

REF 300500 NeuMoDx™ HIV-1 Quant Test Strip**R only**

CUIDADO: Apenas para distribuição fora dos EUA

IVD Para uso em diagnóstico *in vitro* com os NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular Systems*Para obter atualizações de folhetos informativos, visite: www.qiagen.com/neumodx-ifu**Para obter instruções detalhadas, consulte o Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System; nº de ref. 40600108**Para obter instruções detalhadas, consulte o Manual do operador do NeuMoDx 96 Molecular System; nº de ref. 40600317***USO PREVISTO**

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, realizado no NeuMoDx 96 Molecular System e no NeuMoDx 288 Molecular System (NeuMoDx System[s]), é um teste de amplificação de ácidos nucleicos de diagnóstico *in vitro* automatizado, quantitativo e qualitativo, concebido para a quantificação e detecção de RNA do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em plasma humano.

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay destina-se a ser usado em conjunto com um quadro clínico e outros marcadores laboratoriais para o prognóstico da doença para uso no auxílio à gestão clínica de pacientes infectados com o HIV-1 e para o monitoramento dos efeitos do tratamento antirretroviral, conforme medido por alterações nos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1. O ensaio pode quantificar RNA do HIV-1 no intervalo de 34,2 a $5,0 \times 10^7$ UI/mL ($1,5-7,7 \log_{10}$ UI/mL). O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay está validado para a quantificação de RNA dos grupos M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, K, CRF01_AE, CRF02_AG) N, O e P do HIV-1.

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay tem como objetivo auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HIV-1, incluindo infecção aguda ou primária. A presença de RNA do HIV-1 no plasma de pacientes sem anticorpos para o HIV-1 é indicativa de infecção aguda ou primária pelo HIV-1. O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser usado como um teste complementar para espécimes que apresentam resultados reativos repetidos com imunoenaios de HIV aprovados e como uma confirmação de infecção pelo HIV-1.

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay não deve ser usado como teste de rastreio de HIV-1 em doadores quanto à presença do HIV-1 em sangue ou produtos sanguíneos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Para a preparação do plasma, é possível usar sangue total humano coletado em tubos de coleta de sangue estéreis com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido-citrato-dextrose (ACD) como agentes anticoagulantes ou em tubos de preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT). Na preparação para os testes, o plasma em um tubo de espécime secundário ou o sangue fracionado em um tubo de espécime primário compatível com o NeuMoDx System é carregado no NeuMoDx System usando um transportador de tubos de espécime designado para iniciar o processamento. Para cada espécime, uma alíquota de 600 µL da amostra de plasma é misturada com NeuMoDx Lysis Buffer 3 e o NeuMoDx System executa automaticamente todas as etapas necessárias para extrair o ácido nucleico-alvo, preparar o RNA isolado para a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e, se presentes, amplificar e detectar os produtos da amplificação (seções do genoma do HIV-1 em regiões conservadas). O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay inclui um controle de processo de amostras (Sample Process Control 2, SPC2) de RNA para ajudar a monitorar a presença de potenciais substâncias inibidoras e de falhas do NeuMoDx System ou de reagentes que podem ocorrer durante o processo de extração e amplificação.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e é dividido em dois tipos principais, sendo o mais comum e patogênico o HIV tipo 1 (HIV-1). O HIV-1 pode ser transmitido por contato sexual, exposição a sangue ou produtos sanguíneos infectados ou de uma mãe infectada para o feto.¹⁻⁴ A infecção aguda por HIV-1, caracterizada por sintomas semelhantes aos da gripe, se desenvolve entre 3 e 5 semanas após a infecção inicial e está associada a altos níveis de viremia. A resposta imune específica ao HIV-1 é detectável entre 4 e 6 semanas após o início dos sintomas.⁵⁻⁹

Após a soroconversão, a maioria dos pacientes entra em uma fase assintomática que pode durar anos. A medição quantitativa dos níveis de RNA do HIV-1 em sangue periférico tem contribuído bastante para o entendimento da patogênese da infecção pelo HIV-1 e tem demonstrado ser um parâmetro essencial no prognóstico e tratamento de indivíduos infectados pelo HIV-1.¹⁰⁻¹¹ As decisões relacionadas ao começo ou à alteração da terapia antirretroviral são guiadas pelo monitoramento dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 (carga viral), contagem de células T CD4+ e condição clínica do paciente.¹²⁻¹⁷ O objetivo da terapia antirretroviral é suprimir a replicação do HIV-1 a níveis abaixo dos detectáveis pelos testes de carga viral atualmente disponíveis. Os níveis de vírus no sangue periférico podem ser quantificados pela medição do antígeno p24 do HIV no soro, pela cultura quantitativa de HIV do plasma ou pela medição direta do RNA viral no plasma usando tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos ou de amplificação de sinais.⁹⁻¹¹ Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase mediada por transcrição reversa, têm sido amplamente usadas para amplificar ácidos nucleicos.¹¹ O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay usa tecnologia de RT-PCR com detecção de fluorescência homogênea em tempo real. O ensaio inclui amplificação e detecção de duplo alvo, visando duas regiões independentes do genoma do HIV-1. Além disso, o design degenerado do ensaio permite a detecção de diversos subtipos do grupo M (A, B, C, D, F, G, H, K), incluindo formas recombinantes circulantes, e de isolados dos grupos N, O e P. Os resultados do ensaio são apresentados em unidades Internacionais por mL (UI/mL).

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay combina extração de RNA automatizada com amplificação/detecção por RT-PCR em tempo real. Espécimes de sangue total são coletados em tubos com EDTA, ACD ou PPT para a preparação de plasma. O espécime de sangue primário (fracionado) ou uma alíquota de plasma em um tubo de espécime secundário compatível é identificado com código de barras e colocado no NeuMoDx System. O NeuMoDx System aspira automaticamente uma alíquota do plasma para misturar com NeuMoDx Lysis Buffer 3 e com os agentes contidos no NeuMoDx Extraction Plate para iniciar o processamento. O NeuMoDx System automatiza e integra a extração e concentração de RNA, a preparação de reagentes e a amplificação/detecção de ácidos nucleicos das sequências-alvo usando RT-PCR em tempo real. O controle de processo de amostras (Sample Process Control 2, SPC2) incluído ajuda a monitorar a presença de substâncias inibidoras e falhas de sistema, processos ou reagentes. Não é necessária qualquer intervenção do operador uma vez que o espécime estiver carregado no NeuMoDx System.

O NeuMoDx System usa uma combinação de calor, enzima lítica e reagentes de extração para efetuar automaticamente a lise, a extração de RNA e a remoção de inibidores. Os ácidos nucleicos liberados são capturados por partículas paramagnéticas. As partículas, com ácido nucleico ligado, são carregadas no NeuMoDx Cartridge, onde os elementos não ligados são retirados por lavagem usando NeuMoDx Wash Reagent. O RNA ligado é, em seguida, eluído usando o NeuMoDx Release Reagent. O NeuMoDx System usa o RNA eluído para reidratar reagentes de amplificação NeuDry™ patenteados contendo todos os elementos necessários para a amplificação dos alvos específicos de HIV-1 e SPC2. Isso permite a amplificação e a detecção simultâneas das sequências de RNA dos alvos e do controle. Após a reconstituição dos reagentes de RT-PCR secos, o NeuMoDx System dispensa a mistura preparada pronta para RT-PCR em uma câmara de PCR (por espécime) do NeuMoDx Cartridge. A transcrição reversa, a amplificação e a detecção das sequências do controle e do alvo (se presentes) ocorrem na área da câmara de PCR. O NeuMoDx Cartridge foi projetado para conter o amplicon decorrente da RT-PCR em tempo real, eliminando praticamente o risco de contaminação pós-amplificação.

Os alvos amplificados são detectados em tempo real usando química de sondas de hidrólise (comumente chamada de química TaqMan®) usando moléculas de sonda fluorogênica de oligonucleotídeos específicas dos amplicons dos respectivos alvos. As sondas TaqMan consistem em um fluoróforo covalentemente ligado à extremidade 5' da sonda de oligonucleotídeos e um supressor na extremidade 3'. Enquanto a sonda estiver intacta, o fluoróforo e o supressor estão próximos, permitindo 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 projetadas para anelarem-se dentro de uma região do DNA amplificada por um conjunto específico de primers. À medida que a Taq DNA polimerase expande o primer e sintetiza a nova cadeia, a atividade exonuclease de 5' a 3' da Taq DNA polimerase degrada a sonda que se anelou ao modelo. A degradação da sonda libera o fluoróforo e quebra a sua proximidade com o supressor, superando assim o efeito de supressão devido à FRET e permitindo a detecção do fluoróforo. O sinal fluorescente resultante detectado no termociclador de RT-PCR quantitativa do NeuMoDx System é diretamente proporcional ao fluoróforo liberado e pode ser correlacionado à quantidade de alvo presente.

Uma sonda TaqMan, marcada com um fluoróforo (excitação: 490 nm e emissão: 521 nm) na extremidade 5' e um supressor de fluorescência na extremidade 3' é usada para detectar RNA de HIV-1. Para a detecção do SPC2, a sonda TaqMan é marcada com um corante fluorescente alternativo (excitação: 535 nm e emissão: 556 nm) na extremidade 5' e um supressor de fluorescência na extremidade 3'. O software do NeuMoDx System monitora o sinal fluorescente emitido pelas sondas TaqMan no final de cada ciclo de amplificação. Quando a amplificação é concluída, o software do NeuMoDx System analisa os dados e relata um resultado (POSITIVE [POSITIVO]/NEGATIVE [NEGATIVO]/INDETERMINATE [INDETERMINADO]/UNRESOLVED [NÃO RESOLVIDO]). Se um resultado for positivo e a concentração calculada estiver dentro dos limites de quantificação, o software do NeuMoDx System também fornece um valor quantitativo associado à amostra.

REAGENTES/CONSUMÍVEIS

Material fornecido

REF.	Conteúdo	Testes por unidade	Testes por embalagem
300500	NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip <i>Reagentes de RT-PCR secos contendo sonda e primers TaqMan específicos para HIV-1 e SPC2</i>	16	96

Outros materiais necessários (disponibilizados separadamente)

REF.	Conteúdo
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Partículas paramagnéticas, enzima lítica e controles de processo de amostras secas</i>
800304	NeuMoDx HIV-1 Calibrators <i>Conjuntos de uso único de calibradores altos e baixos de HIV-1 para estabelecer a validade da curva-padrão</i>
900301	NeuMoDx HIV-1 External Controls <i>Conjuntos de uso único de controles positivos e negativos para HIV-1</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Ponteiras Hamilton CO-RE/CO-RE II (300 µL) com filtros
235905	Ponteiras 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 HIV-1 Quant Test Strip é destinada para uso em diagnóstico *in vitro* exclusivamente com os NeuMoDx Molecular Systems.
- Não use os reagentes ou consumíveis após a data de validade indicada.
- Não use um reagente se o respectivo selo de segurança estiver rompido ou se a embalagem estiver danificada no momento da entrega.
- Não use consumíveis ou reagentes se a respectiva bolsa protetora estiver aberta ou quebrada no momento da entrega.
- Uma calibração de teste válida (gerada pelo processamento de calibradores altos e baixos dos NeuMoDx HIV-1 Calibrators [REF 800304]) deve existir antes que possam ser gerados resultados de teste para amostras clínicas.
- É necessário processar controles externos (dos NeuMoDx HIV-1 External Controls [REF 900301]) a cada 24 horas ao longo da testagem com o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.
- O volume mínimo de espécime de alíquotas secundárias depende do tamanho do tubo/transportador de tubos de espécime, conforme definido abaixo. Volumes inferiores ao mínimo especificado poderão resultar em um erro "Quantity Not Sufficient" (Quantidade insuficiente).
- O uso de espécimes armazenados a temperaturas inadequadas ou além dos prazos de armazenamento especificados poderá produzir resultados inválidos ou errôneos.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase) de todos os reagentes e consumíveis. É recomendado o uso de pipetas de transferência descartáveis estéreis e livres de RNase ao usar tubos secundários. Use uma pipeta nova para cada espécime.
- Para evitar contaminação, não manuseie ou destrua qualquer NeuMoDx Cartridge pós-amplificação. Sob nenhuma circunstância recolha os NeuMoDx Cartridges do recipiente de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 288 Molecular System) ou da lixeira de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 96 Molecular System). O NeuMoDx Cartridge foi projetado para evitar contaminação.
- Caso o laboratório também realize testes de PCR em tubo aberto, é necessário ter cuidado para garantir que a NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip, os outros consumíveis e reagentes necessários para os testes, o equipamento de proteção individual, como luvas e jalecos, e o NeuMoDx System não sejam contaminados.
- É necessário usar luvas nitrílicas sem talco e limpas ao manusear reagentes e consumíveis NeuMoDx. É necessário ter cuidado para não tocar na superfície superior do NeuMoDx Cartridge, na superfície da película de alumínio da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip e da NeuMoDx Extraction Plate ou na superfície superior do NeuMoDx Lysis Buffer 3; os consumíveis e reagentes devem ser manuseados tocando somente nas superfícies laterais.
- As fichas de dados de segurança (FDS) de cada reagente (conforme aplicável) estão disponíveis em www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Lave muito bem as mãos após realizar o teste.
- Não pipete com a boca. Não fume, beba ou coma em áreas onde estão sendo manuseados espécimes ou reagentes.
- Sempre manuseie os espécimes como se fossem infecciosos e de acordo com procedimentos laboratoriais de segurança como os descritos na publicação *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁸ e no Documento M29-A4 do CLSI.¹⁹
- Descarte os reagentes não usados e resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, federais, regionais, estaduais e locais.



ARMAZENAMENTO, MANUSEIO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

- As NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strips permanecem estáveis em sua embalagem primária até a data de validade indicada no rótulo do produto quando armazenadas entre 15–23 °C.
- As NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strips são enviadas em um recipiente isolado que contém pacotes de gel de refrigeração.
- Não use consumíveis ou reagentes após a data de validade indicada.
- Não use qualquer produto de teste se a embalagem primária ou secundária apresentar danos visíveis.
- Não carregue novamente nenhum produto de teste que tenha sido carregado anteriormente em outro NeuMoDx System.
- Uma vez carregada, a NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip pode permanecer dentro do NeuMoDx System por sete (7) dias. A vida útil restante das tiras de teste carregadas é controlada pelo software e informada ao usuário em tempo real. O sistema solicitará a remoção das tiras de teste que tiverem sido usadas além do prazo permitido.
- Embora não sejam infecciosos, descarte controles externos e calibradores NeuMoDx após o uso em resíduos de risco biológico de laboratório para reduzir o risco de contaminação pelo ácido nucleico-alvo contido.

COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES



1. Manuseie todos os espécimes, calibradores e controles como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos.
2. Não congele sangue total ou quaisquer outros espécimes armazenados em tubos primários.
3. Para preparar espécimes de plasma, o sangue total deve ser coletado em tubos estéreis usando EDTA ou ACD como anticoagulantes. Siga as instruções de preparo e armazenamento do fabricante do tubo de coleta de espécimes.
4. Os espécimes podem ser testados em tubos de coleta primários ou tubos de espécime secundários. Recomendado para testes em tubos primários: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD #368589) ou BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
5. Os espécimes de plasma preparados podem ser armazenados no NeuMoDx System por até 8 horas antes do processamento. Se for necessário tempo adicional de armazenamento, é recomendado que os espécimes sejam refrigerados ou congelados como alíquotas de plasma secundárias.
6. Os espécimes de plasma preparados devem ser armazenados entre 2 e 8 °C por no máximo 7 dias antes dos testes e por no máximo 8 horas à temperatura ambiente.

7. Os espécimes de plasma preparados podem ser armazenados a ≤ -20 °C por até 8 semanas antes do processamento.
 - a. Se as amostras forem congeladas, deixe-as descongelar completamente em temperatura ambiente (15-30 °C); agite-as para que fiquem uniformemente distribuídas.
 - b. Assim que as amostras forem descongeladas, a testagem deve ocorrer no prazo de 8 horas.
 - c. As amostras de plasma não devem ser submetidas a mais de 4 ciclos de congelamento/descongelamento antes do uso
8. Se os espécimes forem expedidos, eles devem ser embalados e rotulados de acordo com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis.
9. Identifique os espécimes de forma clara e indique que eles são para testes de HIV-1.
10. Avance para a seção *Preparação para teste*.

O processo geral de implementação do NeuMoDx HIV-1 Assay está resumido abaixo na *Figura 1*.

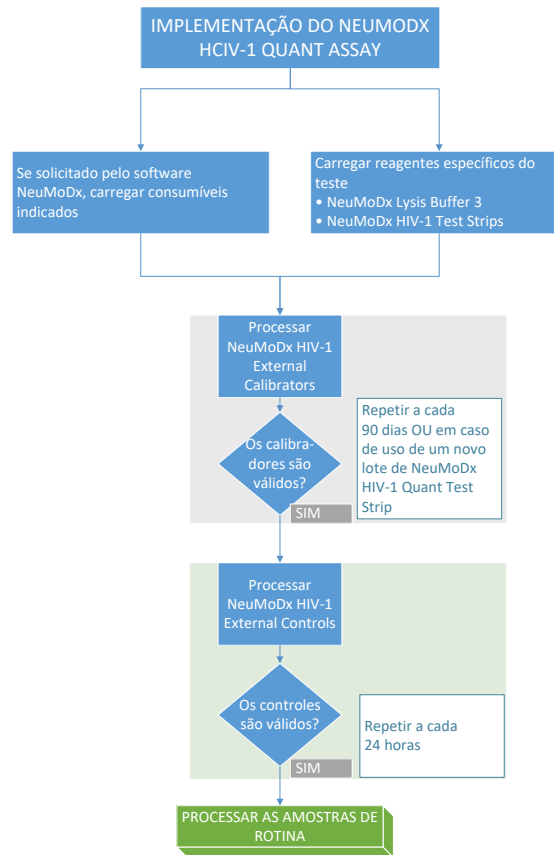


Figura 1: Fluxo de trabalho de implementação do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

INSTRUÇÕES DE USO

Preparação para teste

1. Aplique uma etiqueta de código de barras de espécime em um tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System. O tubo de coleta de sangue primário pode ser etiquetado e colocado diretamente em um transportador de tubos de espécime de 24 tubos ou 32 tubos após a centrifugação, conforme orientação do fabricante. Alternativamente, uma alíquota do plasma pode ser transferida para um tubo secundário para processamento no NeuMoDx System.
2. Se estiver testando o espécime no tubo de coleta primário, coloque o tubo com código de barras em um transportador de tubos de espécime e certifique-se de remover a tampa antes de carregar no NeuMoDx System.
3. Se estiver usando um tubo secundário, transfira uma alíquota do plasma para o tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System de acordo com 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 capacidade ≥ 750 μL
 - Transportador de tubos de espécime (24 tubos): 14,5–18 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura; volume mínimo de capacidade ≥ 1200 μL
 - Transportador de tubos de espécime de baixo volume (32 tubos): tubo para microcentrifuga de fundo cônico de 1,5 mL; volume mínimo de capacidade ≥ 700 μL

Operação do NeuMoDx System

Para obter instruções detalhadas, consulte os Manuais do operador dos NeuMoDx 288 e 96 Molecular Systems (nº de ref. 40600108 e 40600317)

1. Preencha um ou mais NeuMoDx System Test Strip Carrier(s) com NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip(s) e use a tela sensível ao toque para carregar o(s) transportador(es) de tiras de teste no NeuMoDx System.
2. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, adicione os consumíveis necessários aos transportadores de consumíveis do NeuMoDx System e use a tela sensível ao toque para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System.
3. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, reponha NeuMoDx Wash Reagent e NeuMoDx Release Reagent e esvazie os resíduos de preparação, o recipiente de resíduos de risco biológico (somente NeuMoDx 288 Molecular System), a lixeira de resíduos de ponteiros (somente NeuMoDx 96 Molecular System) ou a lixeira de resíduos de risco biológico (somente NeuMoDx 96 Molecular System), conforme apropriado.
4. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, processe os NeuMoDx HIV-1 Calibrators [REF 800304] e/ou os NeuMoDx HIV-1 External Controls [REF 900301]. Mais informações sobre calibradores e controles podem ser encontradas na seção *Processamento de resultados*.
5. Carregue o(s) tubo(s) de espécime/calibrador/controle em um transportador de tubos de espécime e certifique-se de remover as tampas de todos os tubos.
6. Coloque o(s) transportador(es) de tubos de espécime na prateleira de autocarregamento e use a tela sensível ao toque para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System. Isso iniciará o processamento dos espécimes carregados para os testes identificados, desde que haja um pedido de teste válido no sistema.

LIMITAÇÕES

1. A NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip somente pode ser usada em NeuMoDx Molecular Systems.
2. O desempenho da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip foi estabelecido para espécimes de plasma preparados a partir de sangue total coletado com EDTA/ACD como anticoagulante. O uso da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip com outras fontes não foi avaliado e as características de desempenho são desconhecidas com outros tipos de espécime.
3. O desempenho da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip foi estabelecido para testes em tubos primários usando BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tubes e BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube.
4. O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay não deve ser usado com amostras humanas heparinizadas.
5. Visto que a detecção de HIV-1 depende do número de partículas virais presentes na amostra, a confiabilidade dos resultados depende da coleta, do manuseio e do armazenamento adequados do espécime.
6. Os NeuMoDx HIV-1 Calibrators e os NeuMoDx HIV-1 External Controls devem ser processados conforme recomendado nos folhetos informativos quando solicitado pelo software do NeuMoDx System antes do processamento de amostras clínicas de rotina.
7. Podem ocorrer resultados errôneos devido a problemas de coleta, manuseio, armazenamento, erro técnico ou confusão entre tubos de espécime. Além disso, podem ocorrer resultados falso-negativos devido a uma quantidade de partículas virais na amostra inferior ao limite de detecção do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.
8. A operação do NeuMoDx System está limitada a pessoal com treinamento para utilizar o NeuMoDx System.
9. Se ambos os alvos de HIV-1 e de SPC2 não forem amplificados, é relatado um resultado inválido (Indeterminate [Indeterminado] ou Unresolved [Não resolvido]) e o teste deverá ser repetido.
10. Se o resultado do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay for Positivo (Positivo), mas o valor de quantificação estiver além dos limites de quantificação, o NeuMoDx System relatará se o HIV-1 detectado estava abaixo do limite inferior de quantificação (LidQ) ou acima do limite superior de quantificação (LSdQ).
11. Se o HIV-1 detectado estiver abaixo do LidQ, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser repetido (se desejado) com outra alíquota do espécime.
12. Se o HIV-1 detectado estiver acima do LSdQ, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser repetido (se desejado) com uma alíquota diluída do espécime original. É recomendada uma diluição de 1:100 ou 1:1.000 em plasma negativo para HIV-1 ou Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). A concentração do espécime original pode ser calculada da seguinte forma:
$$\text{concentração do espécime original} = \log_{10}(\text{fator de diluição}) + \text{concentração relatada da amostra diluída}.$$
13. A presença ocasional de inibidores de PCR no plasma pode resultar em um erro de quantificação do sistema. Se isso ocorrer, é recomendado repetir o teste com o mesmo espécime diluído em Basematrix a 1:10 ou 1:100.
14. Um resultado positivo não indica necessariamente a presença de HIV-1 viável. No entanto, um resultado positivo pressupõe a presença de RNA de HIV-1.
15. Exclusões ou mutações nas regiões conservadas que são alvo do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay podem afetar a detecção ou levar a um resultado errôneo.
16. Os resultados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay devem ser usados como um complemento às observações clínicas e outras informações à disposição do médico.
17. É recomendável aplicar boas práticas de laboratório, incluindo a troca de luvas entre o manuseio de espécimes de pacientes para evitar contaminação.

PROCESSAMENTO DE RESULTADOS

Os resultados disponíveis podem ser visualizados ou impressos na guia "Results" (Resultados) da janela "Results" (Resultados) na tela sensível ao toque do NeuMoDx System.

Os resultados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay são gerados automaticamente pelo software do NeuMoDx System usando o algoritmo de decisão e parâmetros de processamento de resultados especificados no arquivo de definições de ensaio de HIV-1 (HIV-1 Assay Definition File, HIV-1 ADF) da NeuMoDx. Um resultado do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser relatado como Negative (Negativo), Positive (Positivo) com uma concentração de HIV-1 relatada, Positive (Positivo) acima do L_{SdQ}, Positive (Positivo) abaixo do L_{IdQ}, Indeterminate (Indeterminado) ou Unresolved (Não resolvido), de acordo com o estado de amplificação do alvo e do controle de processo de amostras. Os resultados são relatados com base no algoritmo de decisão do ADF, resumido abaixo na *Tabela 1*.

Tabela 1: Resumo do algoritmo de decisão do HIV-1 Quant Assay

RESULTADO*	Alvo(s) de HIV-1	Controle de processo de amostras (SPC2)
Positive (Positivo) com concentração relatada	Amplified (Amplificado), $1,5 \leq [\text{HIV-1}] \leq 7,7 \log_{10} \text{ UI/mL}$	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)
Positive (Positivo) acima do L_{SdQ}	Amplified (Amplificado), $[\text{HIV-1}] > 7,7 \log_{10} \text{ UI/mL}$	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)
Positive (Positivo) abaixo do L_{IdQ}	Amplified (Amplificado), $[\text{HIV-1}] < 1,5 \log_{10} \text{ UI/mL}$	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)
Negative (Negativo)	Not Amplified (Não amplificado)	Amplified (Amplificado)
Indeterminate (Indeterminado)	Not Amplified, System Error Detected (Não amplificado, erro de sistema detectado)	
Unresolved (Não resolvido)	Not Amplified, No System Error Detected (Não amplificado, Nenhum erro de sistema detectado)	

*O intervalo de quantificação NeuMoDx HIV-1 Quant Assay é de $1,5$ a $7,7 \log_{10} \text{ UI/mL}$. Um resultado POSITIVE (POSITIVO) indica que o RNA do HIV-1 foi detectado e ajuda a diagnosticar a infecção pelo HIV-1. Um resultado NEGATIVE (Negativo) indica ausência de RNA do HIV-1 ou que a carga viral está abaixo do limite de detecção. Resultados falso-negativos ou de carga viral falsamente baixa podem ser causados por uma coleta ou armazenamento inadequado dos espécimes. Os resultados devem ser interpretados dentro do contexto de achados clínicos e laboratoriais relevantes.

Cálculo do teste

- Para amostras dentro do intervalo de quantificação do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, a concentração de RNA do HIV-1 nas amostras é calculada usando a curva-padrão armazenada em conjunto com o coeficiente de calibração.
 - Um coeficiente de calibração é calculado com base nos resultados dos NeuMoDx HIV-1 Calibrators processados para estabelecer a validade da curva-padrão de um determinado lote da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip em um NeuMoDx System específico.
 - O coeficiente de calibração é integrado na determinação final da concentração de RNA do HIV-1.
- Os resultados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay são relatados em $\log_{10} \text{ UI/mL}$. O fator de conversão para o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay é de 0,75 cópias/UI.
- A quantificação resultante de amostras desconhecidas é rastreável em relação a um material de referência calibrado obtido do National Institute for Biological Standards and Control.

Calibração de teste

É necessária uma calibração válida com base na curva-padrão para quantificar o RNA de HIV-1 nos espécimes. Para gerar resultados válidos, é necessário concluir um teste de calibração usando os calibradores fornecidos pela NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibradores

- Os NeuMoDx HIV-1 Calibrators [REF 800304] contêm um alvo de HIV-1 não infeccioso e encapsulado preparado em Basematrix.
- É necessário processar um conjunto de calibradores de HIV-1 com cada novo lote de NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strips, se um novo arquivo de definições de ensaio de HIV-1 for carregado no NeuMoDx System, se o conjunto de calibradores atual estiver fora do período de validade (atualmente definido como 90 dias) ou se o software do NeuMoDx System for modificado.
- O software do NeuMoDx System notificará o usuário quando os calibradores precisarem ser processados. Não é possível usar um novo lote de tiras de teste para testes até que os calibradores tenham sido processados com sucesso.
- A validade da calibração é estabelecida da seguinte forma:
 - É necessário processar um conjunto de dois calibradores, um (1) alto e um (1) baixo, para estabelecer a validade.
 - Pelo menos duas (2) das três (3) réplicas devem originar resultados dentro dos parâmetros predefinidos. O alvo nominal do calibrador baixo é de $3 \log_{10} \text{ UI/mL}$ e o alvo nominal do calibrador alto é de $5 \log_{10} \text{ UI/mL}$.
 - É calculado um coeficiente de calibração para levar em conta a variação esperada entre lotes de tiras de teste. Este coeficiente de calibração é usado na determinação da concentração final do HIV-1.

- Se um ou ambos os calibradores falharem a validação, repita o processamento do(s) calibrador(es) com falha utilizando um novo frasco. No caso de um calibrador falhar a validação, é possível repetir apenas o calibrador que falhou, pois o sistema não exige que o usuário processe ambos os calibradores novamente.
- Se o(s) calibrador(es) falhar(em) a validação consecutivamente, entre em contato com a NeuMoDx Molecular, Inc.

Controle de qualidade

Os regulamentos locais normalmente especificam que o laboratório é responsável pelos procedimentos de controle que monitoram a exatidão e precisão de todo o processo analítico, devendo estabelecer o número, o tipo e a frequência dos materiais de controle da testagem utilizando especificações de desempenho validadas para um sistema de teste aprovado e não modificado.

Controles externos

- Os NeuMoDx HIV-1 External Controls [REF 900301] contêm controles positivos de alvo de HIV-1 não infeccioso encapsulado e preparado em Basematrix e controles negativos apenas de Basematrix.
- É necessário processar controles externos positivos e negativos a cada 24 horas ao longo da testagem com o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay. Se não houver um conjunto de resultados de controles externos válido, o software do NeuMoDx System solicitará que o usuário processe os controles antes de ser possível relatar resultados de amostras.
- A validade dos controles externos será avaliada pelo NeuMoDx System com base no resultado esperado. O controle positivo deve fornecer um resultado Positive (Positivo) para HIV-1 e o controle negativo deve fornecer um resultado Negative (Negativo) para HIV-1.
- Os resultados discrepantes de controles externos devem ser gerenciados da seguinte forma:
 - Um resultado de teste Positive (Positivo) para uma amostra de controle negativo indica um problema de contaminação do espécime.
 - Um resultado de teste Negative (Negativo) para uma amostra de controle positivo pode indicar um problema relacionado com o reagente ou com o instrumento.
 - Em qualquer um dos casos acima, ou no caso de um resultado Indeterminate (Indeterminado, IND), repita os NeuMoDx HIV-1 External Controls com novos frascos do(s) controle(s) que falharam o teste de validação.
 - Se o NeuMoDx HIV-1 External Control positivo continuar relatando um resultado Negative (Negativo), entre em contato com a assistência técnica da NeuMoDx.
 - Se o NeuMoDx HIV-1 External Control negativo continuar relatando um resultado Positive (Positivo), tente eliminar todas as fontes de potencial contaminação, incluindo a reposição de todos os reagentes, antes de entrar em contato com a assistência técnica da NeuMoDx.

Controles (internos) de processo de amostras

Um controle de processo de amostras (Sample Process Control 2, SPC2) exógeno está integrado na NeuMoDx Extraction Plate e passa por todo o processo de extração de ácido nucleico e de amplificação por RT-PCR em tempo real com cada amostra. Estão também incluídos primers e sonda específicos para SPC2 em cada uma das NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip, que permitem a detecção do SPC2 com o RNA-alvo do HIV-1 (se presente) via RT-PCR em tempo real multiplex. A detecção da amplificação do SPC2 permite que o software do NeuMoDx System monitore a eficácia dos processos de extração de RNA e amplificação por RT-PCR.

Resultados inválidos

Se um NeuMoDx HIV-1 Quant Assay realizado no NeuMoDx System não gerar um resultado válido, ele será relatado como Indeterminate (Indeterminado, IND) ou Unresolved (Não resolvido, UNR) com base no tipo de erro ocorrido.

Um resultado IND (Indeterminado) será relatado se um erro do NeuMoDx System for detectado durante o processamento da amostra. Caso seja relatado um resultado IND (Indeterminado), é recomendável repetir o teste.

Um resultado UNR (Não resolvido) será relatado se não for detectada uma amplificação válida de SPC2 ou de RNA de HIV-1, o que indica uma possível falha de reagentes ou a presença de inibidores. Caso um resultado UNR (Não resolvido) seja relatado, um primeiro passo recomendável é repetir o teste. Se a repetição do teste falhar, é possível usar uma diluição do espécime para mitigar os efeitos de qualquer inibição da amostra.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

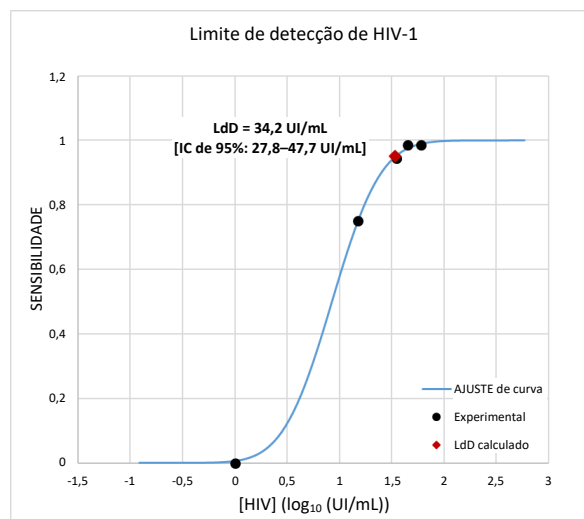
Sensibilidade analítica – Limite de detecção

A sensibilidade analítica do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi caracterizada através da testagem de uma série de diluições rastreável em relação ao 3º Padrão Internacional do HIV-1 da OMS em plasma com EDTA negativo para o RNA do HIV-1 triado para determinar o limite de detecção (LdD) nos NeuMoDx Systems. O LdD é definido como o nível de alvo mais baixo detectado a uma taxa de $\geq 95\%$ conforme determinado através da análise Probit. O estudo foi realizado ao longo de três (3) dias usando vários sistemas, operadores, execuções e lotes de reagentes do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay. Cada sistema processou 12 réplicas em cada nível de diluição por dia. As taxas de detecção estão indicadas na *Tabela 2*.

Tabela 2: Taxas de detecção positiva para determinação do LdD do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Concentração de alvo (UI/mL)	Concentração de alvo (log ₁₀ UI/mL)	Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de detecção (%)
60	1,78	72	71	98,6%
45	1,65	72	71	98,6%
35	1,54	72	68	94,4%
15	1,18	72	54	75,0%
0	-	72	0	0%

Por meio da análise Probit, determinou-se que o LdD do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em plasma entre todos os genótipos é de **34,2 UI/mL (1,5 log₁₀ UI/mL)** com um intervalo de confiança (IC) de 95% de 27,8 a 47,7 UI/mL (1,4–1,7 log₁₀ UI/mL), conforme testado no NeuMoDx 288 Molecular System [Figura 2].


Figura 2: Análise Probit do limite de detecção do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Sensibilidade analítica – Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LidQ) é definido como o nível de alvo mais baixo no qual uma detecção > 95% é obtida e o erro analítico total é ≤ 1. Para determinar o LidQ, o erro analítico total (Total Analytical Error, TAE) foi calculado para cada um dos níveis de alvo de HIV-1 como parte do cálculo do LdD. O TAE é definido da seguinte forma:

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

em que

- a **tendência** é o valor absoluto da diferença entre a média da concentração calculada e a concentração esperada.
- o **DP** é o desvio padrão do valor quantificado da amostra.

Os resultados compilados dos quatro (4) níveis de espécimes de plasma de HIV-1 usados no estudo de LidQ usando o subtipo B são apresentados na Tabela 3. Como o TAE calculado foi ≤ 1 em níveis de HIV-1 abaixo do LdD, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay demonstrou um limite inferior de quantificação equivalente ao limite de detecção: **34,2 UI/mL** (IC de 95% de 27,8–47,7 UI/mL) ou **1,5 log₁₀ UI/mL** (IC de 95% de 1,4–1,7 log₁₀ UI/mL).

Tabela 3: LidQ do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, com tendência e TAE

Conc. de alvo (UI/mL)	Conc. de alvo (log ₁₀ UI/mL)	Conc. média (log ₁₀ UI/mL)	Detecção (%)	DP	Tendência	TAE
60	1,78	1,76	99	0,28	0,02	0,59
45	1,65	1,82	99	0,30	0,17	0,78
35	1,54	1,69	94	0,39	0,15	0,93
15	1,18	1,52	75	0,54	0,34	1,44

Sensibilidade analítica – Linearidade e determinação do limite superior de quantificação

A linearidade e o limite superior de quantificação (LSDQ) do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foram estabelecidos pela preparação de uma série de diluições de HIV-1 proveniente do The External Quality Assurance Program Oversight Laboratory (Duke University, NC, EUA), AccuPlex™ Recombinant HIV/HCV Control (Seracare, MA, EUA) e HIV-1 RNA Working Reagent 2 for NAT Assays (NIBSC). Um painel de nove membros foi preparado em plasma com EDTA negativo para RNA do HIV-1 para abranger um intervalo de concentração de 7,70–1,70 log₁₀ UI/mL. O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay demonstrou a capacidade de quantificar o HIV-1 no intervalo linear de 6 log₁₀ com uma exatidão de ± 0,33 log₁₀ UI/mL com base no erro padrão calculado pelo intervalo de confiança de 95%. Não foram obtidos benefícios significativos usando ajustes de regressão de 2ª ou 3ª ordem. Determinou-se que o LSDQ usando os dados deste estudo é de **7,7 log₁₀ UI/mL**. As concentrações do ensaio de HIV-1 relatadas pelo NeuMoDx System em comparação com os valores esperados são apresentadas na *Figura 3*.

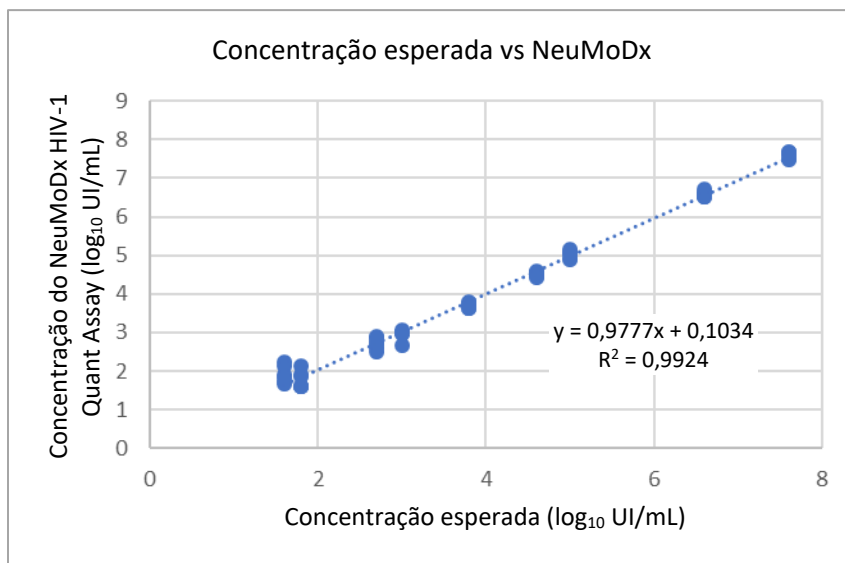


Figura 3: Intervalo linear do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Sensibilidade analítica – Linearidade entre genótipos

A linearidade do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay entre os grupos M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, K, CRF01_AE, CRF02_AG), N, O e P do HIV-1 foi caracterizada testando pelo menos cinco (5) concentrações diferentes de cada grupo/subtipo do HIV-1 preparadas em plasma com EDTA negativo para RNA do HIV-1 agrupado em pools. Os níveis de alvo de HIV-1 testados neste estudo dependiam da concentração do espécime original e, portanto, variavam entre grupos/subtipos. O estudo foi realizado com cada grupo/subtipo usando seis (6) réplicas em cada nível. Foi demonstrada linearidade em todos os intervalos testados, o que é apresentado na *Tabela 4* e na *Figura 4*.

Tabela 4: Linearidade do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay entre os grupos M, N, O e P

Grupo	Subtipo	Equação de linearidade <i>y</i> = Quantificação do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay (log ₁₀ UI/mL) <i>x</i> = Concentração esperada (log ₁₀ UI/mL)	R ²
M	A	$y = 1,0217x - 0,008$	0,9953
	B	$y = 0,9715x + 0,1442$	0,9933
	C	$y = 1,0055x + 0,0658$	0,9879
	D	$y = 1,0203x - 0,3554$	0,9941
	F	$y = 0,9872x + 0,4278$	0,9955
	G	$y = 1,0282x + 0,2223$	0,9970
	CRF01_AE	$y = 1,0163x - 0,0053$	0,9824
	CRF02_AG	$y = 0,99x - 0,0783$	0,9989
	H	$y = 0,9803x + 0,4187$	0,9730
	K	$y = 1,0441x - 0,0223$	0,9684
N		$y = 0,996x + 0,2117$	0,9876
O		$y = 1,0043x + 0,6167$	0,9942
P		$y = 0,9927x + 0,1903$	0,9974

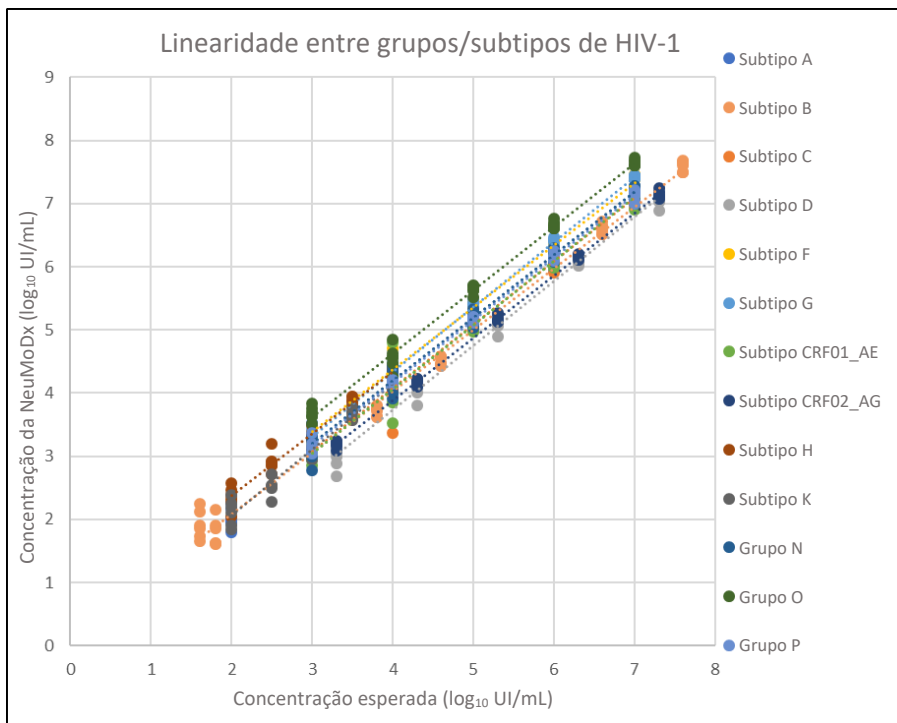


Figura 4: Linearidade do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay entre subtipos

Especificidade analítica – Contaminantes microbianos potencialmente interferentes

A especificidade analítica do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi avaliada testando um painel de microrganismos (*Tabela 5*) preparados em plasma com EDTA negativo para RNA do HIV-1 a altas concentrações quanto a reatividade cruzada. A potencial interferência foi avaliada usando o mesmo painel de microrganismos preparados em plasma com EDTA e misturados com HIV-1 a 2,02 log₁₀ UI/mL. Não foi observada reatividade cruzada, com todas as amostras microbianas negativas para HIV-1 apresentando resultados negativos. Todas as amostras microbianas positivas para HIV-1 apresentaram resultados positivos e não foram observadas interferências significativas nessas amostras, conforme evidenciado pelo desvio mínimo na quantificação de HIV-1 relatada em relação aos espécimes de controle que não continham microrganismos potencialmente interferentes. Foi ainda avaliada uma possível reatividade cruzada pela comparação de sequências de nucleotídeos das sequências-alvo do NeuMoDx HIV Quant Assay com os genomas completos de 26 patógenos adicionais (*Tabela 6*) usando a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponibilizada pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI). A análise de comparação de sequências não demonstrou qualquer analogia entre as sequências-alvo e os genomas examinados.

Tabela 5: Patógenos testados quanto a especificidade analítica

Microrganismo potencialmente interferente
Vírus da hepatite A
Vírus da hepatite B
Vírus da hepatite C
Vírus da leucemia humana de células T tipo 1 (HTLV-1)
Vírus da leucemia humana de células T tipo 2 (HTLV-2)
Vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (HIV-2)
Vírus da imunodeficiência símia (SIV)
Vírus Epstein-Barr

Tabela 6: Microrganismos incluídos na análise de alinhamento de sequências BLASTn

Microrganismo	Número(s) de registro	Microrganismo	Número(s) de registro
Adenovírus Tipo 12	X73487.1	Vírus herpes humano 5	GQ221974.1 KR534211.1 GQ221975.1 NC_006273.2
Poliovírus BK	AB369101.1 NC_001538.1 AB369092.1	Vírus herpes humano 7	AF037218.1 NC_001716.2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CP018052.1 CP017731.1	Vírus herpes humano 8	NC_009333.1
<i>Cutibacterium acnes</i>	NZ_CP006032.1	Vírus do papiloma humano tipo 18	NC_001357.1 MF288723.1
Vírus da dengue	KR919821.1 KR052012.1	Vírus do papiloma humano tipo 16	KY549222.1 KY549321.1
Vírus herpes simplex tipo 2	Z86099.2	Parvovírus humano B19	KX752821.1 MH201456.1
Adenovírus humano 2	J01917.1 AC_000007.1	Influenza A (todos os segmentos)	MN253846.1 MH797924.1 MH842686.1 MN037420.1
Adenovírus humano 5	KX868466.2 AC_000008.1 AY601635.1	Vírus JC	J02226.1 AB081030.1
Adenovírus humano C	AY339865.1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CP034022.1 CP041586.1
Vírus herpes beta humano 6A	NC_001664.4 X83413.2	<i>Propionibacterium acnes C1</i>	CP003877.1
Vírus herpes humano 1	X14112.1 JQ780693.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	AP017922.1
Vírus herpes humano 2	LT797626.1 JN561323.2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	AP008934.1
Vírus herpes humano 3	DQ479962.1 KC847290.1	Vírus do Nilo Ocidental	M12294.2 MF797870.1

Especificidade analítica – Substâncias endógenas e exógenas potencialmente interferentes

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi avaliado quanto a suscetibilidade à interferência de medicamentos comumente prescritos para indivíduos infectados com o HIV-1, níveis elevados de substâncias endógenas e pela presença de doenças autoimunes. Plasma com EDTA negativo para RNA do HIV-1 triado foi misturado com 3 log₁₀ UI/mL de HIV-1 e com albumina (120 mg/mL), bilirrubina (0,03 mg/mL), hemoglobina (3,5 mg/mL), triglicérides (5,3 mg/mL) e compostos de medicamentos (*Tabela 7*) em três vezes a C_{max}. Plasma em estado da doença para lúpus eritematoso sistêmico (LES), anticorpo antinuclear (AAN) e artrite reumatoide (AR) também foram triados como negativos e misturado com 3 log₁₀ UI/mL de HIV-1 para testagem. Não foram observadas interferências significativas. Os resultados do estudo estão resumidos na *Tabela 8*.

Tabela 7: Compostos de medicamentos testados quando a interferência

Classificação do medicamento	Nome do medicamento
Modulador imunológico	Interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, ribavirina
Antagonista do CCR5	Maraviroc
Potenciador farmacocinético	Cobicistat
Inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI)	Doravirina, efavirenz, nevirapina, rilpivirina
Inibidor de protease (IP)	Darunavir, amprenavir, ritonavir, saquinavir, simeprevir
Inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI) ou inibidor da DNA polimerase	Cidofovir, lamivudina, ganciclovir, tenofovir desoproxila, zidovudina, valganciclovir, sulfato de abacavir, emtricitabina, entecavir, foscarnet, sofosbuvir
Inibidor de integrase	Raltegravir, dolutegravir
Inibidor de fusão	Enfuvirtida
Tratamento de infecção oportunista	Azitromicina, claritromicina, fluconazol, sulfametoxazol, trimetoprima

Tabela 8: Resumo dos testes de interferência – Agentes exógenos e endógenos

Endógenos	Média [HIV-1] (log ₁₀ UI/mL)	Tendência (log ₁₀ UI/mL)
Albumina	3,03	-0,11
Bilirrubina	3,04	-0,09
Hemoglobina	3,04	-0,09
Triglicérides	3,14	0,01
Exógenos (Medicamentos)	Média [HIV-1] (log ₁₀ UI/mL)	Tendência (log ₁₀ UI/mL)
Pool 1: Interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, ribavirina, maraviroc, cobicistat	3,06	-0,07
Pool 2: Raltegravir, dolutegravir, efavirenz, nevirapina, rilpivirina	3,04	-0,09
Pool 3: Doravirina, darunavir, amprenavir, ritonavir, saquinavir	3,11	-0,02
Pool 4: Simeprevir, enfuvirtida, sulfato de abacavir, emtricitabina, entecavir, foscarnet	3,12	-0,01
Pool 5: Cidofovir, lamivudina, ganciclovir, tenofovir desoproxila, zidovudina, valganciclovir	3,14	0,01
Pool 6: Sofosbuvir, azitromicina, claritromicina, fluconazol, sulfametoxazol, trimetoprima	3,13	0
Estado de doença	Média [HIV-1] (log ₁₀ UI/mL)	Tendência (log ₁₀ UI/mL)
Lúpus eritematoso sistêmico (LES)	3,00	-0,13
Anticorpo antinuclear (AAN)	3,10	-0,03
Artrite reumatoide (AR)	3,25	0,12

Precisão

A precisão do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi determinada através da testagem de um painel de quatro membros de amostras de HIV-1 preparadas em plasma negativo para HIV-1 (incorporando o subtipo B e o grupo O de HIV-1 do EQAPOL, Duke University) em três (3) NeuMoDx Systems ao longo de seis (6) dias. Um total de 12 execuções em cada sistema foi executado para cada nível de amostra, resultando em 216 réplicas por nível durante o período de testes. Foram caracterizadas as precisões intraensaio, intradiária e intrassistema, e o desvio-padrão global foi determinado como sendo $\leq 0,15 \log_{10}$ UI/mL. Não foram encontradas diferenças significativas no desempenho entre sistemas, dias ou execuções, conforme apresentado na *Tabela 9*. A precisão entre operadores não foi determinada, pois o operador não desempenha um papel significativo no processamento de amostras utilizando o NeuMoDx System.

Tabela 9: Precisão intralaboratorial – NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em NeuMoDx Systems

	Conc. de alvo (log ₁₀ UI/mL)	Conc. méd. (log ₁₀ UI/mL)	DP intrassistema	DP intradiário	DP intraensaio	DP (global) intralaboratorial
Subtipo B	5,7	5,62	0,09	0,09	0,09	0,10
	3,7	3,62	0,10	0,10	0,10	0,13
Grupo O	4,7	4,65	0,09	0,09	0,09	0,12
	2,7	2,66	0,13	0,13	0,12	0,15

Varição lote a lote

A reprodutibilidade lote a lote do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi verificada por meio de uma análise retrospectiva dos dados dos testes de qualidade de três (3) lotes distintos de reagentes críticos. Esses dados foram gerados por meio de testes funcionais dos reagentes em um painel de três membros de alvo de HIV (AccuPlex Recombinant HIV/HCV Control) em plasma negativo para RNA do HIV-1, juntamente com amostras de plasma negativas. No total, 18 réplicas positivas e 14 negativas foram processadas por lote da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip. A variação intralote e entre lotes foi analisada e é apresentada na *Tabela 10*. A tendência absoluta global não excedeu 0,14 log₁₀ UI/mL e o desvio padrão global ficou abaixo de 0,25 log₁₀ UI/mL. Não foram encontradas diferenças significativas no desempenho entre lotes, uma vez que a quantificação de todos os membros do painel estava dentro das especificações de tolerância.

Tabela 10: Reprodutibilidade lote a lote – NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Conc. de alvo (log ₁₀ UI/mL)	Conc. média global (log ₁₀ UI/mL)	Número de testes válidos	Tendência (log ₁₀ UI/mL)	DP entre lotes	DP inralote	DP global
5,00	4,96	18	0,04	0,08	0,08	0,12
3,00	2,86	17	0,14	0,12	0,18	0,22
2,00	1,92	18	0,08	0,17	0,14	0,22

Eficácia do controle

Um controle de processo de amostras (Sample Process Control 2, SPC2) está incluído no NeuMoDx HIV-1 Quant Assay para relatar falhas de processo e/ou amplificação. A eficácia deste controle interno foi testada no NeuMoDx HCV Quant Assay análogo em condições representativas de falhas críticas nas etapas do processo que poderiam potencialmente ocorrer durante o processamento das amostras e que poderão não ser detectadas pelos sensores de monitoramento de desempenho do NeuMoDx System. Amostras moderadas positivas e negativas foram executadas para contestar o controle interno com a presença de inibidores de reação, sem aplicação de NeuMoDx Wash Reagent e sem expulsão da solução de lavagem. As condições que tiveram um efeito adverso na detecção do alvo também foram refletidas na detecção do SPC2 e estão resumidas abaixo na *Tabela 11*. Todos os cenários testados demonstraram a capacidade do controle de processo de amostras em monitorar adequadamente falhas ou que as falhas não detectadas não tinham um efeito significativo na detecção e quantificação do alvo.

Tabela 11: Resumo do estudo de eficácia do controle de processo de amostras

Condição de falha simulada	Estado de amplificação do SPC2	Estado de amplificação do alvo	Resultado do ensaio
Presence of Inhibitor (Presença de inibidor)	Not Amplified (Não amplificado)	Not Amplified (Não amplificado)	Unresolved (Não resolvido)
No Wash Reagent Delivered (Sem aplicação de reagente Wash)	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 (Positivo), ± 0,3 log ₁₀ UI/mL de controle

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi determinada testando seis (6) execuções de amostras alto positivas e negativas para HIV-1 alternadas. Um total de 36 réplicas negativas e 36 réplicas de HIV-1 de alto título a 6,0 log₁₀ UI/mL em uma configuração de titulação cruzada. Todas as réplicas das amostras negativas foram relatadas como negativas, demonstrando a ausência de contaminação cruzada ao longo de todo o processamento da amostra no NeuMoDx System.

Equivalência da matriz de espécimes

Foram realizados testes para demonstrar a equivalência da matriz de espécimes entre sangue total coletado em tubos de coleta com EDTA e ACD para o preparo do plasma. Testes adicionais foram realizados para determinar a equivalência entre espécimes de plasma frescos e congelados (coletados nos dois tipos de tubo). Os espécimes frescos foram mantidos a 2–4 °C antes de serem misturados com quatro níveis de HIV-1 (incluindo um nível negativo) que abrangiam o intervalo quantitativo do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay e testados quanto a equivalência. Em seguida, as amostras foram congeladas por um período mínimo de 24 horas a ≤ -20 °C. Após este período de armazenamento congelado, os espécimes foram descongelados e novamente testados. Os resultados dos espécimes de plasma com EDTA vs. ACD e frescos vs. congelados foram comparados quanto à sua equivalência por meio de uma análise de regressão. Os resultados da análise de dados de regressão linear não mostraram diferenças significativas nos valores relatados entre EDTA e ACD ou entre condições de armazenamento fresco e congelado do plasma testado usando o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.

Foram realizados testes adicionais para demonstrar a equivalência do desempenho do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em espécimes primários vs espécimes secundários. Foram processados primeiro painéis de espécimes de doadores negativos para HIV-1 misturados com alvo de HIV-1 (AccuPlex Recombinant HIV/HCV Control) e de espécimes de doadores positivos para HIV-1 a partir dos tubos de espécime primários. Após o processamento dos tubos primários, o plasma remanescente de cada espécime foi aliquotado em um tubo de espécime secundário e reprocessado. Não foram encontradas diferenças significativas nos resultados relatados entre o processamento de tubos de plasma primários e secundários.

Comparação de métodos clínicos

O desempenho qualitativo e quantitativo do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi comparado com o de um ensaio comparativo aprovado pela FDA/CE-IVD. Foram realizados testes internos através de um estudo simples cego de espécimes de plasma remanescente desidentificados obtidos de um provedor registrado pela FDA. Um total de 723 espécimes de plasma foi processado usando o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em vários NeuMoDx Systems. Todas as amostras que inicialmente produziram um resultado inválido foram processadas novamente com sucesso, fornecendo resultados válidos para todas os espécimes sujeitos a este estudo.

Os erros de processamento e de sistema encontrados durante os testes foram mínimos e estiveram dentro dos critérios de aceitação. Um total de doze (12) resultados Indeterminate (Indeterminado, IND) e sete (7) resultados Unresolved (Não resolvido, UNR) produz uma taxa de resultados indeterminados de 1,48% (IC de 95%: 0,85–2,57%) e uma taxa de resultados não resolvidos de 0,86% (IC de 95%: 0,42–1,77%). A taxa global de resultados válidos foi de 97,7% (IC de 95%: 96,4–98,5%).

Dos 723 resultados válidos obtidos, 165 amostras foram relatadas como Positive (Positivo) pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, com os valores de concentração correspondentes atribuídos pelos testes de referência. Foram produzidas análises de regressão de Deming e de regressão de Passing-Bablok para correlacionar os valores de concentração relatados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay com os valores relatados dos testes de referência.

Foram gerados gráficos de regressão e residuais para representar a correlação entre as concentrações do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay e os valores de concentração dos testes de referência para todas as amostras testadas com concentrações atribuídas por ambos. Os gráficos gerados usando a análise do método de Deming e o método de Passing-Bablok são mostrados nas *Figuras 5 e 6*, respectivamente. A qualidade do ajuste de regressão de Deming é ilustrada por um coeficiente de declive de 0,975 (IC de 95%: 0,939, 1,011) e uma interseção (tendência) de -0,121 (IC de 95%: -0,276, 0,033), demonstrando que os resultados de concentração obtidos com o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay e os testes de referência estão altamente correlacionados com tendência aceitável. A qualidade do ajuste linear de Passing-Bablok é ilustrada por um coeficiente de declive de 0,981 (IC de 95%: 0,950, 1,012) e uma interseção (tendência) de -0,167 (IC de 95%: -0,288, -0,036), demonstrando também que os resultados de concentração obtidos entre o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay e os testes de referência estão altamente correlacionados com tendência aceitável. Os resultados das análises de Deming e de Passing-Bablok estão resumidos abaixo na *Tabela 12*.

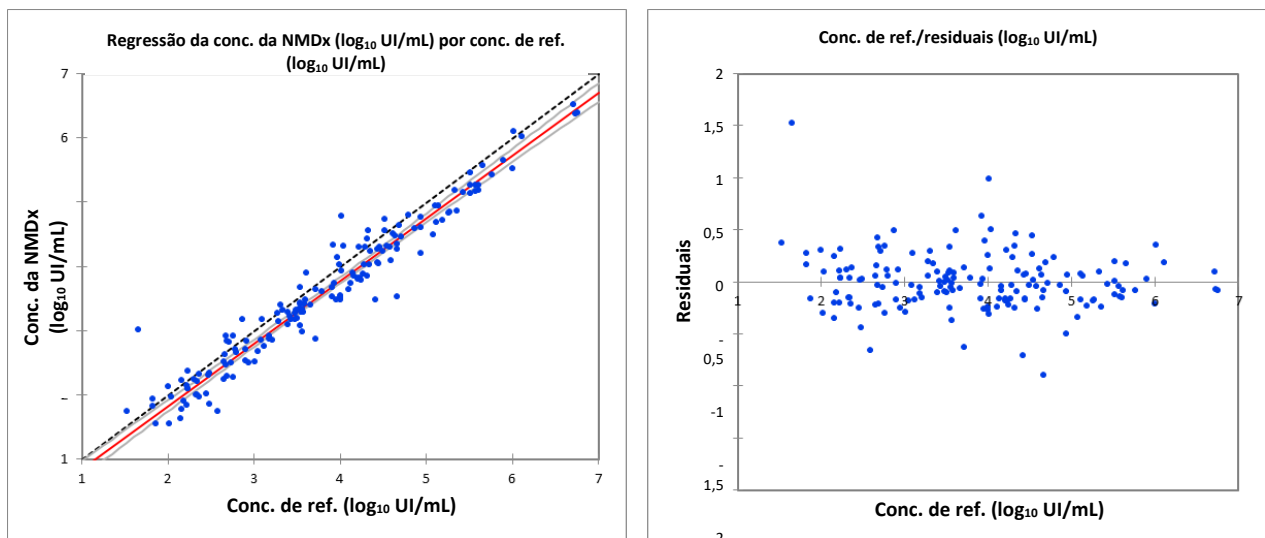


Figura 5: Gráficos de equivalência (à esquerda) e residuais (à direita) – Análise cumulativa do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. testes de referência – Análise de Deming

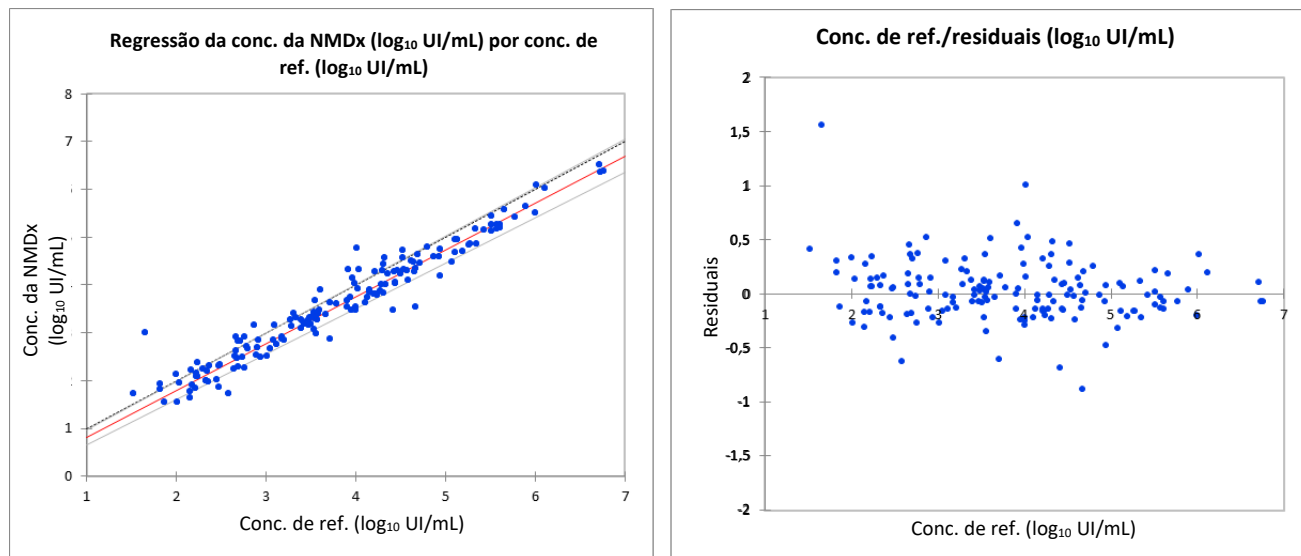


Figura 6: Gráficos de equivalência (à esquerda) e residuais (à direita) – Análise cumulativa do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. testes de referência – Análise de Passing-Bablok

Tabela 12: Resumo das análises de regressão linear de Deming e de Passing-Bablok

Análise de Deming		Análise de Passing-Bablok	
Interseção	Coefficiente de declive	Interseção	Coefficiente de declive
-0,121	0,975	-0,167	0,981
IC de 95% (-0,276, 0,033)	IC de 95% (0,939, 1,011)	IC de 95% (-0,288, -0,036)	IC de 95% (0,950, 1,012)

Dos 723 resultados válidos obtidos usando o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, 171 foram relatados como positivos pelos testes de referência e 552 foram relatados como negativos. A sensibilidade e a especificidade do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foram calculadas em relação aos testes de referência e estão resumidas abaixo na *Tabela 13*. Das 171 amostras positivas testadas, 165 foram relatadas como positivas pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, demonstrando uma sensibilidade de 96,5% (IC de 95%: 92,6-98,4%). Das 552 amostras negativas testadas, 551 foram relatadas como negativas pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, demonstrando uma especificidade de 99,8% (IC de 95%: 99,0-100%).

Tabela 13: Resultados da comparação de métodos qualitativos para o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. testes de referência

		Teste de referência			
		HIV-1	Positive (Positivo)	Negative (Negativo)	Total
NeuMoDx	Positive (Positivo)		165	1	166
	Negative (Negativo)		6	551	557
	Total		171	552	723
		Sensibilidade = 96,5% (IC de 95% de 92,6–98,4)			
		Especificidade = 99,8% (IC de 95% de 99,0–100%)			

Além disso, um total de 12 painéis de soroconversão comerciais, incluindo 75 amostras de plasma individuais, foi processado com o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay para demonstrar a detecção de RNA do HIV-1 antes da detecção de anticorpos/antígenos usando testes disponíveis comercialmente. Foram incluídos na análise membros de painéis de pré-soroconversão, soroconversão precoce e soroconversão. A análise foi realizada para comparar o primeiro sangramento no qual o RNA do HIV-1 é detectado pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em comparação com o primeiro sangramento positivo para o anticorpo/antígeno (Ab/Ag) do HIV-1, conforme relatado pelos testes de sangue comercialmente disponíveis e aprovados pela FDA/CE-IVD. Em todos os painéis testados, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay detectou RNA do HIV-1 pelo menos um sangramento antes que os testes de sangue para a detecção de anticorpos/antígenos. Os resultados estão resumidos na *Tabela 14*.

Tabela 14: Comparação de painéis de soroconversão – NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. teste de sangue para Ab/Ag do HIV-1

ID do painel	Dia de sangramento com primeiro resultado positivo	
	NeuMoDx HIV-1 Quant Assay	Testes de sangue para Ab/Ag do HIV-1
PRB969	4	7
PRB968	5	7
0600-0230	2	4
0600-0270	2	3
0600-0258	2	3
0600-0244 (PRB962)	3	5
0600-0272	3	4
PRB967	2	4
PRB964	3	6
PRB963	4	6
0600-0263	5	7
PRB956	2	4

Foram realizadas análises adicionais para comparar o primeiro sangramento no qual o RNA do HIV-1 é detectado pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay com o primeiro sangramento positivo para o RNA do HIV-1, conforme revelado por testes NAT comercialmente disponíveis e aprovados pela FDA/CE-IVD. Em todos os painéis testados, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay detectou RNA do HIV-1 no mesmo sangramento que os outros testes NAT para a detecção de RNA do HIV-1. Em dois painéis, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay demonstrou detecção de RNA do HIV-1 um sangramento antes que outros testes NAT. Os resultados estão resumidos na *Tabela 15*.

Tabela 15: Comparação de painéis de soroconversão – NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. NAT para RNA do HIV-1

ID do painel	Dia de sangramento com primeiro resultado positivo	
	NeuMoDx HIV-1 Quant Assay	NAT de referência
PRB969	4	4
PRB968	5	5
0600-0230	2	2
0600-0270	2	2
0600-0258	2	2
0600-0244 (PRB962)	3	3
0600-0272	3	3
PRB967	2	2
PRB964	3	4
PRB963	4	5
0600-0263	5	5
PRB956	2	2

REFERÊNCIAS

1. Barré-sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(12):877-83.
2. Piot P, Plummer FA, Mhalu FS, Lamboray JL, Chin J, Mann JM. AIDS: an international perspective. *Science.* 1988;239(4840):573-9.
3. Acheson ED. AIDS: a challenge for the public health. *Lancet.* 1986;1(8482):662-6.
4. De cock KM, Jaffe HW, Curran JW. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS.* 2012;26(10):1205-13.
5. Gaines H, Von sydow MA, Von stedingk LV, et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS.* 1990;4(10):995-9.
6. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1993;328(5):327-35.
7. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324(14):961-4.
8. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324(14):954-60.
9. Coombs RW, Collier AC, Allain JP, et al. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1989;321(24):1626-31.
10. Horsburgh CR, Ou CY, Jason J, et al. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet.* 1989;2(8664):637-40.
11. Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 1993;259(5102):1749-54.
12. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA.* 2007;297(21):2349-50.
13. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Department of Health and Human Services. Available at <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Updated December 18, 2019.
14. Cohen MS, Chen YQ, Mccauley M, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493-505.
15. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):123-6.
16. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):117-22.
17. Dimitrov DS, Martin MA. HIV results in the frame. CD4+ cell turnover. *Nature.* 1995;375(6528):194-5.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
19. 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

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

AccuPlex™ é uma marca da SeraCare Life Sciences, Inc.











BD Vacutainer® é uma marca registrada da Becton, Dickinson and Company

BD e PPT™ são marcas registradas da Becton, Dickinson and Company

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

Todos os outros nomes de produtos, marcas e marcas registradas que possam aparecer neste documento são propriedade de seus respectivos proprietários.

SÍMBOLOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
R only	Sujeito a prescrição médica
	Fabricante
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
REF	Número de catálogo
LOT	Código de lote
	Prazo de validade
	Limite de temperatura
	Limite de umidade
	Não reutilizar
	Contém o suficiente para <n> testes
	Consultar as instruções de uso
	Cuidado
	Riscos biológicos
CE	Marca CE

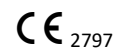


NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, EUA

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
The Netherlands



Suporte técnico/Informação de vigilância: support@qiagen.com

Patente: www.neumodx.com/patents