

REF 201400 NeuMoDx™ CMV Quant 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

Para obter mais informações sobre atualizações do folheto informativo, acessar a: www.qiagen.com/neumodx-ifu
Para obter instruções detalhadas, consultar o Manual do Operador NeuMoDx 288 Molecular System; P/N 40600108
Para obter instruções detalhadas, consultar o Manual do Operador NeuMoDx 96 Molecular System; P/N 40600317

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O NeuMoDx CMV Quant Assay é um teste automatizado *in vitro* de amplificação de ácidos nucleicos para a quantificação do ADN do citomegalovírus (CMV) em espécimes de plasma humano para os genótipos gB1 a gB4 do CMV de indivíduos infetados com CMV. O NeuMoDx CMV Quant Assay implementado no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx Systems) integra a extração automatizada do ADN para isolar o ácido nucleico-alvo do espécime e da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) em tempo real, tendo como alvo as sequências altamente conservadas do genoma do citomegalovírus.

O NeuMoDx CMV Quant Assay destina-se a ser utilizado para a quantificação *in vitro* do ADN do citomegalovírus (CMV) em espécimes recém-colhidos e congelados de plasma humano, utilizando o NeuMoDx 288 Molecular System e o NeuMoDx 96 Molecular System. Este ensaio destina-se a ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica e outros marcadores de laboratório do progresso da doença para a gestão e monitorização clínicas da infeção por CMV. O ensaio não se destina a ser utilizado como teste de rastreamento para a presença do CMV no sangue ou em produtos sanguíneos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O sangue total humano colhido em tubos de colheita de sangue estéreis contendo EDTA ou ACD como agente anticoagulante pode ser utilizado para a preparação de plasma. Para preparar o teste, o plasma num tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System é carregado no NeuMoDx System utilizando um transportador de tubos de espécime designado para iniciar o processamento. Por cada espécime, uma alíquota de 550 µL da amostra de plasma é misturada com o NeuMoDx Lysis Buffer 1 e o NeuMoDx System desempenha automaticamente todos os passos necessários para extrair o ácido nucleico-alvo, preparar o ADN isolado para a amplificação PCR em tempo real e, se presentes, amplificar e detetar os produtos de amplificação (secções do genoma-alvo do CMV em regiões altamente conservadas). O NeuMoDx CMV Quant Assay inclui um controlo de processo de amostra (Sample Process Control 1, SPC1) de ADN para ajudar a monitorizar a presença de possíveis substâncias inibidoras, assim como falhas do reagente ou do NeuMoDx System que podem acontecer durante o processo de extração e amplificação.

O CMV é um vírus comum de ADN de cadeia dupla da família do vírus herpes humano que infeta pessoas de todas as idades. Estima-se que aos 40 anos, mais de metade da população terá sido infetada com o CMV.¹ O CMV é propagado através de fluidos corporais como saliva, urina, sangue, lágrimas, sêmen e leite materno. Os indivíduos imunocompetentes infetados por CMV são geralmente assintomáticos, mas a infeção com o vírus pode ser grave em bebés e pessoas com o sistema imunitário fragilizado. As mulheres grávidas podem passar o CMV aos seus filhos e provocar o CMV congénito, que pode resultar em perda de audição, entre outros atrasos motores e de desenvolvimento. O CMV é um patógeno importante para pacientes imunocomprometidos, incluindo recetores de transplante de órgãos sólidos, recetores de transplante de células hematopoiéticas, pacientes infetados por VIH e pacientes tratados com medicamentos imunomoduladores.² A monitorização da carga viral do CMV é utilizada principalmente nestas populações imunocomprometidas, onde causa muitas morbidades incluindo pneumonia, doença do trato gastrointestinal, hepatite e encefalite, assim como um aumento da probabilidade de rejeição de órgãos e outras infeções oportunistas.

O diagnóstico da infeção por CMV não se baseia apenas no teste de ácidos nucleicos (nucleic acid testing, NAT); o teste NAT é utilizado em conjunto com a análise de antigénios, que envolve a coloração dos leucócitos polimorfonucleares (polymorphonuclear leukocytes, PMN) da proteína estruturalmente precoce da matriz inferior do CMV, assim como outros sintomas que o paciente possa estar a ter. A análise da carga viral do CMV é rotineiramente utilizada para determinar quando é que a terapia antiviral é necessária, assim como para monitorizar a eficácia dessas terapias.³ Apesar de as diretrizes atuais para a gestão e tratamento de infeções por CMV em indivíduos imunocomprometidos serem ambíguas em termos de *quando* iniciar a terapia antiviral, todas requerem uma monitorização constante da carga viral assim que a terapia antiviral é iniciada, de forma a ajudar a mitigar os graves efeitos secundários dos medicamentos em tais populações.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O NeuMoDx CMV Quant Assay no NeuMoDx System utiliza a NeuMoDx CMV Quant Test Strip, os NeuMoDx CMV Calibrators, os NeuMoDx CMV External Controls, o NeuMoDx Lysis Buffer 1 e reagentes de uso geral NeuMoDx para desempenhar a análise. O NeuMoDx CMV Quant Assay combina a extração automatizada de ADN, a amplificação e a deteção PCR em tempo real. Os espécimes de sangue total são colhidos em tubos EDTA ou ACD para a preparação de plasma. O espécime de plasma num tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System é colocado no transportador de tubos de espécime que, por sua vez, é carregado no NeuMoDx System para processamento. Não é necessária intervenção adicional do operador.

Os NeuMoDx Systems utilizam uma combinação de calor, enzimas líticas e reagentes de extração para desempenhar automaticamente a lise celular, a extração de ADN 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 componentes não ADN e não ligados são retirados por lavagem através do NeuMoDx Wash Reagent e o ADN ligado é eluído utilizando o NeuMoDx Release Reagent. Os NeuMoDx Systems utilizam então o ADN eluído para reidratar os reagentes de amplificação NeuDry™ patenteados que contêm todos os elementos necessários para a amplificação PCR de alvos específicos do CMV e SPC1. Após a reconstituição dos reagentes de PCR NeuDry, o NeuMoDx System dispensa a mistura preparada e pronta para PCR no NeuMoDx Cartridge. A amplificação e a deteção das sequências de ADN de controlo e alvo (se presentes) ocorrem na câmara de PCR do NeuMoDx Cartridge. O NeuMoDx Cartridge foi também concebido para conter o amplicão decorrente da PCR em tempo real, 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 sonda fluorogénica de oligonucleotídeos específicas dos amplicões para os 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 estiver intacta, o fluoróforo e o supressor estão próximos, o que faz com que a molécula supressora suprima 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 ADN 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 proximidade com o supressor, ultrapassando assim o efeito de supressão devido ao FRET e permitindo a deteção da fluorescência do fluoróforo. O sinal de fluorescência resultante, detetado no termociclador de PCR quantitativa do NeuMoDx System é diretamente proporcional ao fluoróforo libertado e pode ser correlacionado com a quantidade de ADN alvo presente.

Uma sonda TaqMan marcada com um fluoróforo (excitação: 490 nm e emissão: 521 nm) na extremidade de 5' e um supressor de fluorescência na extremidade de 3' é utilizada para detetar ADN de CMV. Para deteção do SPC1, a sonda TaqMan é marcada com um marcador fluorescente alternativo (excitação: 535 nm e emissão: 556 nm) na extremidade de 5' e um supressor de fluorescência na extremidade de 3'. O software do NeuMoDx System monitoriza o sinal fluorescente emitido pelas sondas TaqMan no final de cada ciclo de amplificação. Quando a amplificação estiver concluída, o software do NeuMoDx System analisa os dados e comunica o resultado final: POSITIVE/NEGATIVE/INDETERMINATE/UNRESOLVED (POSITIVO/NEGATIVO/INDETERMINADO/NÃO RESOLVIDO). Se um resultado for POSITIVE (POSITIVO), o software do NeuMoDx System também fornece um valor quantitativo associado à amostra ou comunica se a concentração calculada estiver dentro dos limites de quantificação.

REAGENTES/CONSUMÍVEIS

Material fornecido

REF	Conteúdo	Testes por unidade	Testes por embalagem
201400	NeuMoDx CMV Quant Test Strip <i>Reagentes de PCR secos contendo sondas e iniciadores TaqMan específicos para CMV, sonda e iniciadores TaqMan específicos para SPC1.</i>	16	96

Reagentes e consumíveis necessários, mas não fornecidos (disponibilizados em separado pela NeuMoDx)

REF	Conteúdo
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Partículas paramagnéticas, enzimas líticas e controlos de processo de amostra secos</i>
800400	NeuMoDx CMV Calibrators <i>Conjuntos de utilização única de calibradores altos e baixos de CMV para estabelecer a validade da curva-padrão</i>
900401	NeuMoDx CMV External Controls <i>Conjuntos de utilização única de controlos positivos e negativos de CMV para estabelecer a validade diária do NeuMoDx CMV Quant Assay</i>
400400	NeuMoDx Lysis Buffer 1
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

Instrumentos necessários

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

AVISOS E PRECAUÇÕES

- A NeuMoDx CMV Quant Test Strip destina-se apenas para utilização em diagnóstico *in vitro* com NeuMoDx Systems.
- 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.
- Deve estar disponível uma calibração de teste válida (gerada através do processamento de calibradores altos e baixos dos NeuMoDx CMV Calibrators [REF 800400]) antes de os resultados de teste poderem ser gerados para as amostras clínicas.
- É necessário processar NeuMoDx CMV External Controls [REF 900401] a cada 24 horas ao longo da testagem com o NeuMoDx CMV Quant Assay.
- O volume mínimo de espécime é de 1 mL de plasma EDTA/ACD ao utilizar o transportador de 32 tubos; um volume inferior a 1 mL pode originar um erro do NeuMoDx System.
- Realizar um ensaio CMV em espécimes armazenados a temperaturas inadequadas ou para além do tempo de armazenamento especificado pode produzir resultados inválidos ou erróneos, ao utilizar a NeuMoDx CMV Quant Test Strip.
- Evitar sempre a contaminação microbiana e por desoxirribonuclease (DNase) de todos os reagentes e consumíveis. É recomendada a utilização de pipetas de transferência descartáveis, estéreis e isentas de DNase. 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 contedor 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 de tubo aberto, é necessário ter especial cuidado para que a NeuMoDx CMV Quant Test Strip, os consumíveis e reagentes adicionais necessários para teste, o equipamento de proteção individual como luvas e batas de laboratório e o NeuMoDx System não sejam contaminados.
- Devem ser utilizadas luvas de nitrilo, sem pó e limpas durante o manuseio 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 CMV Quant Test Strip ou da NeuMoDx Extraction Plate ou na parte superior da superfície do NeuMoDx Lysis Buffer 1; o manuseamento dos consumíveis e reagentes deve ser feito tocando apenas nas superfícies laterais.
- Estão disponíveis mediante solicitação as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS).
- 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 os procedimentos laboratoriais de segurança, tal como os descritos na publicação *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ e no documento M29-A4 do CLSI.⁵
- Eliminar os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, regionais e locais.

ARMAZENAMENTO, TRATAMENTO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

- Todos os reagentes e consumíveis NeuMoDx (à exceção de controlos e calibradores externos) permanecem estáveis dentro da embalagem primária a temperaturas entre 18 e 23°C até à data de validade indicada na etiqueta do produto.
- Uma NeuMoDx CMV Quant Test Strip carregada no NeuMoDx System permanece estável durante 14 dias; o software do NeuMoDx System irá solicitar a remoção das tiras de teste que estão em utilização e a bordo do NeuMoDx System há mais de 14 dias, devendo ser abertas e carregadas novas NeuMoDx CMV Quant Test Strips no NeuMoDx System.
- Os calibradores e controlos NeuMoDx não são infecciosos, mas devem ser descartados no recipiente/contedor de resíduos de risco biológico depois de serem utilizados porque terão material-alvo depois do processamento no sistema que pode provocar contaminação se não for manuseado de forma adequada.

COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES

1. Manuseie todos os espécimes como se fossem passíveis de transmitir agentes infecciosos.
2. Não congele espécimes de sangue total ou quaisquer outros armazenados em tubos primários.
3. Para preparar espécimes de plasma, o sangue total deve ser colhido em tubos estéreis, utilizando EDTA ou ACD como anticoagulante. Siga as instruções do fabricante do tubo para colheita de espécimes.

4. O sangue total colhido nos dispositivos listados acima deve ser armazenado e/ou transportado até 24 horas a temperaturas entre 2 °C e 25 °C, antes da preparação do plasma. A preparação do plasma deve ser realizada de acordo com as instruções do fabricante.
5. Os espécimes de plasma preparados podem permanecer 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.
6. Os espécimes de plasma preparados devem ser armazenados a temperaturas entre 2 e 8 °C até 7 dias antes do teste e durante um máximo de 8 horas à temperatura ambiente.
7. Os espécimes preparados podem ser armazenados a uma temperatura ≤ -20 °C até 26 semanas para o plasma antes do processamento; as amostras de plasma não devem ser sujeitas a mais do que 2 ciclos de congelamento/descongelamento antes de serem utilizadas.
 - a. Se as amostras estiverem congeladas, permitir que descongelem à temperatura ambiente (15–30 °C); agitar para gerar uma amostra uniformemente distribuída.
 - b. Assim que as amostras congeladas estiverem descongeladas, o teste deverá ocorrer num espaço de 8 horas.
8. Se os espécimes forem expedidos, estes devem ser embalados e etiquetados em conformidade com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis.
9. Etiquetar claramente os espécimes e indicar que são para testes de CMV.
10. Avançar para a secção *Preparação para teste*.

O processo geral para implementação do NeuMoDx CMV Quant Assay está resumido abaixo na *Figura 1*.

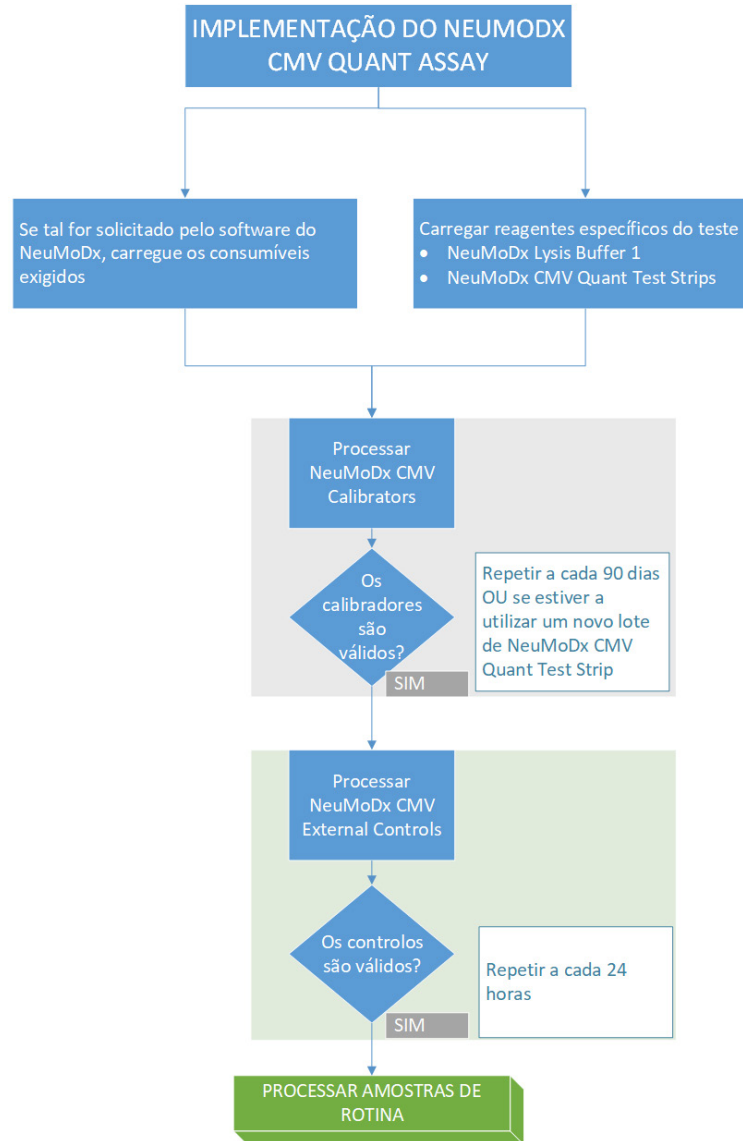


Figura 1: Fluxo de trabalho da implementação do NeuMoDx CMV Quant Assay

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Preparação para teste

1. Aplicar a etiqueta de código de barras de espécime a um tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System.
2. Utilizando uma pipeta de transferência, transferir um volume ≥ 1 mL de plasma para o tubo de espécime (secundário) com código de barras se utilizar o transportador de 32 tubos ou um volume >2 mL se utilizar o transportador de 24 tubos. É necessário ter especial cuidado para não transferir qualquer coágulo da amostra de plasma para o tubo de espécime. Utilizar uma pipeta de transferência diferente para cada espécime.
3. O tubo secundário deve cumprir as seguintes especificações para tubos compatíveis com o NeuMoDx System de acordo com o transportador de tubos de espécime a ser utilizado para processamento.
 - Transportador de 32 tubos: entre 11 mm e 14 mm de diâmetro e entre 60 mm e 120 mm de altura
 - Transportador de 24 tubos: entre 14,5 mm e 18 mm de diâmetro e entre 60 mm e 120 mm de altura

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. Preencher um ou mais transportadores de NeuMoDx System Test Strips com a(s) NeuMoDx CMV Quant Test Strip(s) e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) de tiras de teste no NeuMoDx System.
2. 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.
3. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, substituir o NeuMoDx Wash Reagent, o NeuMoDx Release Reagent e esvaziar os resíduos de iniciação ou o contentor de resíduos de risco biológico, conforme apropriado.
4. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, processar os calibradores [REF 800400] e/ou os controlos externos [REF 900401] conforme necessário. Podem ser encontradas mais informações acerca dos calibradores e controlos na secção *Processamento de resultados*.
5. Carregar o(s) tubo(s) de espécime/calibrador/controlo num transportador padrão de 32 tubos e certificar-se de que as tampas foram removidas de todos os tubos de espécime.
6. Colocar o transportador de tubos de espécime em qualquer posição aberta da prateleira do carregador automático e utilizar o ecrã tátil para carregar o transportador no NeuMoDx System. Isto dará início ao processamento dos espécimes carregados para o(s) teste(s) identificado(s).

LIMITAÇÕES

- A NeuMoDx CMV Quant Test Strip apenas pode ser utilizada em NeuMoDx Systems.
- O desempenho da NeuMoDx CMV Quant Test Strip foi estabelecido para espécimes de plasma preparados com sangue total colhido com EDTA/ACD como anticoagulante; a utilização do NeuMoDx CMV Quant Test Strip com outros tipos de espécimes clínicos não foi avaliada e as características de desempenho do teste são desconhecidas com outros tipos de espécimes.
- Uma vez que a deteção de CMV está dependente do número de organismos presentes na amostra, os resultados fiáveis dependem da colheita, do manuseamento e do armazenamento adequados do espécime.
- Os calibradores e controlos externos devem ser processados conforme recomendado nos folhetos informativos e conforme solicitado pelo software do NeuMoDx System, antes do processamento das amostras clínicas de rotina.
- Podem ocorrer resultados erróneos devido à colheita, ao manuseamento ou ao armazenamento inadequados de espécimes, a erros técnicos ou à mistura de tubos de espécime. Além disso, podem ocorrer falsos resultados negativos devido ao facto de o número de partículas virais presente na amostra estar abaixo do limite de deteção do NeuMoDx CMV Quant Assay.
- A operação do NeuMoDx System apenas pode ser realizada por pessoal com formação para utilizar o NeuMoDx System.
- Se os alvos CMV e SPC1 não forem amplificados, é comunicado um resultado inválido (Indeterminate [Indeterminado] ou Unresolved [Não resolvido]) e o teste deverá ser repetido.
- Se o resultado do NeuMoDx CMV Quant Assay for positivo, mas o valor de quantificação estiver para além dos limites de quantificação, o NeuMoDx System irá comunicar se o CMV detetado está *abaixo* do limite inferior de quantificação (LIdQ) ou *acima* do limite superior de quantificação (LSdQ).
- Se o CMV detetado estiver abaixo do LIdQ, o NeuMoDx CMV Quant Assay pode ser repetido (se pretendido) com outra alíquota do espécime.
- Se o CMV detetado estiver acima do LSdQ, o NeuMoDx CMV Quant Assay pode ser repetido com uma alíquota diluída do espécime original. É recomendada uma diluição a 1:100 ou 1:1000 em plasma negativo para CMV ou Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). A concentração do espécime original pode ser calculada da seguinte forma:
$$\text{Concentração do espécime original} = \log_{10} (\text{fator de diluição}) + \text{concentração comunicada da amostra diluída.}$$
- A presença ocasional dos inibidores de PCR em plasma pode resultar num erro de quantificação do sistema; se isto ocorrer, é recomendável repetir o teste com o mesmo espécime diluído em Basematrix a 1:10 ou 1:100.
- Um resultado positivo não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. No entanto, um resultado positivo pressupõe a presença de ADN do citomegalovírus.
- Eliminações ou mutações nas regiões conservadas que são alvo do NeuMoDx CMV Quant Assay podem afetar a deteção ou originar um resultado erróneo ao utilizar a NeuMoDx CMV Quant Test Strip.
- Os resultados do NeuMoDx CMV Quant Assay podem ser utilizados como complemento às observações clínicas e outras informações à disposição do médico; o teste não foi concebido para o diagnóstico da infeção.
- São recomendadas boas práticas de laboratório, incluindo a troca de luvas entre o manuseamento de espécimes de pacientes, de forma a evitar a contaminação.

PROCESSAMENTO DE 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 CMV Quant 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 de ensaio do NeuMoDx CMV Assay (CMV Assay Definition File, CMV ADF). Um resultado do NeuMoDx CMV Quant Assay pode ser reportado como Negative (Negativo), Positive with a reported CMV concentration (Positivo com uma concentração de CMV declarada), Positive above ULoQ (Positivo acima do LSdQ), Positive below LLoQ (Positivo abaixo do LIdQ), Indeterminate (Indeterminado) ou Unresolved (Não resolvido), de acordo com o estado de amplificação do alvo e do controlo de processo de amostra. Os resultados são comunicados com base no algoritmo de decisão indicado na *Tabela 1*.

Tabela 1: Algoritmo de decisão do NeuMoDx CMV Quant Assay

Resultado	CMV	Controlo de processo de amostra (Sample Process Control 1, SPC1)
Positive (Positivo)	[2 ≤ Ct ≤ 9 AND (E) EPR > 2 AND (E) EP ≥ 1500] OR (ou) [9 ≤ Ct ≤ 41 AND (E) EP ≥ 1500]	N/D
Positive, above Upper Limit of Quantitation [ULoQ] (Positivo, acima do limite superior de quantificação [LSdQ]) (log ₁₀ UI/mL)	[CONC] > 8,0 log ₁₀ UI/mL, NO QUANT (SEM QUANT.)	N/D
Positive, below Lower Limit of Quantitation [LLoQ] (Positivo, abaixo do limite inferior de quantificação [LIdQ]) (log ₁₀ UI/mL)	[CONC] < 1,3 log ₁₀ UI/mL, NO QUANT (SEM QUANT.)	N/D
Negative (Negativo)	N/A (N/D) OR (OU) [2 ≤ Ct < 9 AND (E) EPR ≤ 2] OR (ou) [9 ≤ Ct ≤ 41 AND (E) EP < 1500] OR (OU) Ct > 41	AMPLIFIED (AMPLIFICADA) (28 ≤ Ct ≤ 34) and (e) EP ≥ 2000
Indeterminate (Indeterminado)	NOT AMPLIFIED/ Systems Errors Noted (NÃO AMPLIFICADO/Erros de sistema observados)	
Unresolved (Não resolvido)	NOT AMPLIFIED/ No System Errors Noted (NÃO AMPLIFICADO/Nenhum erro de sistema observado)	

EP = Fluorescência de ponto final (depois da correção da linha de base); EPR = Relação de fluorescência de ponto final; Ct = Limiar do ciclo; Quant = quantidade calculada de CMV presente expressa em log₁₀ UI/mL. Ver Cálculo do teste abaixo.

Cálculo do teste

- Para amostras dentro do intervalo de quantificação do NeuMoDx CMV Quant Assay, a concentração de ADN do CMV nas amostras é calculada utilizando a curva-padrão armazenada em conjunto com o coeficiente de calibração.
 - O "coeficiente de calibração" é calculado com base nos resultados dos calibradores NeuMoDx CMV processados para estabelecer a validade da curva-padrão para um lote específico da NeuMoDx CMV Quant Test Strip, num NeuMoDx System em particular.
 - O coeficiente de calibração está integrado na determinação final da concentração de ADN do CMV.
- Os resultados do NeuMoDx CMV Quant Assay são comunicados em log₁₀ UI/mL.
- A quantificação resultante das amostras desconhecidas é rastreável de acordo com o 1.º padrão internacional da OMS para CMV.

Calibração de teste

É necessária uma calibração válida com base na curva-padrão para quantificar o ADN do CMV presente nos espécimes. Para gerar resultados válidos, deve ser concluída uma calibração de teste utilizando os calibradores fornecidos pela NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibradores externos

- Os NeuMoDx CMV Calibrators são fornecidos num kit [REF 800400] e contêm alvo CMV encapsulado não infeccioso preparado em Basematrix.
- Um conjunto de calibradores CMV precisa de ser processado com cada novo lote de NeuMoDx CMV Quant Test Strip ou se for carregado um novo ficheiro de definição de ensaio CMV no NeuMoDx System ou se o conjunto atual de calibradores estiver fora do prazo de validade (definido atualmente em 90 dias) ou no caso de o software do NeuMoDx System ter sido modificado.

- O software do NeuMoDx System irá notificar o utilizador quando os calibradores precisarem de ser processados; não é possível utilizar um novo lote de tiras de teste para análise até que os calibradores tenham sido processados com êxito.
- A validade da calibração é estabelecida da seguinte forma:
 - É necessário processar um conjunto de dois calibradores (alto e baixo) de forma a estabelecer a validade.
 - Para gerar resultados válidos, pelo menos 2 das 3 réplicas devem originar resultados dentro dos parâmetros predefinidos. O alvo nominal do calibrador baixo é de $3 \log_{10}$ UI/mL e o alvo nominal do calibrador alto é de $5 \log_{10}$ UI/mL.
 - É calculado um coeficiente de calibração para ter em conta a variação esperada entre lotes de tiras de teste; este coeficiente de calibração é utilizado na determinação da concentração final de CMV.
- Se um ou ambos os calibradores falharem na verificação de validade, repetir o processamento do calibrador ou dos calibradores que falharam utilizando um novo frasco. No caso de um calibrador falhar a validade, é possível repetir apenas o calibrador que falhou porque o sistema não necessita que o utilizador processe novamente ambos os calibradores.
- Se o(s) calibrador(es) falhar(em) a verificação de validade uma segunda vez consecutiva, contactar a NeuMoDx Molecular, Inc.

Controlo de qualidade

Os regulamentos locais geralmente especificam que o laboratório é responsável pelos procedimentos de controlo que monitorizam o rigor e precisão de todo o processo analítico e deve estabelecer o número, tipo e frequência dos materiais de controlo do teste, utilizando especificações verificadas de desempenho para um sistema de teste aprovado e não modificado.

Controlos externos

- Os materiais de controlo externo que contêm alvo CMV encapsulado não infeccioso em Basematrix para controlos positivos são fornecidos pela NeuMoDx Molecular, Inc. num kit que contém os NeuMoDx CMV External Controls [REF 900401].
- Os controlos positivos e negativos externos precisam de ser processados uma vez a cada 24 horas. Se não existir um conjunto válido 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.
- Se os controlos externos forem necessários, obter o conjunto de controlos externos do congelador e deixar os frascos descongelarem à temperatura ambiente (15–30 °C) até estarem completamente descongelados. Agitar suavemente para assegurar a homogeneidade.
- Utilizando o ecrã tátil e um transportador de tubos de espécime colocado na prateleira do carregador automático, carregar os frascos de controlo positivo e negativo no NeuMoDx System. O NeuMoDx System irá reconhecer o código de barras e iniciar o processamento dos tubos de espécime, exceto quando não estiverem disponíveis os reagentes ou consumíveis necessários para o teste.
- A validade dos controlos externos irá ser avaliada pelo NeuMoDx System de acordo com o resultado previsto. O controlo positivo deve fornecer um resultado positivo para CMV e o controlo negativo um resultado negativo para CMV.
- O tratamento de resultados discrepantes de controlos externos deve ser realizado da seguinte forma:
 - Um resultado de teste Positive (Positivo) para uma amostra de controlo negativo indica um problema de contaminação de espécimes.
 - Um resultado de teste Negative (Negativo) para uma amostra de controlo positivo pode indicar um problema relacionado com o reagente ou com o instrumento.
 - Em ambos os casos acima, repita o(s) NeuMoDx CMV External Control(s) com um frasco recém-descongelado do(s) controlo(s) que falhou(falharam) o teste de validade.
 - Se o controlo externo positivo NeuMoDx CMV continuar a comunicar um resultado negativo, contactar o apoio ao cliente da NeuMoDx.
 - Se um controlo externo negativo NeuMoDx CMV continuar a comunicar um resultado positivo, tentar eliminar todas as fontes de potencial contaminação, incluindo a substituição de TODOS os reagentes antes de contactar o apoio ao cliente da NeuMoDx.

Controlos (internos) do processo de amostra

Um controlo de processo de amostra (Sample Process Control 1, SPC1) exógeno está integrado na NeuMoDx Extraction Plate e passa por todo o processo de extração do ácido nucleico e de amplificação PCR em tempo real com cada amostra. Estão também incluídos os iniciadores e a sonda específicos para o SPC1 em cada uma das NeuMoDx CMV Quant Test Strip, permitindo a deteção da presença do SPC1 em conjunto com o ADN alvo de CMV (se presente) via PCR em tempo real multiplex. A deteção da amplificação do SPC1 permite que o software do NeuMoDx System monitorize a eficácia dos processos de extração de ADN e de amplificação PCR.

Resultados inválidos

Se um NeuMoDx CMV Quant Assay realizado no NeuMoDx System não produzir um resultado válido, será comunicado como Indeterminate (Indeterminado, IND) ou Unresolved (Não resolvido, UNR) com base no tipo de erro que ocorreu.

Caso seja detetado um erro do NeuMoDx System durante o processamento da amostra, será comunicado um resultado IND (Indeterminado). Caso seja comunicado um resultado IND (Indeterminado), recomenda-se realizar um novo teste.

Será comunicado um resultado UNR (Não resolvido) se não for detetada uma amplificação válida do SPC1 ou ADN de CMV, o que indica uma possível falha de reagentes ou a presença de inibidores. Como primeiro passo, pode ser realizado um novo teste no caso de ser comunicado um resultado UNR. Se o novo teste falhar, pode ser utilizado um espécime diluído para mitigar os efeitos de qualquer inibição da amostra.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica – Limite de detecção utilizando o padrão da OMS

A sensibilidade analítica do NeuMoDx CMV Quant Assay foi caracterizada testando espécimes negativos e uma série de diluições do 1.º padrão internacional da OMS em plasma humano negativo analisado para determinar o limite de detecção (LdD) nos NeuMoDx Systems. O LdD foi definido como o nível de alvo mais baixo detectado a uma taxa de 95% tal como determinado pela análise de estilo Probit. O estudo foi realizado ao longo de 3 dias em vários sistemas com vários lotes de reagentes NeuMoDx. Cada sistema processou 18 réplicas em cada nível de diluição por dia. As taxas de detecção estão descritas na *Tabela 2*.

Tabela 2: Taxas de detecção positiva para a determinação do LdD do NeuMoDx CMV Quant Assay

Concentração do alvo [UI/mL]	Concentração do alvo [\log_{10} UI/mL]	PLASMA		
		Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de detecção
50	1,70	108	108	100,0%
30	1,48	108	107	99,1%
25	1,40	108	106	98,1%
20	1,30	108	105	97,2%
15	1,18	108	99	91,7%
NEG	---	108	0	0,0%

O LdD do NeuMoDx CMV Quant Assay em plasma para a variante gB1 foi determinado como sendo de 17,7 UI/mL (1,25 \log_{10} UI/mL) com um intervalo de confiança (IC) de 95% de 13,8–21,0 UI/mL (1,14–1,32 \log_{10} UI/mL) [Figura 2]. O LdD entre genótipos é de 20,0 UI/mL (1,30 \log_{10} UI/mL) tal como determinado pela análise da taxa de identificação.

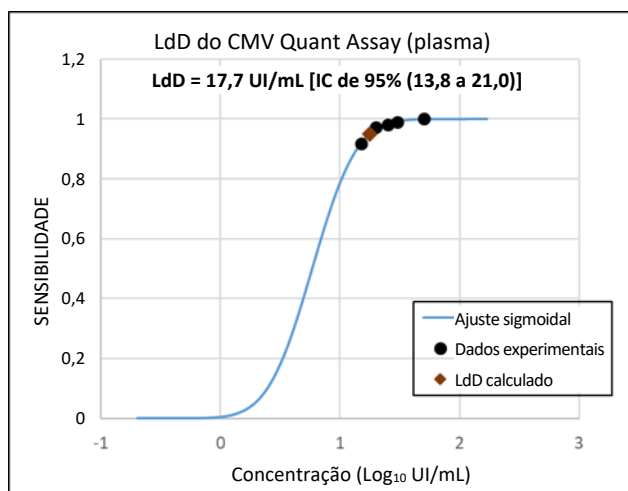


Figura 2: Análise de estilo Probit utilizada para determinar o LdD do NeuMoDx CMV Quant Assay em amostras de plasma

Sensibilidade analítica – Limite de quantificação – Limite inferior de quantificação (LidQ)

O limite inferior de quantificação (LidQ) é definido como o nível de alvo mais baixo a que uma detecção >95% é atingida e o TAE é $\leq 1,0$. De forma a determinar o LidQ, o erro analítico total (total analytical error, TAE) foi calculado para cada um dos níveis do alvo CMV que apresentaram uma detecção >95% como parte do cálculo do LdD. O TAE é definido da seguinte forma:

$$\text{TAE} = \text{tendência} + 2 \cdot \text{DP} \text{ (Estatística de Westgard)}$$

A tendência é o valor absoluto da diferença entre a média da concentração calculada e a concentração prevista. O DP refere-se ao desvio-padrão do valor quantificado da amostra.

Os resultados compilados para os 5 níveis dos espécimes de plasma de CMV (variante gB1) utilizados no estudo de LidQ são apresentados na *Tabela 3*. Com base neste conjunto de dados e no LdD anteriormente determinado, o LidQ foi determinado como sendo de 20,0 UI/mL (1,30 \log_{10} UI/mL) e confirmado entre genótipos.

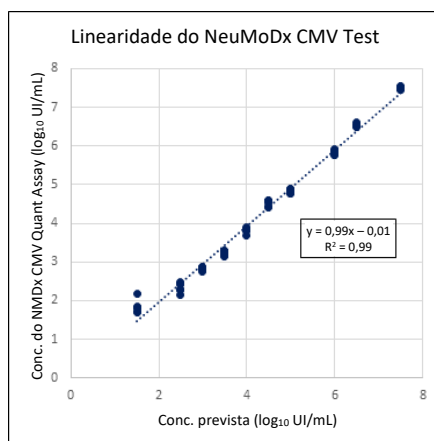
Tabela 3: LidQ do NeuMoDx CMV Quant Assay com tendência e TAE

Conc. do alvo [UI/mL]	Conc. do alvo [\log_{10} UI/mL]	Plasma				
		Conc. média [\log_{10} UI/mL]	Deteção (%)	DP	Tendência	TAE
50	1,70	1,75	100,0	0,16	0,05	0,37
30	1,48	1,62	99,1	0,24	0,14	0,62
25	1,40	1,56	98,1	0,19	0,17	0,55
20	1,30	1,57	97,2	0,22	0,27	0,72
15	1,18	1,52	91,7	0,21	0,35	0,78

Com base no resultado destes estudos, o LdD e o LidQ do NeuMoDx CMV Quant Assay foram ambos determinados como sendo de 20,0 UI/mL [$1,30 \log_{10}$ UI/mL].

Linearidade e determinação do limite superior de quantificação (LSdQ)

A linearidade e o limite superior de quantificação (LSdQ) do NeuMoDx CMV Quant Assay foram estabelecidos em plasma, preparando uma série de diluições utilizando o alvo CMV encapsulado da NeuMoDx e o Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) com rastreabilidade estabelecida de acordo com o 1.º padrão internacional da OMS. Um painel de 9 membros foi preparado em plasma negativo para CMV agrupado em pools de forma a criar um painel que abrangesse um intervalo de concentração de 8–1,7 \log_{10} UI/mL. O LSdQ do NeuMoDx CMV Quant Assay foi determinado como sendo de 8,0 \log_{10} UI/mL. As concentrações do ensaio CMV comunicadas pelo NeuMoDx System em comparação com os valores esperados são apresentadas na *Figura 3*.


Figura 3: Linearidade do NeuMoDx CMV Quant Assay

Linearidade entre genótipos

A linearidade do NeuMoDx CMV Quant Assay entre os quatro genótipos do CMV (gB1, gB2, gB3 e gB4) foi caracterizada testando cinco concentrações diferentes de cada genótipo do CMV, preparadas em plasma negativo para CMV agrupado em pool. Os níveis testados dos alvos CMV utilizados neste estudo estavam dependentes da concentração do espécime original e, por este motivo, variavam entre genótipos. O estudo foi realizado testando 6 réplicas de cada um dos 4 genótipos em 5 concentrações. A linearidade em quatro genótipos de CMV é apresentada na *Tabela 4* e na *Figura 4*.

Tabela 4: Linearidade do NeuMoDx CMV Quant Assay entre genótipos

Genótipo	Equação de linearidade y = Quantificação do NeuMoDx CMV Assay x = Quantificação esperada	R ²
gB1	y = 0,960x + 0,103	0,994
gB2	y = 0,989x + 0,009	0,996
gB3	y = 1,023x + 0,099	0,967
gB4	y = 0,968x + 0,004	0,992

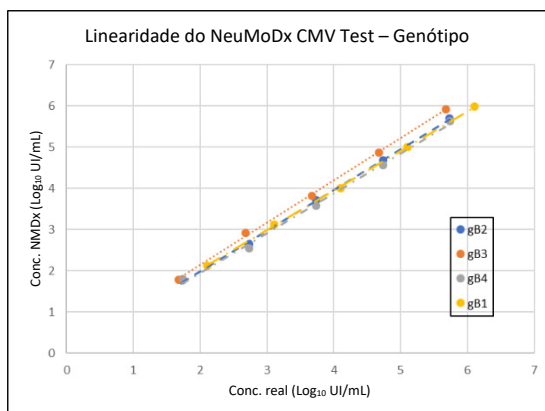


Figura 4: Linearidade do NeuMoDx CMV Quant Assay entre genótipos

Especificidade analítica – Reatividade cruzada

A especificidade analítica foi demonstrada através da análise de 35 organismos habitualmente presentes em espécimes de sangue/plasma, assim como espécies filogeneticamente semelhantes ao CMV no que diz respeito à reatividade cruzada. Os organismos foram preparados em pools de 5–6 organismos e testados com uma concentração elevada. Os organismos testados são apresentados na *Tabela 5*. Nenhuma reatividade cruzada foi observada com qualquer um dos organismos testados, confirmando uma especificidade analítica de 100% do NeuMoDx CMV Quant Assay.

Tabela 5: Patogénicos utilizados para demonstrar a especificidade analítica

Organismos não alvo					
Poliomavírus BK	Adenovírus tipo 5	Vírus do herpes simplex tipo 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Vírus Epstein-Barr	Vírus da hepatite C	Vírus do herpes simplex tipo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Vírus herpes humano tipo 6	Parvovírus B19	Vírus varicela-zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Vírus herpes humano tipo 7	Vírus JC	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Vírus herpes humano tipo 8	Vírus do papiloma humano 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Vírus da hepatite B	Vírus do papiloma humano 18	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Especificidade analítica – Substâncias interferentes, organismos patogénicos

O NeuMoDx CMV Quant Assay foi avaliado quanto a interferência na presença de organismos não alvo utilizando os mesmos pools de organismos preparados para a análise de reatividade cruzada indicados acima na *Tabela 5*. O plasma negativo para CMV foi enriquecido com organismos agrupados em pools de 4–7 e também com alvo CMV a uma concentração de 3 log₁₀ UI/mL. Nenhuma interferência significativa foi observada na presença destes organismos comensais, tal como indicado pelo desvio mínimo de quantificação dos espécimes de controlo que não continham qualquer agente interferente.

Especificidade analítica – Substâncias interferentes, substâncias endógenas e exógenas

O NeuMoDx CMV Quant Assay foi avaliado na presença de substâncias endógenas e exógenas interferentes típicas, encontradas nos espécimes clínicos de plasma com VHC. Estas incluíam níveis anormalmente elevados de componentes sanguíneos, assim como medicamentos antivirais comuns, classificados na *Tabela 6*. Cada uma das substâncias foi adicionada ao plasma humano negativo para CMV analisado, enriquecido com 3 log₁₀ UI/mL de CMV e as amostras foram analisadas em relação à interferência. Além disso, foi também testado plasma comum em estado de doença associada à infeção por CMV em relação a possíveis interferências. A concentração e a tendência médias de todas as substâncias testadas em relação a amostras de controlo enriquecidas com o mesmo nível de CMV são indicadas na *Tabela 7*. Nenhuma das substâncias endógenas e exógenas afetou a especificidade do NeuMoDx CMV Quant Assay.

Tabela 6: Teste de interferência – Agentes exógenos (classificação de medicamentos)

Pool	Nome do medicamento	Classificação	Pool	Nome do medicamento	Classificação
Pool 1	Azatioprina	Imunossupressor	Pool 4	Trimetoprima	Antibiótico
	Ciclosporina	Imunossupressor		Vancomicina	Antibiótico
	Foscarnet	Antiviral (Herpesviridae)		Tacrolimus	Imunossupressor
	Ganciclovir	Antiviral (CMV)		Everolimus	Imunossupressor
	Cloridrato de valganciclovir	Antiviral (CMV)		Clavulanato de potássio	Antibiótico
Pool 2	Prednisona	Corticosteroide/Imunossupressor	Pool 5	Famotidina	Antagonista do recetor de histamina
	Cidofovir	Antiviral (CMV)		Sulfametoxazol	Antibiótico
	Cefotetan	Antibiótico (largo espectro)		Valaciclovir	Antiviral (Herpesviridae)
	Cefotaxima	Antibiótico (largo espectro)		Letermovir	Antiviral (CMV)
	Fluconazol	Antifúngico		Ticarcilina dissódica	Antibiótico
Pool 3	Micofenolato mofetil	Imunossupressor	Leflunomida	Imunossupressor	
	Micofenolato de sódio	Imunossupressor			
	Piperacilina	Antibiótico			
	Sirolimus/Rapamicina	Imunossupressor			
	Tazobactam	Antibiótico modificado			

Tabela 7: Teste de interferência – Agentes endógenos e exógenos

Endógenas	Conc. média	Tendência
	log ₁₀ UI/mL	log ₁₀ UI/mL
Hemoglobina	2,97	0,07
Triglicéridos	3,03	0,13
Bilirrubina	3,01	0,11
Albumina	2,88	-0,02
Exógenos (medicamentos)	Conc. média	Tendência
	log ₁₀ UI/mL	log ₁₀ UI/mL
Pool 1: Azatioprina, Ciclosporina, Foscarnet, Ganciclovir, Cloridrato de valganciclovir	2,88	-0,02
Pool 2: Prednisona, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxima, Fluconazol	2,91	0,01
Pool 3: Micofenolato mofetil, Micofenolato de sódio, Piperacilina, Sirolimus/Rapamicina, Tazobactam	2,98	0,08
Pool 4: Trimetoprim, Vancomicina, Tacrolimus, Everolimus, Clavulanato de potássio	3,05	0,15
Pool 5: Famotidina, Sulfametoxazol, Letermovir, Valaciclovir, Ticarcilina dissódica, Leflunomida	2,87	-0,03
Estado de doença	Conc. média	Tendência
	log ₁₀ UI/mL	log ₁₀ UI/mL
Anticorpo antinuclear (ANA)	2,90	0,00
Lúpus eritematoso sistémico (LES)	3,04	0,14
Artrite reumatoide	2,99	0,09

Precisão intralaboratorial

A precisão do NeuMoDx CMV Quant Assay foi determinada testando 3 réplicas de um painel de 4 membros de espécimes de CMV preparados com Exact CMV Positive Control (Exact Diagnostics, Fort Worth, TX) duas vezes por dia, utilizando dois NeuMoDx 288 Systems e um NeuMoDx 96 System ao longo de 12 dias. Foram caracterizadas as precisões intraensaio, intradiária e intrassistema, e o desvio-padrão geral foi determinado como sendo $\leq 0,15 \log_{10}$ UI/mL. Foi demonstrada uma precisão excelente entre sistemas, dias ou ensaios, tal como apresentado na *Tabela 8*. A precisão entre operadores não foi determinada, uma vez que o operador não desempenha um papel significativo no processamento de amostras utilizando o NeuMoDx System.

Tabela 8: Precisão intralaboratorial – NeuMoDx CMV Quant Assay nos NeuMoDx Systems

Conc. do alvo CMV [\log_{10} UI/mL]	Conc. média de CMV [\log_{10} UI/mL]	DP intrassistema	DP intradiário	DP intraensaio	DP geral (intralaboratorial)
5,7	5,64	0,09	0,09	0,07	0,13
4,7	4,58	0,10	0,10	0,08	0,14
3,7	3,60	0,09	0,09	0,07	0,12
2,7	2,62	0,13	0,13	0,10	0,15

Reprodutibilidade lote a lote

A reprodutibilidade lote a lote do NeuMoDx CMV Quant Assay foi determinada utilizando três lotes diferentes dos principais reagentes: NeuMoDx Lysis Buffer 1, NeuMoDx Extraction Plates e NeuMoDx CMV Quant Test Strips. Foi utilizado um painel de 4 membros de CMV preparado com Exact CMV Control para avaliar o desempenho. O teste foi desempenhado utilizando os três lotes de reagentes em três sistemas ao longo de 6 dias. A variação intralote e entre lotes foi analisada e os resultados são apresentados na *Tabela 9*. A tendência geral máxima foi de $0,12 \log_{10}$ UI/mL e o DP geral máximo foi de $0,39 \log_{10}$ UI/mL. A equivalência de desempenho foi demonstrada entre lotes, uma vez que a quantificação de todos os membros do painel se encontrava dentro da especificação de tolerância.

Tabela 9: Reprodutibilidade lote a lote – NeuMoDx CMV Quant Assay

Conc. do alvo CMV [\log_{10} UI/mL]	Conc. média de CMV [\log_{10} UI/mL]	N (Resultados válidos por lote)	Tendência	DP entre lotes	DP intralote	DP geral
5,7	5,65	36	0,05	0,27	0,15	0,31
4,7	4,63	36	0,07	0,22	0,13	0,26
3,7	3,58	36	0,12	0,34	0,18	0,39
2,7	2,64	36	0,06	0,12	0,14	0,18

Eficácia do controlo

O SPC1 está incluído no NeuMoDx CMV Quant Assay para comunicar falhas nos passos do processo ou inibição que afeta o desempenho do ensaio. A eficácia foi testada em condições representativas de falhas críticas nos passos do processo que podem potencialmente ocorrer durante o processamento de amostras e *poderão não ser detetadas* pelos sensores de monitorização de desempenho do NeuMoDx System. Os espécimes positivos ($a 3 \log_{10}$ UI/mL) e negativos foram contestados na presença de um controlo nas seguintes condições: presença do inibidor, sem fornecimento da solução de lavagem e sem expulsão da solução de lavagem. As ineficácias do processo que tiveram um efeito adverso na deteção/quantificação de CMV foram refletidas pelo desempenho do alvo de SPC1, tal como apresentado na *Tabela 10*. Em todos os casos testados, foi demonstrado que o controlo de processo de amostra monitorizou adequadamente as ineficácias do processo e a presença dos inibidores ou a ineficácia antecipada do processo não teve um efeito adverso significativo, quer na deteção do SPC1, quer na deteção e quantificação do CMV. Por este motivo, o SPC1 demonstrou ser bem-sucedido na monitorização eficaz do desempenho do ensaio no NeuMoDx System.

Tabela 10: Eficácia do controlo de processo de amostra

Falha do passo do processo testada	Estado de amplificação do controlo de processo de amostra 1	Estado de amplificação do alvo CMV	Resultado do ensaio
Presence of Inhibitor (Presença do inibidor)	Not Amplified (Não amplificado)	Not Amplified (Não amplificado)	Unresolved (Não resolvido)
No Wash Delivered (Sem fornecimento da solução de lavagem)	Not Amplified (Não amplificado)	Not Amplified (Não amplificado)	Unresolved (Não resolvido)
No Wash Blowout (Sem expulsão da solução de lavagem)	Amplified (Amplificado)	Amplified (Amplificado)	Positive with Quantitation within (Positivo com quantificação dentro de) 0,3 log ₁₀ UI/mL do controlo

Taxa de resultados válidos

Foi utilizada uma análise retrospectiva dos dados obtidos durante a avaliação do desempenho do NeuMoDx CMV Assay nos NeuMoDx Systems para determinar a percentagem de resultados válidos. Os resultados de teste válidos são reportados como Positive (Positivo) ou Negative (Negativo); os resultados de teste inválidos poderão ser indicados como Indeterminate (Indeterminado, IND) ou Unresolved (Não resolvido, UNR) com base no estado de amplificação do alvo e do controlo de processo de amostra. Um resultado IND é geralmente causado por um erro do instrumento que origina uma falha do alvo e/ou do controlo de processo interno a amplificar. Um resultado UNR é atribuído a amostras quando o alvo e o controlo de processo interno falham na amplificação e não há uma falha do instrumento detetada. Foram incluídos 1100 resultados individuais do NeuMoDx CMV Quant Assay na análise retrospectiva, que incluiu dados obtidos do NeuMoDx 288 System e do NeuMoDx 96 System. A taxa de UNR foi determinada como sendo de 0,91% (10/1100) e a taxa de IND foi determinada como sendo de 0,36% (4/1100), cumprindo os critérios de aceitação da análise. Assim, a taxa de resultados válidos do NeuMoDx CMV Assay nos NeuMoDx Systems foi concluída como sendo de 98,7% com um IC de 95% (97,9 a 99,2).

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada do NeuMoDx CMV Quant Assay foi determinada testando três conjuntos de espécimes de CMV, contendo espécimes alternados altamente positivos e negativos. No total, isto envolveu a análise de 108 réplicas de plasma negativo para CMV e 108 réplicas de plasma CMV enriquecido a 6,0 log₁₀ UI/mL. Todas as 108 réplicas dos espécimes negativos foram comunicados como negativos, o que demonstra que não houve contaminação cruzada durante o processamento das amostras no NeuMoDx System.

Equivalência da matriz de espécimes

O teste foi realizado para demonstrar a equivalência da matriz de espécimes entre sangue total colhido em tubos de colheita com ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e com ácido-citrato-dextrose (ACD) para a preparação de plasma. Foram realizados testes adicionais para determinar a equivalência entre espécimes de plasma recém-colhidos e congelados (colhidos nos dois tipos de tubo). Os espécimes recém-colhidos foram mantidos a 4 °C até serem enriquecidos com três níveis de CMV e testados em relação à equivalência. Em seguida, as amostras foram congeladas durante um período mínimo de 24 horas a -20 °C. Depois deste período de armazenamento congelado, os espécimes foram descongelados e novamente testados. Os resultados dos espécimes de plasma recém-colhidos vs. congelados e dos espécimes de plasma com EDTA vs. ACD foram comparados em relação à equivalência através de uma análise de regressão. Os dados demonstraram uma equivalência excelente entre espécimes de plasma com EDTA e ACD e entre espécimes recém-colhidos e congelados de plasma com inclinações de 0,02 em relação a 1,0 e uma tendência (intersecção) muito baixa, tal como apresentado na *Tabela 11* abaixo.

Tabela 11: Equivalência da matriz de espécimes

Requisito de parâmetro	ACD vs. K2EDTA		Recém-colhidas vs. Congeladas	
	Recém-colhido	Congelado	ACD	EDTA
Inclinação [0,9–1,1]	1,000	0,982	1,014	1,000
Intersecção [$<0,5 \log_{10}$ UI/mL]	-0,050	0,018	-0,061	0,020
valor $p > 0,05$	0,848	0,644	0,895	0,631

Comparação do método clínico

O desempenho quantitativo do NeuMoDx CMV Quant Assay foi avaliado em comparação com ensaios comparativos aprovados pela FDA/CE, testando espécimes clínicos não diluídos de pacientes infetados com CMV. O teste foi realizado internamente na NeuMoDx através de um estudo cego único de espécimes residuais clínicos anonimizados, obtidos de quatro laboratórios externos de referência. Foi processado um total de 284 espécimes de plasma utilizando o NeuMoDx CMV Quant Assay de forma cega (única) em vários NeuMoDx Molecular Systems.

Os erros de processamento e de sistema obtidos nos NeuMoDx Molecular Systems foram mínimos e cumpriram os critérios. Foi obtido um total de 3 resultados Indeterminate (Indeterminado, IND) para as amostras, o que resultou numa taxa inicial geral IND de 1% com um IC de 95% (0,27 a -3,32%). Não havia um volume suficiente para reprocessar estes 3 espécimes no fluxo de trabalho normal. Inicialmente, foram obtidos 10 resultados Unresolved (Não resolvido, UNR), mas, no seguimento do procedimento recomendado do CMV Quant Assay para uma diluição de 1:10 em Basematrix para resultados UNR, os resultados válidos foram obtidos após uma nova análise das 10 amostras UNR diluídas de forma apropriada. Assim, a taxa total de erros de processamento foi de 1,06% com um IC de 95% (0,27% a 3,3%) devido aos resultados Indeterminate (Indeterminado) que não puderam ser repetidos devido ao volume insuficiente.

Houve 4 amostras que geraram uma sinalização de Quantitation Error (Erro de quantificação). Dessas 4, foi possível repetir a análise de 3 de acordo com o procedimento recomendado, utilizando uma diluição de 1:10 da amostra em Basematrix, de forma a obter um resultado quantitativo válido. Dos 283 resultados válidos obtidos no estudo, 129 amostras foram declaradas como Positive (Positivas) pelo NeuMoDx CMV Assay, com os valores de concentração correspondentes atribuídos pelos testes de referência. Entre seis destas amostras, cinco foram reportadas como estando abaixo do LIdQ e uma foi reportada como estando acima do LSdQ pelos testes de referência. Assim, um total de 123 amostras tinha valores de concentração correspondentes atribuídos pelo NeuMoDx CMV Quant Assay e pelos testes CE-IVD de referência, os quais foram utilizados para uma análise de correlação quantitativa. As análises de regressão de Deming e de regressão de Passing-Bablok foram utilizadas para fazer a correlação entre os valores de concentração do NeuMoDx CMV Assay e os valores reportados pelos testes de referência.

Foram criados gráficos de equivalência para representar a correlação entre as concentrações do NeuMoDx CMV Quant Assay e os valores de concentração dos testes de referência para todas as amostras testadas, utilizando o ajuste de regressão de Deming e o ajuste Passing-Bablok, sendo apresentados na *Figura 5*.

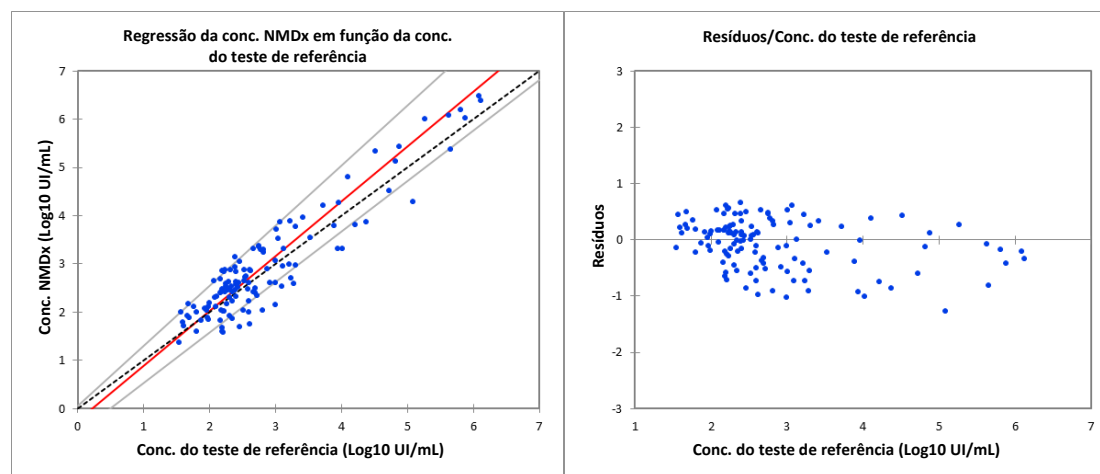


Figura 5: Gráficos de equivalência (*à esquerda*) e resíduos (*à direita*) – Análise cumulativa (em ambos os NeuMoDx Systems) dos resultados do NeuMoDx CMV Quant Assay em comparação com os resultados do teste de referência para TODAS as amostras, com base na análise de regressão de Passing-Bablok.

A qualidade do ajuste de regressão de Deming é ilustrada por um coeficiente de inclinação de 1,1 com um IC de 95% (1,0 a 1,2) e uma intersecção (tendência) de -0,18 com um IC de 95% (-0,39 a 0,03), demonstrando que os resultados de concentração obtidos entre o NeuMoDx CMV Quant Assay e os testes de referência estão altamente correlacionados e possuem uma tendência aceitável. A qualidade do ajuste linear de Passing-Bablok é ilustrada por um coeficiente de inclinação de 1,1 com um IC de 95% (1,0 a 1,2) e uma intersecção (tendência) de -0,24 com um IC de 95% (-0,51 a 0,06), demonstrando que os resultados de concentração obtidos entre o NeuMoDx CMV Quant Assay e os testes de referência estão altamente correlacionados e possuem uma tendência aceitável, tal como apresentado na *Tabela 12*.

Tabela 12: Resumo da análise de regressão linear de Deming e de Passing-Bablok

Análise de Deming		Análise de Passing-Bablok	
Intersecção	Coefficiente de inclinação	Intersecção	Coefficiente de inclinação
-0,18 IC de 95% (-0,39 a 0,03)	1,1 IC de 95% (1,0 a 1,2)	-0,24 IC de 95% (-0,51 a 0,06)	1,1 IC de 95% (1,0 a 1,2)

REFERÊNCIAS

1. Centers for Disease Control (CDC). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. (2018). Retrieved from <https://www.cdc.gov/cmvc/clinical/features.html>
2. Kraft, C. S., Armstrong, W. S., & Caliendo, A. M. (2012). Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clinical infectious diseases*, 54(12), 1793-1797.
3. A Ross, S., Novak, Z., Pati, S., & B Boppana, S. (2011). Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 11(5), 466-474.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
5. 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











NeuMoDx[™] é uma marca comercial da NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry[™] é uma marca comercial da NeuMoDx Molecular, Inc.

TaqMan[®] é uma marca comercial registrada da Roche Molecular Systems, Inc.

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

SÍMBOLOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
Rx only	Sujeito a receita médica
	Fabricante
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
REF	Número de catálogo
LOT	Código de lote
	Data de validade
	Limite de temperatura
	Limitação de humidade
	Não reutilizar
	Contém o suficiente para $<n>$ testes
	Consultar as instruções de utilização
	Cuidado
	Riscos biológicos
CE	Marcação CE

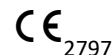


NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, EUA

Patrocinador (AUS):
QIAGEN Pty Ltd
Level 2 Chadstone Place
1341 Dandenong Rd
Chadstone VIC 3148
Austrália



Emergo Europe B.V.
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
Países Baixos



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

Patente: www.neumodx.com/patents