

REF 300901 NeuMoDx™ FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip

R only

CUIDADO: Apenas para exportação dos EUA

IVD Para utilização em diagnóstico *in vitro* no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System



A versão eletrônica está disponível em www.giaqen.com/neumodx-ifu

Para obter instruções detalhadas, consultar o Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System; P/N 40600108

Para obter instruções detalhadas, consultar o Manual do operador do NeuMoDx 96 Molecular System; P/N 40600317

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay é um teste de diagnóstico RT-PCR em tempo real, *in vitro* e multiplexado destinado à diferenciação e detecção qualitativa simultânea do vírus da Influenza A (Flu A), vírus da Influenza B (Flu B), Vírus sincicial respiratório (Respiratory Syncytial Virus, RSV) e ARN do SARS-CoV-2 através de espécimes de esfregaço nasofaríngeo (Nasopharyngeal, NP) colhidos em meio de transporte de indivíduos com sinais e sintomas de doenças semelhantes a Influenza (DSI).

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay conforme executado no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System integra a extração automatizada do ARN para isolar o ácido nucleico-alvo do espécime e RT-PCR em tempo real, cujo alvo é uma região conservada única para a Flu A e RSV e duas regiões conservadas para SARS-CoV-2 e Flu B.

Os resultados deste teste não devem ser utilizados como base única de diagnóstico, tratamento ou outras decisões de gestão do paciente. Resultados positivos são indicativos da presença de SARS-CoV-2 e/ou Flu A e/ou Flu B e/ou de ARN de RSV, mas não excluem uma infecção bacteriana ou uma coinfeção com outros vírus. A correlação clínica com o histórico do paciente e com outras informações de diagnóstico é necessária para determinar o estado de infecção do paciente.

Os resultados negativos não excluem a infecção pelos vírus da Flu A, Flu B, RSV, ou SARS-CoV-2 e não devem ser utilizados como base única de diagnóstico, tratamento ou outras decisões de gestão do paciente. Os resultados negativos devem ser combinados com observações clínicas, o histórico do paciente e/ou informações epidemiológicas.

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay destina-se à utilização por pessoal de laboratórios clínicos qualificado especificamente formado e treinado nas técnicas de procedimentos de diagnóstico de RT-PCR em tempo real e *in vitro* e/ou em NeuMoDx Molecular Systems. O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay não se destina a autoteste ou utilização em locais de prestação de cuidados.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay é um ensaio qualitativo para utilização nos sistemas de instrumentos NeuMoDx 96 e NeuMoDx 288 para a detecção de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, e ou de ARN de RSV em amostras de esfregaço nasofaríngeo. O ensaio não diferencia entre ARN RSV A e RSV B. Os espécimes de esfregaço nasofaríngeo são colhidos em Copan Universal Transport Medium (UTM-RT®) (Copan UTM-RT, Copan, CA, EUA) ou BD™ Universal Viral Transport System (UVT) (BD™ UVT, BD, NJ, EUA). O teste utiliza um Controle de processo de amostra interno de ARN (Sample Process Control, SPC2) que é incorporado durante a preparação de amostras e serve para monitorizar a preparação da amostra total, transcrição reversa e processo de amplificação do PCR. O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay permite até dois fluxos de trabalho de processamento de espécimes com base na necessidade do laboratório: um fluxo de trabalho direto e um fluxo de trabalho pré-tratado. O NeuMoDx Molecular System realiza automaticamente todos os passos necessários para extrair os ácidos nucleico-alvo, prepara o ARN isolado para a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) e, se presentes, realiza a transcrição reversa, amplificação e detecção de produtos de amplificação. O ensaio NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 tem como alvo as regiões conservadas dos genes SARS-CoV-2 Nsp2 e O-ribose metiltransferase, regiões na proteína matriz do vírus da Influenza A e do Vírus sincicial respiratório e na proteína matriz e nos genes NS1 da proteína não estrutural do vírus da Influenza B.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O atual estado da arte na detecção de infecções agudas de FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 é a amplificação do ácido nucleico das regiões conservadas no genoma do alvo, que está alinhado com a transcrição reversa de PCR em tempo real aplicada pelo NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay, conforme executado no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System.

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay combina a extração automatizada de ARN e a amplificação/detecção de SARS-CoV-2, Flu A, Flu B e/ou ARN de RSV por RT-PCR em tempo real. As amostras de esfregaço nasofaríngeo são colhidas no Copan UTM-RT System ou no BD™ UVT System. O fluxo de trabalho direto permite que o tubo de colheita do esfregaço primário ou uma alíquota do meio de transporte num tubo secundário seja etiquetado com código de barras e carregado no NeuMoDx System para processamento. Em alternativa, é possível tratar em primeiro lugar um espécime de esfregaço em meio de transporte com um volume idêntico de NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) antes de ser carregado no sistema sem intervenção adicional por parte do utilizador. O NeuMoDx System aspira automaticamente uma alíquota do espécime a misturar com o NeuMoDx Lysis Buffer 3 para um fluxo de trabalho direto ou uma alíquota do espécime pré-tratado a misturar com o Lysis Buffer 2 e os reagentes contidos na NeuMoDx Extraction Plate para iniciar o processamento. Especificamente, utilizando o fluxo de trabalho direto, o tubo de colheita primário (sem esfregaço e sem tampa) ou uma alíquota do meio de amostra num tubo secundário é etiquetado com um código de barras e carregado no NeuMoDx System, utilizando um transportador de tubos de espécime designado. Para o fluxo de trabalho pré-tratado, o espécime em meio de transporte é, em primeiro lugar, tratado com um volume idêntico de NeuMoDx VVLB antes de ser carregado no sistema. No fluxo de trabalho direto, é aspirada uma alíquota de 400 µL da amostra pelo NeuMoDx System e misturada com um volume idêntico de NeuMoDx Lysis Buffer 3; para o fluxo de trabalho pré-tratado, é combinado 550 µL da amostra pré-tratada com um volume idêntico de Lysis Buffer 2. O NeuMoDx System automatiza e integra a extração e a concentração de ARN, a preparação de reagentes e a amplificação/detecção de ácidos nucleicos das sequências-alvo, utilizando RT-PCR em tempo real. O controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) ajuda a monitorizar a presença de substâncias inibidoras e as falhas de sistema, processo ou reagentes. Não é necessária qualquer intervenção do operador depois de o espécime ser carregado no NeuMoDx System.

O NeuMoDx System utiliza uma combinação de calor, enzimas líticas e reagentes de extração para desempenhar automaticamente a lise, a extração de ARN e a remoção de inibidores. Os ácidos nucleicos libertados são capturados por partículas paramagnéticas. As partículas, com os ácidos nucleicos ligados, são carregadas no NeuMoDx Cartridge, onde os elementos não ligados são retirados por lavagem, utilizando o NeuMoDx Wash Reagent. O ARN ligado é então eluído utilizando o NeuMoDx Release Reagent. O NeuMoDx System utiliza o ARN eluído para reidratar reagentes de amplificação NeuDry™ patenteados que contêm todos os elementos necessários para a amplificação dos alvos de Flu A, Flu B, RSV, SARS-CoV-2 e SPC2. Isto permite a amplificação e detecção simultâneas de todos os alvos e sequências de ARN de controlo de processo de amostra. Depois da reconstituição dos reagentes de RT-PCR secos, o NeuMoDx System dispensa a mistura preparada e pronta para RT-PCR numa câmara de PCR (por espécime) do NeuMoDx Cartridge. A transcrição reversa, a amplificação e a detecção das sequências de controlo e alvo (se presentes) ocorrem na câmara de PCR. O NeuMoDx Cartridge foi concebido para conter o amplificação gerado decorrente de RT-PCR, eliminando essencialmente o risco de contaminação após a amplificação.

Os alvos amplificados são detetados em tempo real utilizando química de sondas de hidrólise (habitualmente referida como química TaqMan®), utilizando moléculas de sondas fluorogénicas de oligonucleotídeos específicas dos amplicões dos seus respetivos alvos. As sondas TaqMan consistem num fluoróforo covalentemente ligado à extremidade de 5' da sonda de oligonucleotídeos e num supressor na extremidade de 3'. Enquanto a sonda está intacta, o fluoróforo e o supressor estão próximos, permitindo que a molécula supressora extinga a fluorescência emitida pelo fluoróforo via Transferência de energia por ressonância de Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

As sondas TaqMan foram concebidas de forma a hibridizar dentro de uma região de cDNA amplificada por um conjunto específico de iniciadores. À medida que a Polimerase Taq de ADN expande o iniciador e sintetiza a nova cadeia, a atividade exonuclease de 5' a 3' da Polimerase Taq de ADN degrada a sonda que foi hibridizada com o modelo. A degradação da sonda liberta o fluoróforo e quebra a sua proximidade com o supressor, ultrapassando assim o efeito de supressão devido ao FRET e permitindo a detecção do fluoróforo. O sinal de fluorescência resultante, detetado no termociclador de RT-PCR do NeuMoDx System é diretamente proporcional ao fluoróforo libertado e pode ser correlacionado com a quantidade de alvo presente.

O canal de detecção de fluorescência para cada alvo do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay é apresentado na tabela abaixo. O software do NeuMoDx System monitoriza o sinal fluorescente emitido pelas sondas TaqMan no final de cada ciclo de amplificação. Quando a termociclagem estiver concluída, o software do NeuMoDx System analisa os dados e comunica um resultado (POSITIVE [POSITIVO]/NEGATIVE [NEGATIVO]/INDETERMINATE [INDETERMINADO]/NO RESULTS [SEM RESULTADOS]/UNRESOLVED [NÃO RESOLVIDO]).

Tabela 1. Canais de detecção

Alvo	Região-alvo	Fluoróforo da sonda	Excitação/emissão	Canal de detecção
Influenza A	Proteína matriz	FAM	530/555 nm	Green
Influenza B	Proteína matriz	HEX	470/510 nm	Yellow
	Proteína não estrutural NS1			
SARS-CoV-2	Gene Nsp2	Texas Red	585/610 nm	Orange
	O-ribose metiltransferase			
Vírus sincicial respiratório	Proteína matriz	Q705	680/715 nm	Far Red
SPC2	Proteína de montagem (MS2)	Q670	625/660 nm	Red

REAGENTES/CONSUMÍVEIS

Material fornecido

REF	Conteúdo	Unidades por embalagem	Testes por unidade	Testes por embalagem
300901	NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip <i>Reagentes de RT-PCR secos contendo sondas e iniciadores TaqMan específicos para Flu A/Flu B/RSV/SARS-CoV-2 e sondas e iniciadores TaqMan específicos para SPC2. Contém 21,1% de HCl de tris, 8,4% de dNTP e outros ingredientes inativos</i>	6	16	96

Materiais necessários, mas não fornecidos (disponibilizados em separado pela NeuMoDx)

REF	Conteúdo
901200	NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls <i>Conjuntos de utilização única de controlos positivos e negativos de Flu A/Flu B/RSV/SARS-CoV-2 para estabelecer a validade diária do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (1 frasco por cada controlo = 1 conjunto)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Partículas paramagnéticas, enzimas líticas e controlos de processo de amostra secos</i>
400500**	NeuMoDx Lysis Buffer 2
400600*	NeuMoDx Lysis Buffer 3
401500**	NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Pontas Hamilton® CO-RE/CO-RE II (300 µL) com filtros
235905	Pontas Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µL) com filtros

* Necessários apenas para o processamento de amostras, utilizando o Fluxo de trabalho direto, sem uma etapa de pré-tratamento. Consultar a secção "Instruções de utilização" abaixo.

** Necessários apenas se processar de amostras, utilizando o Fluxo de trabalho pré-tratado, sem uma etapa de pré-tratamento. Consultar a secção "Instruções de utilização" abaixo.

Esfregaços e meios de transporte (não fornecidos)

Tipo de amostra	Dispositivo de colheita recomendado	Esfregaço recomendado
Zaragatoa nasofaríngea	3 mL de Universal Transport Medium (Copan UTM-RT, Copan, CA, EUA, 305C) ou 3 mL de Universal Viral Transport System (BD UVT, BD, NJ, EUA, BD 220531)	Flexible Minitip Nylon® Flocked Swab (Copan, CA, EUA) ou Flexible Minitip Flocked Swab (BD, NJ, EUA)

Instrumentos necessários

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] ou **NeuMoDx 96 Molecular System** [REF 500200]
NeuMoDx System Software versão 1.9.2.6 ou superior



AVISOS E PRECAUÇÕES

- O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay destina-se a ser utilizado apenas com NeuMoDx Systems para diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar os reagentes ou consumíveis depois da data de validade indicada.
- Não utilizar quaisquer reagentes que tenham o selo de segurança aberto ou cuja embalagem tenha sido danificada ao chegar ao destino.
- Não utilizar consumíveis ou reagentes cuja bolsa protetora tenha sido aberta ou danificada ao chegar ao destino.
- O volume mínimo de espécime de alíquotas secundárias depende do tamanho do tubo/transportador de tubos de espécime, tal como definido abaixo. Volumes de espécimes inferiores ao mínimo especificado poderão resultar num erro "Quantity Not Sufficient" (Quantidade insuficiente).
- A utilização de espécimes armazenados a temperaturas inadequadas ou para além dos períodos de armazenamento especificados poderá produzir resultados inválidos ou erróneos.
- Evitar a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase) de todos os reagentes e consumíveis. É recomendada a utilização de pipetas de transferência descartáveis, estéreis e isentas de RNase ao utilizar tubos secundários. Utilizar uma nova pipeta para cada espécime.
- Para evitar a contaminação, não manusear nem destruir um NeuMoDx Cartridge após a amplificação. Não recuperar NeuMoDx Cartridges do contentor de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 288 Molecular System) ou do recipiente de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 96 Molecular System) em quaisquer circunstâncias. O NeuMoDx Cartridge foi concebido para prevenir a contaminação.
- Nos casos em que são também realizados em laboratório testes de PCR em tubo aberto, é necessário ter atenção para assegurar que a NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip, os consumíveis e reagentes adicionais necessários para testes, o equipamento de proteção individual, tal como luvas e batas de laboratório, e o NeuMoDx System não são contaminados.
- Devem ser utilizadas luvas de nitrilo, sem pó e limpas durante o manuseamento de reagentes e consumíveis NeuMoDx. É necessário ter especial cuidado para não tocar na parte superior da superfície do NeuMoDx Cartridge, na superfície da película de alumínio da NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip e na NeuMoDx Extraction Plate ou na parte superior da superfície do recipiente de NeuMoDx Lysis Buffer; o tratamento dos consumíveis e reagentes deve ser realizado tocando apenas nas superfícies laterais.
- Os NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls [REF 901200] devem ser processados a cada 24 horas quando testados com o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
- São fornecidas fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS) para cada reagente (conforme aplicável) em www.giagen.com/neumodx-ifu.
- Lavar muito bem as mãos depois de realizar o teste.
- Não pipetar com a boca. Não fumar, beber ou comer em áreas onde estiverem a ser manuseados espécimes ou reagentes.
- Manusear sempre os espécimes como se fossem infecciosos e de acordo com procedimentos laboratoriais seguros, tal como os descritos na publicação *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹ e no documento M29-A4 do CLSI.²
- Quando trabalhar com químicos, utilize sempre uma bata de laboratório apropriada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS).
- Eliminar os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos federais, nacionais, regionais e locais.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip



Contém ácido bórico; nonilfenol etoxilado. Perigo! Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode prejudicar a fertilidade ou o nascituro. Nocivo para a vida aquática com efeitos duradouros. Obter instruções especiais antes da utilização. Não manusear sem ler e compreender todas as precauções de segurança. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Procurar assistência/aconselhamento médico. Armazenar em local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente em instalação de eliminação de resíduos aprovada.

Informação de emergência

CHEMTREC

Fora dos EUA e Canadá +1 703-527-3887

Eliminação

O produto contém nonilfenol etoxilado, uma substância disruptora endócrina que tem efeitos adversos no ambiente.

Elimine como sendo resíduos perigosos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais. Tal também se aplica a produtos não utilizados.

Não elimine resíduos líquidos pelo esgoto.

Siga as recomendações nas fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS).



ARMAZENAMENTO, TRATAMENTO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

- As NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips permanecem estáveis dentro da embalagem primária até à data de validade indicada na etiqueta do produto quando armazenadas a temperaturas entre 15 °C e 28 °C.
- Não carregue novamente qualquer produto de teste que tenha sido previamente carregado noutra NeuMoDx System.
- Uma vez carregada, a NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip pode permanecer a bordo do NeuMoDx System durante 14 dias. O prazo de validade restante de tiras de teste carregadas é controlado pelo software e comunicado ao utilizador em tempo real. O NeuMoDx System irá solicitar a remoção de tiras de teste que tenham sido utilizadas para além do período permitido.

COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES

Manuseie todos os espécimes como se fossem passíveis de transmitir agentes infecciosos.

1. Os espécimes devem ser colhidos utilizando o Copan UTM-RT® System ou o BD™ UVT System e os esfregaços flocados de nylon validados (consulte Esfregaços e meios de transporte). Adicionalmente, são aceites esfregaços flocados, de poliéster e de nylon. Siga as instruções do fabricante para a colheita, o transporte e o armazenamento de espécimes.
2. Os espécimes podem ser testados em tubos de colheita primários ou em tubos de espécime secundários compatíveis.
3. Os espécimes podem ser armazenados no NeuMoDx System até 8 horas antes do processamento. Se for necessário tempo adicional de armazenamento, é recomendado que os espécimes sejam refrigerados ou congelados como alíquotas secundárias.
4. Os espécimes preparados devem ser armazenados a temperaturas entre 2 e 8 °C até 7 dias antes do teste.
5. Se os espécimes forem expedidos, estes devem ser embalados e etiquetados em conformidade com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis.
6. Avançar para a secção *Preparação para teste*.

PREPARAÇÃO PARA TESTE

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay abrange dois fluxos de trabalho diferentes, dependendo das preferências do utilizador/laboratório:

Fluxo de trabalho 1: **DIRETO** – o espécime de esfregaço em meio de transporte é carregado diretamente no NeuMoDx System num tubo de colheita primário ou num tubo de espécime secundário

-ou-

Fluxo de trabalho 2: **PRÉ-TRATADO** – o espécime de esfregaço em meio de transporte é pré-tratado com NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer antes de ser carregado no NeuMoDx System num tubo de colheita primário ou num tubo de espécime secundário

Preparação para teste – Fluxo de trabalho DIRETO para espécimes de esfregaço diretos

1. Aplique uma etiqueta de código de barras de espécime a um tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System, conforme descrito no passo 3 abaixo.
2. Se estiver a testar o espécime no tubo de colheita primário, colocar o tubo etiquetado com código de barras num transportador de tubos de espécime e garantir que a tampa e o esfregaço são removidos antes de o carregar no NeuMoDx System.
3. Em alternativa, uma alíquota do meio de transporte pode ser transferida para um tubo secundário etiquetado com um código de barras e colocado num transportador de tubos de espécime. Caso esteja a utilizar um tubo secundário, transferir uma alíquota do meio de transporte para um tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System conforme os volumes definidos abaixo:
 - Transportador de tubos de espécime (32 tubos): 11–14 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura, volume mínimo de enchimento $\geq 600 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime (24 tubos): 14,5–18 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura, volume mínimo de enchimento $\geq 1000 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime de baixo volume (32 tubos): Tubo de microcentrífuga com base cónica de 1,5 mL, volume mínimo de enchimento $\geq 500 \mu\text{L}$

Preparação para teste – Fluxo de trabalho PRÉ-TRATADO para espécimes de esfregaço pré-tratadas

Nota: Permitir que o Vantage Viral Lysis Buffer atinja a temperatura ambiente (15 a 30 °C) antes de utilizar.

AVISO: O pré-tratamento de amostras de esfregaço com NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer não garante a inativação de qualquer vírus presente. Todas as amostras devem ser manuseadas como se fossem passíveis de transmitir agentes infecciosos.

1. Pré-tratar o meio de transporte do espécime com um volume 1:1 de NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. Tal pode ser efetuado no tubo de colheita de esfregaço primário, se o volume do meio de transporte for conhecido. Em alternativa, o pré-tratamento pode ser efetuado num tubo secundário combinando uma alíquota do meio de transporte com um volume idêntico de NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. A mistura resultante deve respeitar os requisitos de volume mínimo especificados no passo 4 abaixo.
2. Misturar cuidadosamente com uma pipeta para assegurar a distribuição uniforme do NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer.
3. Se estiver a testar o espécime pré-tratado no tubo de colheita primário, colocar o tubo etiquetado com código de barras num transportador de tubos de espécime e garantir que a tampa e o esfregaço são removidos antes de o carregar no NeuMoDx System.
4. Caso esteja a utilizar um tubo secundário, transferir uma alíquota da amostra pré-tratada para um tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System e colocar num transportador de tubos de espécime conforme os volumes definidos abaixo:
 - Transportador de tubos de espécime (32 tubos): 11–14 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura, volume mínimo de enchimento $\geq 750 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime (24 tubos): 14,5–18 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura, volume mínimo de enchimento $\geq 1100 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime de baixo volume (32 tubos): Tubo de microcentrífuga com base cônica de 1,5 mL, volume mínimo de enchimento $\geq 650 \mu\text{L}$

Operação do NeuMoDx System

Para obter instruções detalhadas, consultar os Manuais do operador do NeuMoDx 288 Molecular System e do NeuMoDx 96 Molecular System (P/N 40600108 e 40600317)

1. Carregar o pedido de teste no NeuMoDx System de acordo com o fluxo de trabalho utilizado na preparação para teste:
 - Os espécimes puros de esfregaço não tratado, preparados utilizando o fluxo de trabalho DIRETO, são testados definindo o espécime como "**Transport Medium**" (Meio de transporte)
 - Os espécimes de esfregaço pré-tratados com NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer utilizando o fluxo de trabalho PRÉ-TRATADO são testados definindo o espécime como "**UserSpecified1**" (Especificado pelo utilizador 1)Caso não seja definido no pedido de teste, será utilizado o tipo de espécime Meio de transporte (fluxo de trabalho direto) num **Secondary Tube** (Tubo secundário) como predefinição.
2. Preencher um ou mais NeuMoDx System Test Strip Carrier(s) com a(s) NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip (s) e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) Test Strip Carrier(s) no NeuMoDx System.
3. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, adicionar os consumíveis necessários aos transportadores de consumíveis do NeuMoDx System e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System.
4. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, repor NeuMoDx Wash Reagent e/ou NeuMoDx Release Reagent e esvaziar os resíduos de iniciação, o contedor de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 288 Molecular System), o recipiente de resíduos de pontas (apenas NeuMoDx 96 Molecular System) e/ou o recipiente de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 96 Molecular System), conforme apropriado.
5. Carregar o(s) tubo(s) de espécime no transportador de tubos de espécime e certificar-se de que as tampas e os esfregaços foram removidos de todos os tubos.
6. Colocar os transportadores de tubos de espécime na prateleira do carregador automático e utilizar o ecrã tátil para carregar os transportadores no NeuMoDx System. Tal irá iniciar o processamento dos espécimes carregados para os testes identificados, desde que esteja presente no sistema um pedido de teste válido.

LIMITAÇÕES

1. A NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip apenas pode ser utilizada em NeuMoDx Systems.
2. O desempenho da NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip foi estabelecido para espécimes de esfregaço nasofaríngeo em meio de transporte colhidas por um médico. A utilização da NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip com outros tipos de espécimes e o meio de colheita não foi avaliado e as características de desempenho são desconhecidas.
3. Uma vez que a deteção de alvos virais está, geralmente, dependente do número de partículas virais presentes na amostra, a obtenção de resultados fiáveis depende da colheita, do tratamento e do armazenamento adequados do espécime.
4. Podem ocorrer resultados erróneos devido à colheita, ao manuseamento e ao armazenamento inadequados de espécimes, a erros técnicos ou à mistura de tubos de espécime. Para além disso, podem ocorrer resultados falso-negativos porque o número de partículas virais presente na amostra está abaixo do limite de deteção do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

5. A operação do NeuMoDx System apenas pode ser realizada por pessoal com formação para utilizar o NeuMoDx System.
6. Se os alvos de Flu A, Flu B, RSV e SARS-CoV-2 e o alvo de SPC2 não forem amplificados, é comunicado um resultado inválido (Indeterminate [Indeterminado] ou Unresolved [Não resolvido]) e o teste deverá ser repetido.
7. Se ocorrer um erro do sistema antes da conclusão do processamento de amostras, será comunicado "No Result" (Sem resultados) e o teste deverá ser repetido.
8. Um resultado positivo não indica necessariamente a presença de influenza A, influenza B, SARS-CoV-2 e/ou do RSV viável. No entanto, um resultado positivo pressupõe a presença de ARN de influenza A, influenza B, SARS-CoV-2 e/ou do ARN de RSV.
9. Eliminações ou mutações nas regiões conservadas visadas pelo NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay podem afetar a deteção e originar um resultado incorreto.
10. Os resultados do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay devem ser utilizados como complemento às observações clínicas e a outras informações à disposição do médico.
11. São recomendadas boas práticas de laboratório, incluindo a troca de luvas entre o manuseamento de espécimes de pacientes para evitar a contaminação.

RESULTADOS

Os resultados disponíveis podem ser visualizados ou impressos a partir do separador "Results" (Resultados) na janela Results (Resultados) do ecrã tátil do NeuMoDx System. Os resultados do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay são gerados automaticamente pelo software do NeuMoDx System, utilizando o algoritmo de decisão e os parâmetros de processamento de resultados especificados no ficheiro de definição do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (versão FluA-B-RSV-CoV-2 ADF 4.0.0 ou superior). Um resultado do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay pode ser comunicado como Negative (Negativo), Positive (Positivo), Indeterminate (Indeterminado), No Result (Sem resultados) ou Unresolved (Não resolvido), com base no estado de amplificação do alvo e no SPC2. Os resultados são comunicados com base no algoritmo de decisão de processamento de resultados do ADF, resumido na *Tabela 2* abaixo.

Tabela 2. Interpretação de resultados do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay

RESULTADO GERAL	ALVO 1 (Flu A) FAM	ALVO 2 (Flu B) HEX	ALVO 3 (SARS-CoV-2) TX RED	ALVO 4 (RSV) Vermelho distante	CONTROLO DE PROCESSO (SPC2) Vermelho	INTERPRETAÇÃO
POSITIVO (ARN alvo detetado)	AMPLIFIED (AMPLIFICADO) [5 ≤ Ct < 25 AND (e) EPR > 2,0 AND (e) EP ≥ 750] OR (ou) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (e) EP ≥ 750)	N/D	N/D	N/D	N/D	ARN de Flu A detetado
	N/D	AMPLIFIED (AMPLIFICADO) [5 ≤ Ct < 28 AND (e) EPR > 1,5 AND (e) EP ≥ 600] OR (ou) [28 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 600]	N/D	N/D	N/D	ARN de Flu B detetado
	N/D	N/D	AMPLIFIED (AMPLIFICADO) [5 ≤ Ct < 25 AND (e) EPR > 1,5 AND (e) EP ≥ 1200] OR (ou) [25 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 1200]	N/D	N/D	ARN de SARS-CoV-2 detetado

RESULTADO GERAL	ALVO 1 (Flu A) FAM	ALVO 2 (Flu B) HEX	ALVO 3 (SARS-CoV-2) TX RED	ALVO 4 (RSV) Vermelho distante	CONTROLO DE PROCESSO (SPC2) Vermelho	INTERPRETAÇÃO
	N/D	N/D	N/D	AMPLIFIED (AMPLIFICADO) [5 ≤ Ct < 30 AND (e) EPR > 1,15 AND (e) EP ≥ 1200] OR (ou) [30 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 1200]	N/D	ARN de RSV detetado
NEGATIVO (ARN do alvo não detetado)	NOT AMPLIFIED (NÃO AMPLIFICADO) N/D OR (ou) (5 ≤ Ct < 25 AND (e) EPR ≤ 2,0) OR (ou) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (e) EP < 750) OR (ou) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NÃO AMPLIFICADO) N/D OR (ou) (5 ≤ Ct < 28 AND (e) EPR ≤ 1,5) OR (ou) (28 ≤ Ct ≤ 37 AND (e) EP < 600) OR (ou) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NÃO AMPLIFICADO) N/D OR (ou) (5 ≤ Ct < 25 AND (e) EPR ≤ 1,5) OR (ou) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND (e) EP < 1200) OR (ou) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (NÃO AMPLIFICADO) N/D OR (ou) (5 ≤ Ct < 30 AND (e) EPR ≤ 1,15) OR (ou) (30 ≤ Ct ≤ 37 AND (e) EP < 1200) OR (ou) (Ct > 37)	AMPLIFIED (AMPLIFICADO) (24 ≤ Ct ≤ 31 AND (e) EP ≥ 1800)	ARN de Flu A, Flu B, RSV e SARS-CoV-2 não detetado
NR*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (Não amplificado, Erro do sistema detetado, Processamento de amostras interrompido)					O processamento de amostras foi interrompido; testar novamente a amostra
IND*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Não amplificado, Erro do sistema detetado, Processamento de amostras completo)					Todos os resultados de alvo foram inválidos; testar novamente a amostra
UNR*	Not Amplified, No System Error Detected (Não amplificado, Nenhum erro do sistema detetado)					Todos os resultados de alvo foram inválidos; testar novamente a amostra

* O Sistema possui a capacidade adicional de Rerun/Repeat (Reexecutar/repetir) que permite o reprocessamento automático em caso de ocorrência de um resultado inválido para minimizar atrasos na comunicação de resultados.

Resultados inválidos

Se um NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay realizado no NeuMoDx System não produzir um resultado válido, será comunicado como Indeterminate (Indeterminado), No Result (Sem resultados) ou Unresolved (Não resolvido) com base no tipo de erro ocorrido, devendo o teste ser repetido para obtenção de um resultado válido.

Será comunicado um resultado Indeterminate (Indeterminado) no caso de ser detetado um erro do NeuMoDx System durante o processamento da amostra. É recomendada a realização de um novo teste no caso de ser comunicado um resultado Indeterminate (Indeterminado).

Será comunicado um resultado No Result (Sem resultados) no caso de ser detetado um erro do NeuMoDx System e o processamento de amostras for interrompido. Recomenda-se repetir o teste caso seja comunicado um resultado No Result (Sem resultados).

Caso não seja detetado um alvo e não haja amplificação do controlo de processo de amostra, o que indica uma possível falha do reagente ou a presença de inibidores, será comunicado um resultado Unresolved (Não resolvido). Caso seja comunicado um resultado Unresolved (Não resolvido), é recomendada, como primeiro passo, a realização de um novo teste. Se o novo teste falhar, pode ser utilizado um espécime diluído para mitigar os efeitos de uma possível inibição.

Consulte o Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System (P/N: 40600108) ou o Manual do utilizador do operador do NeuMoDx 96 Molecular System (P/N: 40600317) para obter uma lista dos códigos de erro que podem ser associados a resultados inválidos.

O NeuMoDx System está equipado com a capacidade de Rerun/Repeat (Reexecutar/repetir) automática que o utilizador final pode optar por utilizar, de forma a assegurar que um resultado INVALID (Inválido) é reprocessado automaticamente para minimizar atrasos na comunicação de resultados.

Controlo de qualidade

Geralmente, os regulamentos locais especificam que o laboratório é responsável pelos procedimentos de controlo que monitorizam a exatidão e precisão do processo analítico completo e devem estabelecer o número, o tipo e a frequência dos materiais de controlo de teste utilizando especificações de desempenho verificadas para um sistema de teste aprovado e não modificado.

Controlos externos

- 1) É necessário que os utilizadores processem um conjunto de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls [REF 901200] a cada 24 horas e antes do processamento de amostras do paciente. Se não existir um conjunto válido de resultados de controlos externos, o software do NeuMoDx System irá solicitar ao utilizador que estes controlos sejam processados antes de os resultados da amostra poderem ser comunicados.
- 2) Se forem necessários controlos externos, processar os controlos (1 controlo positivo e 1 controlo negativo):

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Esquema de cores da etiqueta
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control(s)	Vermelho
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control(s)	Preto

- 3) Se estiver a processar Controlos externos, colocar os controlos num transportador de tubos de espécime e utilizar o ecrã tátil para carregar o transportador no NeuMoDx System a partir da prateleira do carregador automático. O NeuMoDx System irá reconhecer os códigos de barras e iniciar os controlos de processamento, exceto quando não estiverem disponíveis os reagentes ou consumíveis que são necessários para o teste.
- 4) A validade destes controlos externos irá ser avaliada pelo NeuMoDx System com base nos resultados previstos.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Resultado de FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	Resultado do SPC2
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control(s)	Detetado ARN de FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2	N/D
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control(s)	ARN de FluA, FluB, RSV e SARS-CoV-2 não detetado	SPC2 Positivo

- 5) O tratamento de resultados discrepantes de controlos externos deve ser realizado da seguinte forma:
 - a) A comunicação de um resultado de teste Positive (Positivo) para uma amostra de controlo negativo pode indicar um problema de contaminação e os procedimentos de controlo de qualidade do laboratório necessitam de ser examinados para encontrar a causa principal. Certifique-se de que utiliza áreas separadas para preparação de amostras, manuseamento do controlo e configuração de RT-PCR. Consultar o *Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System ou do NeuMoDx 96 Molecular System* para obter dicas adicionais sobre resolução de problemas.
 - b) A comunicação de um resultado Negative (negativo) para uma amostra de controlo positivo pode indicar que existe um problema relacionado com reagentes ou com o NeuMoDx System. Consultar o *Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System ou do NeuMoDx 96 Molecular System* para obter dicas sobre resolução de problemas.
 - c) Em ambos os casos acima ou no caso de um resultado No Result (Sem resultados, NR), Unresolved (Não resolvido, UNR) ou Indeterminate (Indeterminado, IND), repetir os controlos falhados com frascos recém-descongelados dos controlos que falharam o teste de validade.
 - d) Se o controlo positivo continuar a comunicar um resultado de teste Negative (Negativo), contactar a assistência técnica da QIAGEN.
 - e) Se o controlo negativo continuar a comunicar um resultado de teste Positive (Positivo), tentar eliminar todas as potenciais fontes de contaminação, incluindo substituir todos os reagentes e repetir o processamento antes de contactar a assistência técnica da QIAGEN.
 - f) Se os Controlos externos não fornecem os resultados esperados, é necessário repetir um conjunto de controlos positivos e negativos. Os resultados do paciente não serão comunicados se os controlos não tiverem os resultados esperados.

Controlos (internos) do processo de amostra

Um controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) exógeno está integrado na NeuMoDx Extraction Plate e passa por todo o processo de extração do ácido nucleico e de amplificação RT-PCR em tempo real com cada amostra. Estão também incluídos os iniciadores e as sondas específicos para o SPC2 em cada um dos poços da NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip, permitindo a deteção do SPC2 em conjunto com o ARN alvo (se presente) via PCR em multiplex. A deteção da amplificação do SPC2 permite que o software do NeuMoDx System monitorize a eficácia dos processos de extração de ARN e de amplificação RT-PCR.

Antes da RT-PCR, o NeuMoDx System efetua automaticamente uma "FILL CHECK" (Verificação de enchimento) para assegurar que a câmara de PCR está cheia de solução e contém uma quantidade adequada de sonda fluorescente.

O software do NeuMoDx System monitoriza continuamente os sensores e atuadores a bordo para garantir a operação segura e eficaz do sistema.

São implementados vários modos de recuperação de erro de fluido através da monitorização ativa das operações de aspiração e dispensa para assegurar que o sistema pode concluir o processamento de todas as amostras de forma segura e eficaz ou fornecer um código de erro adequado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay no NeuMoDx Molecular System foi caracterizada em duas partes. O limite de deteção (LdD) foi caracterizado utilizando espécimes clínicos negativos de esfregaços nasofaríngeos não identificados que restaram em pools colhidos na matriz UVT e em estirpes-modelo de cada alvo. A estirpe-modelo utilizada para cada alvo está apresentada na *Tabela 3*. Primeiro, foi preparada uma série de diluições utilizando estirpes-modelo de cada alvo em UVT com os fluxos de trabalho pré-tratado e direto e, em seguida, processada pelo NeuMoDx System para determinar um valor preliminar de limite de deteção (LdD). Na segunda parte do teste, estes valores preliminares de LdD foram confirmados utilizando um estudo da taxa de identificação no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System para ambos os fluxos de trabalho. O LdD preliminar é aceite se o teste da taxa de identificação obtiver uma taxa de positividade de 95% para ambos os fluxos de trabalho em ambos os sistemas. As taxas de deteção para o LdD preliminar estão descritas na *Tabela 4*; a *Tabela 5* oferece detalhes sobre a confirmação da taxa de identificação do N288 System e a *Tabela 6* oferece detalhes sobre a confirmação da taxa de identificação do N96 System. As reivindicações finais do LdD na *Tabela 4* estão indicadas a **negrito**.

Tabela 3. Estirpe utilizada para cada alvo

Alvo/Estirpe	Fonte	N.º de cat.	N.º de lote	Tipo de material
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1688	70031602	Supernadante clarificado de células infetadas
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1690	70032253	Supernadante clarificado de células infetadas
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	Virapur	N/D	B1904J	Substância em bruto ativa
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	Virapur	N/D	C2030D	Substância em bruto ativa
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	IRR	FR-1619	70015942	Supernadante clarificado de células infetadas
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	IRR	FR-1592	70013310	Supernadante clarificado de células infetadas
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	ATCC	VR-1931	70020870	Fluído de cultura clarificado e lisado celular
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	Virapur	N/D	B1904N	Substância em bruto ativa
RSV A2	ATCC	VR-1540	60430286	Fluído de cultura e lisado celular
RSV B (WV/14617/85)	ATCC	VR-1400	70013461	Fluído de cultura e lisado celular
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	NIBSC	20/146	N/D	Ácido liofilizado e vírus inativado por calor
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	BEI	NR-52285	70037779	Vírus inativado por calor

Tabela 4. Taxas de detecção positivas para a determinação de LdD preliminar do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – (a) Fluxo de trabalho pré-tratado; (b) Fluxo de trabalho direto

(a) Fluxo de trabalho pré-tratado

Alvo/Estirpe	Nível	Unidade	N.º de resultados válidos (n/N)	N.º de pos.	% de pos.	Ct méd.	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /mL	10/10	7	70%	33,97	0,90
	0,06		10/10	10	100%	33,36	0,96
	0,17		10/10	10	100%	32,17	0,45
	0,5		10/10	10	100%	31,05	0,42
	1,5		10/10	10	100%	31,01	0,45
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	33,72	1,00
	0,5		10/10	10	100%	32,97	0,51
	1,5		10/10	10	100%	32,28	0,60
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	32,81	0,38
	0,5		10/10	10	100%	31,68	0,84
	1,5		10/10	10	100%	31,69	0,65
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	20/20	15	75%	32,15	1,70
	0,5		10/10	9	90%	32,37	0,50
	1,5		10/10	10	100%	32,63	1,35
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	32,90	1,27
	0,03		10/10	10	100%	32,26	0,48
	0,08		10/10	10	100%	31,48	0,78
	0,25		10/10	10	100%	30,59	0,40
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /mL	10/10	10	100%	33,97	0,58
	0,01		10/10	10	100%	33,90	0,39
	0,03		10/10	10	100%	33,85	0,56
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	34,39	0,84
	0,25		10/10	10	100%	32,53	0,21
	0,75		10/10	10	100%	32,57	0,40
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,33	TCID ₅₀ /mL	20/20	15	75%	33,58	1,50
	1		10/10	10	100%	34,03	0,69
	3		10/10	10	100%	32,30	0,66
RSV A2	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	5	50%	32,68	0,43
	0,5		10/10	10	100%	31,72	0,85
	1,5		10/10	10	100%	31,71	1,35
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /mL	10/10	5	50%	32,20	1,10
	0,05		10/10	10	100%	31,50	0,49
	0,15		10/10	10	100%	29,94	0,93
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	50	UI/mL	10/10	6	60%	34,36	0,64
	150		10/10	10	100%	34,20	0,31
	450		10/10	10	100%	33,04	0,63
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	50	cópias/mL	10/10	6	60%	34,20	1,19
	150		10/10	10	100%	33,46	0,58
	450		10/10	10	100%	32,62	1,06

(b) Fluxo de trabalho direto

Alvo/Estirpe	Nível	Unidade	N.º de resultados válidos (n/N)	N.º de pos.	% de pos.	Ct méd.	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /mL	20/20	17	85%	33,11	1,30
	0,06		10/10	10	100%	33,18	0,86
	0,17		10/10	10	100%	32,63	1,14
	0,5		10/10	10	100%	31,33	0,74
	1,5		10/10	10	100%	30,79	0,31
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	33,41	1,10
	0,5		10/10	9	90%	32,54	1,03
	1,5		10/10	10	100%	32,05	0,26
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	7	70%	33,39	0,16
	0,5		10/10	10	100%	32,70	1,01
	1,5		10/10	10	100%	31,12	1,07
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	34,11	0,69
	0,5		10/10	10	100%	33,68	0,50
	1,5		10/10	10	100%	32,27	1,29
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	33,31	0,95
	0,03		10/10	10	100%	31,51	0,94
	0,08		10/10	10	100%	31,76	0,46
	0,25		10/10	10	100%	30,11	0,45
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /mL	10/10	9	90%	34,82	0,39
	0,01		10/10	10	100%	34,37	0,55
	0,03		10/10	10	100%	33,64	0,34
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	33,78	1,11
	0,25		10/10	10	100%	33,89	0,69
	0,75		10/10	10	100%	32,38	0,47
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,25	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	33,23	1,17
	0,75		20/20	19	95%	32,63	1,22
	2,25		10/10	10	100%	31,24	1,58
RSV A2	0,42	TCID ₅₀ /mL	10/10	7	70%	32,61	0,70
	1,25		10/10	10	100%	30,99	1,55
	3,75		10/10	10	100%	31,49	1,04
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /mL	10/10	6	60%	33,63	1,49
	0,05		10/10	10	100%	32,42	1,12
	0,15		10/10	10	100%	31,81	0,81
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	50	UI/mL	10/10	7	70%	34,80	0,56
	150		20/20	19	95%	32,88	1,22
	450		10/10	10	100%	33,38	0,46
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	66,7	cópias/mL	10/10	7	70%	33,53	0,58
	200		10/10	10	100%	32,63	1,25
	600		10/10	10	100%	32,69	0,86

Tabela 5. Taxas de detecção positivas para a determinação de LdD de confirmação para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N288, (a) Fluxo de trabalho pré-tratado; (b) Fluxo de trabalho direto

(a) Fluxo de trabalho pré-tratado

Alvo/Estirpe	Nível	Unidade	N.º de resultados válidos (n/N)	N.º de pos.	% de detecção	Ct méd.	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,89	0,57
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,81	0,44
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,17	0,47
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,77	0,52
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	29/30	29	100%	32,32	1,09
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	34,50	0,68
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,83	0,44
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /mL	29/30	29	100%	33,04	0,69
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,17	1,23
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,39	0,41
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	30	100%	33,63	0,61
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	150	cópias/mL	29/30	28	96,6%	33,59	1,01

(b) Fluxo de trabalho direto

Alvo/Estirpe	Nível	Unidade	N.º de resultados válidos (n/N)	N.º de pos.	% de detecção	Ct méd.	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,92	0,69
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,75	0,57
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,96	0,48
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,67	0,48
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	29/30	28	96,6%	31,74	1,19
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	34,88	0,95
	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	34,22	0,51
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,55	0,38
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,33	0,74
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	31,87	0,95
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,46	0,72
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	29	96,7%	33,78	0,77
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	200	cópias/mL	30/30	30	100%	34,18	0,83

Tabela 6. Taxas de detecção positivas para a confirmação da taxa de identificação do LdD para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N96, (a) Fluxo de trabalho pré-tratado; (b) Fluxo de trabalho direto

(a) Fluxo de trabalho pré-tratado

Alvo/Estirpe	Nível	Unidade	N.º de resultados válidos (n/N)	N.º de pos.	% de detecção	Ct méd.	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,05	0,81
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,53	0,75
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,33	1,11
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,98	0,96
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,75	0,69
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /mL	10/10	4	40%	34,75	0,58
	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,91	0,75
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,25	0,97
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,21	0,96
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /mL	29/30	28	96,6%	32,39	1,10
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,06	0,76
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	29	96,7%	33,79	0,67
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	150	cópias/mL	30/30	29	96,7%	33,59	1,05

(b) Fluxo de trabalho direto

Alvo/Estirpe	Nível	Unidade	N.º de resultados válidos (n/N)	N.º de pos.	% de detecção	Ct méd.	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,42	0,54
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,35	1,10
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,17	1,24
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,22	0,50
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,78	0,56
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	34,21	0,50
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,41	0,65
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,36	1,04
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,29	0,99
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,17	0,75
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	29	96,7%	33,50	0,78
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	200	cópias/mL	29/30	29	100%	34,45	0,39

Os níveis aceites como os valores de LdD para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay nos NeuMoDx Systems encontram-se resumidos na *Tabela 7*.

Tabela 7. Resumo do estudo do limite de detecção

Alvo	Estirpe	Limite de detecção		
		Fluxo de trabalho pré-tratado	Fluxo de trabalho direto	Unidade
Influenza A (Flu A) – H1N1	Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	0,06	TCID ₅₀ /mL
	Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	0,5	
Influenza A (Flu A) – H3N2	Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	0,5	
	Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	0,5	
Influenza B (Flu B) – Victoria lineage	Hong Kong/286/2017	0,03	0,03	
	Colorado/6/2017	0,01	0,01	
	Florida/78/2015	0,25	0,25	
Influenza B (Flu B) – Yamagata lineage	Phuket/3073/2013	1	0,75	
RSV A	A2	0,5	1,25	
RSV B	(WV/14617/85)	0,05	0,05	
SARS-CoV-2	1.º padrão internacional da OMS	150	150	UI/mL
	Isolate USA-WA1/2020	150	200	cópias/mL

Interferência competitiva para organismos-alvo: Flu A, Flu B, RSV e SARS-CoV-2

A interferência competitiva do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada utilizando painéis de alvos virais enriquecidos em espécimes clínicos negativos de esfregaços nasofaríngeos colhidos em UVT. Dez painéis que contêm um ou dois alvos perto do seu Limite de detecção (3-10X LdD) e um alvo único a $\geq 1E5$ cópias/mL, que representam o alvo coinfetado. Um décimo primeiro painel que contém um de cada um dos quatro alvos a 2X LdD. A presença de dois ou três vírus em concentrações variáveis num único espécime e os seus efeitos na sensibilidade analítica estão apresentados na *Tabela 8*.

Resultados negativos de Influenza A e RSV A devem ser considerados presuntivos em amostras com um resultado positivo de SARS-CoV-2 e resultados negativos de RSV devem ser considerados presuntivos em amostras com um resultado positivo de Influenza A. Estudos de interferência competitiva mostram que o vírus SARS-CoV-2 quando presente em concentrações de 1E5 cópias/mL ou superiores pode inibir a detecção e amplificação do ARN de Influenza A e RSV A, se presente ou inferior a 1,5 TCID₅₀/mL ou 6,25 TCID₅₀/mL, respetivamente, e pode levar a resultados falso-negativos. Além disso, o vírus da Influenza A, quando presente em concentrações de 1E5 cp/mL ou superiores, pode inibir a detecção e amplificação do ARN do vírus de RSV A, se presente ou inferior a 3,75 TCID₅₀/mL e pode levar a resultados falso-negativos para RSV. Se existir suspeita de coinfecção de vírus de Influenza A ou RSV nas amostras com um resultado positivo de SARS-CoV-2 ou suspeita de coinfecção com vírus RSV nas amostras com um resultado positivo de Influenza A, a amostra deve ser novamente testada com um teste de influenza ou RSV aprovado e autorizado pela FDA, caso a detecção de vírus de influenza ou RSV possa alterar a gestão clínica.

Tabela 8. Resumo do estudo de interferência competitiva

Painel	Alvo	Nível do painel	Conc. do alvo	Resultados válidos	N.º de pos.	% de detecção
1	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /mL	24	23	96%
	Flu B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
2 (Execução 1)	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /mL	24	19	79%
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /mL	24	8	33%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
2 (Execução 2)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /mL	24	16	67%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
2 (Execução 3)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV A	10X	12,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
3	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	3X	450 UI/mL	24	24	100%
	RSV B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
4	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
5	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
6	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
7	SARS-CoV-2	3X	450 UI/mL	24	24	100%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
8	SARS-CoV-2	3X	450 UI/mL	24	24	100%
	Flu B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
9 (Execução 1)	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /mL	24	20	83%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
9 (Execução 2)	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /mL	24	23	96%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
10	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /mL	24	23	96%
	Flu B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
11	Flu A	2X	1 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	Flu B	2X	0,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	2X	0,1 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	2X	300 UI/mL	24	24	100%

Reatividade analítica e inclusividade

A reatividade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada em comparação com várias estirpes/isolados de Influenza A, Influenza B, RSV e SARS-CoV-2. A reatividade de cada estirpe/isolado foi caracterizada em duas partes. A avaliação inicial dos níveis de reatividade para cada alvo foi realizada com cada estirpe-alvo individual testada em três concentrações numa matriz de esfregaço nasofaríngeo simulada (preparada com 3000 células epiteliais humanas por mL de UVT), *Tabela 9*. Na segunda parte, o nível mais baixo que obteve uma taxa positiva de 100% na fase 1 foi confirmado como o nível de reatividade, através do teste de um mínimo de 20 réplicas *Tabela 10*. Foi analisado um total de 14 estirpes de Flu A, 6 estirpes de Flu B, 1 isolado de RSV A, 1 isolado de RSV B e 6 isolados de SARS-CoV-2.

Tabela 9. Estirpes de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 – Análises preliminares do nível de reatividade

Análises preliminares					
Alvo	Estirpe		Níveis testados	N.º de resultados válidos	% de pos.
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	0,5 TCID ₅₀ /mL	8	75,0%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			4,5 TCID ₅₀ /mL	7	100%
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,33 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			3 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,17 TCID ₅₀ /mL	6	50%
			0,5 TCID ₅₀ /mL	6	100%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	6	100%
		A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,33 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			3 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	3,3 CEID ₅₀ /mL	8	62,5%
			10 CEID ₅₀ /mL	8	87,5%
			30 CEID ₅₀ /mL	8	100%
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,17 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			0,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,15 TCID ₅₀ /mL	7	28,6%
			0,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Kansas/14/2017 (H3N2)	2,67 TCID ₅₀ /mL	8	50%
			8 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			24 TCID ₅₀ /mL	7	100%
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	3,3 CEID ₅₀ /mL	6	83,3%
			10 CEID ₅₀ /mL	6	100%
			30 CEID ₅₀ /mL	6	100%
		A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /mL	8	85,7%
			0,03 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			0,1 TCID ₅₀ /mL	7	100%
			0,33 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	3 TCID ₅₀ /mL	7
10,87 pg/mL ¹	8			100%	
32,6 pg/mL ¹	8			87,5%	
H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	97,8 pg/mL ¹	7	100%	
		8 pg/mL ¹	8	100%	
		25 pg/mL ¹	8	100%	
H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	75 pg/mL ¹	7	100%	
		1:3E5 ¹	8	50%	
		1:1E5 ¹	7	87,5%	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	1:3.3E4 ¹	8	100%	
		22,67 pg/mL ¹	8	100%	
		68 pg/mL ¹	8	100%	
Flu B	Victoria Lineage	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	204 pg/mL ¹	8	100%
			1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			3 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Washington/02/2019 (Victoria)	9 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			2,5 CEID ₅₀ /mL	8	25,0%
			5 CEID ₅₀ /mL	8	87,5%
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	15 CEID ₅₀ /mL	8	100%
			0,01 TCID ₅₀ /mL	12	91,7%
			0,03 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			0,1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		0,33 TCID ₅₀ /mL	16	100%	
		1 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		3 TCID ₅₀ /mL	8	100%	

Análises preliminares					
Alvo	Estirpe		Níveis testados	N.º de resultados válidos	% de pos.
Flu B (continuação)	Yamagata Lineage	Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	0,17 CEID ₅₀ /mL	8	75,0%
			0,5 CEID ₅₀ /mL	8	100%
			1,5 CEID ₅₀ /mL	8	100%
		B/Utah/09/2014 (Yamagata Lineage)	0,06 CEID ₅₀ /mL	8	25,0%
			0,19 CEID ₅₀ /mL	8	87,5%
			0,56 CEID ₅₀ /mL	7	85,7%
			1,7 CEID ₅₀ /mL	6	100%
			5 CEID ₅₀ /mL	6	100%
			15 CEID ₅₀ /mL	6	100%
			B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	0,33 TCID ₅₀ /mL	8
1 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%			
3 TCID ₅₀ /mL	8	100%			
RSV	RSV A	A (estirpe longa)	0,67 pfu/mL	8	37,5%
			2 pfu/mL	8	100%
			6 pfu/mL	7	100%
	RSV B	B (9320)	0,03 PFU/mL	8	12,5%
			0,1 pfu/mL	8	87,5%
			0,3 pfu/mL	8	100%
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)	0,06 TCID ₅₀ /mL	8	0%	
		0,17 TCID ₅₀ /mL	8	12,5%	
		0,5 TCID ₅₀ /mL	8	37,5%	
		1,5 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%	
		4,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		13,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		USA/CA_CDC_5574/2020 (Alpha, B.1.1.7)	0,006 TCID ₅₀ /mL	8	62,5%
			0,02 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			0,06 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			0,17 TCID ₅₀ /mL	7	100%
	0,5 TCID ₅₀ /mL		7	100%	
	1,5 TCID ₅₀ /mL		7	100%	
	Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	0,002 TCID ₅₀ /mL	8	62,5%	
		0,006 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		0,02 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		0,06 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		0,17 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		0,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)	0,001 TCID ₅₀ /mL	8	37,5%	
		0,004 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%	
		0,013 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		0,04 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		0,11 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		0,33 TCID ₅₀ /mL	4	100%	
	Itália-INMI1	7,44 cp/mL ¹	8	37,5%	
		22,33 cp/mL ¹	8	87,5%	
		67 cp/mL ¹	8	100%	
		200 cp/mL ¹	8	100%	
		600 cp/mL ¹	8	100%	
		Isolate Hong Kong/VM20001061/2020	7,44 cp/mL ¹	8	25,0%
22,33 cp/mL ¹	8		87,5%		
67 cp/mL ¹	7		100%		
200 cp/mL ¹	7		100%		
600 cp/mL ¹	7		100%		

¹Estas variantes foram fornecidas com uma quantificação de "ARN total", que inclui o ARN viral e ARN da célula hospedeira.

Tabela 10. Estirpes de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 – Confirmação do nível de reatividade

Confirmação					
Alvo	Estirpe		Nível	N.º de resultados válidos	% de pos.
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	1,0 TCID ₅₀ /mL	23	91,3%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	23	100%
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,5 TCID ₅₀ /mL	23	82,6%
			1,0 TCID ₅₀ /mL	24	100%
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%
			0,33 TCID ₅₀ /mL	24	85,7%
		A/Iowa/53/2015 (H1N1)pdm09	0,67 TCID ₅₀ /mL	24	95,2%
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1)pdm09	10 CEID ₅₀ /mL	24	100%
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,25 TCID ₅₀ /mL	24	87,0%
			0,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,5 TCID ₅₀ /mL	23	91,3%
			1,0 TCID ₅₀ /mL	23	95,7%
		Kansas/14/2017 (H3N2)	12 TCID ₅₀ /mL	23	100%
			5 CEID ₅₀ /mL	23	91,3%
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	10 CEID ₅₀ /mL	23	100%
		A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /mL	24	91,7%
			0,03 TCID ₅₀ /mL	24	100%
	H2N2	A2/Japan/305/57 (H2N2)	10,87 pg/mL ¹	24	100%
H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	2 pg/mL ¹	24	83,3%	
		4 pg/mL ¹	23	100%	
		8 pg/mL ¹	23	100%	
H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1:3.3E4 ¹	24	95,7%	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	7,6 pg/mL ¹	23	73,9%	
		22,67 pg/mL ¹	23	100%	
Flu B	Victoria Lineage	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	1 TCID ₅₀ /mL	23	95,7%
			5 CEID ₅₀ /mL	24	95,8%
		Washington/02/2019 (Victoria)	10 CEID ₅₀ /mL	24	100%
			0,01 TCID ₅₀ /mL	23	83,3%
	Yamagata Lineage	B/Maryland/15/2016 (Victoria)	0,03 TCID ₅₀ /mL	24	100%
		Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	0,05 CEID ₅₀ /mL	24	100%
		B/Utah/09/2014 (Yamagata Lineage)	0,56 TCID ₅₀ /mL	24	87,0%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%
			0,75 TCID ₅₀ /mL	24	87,5%
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	1,5 TCID ₅₀ /mL	20	95,0%
	3,0 TCID ₅₀ /mL	24	100%		
RSV	RSV A	A (estirpe longa)	2 pfu/mL	24	91,7%
			4 pfu/mL	24	95,8%
	RSV B	B (9320)	0,15 PFU/mL	24	100%
			0,3 pfu/mL	21	100%
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)		1,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%
			3 TCID ₅₀ /mL	24	100%
			4,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%
		USA/CA_CDC_5574/2020 (Alpha, B.1.1.7)	0,02 TCID ₅₀ /mL	24	95,8%
			0,06 TCID ₅₀ /mL	24	100%
		Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	0,006 TCID ₅₀ /mL	24	95,8%
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)		0,006 TCID ₅₀ /mL	24	87,5%
			0,013 TCID ₅₀ /mL	24	100%
		Itália-INMI1	22 cp/mL ¹	24	95,8%
			67 cp/mL ¹	24	100%
SARS-CoV-2 (continuação)	Isolate Hong Kong/VM20001061/2020	22 cp/mL ¹	24	57,1%	
		67 cp/mL ¹	24	100%	

¹Estas variantes foram fornecidas com uma quantificação de "ARN total", que inclui o ARN viral e ARN da célula hospedeira.

A reatividade do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na detecção de diferentes isolados clínicos de SARS-CoV-2 foi demonstrada realizando uma análise *in silico* com os iniciadores e sondas do ensaio em comparação com todas as sequências disponíveis no GenBank (à data de Novembro de 2021), utilizando a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) baseada na Web e disponibilizada pelo NCBI. Os resultados demonstram que os iniciadores e sondas de SARS-CoV-2 apresentam 100% de homologia com mais de 98% das sequências. De forma geral, os iniciadores e sondas apresentam uma homologia > 95% para todas as sequências analisadas.

Reprodutibilidade intralaboratorial

A reprodutibilidade intralaboratorial para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi caracterizada testando dez painéis de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B, ou SARS-CoV-2 enriquecidos individualmente a dois níveis (moderado-positivo [5x LdD] e baixo-positivo [2x LdD]) e um painel negativo. Os painéis foram testados em três lotes de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips, fabricadas de acordo com as boas-práticas médicas, em dois NeuMoDx Systems e durante seis dias não consecutivos. Os membros do painel foram preparados em espécimes de esfregaço nasofaríngeo simulados, preparados com 3000 células epiteliais humanas por mL de meio Universal Viral Transport (UVT) e enriquecidos com uma estirpe representativa de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2. As NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips e o NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) foram identificados como os principais reagentes específicos de teste, capazes de influenciar o desempenho do ensaio e, por este motivo, foi utilizado o fluxo de trabalho pré-tratado para incorporar o VVLB no estudo. O desvio-padrão dos valores de Ct dos três lotes e entre os mesmos das tiras de teste do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay e dois NeuMoDx Molecular Systems foi $\leq 1,2$ com coeficientes de variação (CV) $\leq 4,0\%$ para todos os alvos, o que demonstra uma excelente reprodutibilidade, *Tabela 11, 12 e 13.*

Tabela 11. Reprodutibilidade de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips em sistemas/lotos/dias

Alvo	Nível de alvo	N válido	% de positivos	Ct méd.	DP	% de CV
Flu A	Mod. pos.	72	100%	31,21	0,59	1,9%
	Baixo pos.	72	100%	32,01	0,58	1,8%
Flu B	Mod. pos.	72	100%	31,02	0,39	1,3%
	Baixo pos.	72	100%	31,88	0,56	1,7%
RSV A	Mod. pos.	72	100%	29,71	0,95	3,2%
	Baixo pos.	72	100%	30,75	1,18	3,8%
RSV B	Mod. pos.	72	100%	28,43	0,53	1,9%
	Baixo pos.	72	100%	29,45	0,56	1,9%
SARS-CoV-2	Mod. pos.	72	100%	32,70	0,51	1,5%
	Baixo pos.	72	100%	33,68	0,56	1,7%
Verdadeiro-negativo		72	0%	N/D	N/D	N/D

Tabela 12. Reprodutibilidade de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips por cada sistema

Painel		N0000096					N000012				
Alvo	Nível de alvo	N válido	% de positivos	Ct méd.	DP	% de CV	N válido	% de positivos	Ct méd.	DP	% de CV
Flu A	Mod. pos.	36	100%	31,37	0,66	2,1%	36	100%	31,05	0,46	1,5%
	Baixo pos.	36	100%	32,07	0,65	2,0%	36	100%	31,95	0,51	1,6%
Flu B	Mod. pos.	36	100%	31,10	0,40	1,3%	36	100%	30,94	0,37	1,2%
	Baixo pos.	36	100%	31,84	0,57	1,8%	36	100%	31,91	0,55	1,7%
RSV A	Mod. pos.	36	100%	29,94	0,97	3,2%	36	100%	29,49	0,89	3,0%
	Baixo pos.	36	100%	30,93	1,19	3,8%	36	100%	30,57	1,16	3,8%
RSV B	Mod. pos.	36	100%	28,60	0,58	2,0%	36	100%	28,26	0,42	1,5%
	Baixo pos.	36	100%	29,60	0,53	1,8%	36	100%	29,29	0,56	1,9%
SARS-CoV-2	Mod. pos.	36	100%	32,80	0,56	1,7%	36	100%	32,61	0,43	1,3%
	Baixo pos.	36	100%	33,83	0,64	1,9%	36	100%	33,52	0,42	1,2%
Verdadeiro-negativo		36	0%	N/D	N/D	N/D	36	0%	N/D	N/D	N/D

Tabela 13. Reprodutibilidade de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips por cada lote de reagentes

Painel		Lote 1				Lote 2				Lote 3			
Alvo	Nível de alvo	N válido	Ct méd.	DP	% de CV	N válido	Ct méd.	DP	% de CV	N válido	Ct méd.	DP	% de CV
Flu A	Mod. pos.	24	31,06	0,38	1,2%	24	31,49	0,62	2,0%	24	31,08	0,65	2,1%
	Baixo pos.	24	32,02	0,59	1,8%	24	32,18	0,50	1,6%	24	31,82	0,61	1,9%
Flu B	Mod. pos.	24	31,05	0,39	1,2%	24	31,08	0,47	1,5%	24	30,94	0,29	0,9%
	Baixo pos.	24	31,93	0,36	1,1%	24	32,01	0,77	2,4%	24	31,69	0,42	1,3%
RSV A	Mod. pos.	24	29,04	0,71	2,4%	24	30,40	0,66	2,2%	24	29,69	0,94	3,2%
	Baixo pos.	24	31,53	0,50	1,6%	24	29,45	0,79	2,7%	24	31,25	0,87	2,8%
RSV B	Mod. pos.	24	28,65	0,54	1,9%	24	28,29	0,52	1,8%	24	28,35	0,47	1,7%
	Baixo pos.	24	29,31	0,48	1,6%	24	29,46	0,64	2,2%	24	29,57	0,55	1,8%
SARS-CoV-2	Mod. pos.	24	32,82	0,43	1,3%	24	32,70	0,56	1,7%	24	32,59	0,50	1,5%
	Baixo pos.	24	33,42	0,58	1,7%	24	33,80	0,57	1,7%	24	33,81	0,47	1,4%
Verdadeiro-negativo		24	N/D	N/D	N/D	24	N/D	N/D	N/D	24	N/D	N/D	N/D

Desempenho clínico

As características de desempenho clínico do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foram determinadas utilizando um estudo retrospectivo interno de comparação de métodos, utilizando espécimes residuais de esfregaço nasofaríngeo (Nasopharyngeal, NP) obtidos a partir de quatro localizações laboratoriais geograficamente distintas. Foram igualmente incluídas neste estudo diluições de amostras positivas de SARS-CoV-2 clínico, de forma a demonstrar a sensibilidade clínica próxima do LdD.

Os espécimes residuais de esfregaço nasofaríngeo de pacientes sintomáticos foram anonimizados e foi-lhes atribuído um número de ID exclusivo pelo laboratório fornecedor, estabelecendo uma lista confidencial que associa a ID do doente aos espécimes anonimizados para efeitos de estudo. Foi colhido um total de 747 espécimes de esfregaço NP para este estudo. Todos os espécimes foram processados em ambos os fluxos de trabalho pré-tratado e direto, acabando por produzir 739 resultados válidos e 8 inválidos no fluxo de trabalho direto e 736 resultados válidos e 11 inválidos no fluxo de trabalho pré-tratado. Destas amostras válidas, 121 foram exclusivamente dedicadas à avaliação de alvos de Flu A, Flu B, e RSV. As amostras positivas de Flu A representam 54 desses espécimes, as amostras positivas de Flu B representam 34 e as amostras positivas de RSV representam 33. Dentro deste coorte de 121 amostras, os resultados para os três alvos de interesse foram disponibilizados pelos laboratórios clínicos fornecedores. Como tal, este coorte de amostras positivas também forneceu 67 resultados negativos de Flu A, 87 resultados negativos de Flu B e 88 resultados negativos de RSV. Os resultados negativos acima mencionados foram ainda complementados por 59 espécimes clínicos que tiveram resultados negativos confirmados no ensaio comparativo para os quatro alvos. No total, 106 amostras foram identificadas como SARS-CoV-2 positivas em ambos os fluxos de trabalho. Os negativos clínicos SARS-CoV-2 foram confirmados com um resultado NeuMoDx válido em 512 amostras de fluxo de trabalho direto e 509 amostras de fluxo de trabalho pré-tratado.

O estado de teste destas amostras foi ocultado do operador de forma a implementar um "estudo cego único". Os resultados comunicados pelos laboratórios através dos dispositivos moleculares específicos legalmente comercializados e aprovados pela FDA e CE para o teste de padrão de cuidados foram utilizados para realizar a análise de comparação de métodos.

Os resultados do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay forneceram uma Sensibilidade clínica de 98,1% em ambos os fluxos de trabalho para a Flu A e uma Especificidade clínica de 100% e 99,2% para o fluxo de trabalho direto e para o fluxo de trabalho pré-tratado, respetivamente (*Tabela 14A*). Os resultados para o alvo de Flu B forneceram uma sensibilidade clínica e especificidade clínica de 97,1% e 100%, respetivamente, para ambos os fluxos de trabalho (*Tabela 14B*). Os resultados para o alvo de RSV (indiferenciado) forneceram uma sensibilidade clínica de 97% para ambos os fluxos de trabalho e Especificidade clínica de 99,3% e 98,6% para o fluxo de trabalho direto e para o fluxo de trabalho pré-tratado, respetivamente (*Tabela 14C*). Os resultados para o alvo de SARS-CoV-2 forneceram uma Sensibilidade Clínica de 97,2% para ambos os fluxos de trabalho e uma Especificidade Clínica de 98,4% no fluxo de trabalho direto e 98,2% no fluxo de trabalho pré-tratado (*Tabela 14D*). Os limites inferior e superior dos intervalos de confiança de 95% são apresentados nas *Tabelas 14A, 14B, 14C e 14D* abaixo e foram calculados utilizando o método de Wilson com correção de continuidade.

Tabela 14A. Resumo do desempenho clínico – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detecção de **Flu A**
(a) Fluxo de trabalho direto e (b) Fluxo de trabalho pré-tratado

(a) Fluxo de trabalho direto

Flu A		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	53	0	53
	NEG	1	126	127
	Total	54	126	180
Sensibilidade clínica (Flu A) = 98,1% (88,8% – 99,9%)				
Especificidade clínica (Flu A) = 100% (96,3% – 100%)				

(b) Fluxo de trabalho pré-tratado

Flu A		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	53	1	54
	NEG	1	125	126
	Total	54	126	180
Sensibilidade clínica (Flu A) = 98,1% (88,8% – 99,9%)				
Especificidade clínica (Flu A) = 99,2% (95,0% – 100%)				

Tabela 14B. Resumo do desempenho clínico – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detecção de **Flu B**
(a) Fluxo de trabalho direto (b) Fluxo de trabalho pré-tratado

(a) Fluxo de trabalho direto

Flu B		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	33	0	33
	NEG	1	146	147
	Total	34	146	180
Sensibilidade clínica (Flu B) = 97,1% (82,9% – 99,8%)				
Especificidade clínica (Flu B) = 100% (96,8% – 100%)				

(b) Fluxo de trabalho pré-tratado

Flu B		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	33	0	33
	NEG	1	146	147
	Total	34	146	180
Sensibilidade clínica (Flu B) = 97,1% (82,9% – 99,8%)				
Especificidade clínica (Flu B) = 100% (96,8% – 100%)				

Tabela 14C. Resumo do desempenho clínico – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detecção de RSV por

(a) Fluxo de trabalho direto (b) Fluxo de trabalho pré-tratado

(a) Fluxo de trabalho direto

RSV		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	32	1	33
	NEG	1	146	147
	Total	33	147	180
Sensibilidade clínica (RSV) = 97,0% (82,5% – 99,8%)				
Especificidade clínica (RSV) = 99,3% (95,7% – 100%)				

(b) Fluxo de trabalho pré-tratado

RSV		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	32	2	34
	NEG	1	145	146
	Total	33	147	180
Sensibilidade clínica (RSV) = 97,0% (82,5% – 99,8%)				
Especificidade clínica (RSV) = 98,6% (94,7% – 99,8%)				

Tabela 14D. Resumo do desempenho clínico – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detecção de SARS-CoV-2 por

(a) Fluxo de trabalho direto e (b) Fluxo de trabalho pré-tratado

(a) Fluxo de trabalho direto

SARS-CoV-2		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	103	8	111
	NEG	3	504	507
	Total	106	512	618
Sensibilidade clínica (SARS-CoV-2) = 97,2% (91,3% – 99,3%)				
Especificidade clínica (SARS-CoV-2) = 98,4% (96,8% – 99,3%)				

(b) Fluxo de trabalho pré-tratado

SARS-CoV-2		Resultado de teste de referência aprovado pela FDA/CE		
		POS	NEG	Total
Resultados do teste NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	POS	103	9	112
	NEG	3	500	503
	Total	106	509	615
Sensibilidade clínica (SARS-CoV-2) = 97,2% (91,3% – 99,3%)				
Especificidade clínica (SARS-CoV-2) = 98,2% (96,5% – 99,1%)				

Especificidade analítica e reatividade cruzada

A especificidade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada testando um painel de 47 organismos constituído por 22 estirpes virais, 24 estirpes bacterianas e 1 estirpe de levedura, representando agentes patogénicos respiratórios comuns ou flora frequentemente presente no trato respiratório. As bactérias e levedura foram testadas em concentrações de ~6E6 CFU/mL ou IFU/mL, exceto indicação contrária. Os vírus foram testados em concentrações de 1E5 a 1E6 TCID₅₀/mL ou cópias/mL, exceto indicação contrária. Para confirmar a reatividade cruzada potencial entre SARS-CoV-2 e a família de Coronavírus (229E, OC43, NL63, MERS e SARS-1) com *Legionella pneumophila* foram incluídas réplicas adicionais (> 20) para cumprir os requisitos do MDCG para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro SARS-CoV-2. A especificidade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi de 100% para Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2.

O HKU1 foi outro membro da família de Coronavírus que foi testado, no entanto, devido à indisponibilidade do vírus e ARN genómico, foram testadas quatro réplicas de material sintético. Foi igualmente realizada uma análise *in silico* entre os iniciadores e sondas NeuMoDx SARS-CoV-2 e os genomas coronavírus HKU1 publicados no GenBank para investigar a reatividade cruzada potencial. Foi obtido um total de 57 sequências de genoma HKU1 da base de dados de vírus disponibilizada pelo NCBI do NIH. Todas as sequências HKU1 tinham três ou mais não correspondências para cada um dos iniciador e sonda NeuMoDx SARS-CoV-2. Não foi detetada nenhuma homologia próxima. Portanto, não é esperada qualquer reatividade cruzada entre o Coronavírus HKU1 e o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

Tabela 15. Resultados da especificidade analítica

Organismo	Concentração	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
Adenovírus tipo 1	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Adenovírus tipo 7	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> 1176	10 ng/mL	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	10 ng/mL	-	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
EBV	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Hemophilus influenzae</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
HHV 6A	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HHV 7	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HHV 8	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HSV 1	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HSV 2	1E6 cp/mL	-	-	-	-
Coronavírus humano 229E	1E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Coronavírus humano HKU1	1E6 cp/mL	-	-	-	-
Coronavírus humano NL63	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Coronavírus humano OC43	1E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Enterovírus humano 68	1E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Metapneumovírus humano	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Parainfluenza humana tipo 1	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Parainfluenza humana tipo 2	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Parainfluenza humana tipo 3	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Rinovírus humano tipo 1A	5E3 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus jensonii</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
Vírus do sarampo	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Coronavírus MERS EMC/2012	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
Vírus da papeira	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero A	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero B	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero C	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero D	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
Coronavírus SARS	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-

Organismo	Concentração	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
<i>Streptococcus pneumonia</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016	3x o LdD	+	-	-	-
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	3x o LdD	-	+	-	-
RSV A2	3x o LdD	-	-	+	-
RSV B (WV/14617/85)	3x o LdD	-	-	+	-
SARS-CoV-2, 1.º padrão internacional da OMS	3x o LdD	-	-	-	+
Controlo negativo (sem agentes patogénicos)	N/D	-	-	-	-

Tabela 16. Especificidade analítica - Família de Coronavírus e *Legionella pneumophila* (> 20 réplicas testadas)

Organismo	Concentração	SARS-CoV-2
Coronavírus humano NL63	1,00E+04 TCID ₅₀ /mL	-
Coronavírus SARS-1	1,00E+06 pfu/mL	-
Coronavírus MERS EMC/2012	1,00E+04 TCID ₅₀ /mL	-
Coronavírus humano 229E	1,00E+05 TCID ₅₀ /mL	-
Coronavírus humano OC43	1,00E+05 TCID ₅₀ /mL	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6,00E+06 CFU/mL	-
Controlo positivo: SARS-CoV-2 primeiro padrão internacional da OMS	3x o LdD	+
Controlo negativo (sem agentes patogénicos)	N/D	-

Substâncias interferentes – Organismos comensais

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi testado quanto à interferência na presença de organismos não alvo (potencialmente presentes no trato respiratório superior) avaliando o desempenho do ensaio com níveis reduzidos (~3X o LdD) de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 na presença de concentrações elevadas dos organismos listados na *Tabela 15*, acima. Além disso, para confirmar a potencial interferência entre SARS-CoV-2 e a família de Coronavírus (229E, OC43, NL63, MERS e SARS-1) com *Legionella pneumophila* (*Tabela 16*) foram incluídas réplicas adicionais (> 20) para cumprir os requisitos do MDCG em dispositivos médicos de diagnóstico in vitro SARS-CoV-2. Estas amostras foram enriquecidas com SARS-CoV-2 apenas a ~3X o LdD para a porção de interferência do estudo. Foi observada uma taxa de deteção de 100% para todos os alvos. Por conseguinte, não foi observada uma interferência na deteção de qualquer alvo com qualquer um dos organismos comensais.

Substâncias interferentes – Endógenas/exógenas

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliado quanto à suscetibilidade a interferências causadas por substâncias potencialmente associadas à colheita de espécimes de esfregaço nasofaríngeo. Os espécimes clínicos residuais negativos de esfregaço nasofaríngeo foram enriquecidos individualmente com Flu A, Flu B, RSV A, RSV B ou SARS-CoV-2 a 3X o LdD e processados na presença e ausência dos agentes apresentados na *Tabela 17*. Nenhuma das substâncias incluídas no teste teve um efeito adverso no desempenho do ensaio para qualquer um dos alvos.

Tabela 17. Substâncias testadas quanto a interferência

Substância	Descrição/ingrediente ativo	Concentração*	
Exógenas	Neo-Sinefrina	Fenilefrina	15% v/v
	Gel nasal – Gel nasal Ayr Saline	Cloreto de sódio com conservantes	15% v/v
	Alívio de alergia homeopático – Similasan	Cardiospermum, Sabadilla, Luffa operculata, Galphimia glauca	15% v/v
	Zinco da marca Nature’s Bounty	Gluconato de zinco	0,1mg/mL
	Anestésico/analgésico oral – Oragel	Benzocaína, Cloreto de benzalcónio	1% v/v
	Spray nasal – Afrin	Oximetazolina	15% w/v
	Spray nasal – Zicam	<i>Luffa operculata</i> , <i>Galphimia glauca</i> , hidrocloreto de histamina, enxofre	15% v/v
	Corticosteroide nasal – Flonase	Fluticasona	5% v/v
	Corticosteroide nasal – Rhinocort	Budesonida	5% v/v
	Corticosteroide nasal – Nasacort	Triamcinolona	5% v/v
	Corticosteroide nasal – Dexametasona	Dexametasona	10 mg/mL
	Corticosteroide nasal – Mometasona	Mometasona	10 mg/mL
	Corticosteroide nasal – Beclometasona	Beclometasona	10 mg/mL
	Chloraseptic Throat Lozenge	Benzocaína, mentol	2 mg/mL
	Antibiótico, pomada nasal	Mupirocina	10 mg/mL

Substância		Descrição/ingrediente ativo	Concentração*
	Relenza Antiviral Drug	Zanamivir	7,5 mg/mL
	Tamiflu Antiviral Drug	Oseltamivir	25mg/mL
	Antibiótico sistêmico	Tobramicina	15 mg/mL
Endógenas	Mucina	Proteína mucina purificada	2,5% w/v
	Sangue humano	Sangue	2% v/v

*Nota: As concentrações apresentadas são as utilizadas para saturar esfregaços antes de dosear amostras clínicas positivas artificiais com substâncias interferentes. Desse modo, são representativas do nível na área de colheita do esfregaço que pode ser tolerado.

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay nos sistemas NeuMoDx Molecular 288 e 96 foi determinada ao processar amostras negativas e positivas altas num padrão "tabuleiro de damas" alternado. Todas as amostras consistiam em material de esfregaço NP simulado com amostras positivas enriquecidas a $\geq 10^5$ TCID₅₀/mL (ou $\geq 10\ 000X$ o LdD). Foram realizados cinco conjuntos de testes de tabuleiro de damas, que acabaram por produzir um total de 60 réplicas negativas e 60 positivas tanto no NeuMoDx 288 Molecular System como no NeuMoDx 96 Molecular System. Em ambos os sistemas, todas as 120 réplicas das amostras negativas foram comunicadas de forma exata como negativas, o que demonstra a ausência de contaminação cruzada durante o processamento de amostras no NeuMoDx System.

Tempo de resposta

O tempo de resposta para processar oito amostras utilizando o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi determinado como sendo ~85 minutos no N288 system e ~78 minutos no NeuMoDx 96 system para o processamento de quatro amostras.

Taxa de erro do sistema

A taxa de erro do sistema para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada ao testar um nível de alvo de SARS-CoV-2 a uma concentração de ~3X o LdD, preparada ao enriquecer espécimes clínicos negativos de esfregaços nasofaríngeos com o 1.º padrão internacional da OMS para SARS-CoV-2. Foi processado um total de 200 réplicas utilizando o fluxo de trabalho direto em ambos os NeuMoDx 96 e 288 Molecular Systems (100 réplicas por sistema). A taxa de erro foi calculada através da percentagem de resultados falso-negativos do número total de resultados válidos obtidos. A taxa de detecção do alvo de SARS-CoV-2 no NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi considerada de 100% para os NeuMoDx 96 e 288 Molecular Systems demonstrando uma taxa de erro de 0% em ambos os sistemas.

Robustez do sistema – Inibição

A taxa de inibição foi determinada ao calcular a taxa de Unresolved (Não resolvido, controlo de processo de amostra não amplificado na ausência de erros do sistema) em todas as amostras negativas processadas em estudos de verificação e validação. Foi obtido um total de 11 resultados Unresolved (Não resolvido) de um total de 1221 amostras negativas processadas, demonstrando uma taxa de inibição de 0,9% para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

REFERÊNCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARCAS COMERCIAIS

BD™ é uma marca comercial da Becton, Dickinson and Company

Hamilton® é uma marca comercial registada da Hamilton Company

Minitip Nylon® Flocked Swab é uma marca comercial registada da Copan Diagnostics, Inc.


NeuMoDx™ e NeuDry™ são marcas comerciais da NeuMoDx Molecular, Inc.

TaqMan® é uma marca comercial registada da Roche Molecular Systems, Inc.

UTM-RT® é uma marca comercial registada da Copan Diagnostics, Inc.

Todos os outros nomes de produto, marcas comerciais e marcas registadas que possam ser referidos neste documento pertencem aos seus respetivos proprietários.

SÍMBOLO

	Utilização apenas mediante receita médica		Não reutilizar
	Fabricante		Contém o suficiente para <n> testes
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar as instruções de utilização
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Cuidado
	Número de catálogo		Marcação CE
	Código de lote		Contém
	Data de validade		Contém material biológico de origem animal
	Limite de temperatura		



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

Assistência técnica/relatórios de vigilância: support@qiagen.com

Patente: www.neumodx.com/patents



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANY
+49 2103 290

