	0,07
Sursa 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtid, Ciprofloxacina, Paroxetină,	1,51	0,18
Sursa 5: Adefovir (dipivoxil), Azitromicină, Indinavir sulfat, Sertralină	1,40	0,07
Stadiul bolii	Conc. medie log ₁₀ UI/ml	Abatere log ₁₀ UI/ml
Anticorp anti-nuclear (Antinuclear Antibody, ANA)	1,53	0,18
Lupus eritematos sistemic (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)	1,29	-0,06
Artrită reumatoidă	1,39	0,04
Anticorpi pentru HBV	1,45	0,10
Ciroză alcoolică	1,43	0,08
Factor reumatoid	1,43	0,08
Steatohepatită non-alcoolică (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	1,32	-0,03

Precizia în laborator

Precizia NeuMoDx HCV Quant Assay a fost determinată prin testarea unui grup cu 7 elemente de eșantioane HCV pregătite (incorporând atât HCV Armored RNA, cât și AcroMetrix HCV Control) utilizând trei sisteme NeuMoDx System timp de 12 zile. Au fost caracterizate precizia în cadrul rulării, precizia din timpul zilei și precizia în sistem, și abaterea standard globală s-a determinat a fi $\leq 0,26 \log_{10}$ UI/ml. Nu s-a constatat nicio diferență semnificativă în performanța între sisteme, zile sau execuții, după cum se arată în *Tabelul 11*. Precizia la nivelul operatorilor nu a fost caracterizată, deoarece operatorul nu joacă un rol semnificativ în procesarea probelor utilizând NeuMoDx System.

Tabelul 11. Precizie în laborator – NeuMoDx HCV Quant Assay pe sisteme NeuMoDx System

	Conc. țintă [log ₁₀ UI/ml]	Conc. medie [log ₁₀ UI/ml]	SD în sistem	SD în timpul zilei	SD în execuție	SD în laborator (globală)
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

Reproductibilitatea de la un lot la altul

Reproductibilitatea de la un lot la altul a NeuMoDx HCV Quant Assay a fost determinată utilizând trei loturi diferite de reactivi cheie – NeuMoDx Lysis Buffer 3, plăcile NeuMoDx Extraction Plate și bandetele NeuMoDx HCV Quant Test Strip. Pentru evaluarea performanței a fost utilizat un grup cu 7 elemente de HCV (care a încorporat HCV Armored RNA și AcroMetrix HCV Control). Testarea a fost efectuată utilizând cele trei loturi de reactivi pe trei sisteme timp de 6 zile. Variația din cadrul lotului și între loturi a fost analizată, iar rezultatele au fost prezentate în *Tabelul 12*. Abaterea globală maximă a fost 0,24 log₁₀ UI/ml și SD globală maximă a fost 0,33 log₁₀ UI/ml. Nu s-a constatat nicio diferență semnificativă de performanță între loturi, deoarece cuantificarea tuturor elementelor panelului s-a încadrat în specificațiile de toleranță.

Tabelul 12. Reproducibilitatea de la un lot la altul – NeuMoDx HCV Quant Assay

	Conc. țintă [log ₁₀ UI/ml]	Conc. medie GLOBAL [log ₁₀ UI/ml]	n (Rezultate valide pe lot)	ABATERE ABS	SD între loturi	SD în lot	Abatere standard globală
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

Eficacitatea substanței de control

SPC2 este inclusă în NeuMoDx HCV Quant Assay pentru a raporta erorile din timpul etapelor de procesare sau inhibarea care afectează performanța analizei. Eficacitatea a fost testată în condiții reprezentative erorilor critice din timpul etapelor de procesare, care puteau apărea în timpul procesării probelor și care *era posibil să nu fie detectate* de senzorii de monitorizare a performanței NeuMoDx System. Eșantioanele pozitive (3 log₁₀ UI/ml) și negative au fost provocate în prezența unei substanțe de control, în următoarele condiții: Presence of inhibitor (Prezența inhibitorului), No wash reagent delivered (Niciun reactiv de spălare furnizat) și No Wash Blowout (Lipsă suflare spălare). Ineficiențele în procesare, care au afectat negativ detecția/cuantificarea HCV, au fost reflectate de performanța țintei SPC2, după cum se arată în *Tabelul 13*. În toate cazurile testate, s-a demonstrat că substanța de control pentru procesarea probei a monitorizat în mod adecvat ineficiențele în procesare și prezența inhibitorilor, sau că ineficiența anticipată în procesare nu a avut un efect negativ semnificativ asupra detecției SPC2 sau a detecției și cuantificării HCV. Prin urmare, SPC2 a demonstrat succesul în monitorizarea eficientă a performanței analizei pe NeuMoDx System.

Tabelul 13. Eficacitatea substanței de control pentru procesarea probei

Eroare în timpul etapelor de procesare testată	Starea de amplificare a substanței de control pentru procesarea probei	Stare de amplificare țintă HCV	Rezultatul analizei
Presence of Inhibitor (Prezența inhibitorului)	Not Amplified (Neamplificat)	Not Amplified (Neamplificat)	Unresolved (Nerezolvat)
No Wash Delivered (Niciun reactiv de spălare furnizat)	Not Amplified (Neamplificat)	Not Amplified (Neamplificat)	Unresolved (Nerezolvat)
No Wash Blowout (Lipsă suflare spălare)	Amplified (Amplificat)	Amplified (Amplificat)	Positive with Quantitation within 0.3 Log ₁₀ IU/mL of Control (Pozitiv cu cuantificarea în 0,3 Log ₁₀ UI/ml din substanța de control)

Rata rezultatelor valide

O analiză retrospectivă a datelor obținute în timpul evaluării performanței NeuMoDx HCV Quant Assay pe sistemele NeuMoDx System a fost utilizată pentru determinarea procentului de rezultate valide. Rezultatele valide ale testării vor fi numite Positive (Pozitiv) sau Negative (Negativ); rezultatele nevalide ale testării pot fi raportate ca Indeterminate (Neconcludent) (IND) sau Unresolved (Nerezolvat) (UNR), în funcție de starea țintei și a substanței de control pentru procesarea probei. Un rezultat IND este, de obicei, generat de o eroare a instrumentului, care duce la un eșec al țintei și/sau al substanței de control interne pentru procesare, care trebuie amplificate. Un rezultat UNR este alocat probelor atunci când atât ținta, cât și substanța de control internă pentru procesare nu reușesc să amplifice în absența unei erori detectate a instrumentului. În analiza retrospectivă au fost incluse 1.962 de rezultate individuale ale NeuMoDx HCV Quant Assay, care au inclus date obținute atât din eșantioanele serice, cât și din eșantioanele plasmatiche, pe sistemele NeuMoDx 288 și NeuMoDx 96 System. S-a determinat că rata UNR este egală cu 0,61% (12/1962), iar rata IND, 0,41% (8/1962); acestea au întrunit criteriile de acceptare ale analizei. Prin urmare, rata rezultatelor valide ale NeuMoDx HCV Quant Assay pe matrice clinice și sisteme NeuMoDx System s-a concluzionat a fi de 99,0% cu Î 95% (98,4- 99,3).

Contaminare încrucișată

Rata de contaminare încrucișată pentru NeuMoDx HCV Quant Assay a fost determinată prin testarea a trei seturi de eșantioane de HCV, formate din eșantioane puternic pozitive și negative. În total, aceasta a implicat testarea a 144 de replicate de eșantioane umane negative la HCV și 144 de replicate ale unui eșantion HCV cu titru mare la 8,2 Log₁₀ UI/ml. Toate cele 144 de replicate ale eșantionului negativ au fost raportate ca negative, ceea ce demonstrează că nu s-a produs nicio contaminare încrucișată în timpul procesării probelor pe NeuMoDx System.

Echivalența matricelor eșantioanelor

Testarea a fost efectuată pentru a demonstra echivalența matricelor eșantioanelor dintre sângele integral recoltat în eprubete de recoltare cu acid etilendiaminetetraacetic (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) și acid-citrat-dextroză (ACD) pentru pregătirea plasmei. S-a efectuat o testare suplimentară pentru a determina echivalența dintre eșantioanele plasmatiche proaspete și cele congelate (recoltate în două tipuri de eprubete), precum și dintre eșantioanele serice proaspete și cele congelate. Eșantioanele proaspete au fost păstrate la 4 °C până când au fost îmbogățite cu patru niveluri de HCV și testate pentru echivalență. După aceea, probele au fost congelate timp de minim 24 de ore la -20 °C. După această perioadă de depozitare în stare congelată, eșantioanele au fost decongelate și retestate. Rezultatele obținute de la eșantioanele serice și cele plasmatiche proaspete și congelate, precum și cele de la eșantioanele plasmatiche cu EDTA și cu ACD, au fost comparate pentru echivalență prin analiză de regresie. Datele au demonstrat o echivalență excelentă între eșantioanele plasmatiche cu EDTA și ACD, eșantioanele plasmatiche proaspete și congelate, și eșantioanele serice proaspete și congelate.

S-a efectuat o testare suplimentară pentru a demonstra echivalența performanței NeuMoDx HCV Quant Assay pe eșantioane primare față de eșantioane secundare. Grupurile de eșantioane ale donatorilor, negative la HCV, îmbogățite cu țintă HCV (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) și de eșantioane ale donatorilor, pozitive la HCV, au fost procesate pentru prima dată din eprubetele primare pentru eșantioane. După procesarea eprubetei primare, plasma sau serul rămas(ă) din fiecare eșantion a fost împărțit(ă) în părți alicote într-o eprubetă secundară pentru eșantioane și reprocessat(ă). Nu s-a constatat nicio diferență semnificativă în rezultatele raportate între procesarea eprubetelor primare și a celor secundare pentru eșantioane.

Compararea metodelor clinice

Performanța calitativă și cantitativă a NeuMoDx HCV Quant Assay au fost evaluate în raport cu analizele comparative cu aprobare FDA/CE, prin testarea eșantioanelor clinice nediluate de la pacienți infectați cu HCV. Testarea a fost efectuată intern, la NeuMoDx, prin intermediul unui studiu simplu orb al eșantioanelor clinice cu elementele de identificare anulate, reziduale, obținute de la șase laboratoare externe de referință. Un total de 323 de eșantioane plasmatiche și 336 de eșantioane serice au fost procesate utilizând NeuMoDx HCV Quant Assay într-un mod (simplu) orb, pe mai multe sisteme NeuMoDx Molecular System. Dintre aceste probe, 35 de probe plasmatiche și 13 probe serice au fost procesate pe AMBELE sisteme NeuMoDx 288 și 96 Molecular System. Unele dintre probele care au generat un rezultat NEVALID nu au putut fi reprocessate, din cauza lipsei de disponibilitate a unei probe suficiente.

Erorile de procesare și de sistem obținute pe sistemele NeuMoDx Molecular System au fost minime și au întrunit criteriile. Un total de 4 rezultate Indeterminate (Neconcludent) (IND) au fost obținute inițial pentru probele plasmatice, și 4 rezultate IND au fost obținute pentru probele serice, ceea ce a dus la o rată IND inițială globală de 1% (Î 95% 0,5%-3%) pentru plasmă și 1% (Î 95% 0,4%-3%) pentru ser. Un total de 3 rezultate UNRESOLVED (NEREZOLVAT) (UNR) au fost obținute inițial pentru probele plasmatice și 5 rezultate UNR pentru probele serice, ceea ce a generat o rată globală de 1% (Î 95% 0,2%-3%) pentru plasmă, și 1% (Î 95% 0,6%-4%) pentru ser.

Eșantioanele care au generat rezultate nevalide (IND/UNR) sau „Eroare de cuantificare” au fost retestate atunci când a rămas un volum suficient; s-a realizat o etapă de diluare pe unele probe, pentru obținerea unor rezultate valide. Dintre cele 13 eşantioane care au avut un volum suficient pentru a fi repetate (diluare SAU pure), s-a obținut un rezultat valid.

Dintre cele 321 de rezultate valide obținute pentru eşantioanele plasmatice și 334 de rezultate valide obținute pentru probele serice, 206 de probe plasmatice și 154 de probe serice au fost raportate drept POSITIVE (POZITIV) de NeuMoDx HCV Quant Assay, valorile concentrațiilor corespunzătoare fiind alocate de testările de referință. S-au folosit analizele de regresie Deming și Passing-Bablok pentru a face corelarea dintre valorile concentrațiilor NeuMoDx HCV Quant Assay și valorile raportate de testările de referință pentru probele plasmatice și cele serice.

Au fost generate reprezentări grafice ale echivalenței pentru a reprezenta corelarea dintre concentrațiile NeuMoDx HCV Quant Assay și valorile concentrațiilor din testările de referință, pentru toate probele testate, utilizând adaptarea prin regresie Deming și Passing-Bablok, acestea fiind prezentate în *Figura 7* și *Figura 8*. Calitatea adaptării prin regresie Deming este ilustrată de un coeficient al pantei egal cu 1,00, cu un Î 95% (0,97, 1,03), și o intersecție (abatere) de -0,16 cu un Î 95% (-0,37, 0,06), demonstrând faptul că rezultatele concentrațiilor obținute între NeuMoDx HCV Quant Assay și testările de referință sunt extrem de bine corelate și prezintă o abatere acceptabilă. Calitatea adaptării liniare Passing-Bablok este ilustrată de un coeficient al pantei egal cu 1,02, cu un Î 95% (0,99, 1,05), și o intersecție (abatere) de -0,28 cu un Î 95% (-0,43, -0,14), demonstrând faptul că rezultatele concentrațiilor obținute între NeuMoDx HCV Quant Assay și testările de referință sunt extrem de bine corelate și prezintă o abatere acceptabilă, după cum se arată în *Tabelul 14*.

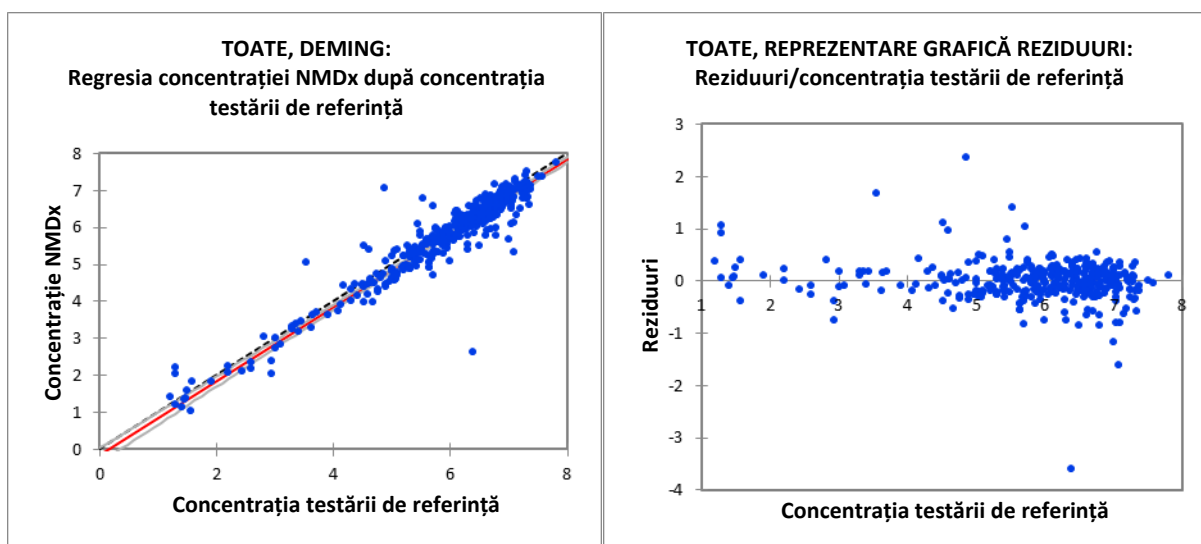


Figura 7: Reprezentări grafice ale echivalenței (stânga) și reziduurilor (dreapta) – Analiză cumulativă (pentru cele două sisteme NeuMoDx System) a rezultatelor NeuMoDx HCV Quant Assay în comparație cu rezultatele testărilor de referință pentru TOATE probele, pe baza analizei de regresie Deming.

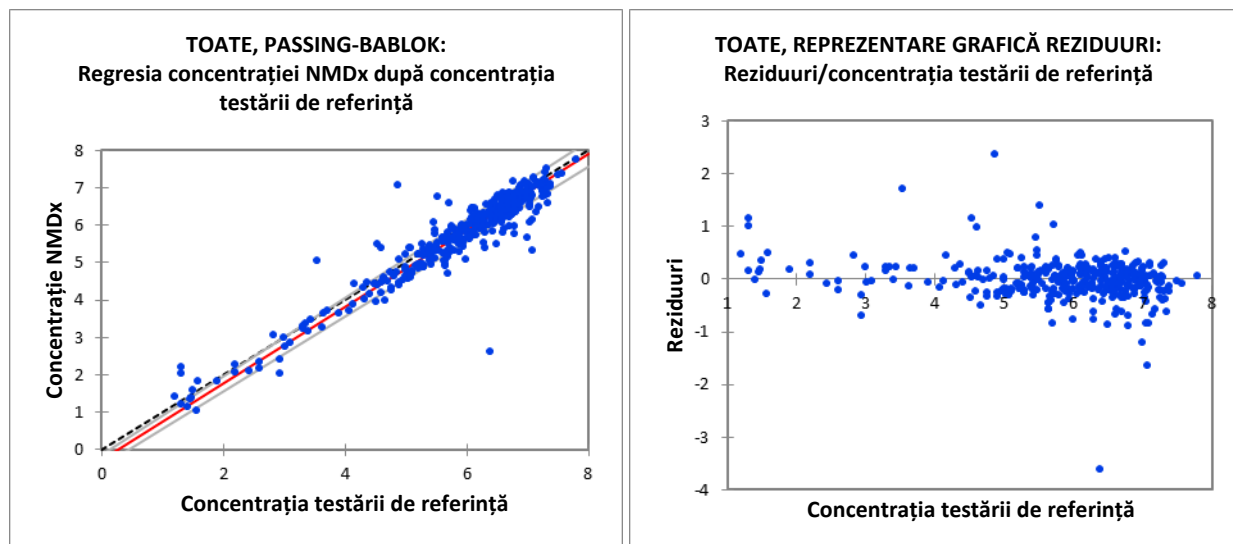


Figura 8: Reprezentări grafice ale echivalenței (stânga) și reziduurilor (dreapta) – Analiză cumulativă (pentru cele două sisteme NeuMoDx System) a rezultatelor NeuMoDx HCV Quant Assay în comparație cu rezultatele testărilor de referință pentru TOATE probele, pe baza analizei de regresie Passing-Bablok.

Tabelul 14. Sumarul analizei de regresie liniară Deming și Passing-Bablok

	Analiză Deming		Analiză Passing-Bablok	
	Intersecție	Coeficientul pantei	Intersecție	Coeficientul pantei
CUMULAT (Toate probele plasmatică + serice)	- 0,16 Î 95% (-0,37,0,06)	1,00 Î 95% (0,97,1,03)	- 0,28 Î 95% (-0,43,-0,14)	1,02 Î 95% (0,99,1,05)

Dintre cele 655 de rezultate valide obținute pentru eșantioanele plasmatică și serice utilizând NeuMoDx HCV Quant Assay, 361 au fost raportate pozitive prin testările de referință pentru HCV și 294 au fost raportate negative. Sensibilitatea și specificitatea NeuMoDx HCV Quant Assay au fost calculate utilizând datele din toate probele clinice valide în comparație cu testarea de referință, care este compilată și prezentată în **Tabelul 15**. Dintre cele 361 de probe pozitive testate, 360 au fost, de asemenea, raportate pozitive de NeuMoDx HCV Quant Assay, demonstrând o sensibilitate de 99,7% cu Î 95% (98,2%-100%). Dintre cele 294 de probe negative testate, 271 au fost, de asemenea, raportate negative de NeuMoDx HCV Quant Assay, demonstrând o specificitate de 92,2% cu Î 95% (88,3%-94,9%).

Echivalența NeuMoDx HCV Quant Assay a fost demonstrată prin rezultate extrem de bine corelate ale performanței analizei pentru NeuMoDx 288 Molecular System, NeuMoDx 96 Molecular System și testarea de referință pentru eșantioanele plasmatică și cele serice.

Tabelul 15. Rezultatele comparației calitative a metodelor pentru NeuMoDx HCV Quant Assay în comparație cu testările de referință – plasmă și ser

	Analiză de referință (POZ)	Analiză de referință (NEG)	TOTAL
NeuMoDx HCV Quant Assay (POZ)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
TOTAL	361	294	655
SENSIBILITATE = 99,7% Î 95% (98,2%-100%) *SPECIFICITATE = 92,2% Î 95% (88,3%-94,9%)			

***NOTĂ:** LLoQ pentru NeuMoDx HCV Quant Assay este 0,9 Log₁₀ UI/ml, care este mai mică decât analiza comparativă folosită ca testare de referință. A fost efectuată o analiză ulterioară, excluzând 9 probe în care s-a detectat HCV de NeuMoDx, dar care au fost raportate ca negative de analiza comparativă. Prin excluderea acestor 9 probe, specificitatea NeuMoDx HCV Quant Assay a fost recalculată a fi de 95,1% cu un ÎI 95% (91,7-97,2).

Testarea eșantioanelor recoltate – fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl

Corelarea cantitativă dintre fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl și cel de 550 μl a fost confirmată utilizând un grup format din probe plasmatic și probe serice individuale, negative la HCV, îmbogățite cu patru niveluri cunoscute de material de control Accuplex HCV, trasabile în conformitate cu AI 5^{lea} standard internațional al OMS pentru ARN HCV pentru testări ale acidului nucleic. Aceste eșantioane individuale de plasmă și ser au fost procesate utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μl și fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl pentru un total de 324 de testări efectuate. Comparările pentru echivalență între concentrația raportată de software-ul NeuMoDx Software pentru fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl și pentru fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μl cu grupul recoltat au fost realizate pe probe individuale. Analiza de regresie Deming și Passing-Bablok a avut o pantă de 1,003 și 1,000, cu intersecții de -0,082 și, respectiv, -0,085 pentru plasmă și o pantă de 0,974 și 0,984 cu intersecții de 0,086 și, respectiv, 0,037 pentru ser, demonstrând o concordanță excelentă a cuantificărilor HCV între cele două fluxuri de lucru pentru procesarea volumelor. O comparație Bland and Altman a demonstrat o abatere minimă între cele două fluxuri de lucru. În plus, analizele de regresie liniară simplă cu concentrația preconizată și cu concentrația raportată pentru fluxul de lucru de 200 μl au avut o pantă de 1,0432 și un coeficient de corelare de 0,994 (plasmă) și o pantă de 1,0007 cu coeficientul de corelare 0,993 (ser), susținând performanța excelentă utilizând fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl pentru NeuMoDx HCV Quant Assay. Rezultatele acestor studii sunt sintetizate mai jos, în *Figura 9* și *Figura 10*.

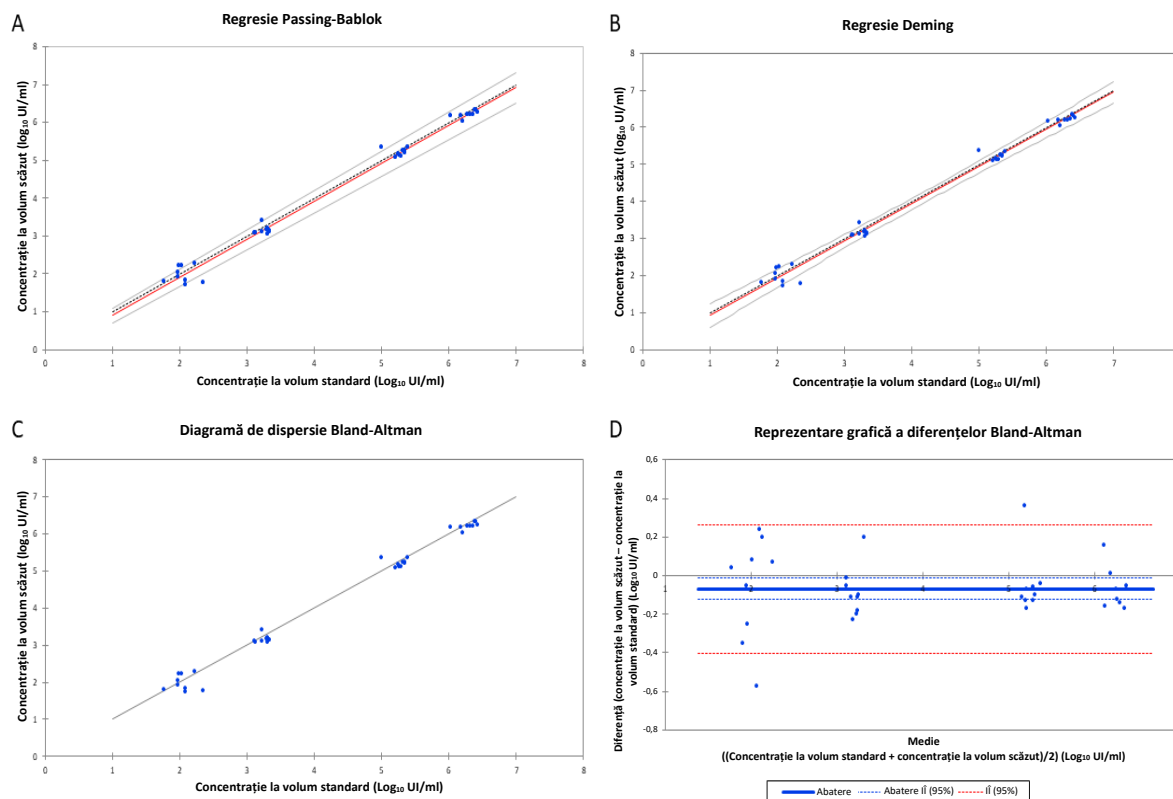


Figura 9: Comparații grafice de echivalență între concentrațiile raportate în fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 200 μl și concentrațiile raportate în fluxul de lucru pentru volumul eșantionului de 550 μl. A) Regresie Passing-Bablok. B) Regresie Deming. C) Diagramă de dispersie Bland-Altman D) Reprezentare grafică a diferențelor Bland-Altman – eșantioane de plasmă

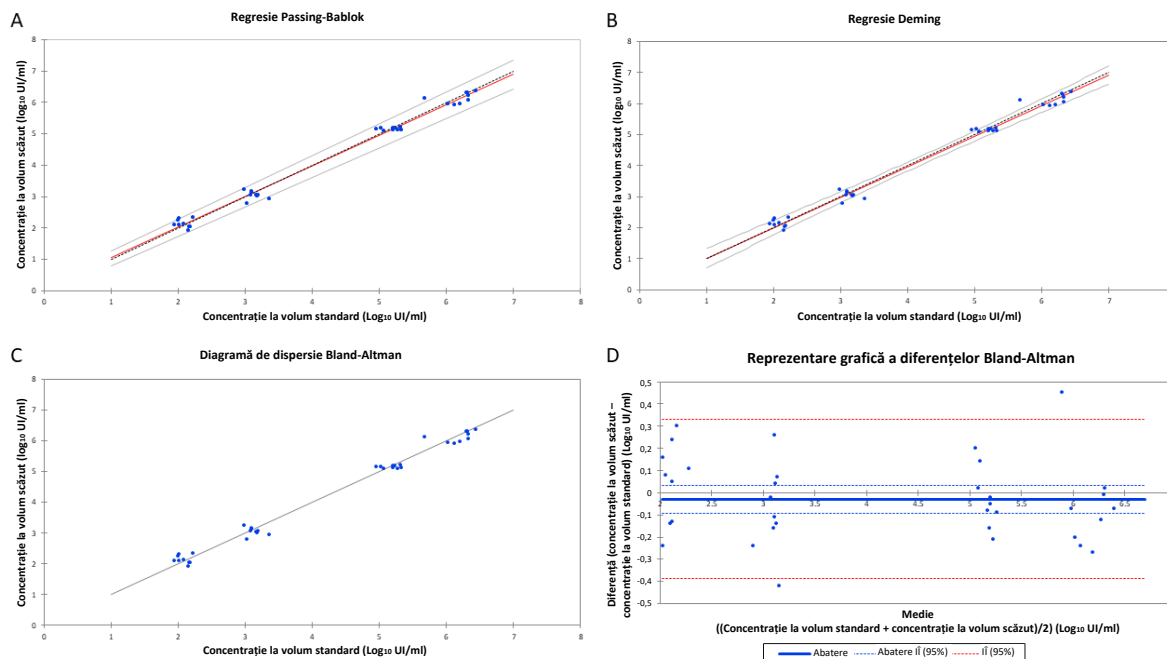


Figura 10: Comparații grafice de echivalență între concentrațiile raportate în flux de lucru pentru volumul eșantionului de 200 µl și concentrațiile raportate în flux de lucru pentru volumul eșantionului de 550 µl. A) Regresie Passing-Bablok. B) Regresie Deming. C) Diagramă de dispersie Bland-Altman D) Reprezentare grafică a diferențelor Bland-Altman – eșantioane de ser

REFERINȚE

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. J haveri 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

MĂRCI COMERCIALE

NeuMoDx™ și NeuDry™ sunt mărci comerciale ale NeuMoDx Molecular, Inc.
 AcroMetrix™ este marcă comercială a Thermo Fisher Scientific.
 Armored RNA® este marcă comercială înregistrată a Asuragen, Inc.
 BD Vacutainer® este marcă comercială înregistrată a Becton, Dickinson and Company
 BD, PPT™ și SST™ sunt mărci comerciale ale Becton, Dickinson and Company
 TaqMan® este marcă comercială înregistrată a Roche Molecular Systems, Inc.

Toate celelalte nume de produse, mărci comerciale și mărci comerciale înregistrate care pot apărea în acest document sunt deținute de proprietarii respectivi.

LEGENDĂ

R only	Doar pe bază de rețetă		Limită de temperatură
	Producător		A nu se reutiliza
IVD	Dispozitiv medical pentru diagnosticare <i>in vitro</i>		Conține suficient pentru <n> (de) testări
EC REP	Reprezentanță autorizată în Comunitatea Europeană		Consultați instrucțiunile de utilizare
REF	Număr de catalog		Atenție
LOT	Cod lot		Riscuri biologice
	Termen de valabilitate	CE	Marcaj 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



Asistență tehnică/Raportarea vigilenței: support@qiagen.com

Brevet: www.neumodx.com/patents