

REF 300300 NeuMoDx™ HCV 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, aceder 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 HCV Quant Assay é um teste automatizado *in vitro* de amplificação de ácidos nucleicos para a quantificação do ARN do vírus da hepatite C (VHC) em espécimes de plasma e soro humanos para os genótipos 1 a 6 dos anticorpos positivos para VHC de indivíduos infetados por VHC. O NeuMoDx HCV Quant Assay implementado no NeuMoDx 288 Molecular System e NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx Systems) integra a extração automatizada do ARN para isolar o ácido nucleico-alvo do espécime e da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR), tendo como alvo as sequências altamente conservadas do genoma viral da hepatite C.

O NeuMoDx HCV Quant Assay destina-se a ser utilizado como um auxiliar na gestão de pacientes com infeções por VHC. Os resultados do NeuMoDx HCV Quant Assay devem ser interpretados no contexto de todos os resultados clínicos e laboratoriais relevantes. O NeuMoDx HCV Quant Assay não se destina a ser utilizado como teste de rastreamento de sangue ou de produtos sanguíneos ou para diagnosticar o estado clínico da infeção por VHC.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O sangue total humano colhido em tubos estéreis para colheita de sangue que contém ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido-citrato-dextrose (ACD) como agentes anticoagulantes ou em tubos para preparação de plasma (plasma preparation tubes, PPT) pode ser utilizado na preparação do plasma, enquanto o soro deve ser colhido em tubos de colheita ou de separação de soro (serum separation tubes, SST). Para preparar o teste, o plasma ou o soro num tubo de espécime secundário ou o sangue fracionado num tubo de espécime primário compatível com o NeuMoDx System é carregado no NeuMoDx System, utilizando um transportador de tubos de espécime designado. Por cada espécime, uma alíquota da amostra de plasma/soro é misturada com o NeuMoDx Lysis Buffer 3 e o NeuMoDx System desempenha automaticamente todos os passos necessários para extrair o ácido nucleico-alvo, preparar o ARN isolado para amplificação RT-PCR em tempo real e, se presentes, amplificar e detetar os produtos de amplificação. O NeuMoDx HCV Quant Assay tem como alvos duas regiões altamente conservadas do genoma VHC para aumentar a robustez do ensaio. O NeuMoDx HCV Quant Assay também inclui um controlo de processo de amostra (Sample Process Control 2, SPC2) de ARN 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 VHC é um vírus de ARN de cadeia simples, de sentido positivo, capaz de causar infeções agudas e crónicas.¹ Não existe atualmente uma vacina para a hepatite C. Embora a infeção aguda seja geralmente assintomática e muito raramente associada a doença potencialmente fatal, mais de metade das pessoas infetadas por VHC pode desenvolver uma infeção crónica. De entre os pacientes com infeção crónica por VHC, o risco de desenvolver cirrose hepática é de 15–30% num período de 20 anos. Em todo o mundo, estima-se que 71 milhões de pessoas sofram de infeção crónica por VHC e espera-se que um número significativo dessas pessoas desenvolva cirrose ou cancro do fígado.²⁻⁴ Sendo um vírus que circula na corrente sanguínea, o VHC tem sido transmitido principalmente através do contacto sanguíneo ou por produtos derivados do sangue. A adoção generalizada de testes de análise ao sangue reduziu significativamente a incidência de infeções a partir de sangue doado.¹

A deteção de anticorpos para VHC não diferencia entre infeções ativas e eliminadas. Por conseguinte, os algoritmos de teste de VHC em laboratório requerem o diagnóstico de infeções ativas por VHC em indivíduos com anticorpos positivos para VHC, através da deteção de ARN de VHC em plasma ou soro antes de se iniciar a terapia (se necessária). A quantificação de ARN de VHC (carga viral) é agora utilizada rotineiramente na definição e monitorização do tratamento bem-sucedido do VHC.

As diretrizes atuais em matéria de gestão e tratamento de infeções por VHC recomendam a realização de testes quantitativos de ARN de VHC antes de se iniciar a terapia antiviral para estabelecer uma linha de base 12 semanas ou mais após o fim do tratamento. Momentos de avaliação adicionais podem, por vezes, ser recomendáveis. O objetivo da terapia do VHC é a resposta virológica sustentada (RVS) e é definida como ARN de VHC não detetável (com um ensaio que tem um limite de deteção <25 UI/mL) após a terapia.⁵⁻⁷ Diretrizes recentes da American Association for the Study of Liver Diseases sugerem o teste de ARN de VHC não apenas como linha de base, mas também de forma periódica durante o tratamento (ou seja, 4 semanas) e 12 semanas após a conclusão do mesmo. Os testes para a deteção de ARN de VHC, em combinação com os testes serológicos, são utilizados para identificar uma infeção ativa por VHC.⁶

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O NeuMoDx HCV Quant Assay combina a extração automatizada de ARN, a amplificação e a detecção RT-PCR em tempo real. Os espécimes de sangue total são colhidos em tubos EDTA, ACD ou PPT para a preparação de plasma e/ou em tubos SST para a preparação de soro. O espécime de sangue primário (fracionado) ou uma alíquota de plasma/soro num tubo de espécime secundário compatível é etiquetado com um código de barras e carregado no NeuMoDx System. O NeuMoDx System aspira automaticamente uma alíquota do plasma/soro para misturar com NeuMoDx Lysis Buffer 3 e com os agentes contidos na NeuMoDx Extraction Plate para iniciar o processamento. O NeuMoDx System automatiza e integra a extração e a concentração de ARN, a preparação de reagentes e a amplificação/detecção de ácidos nucleicos das sequências-alvo, utilizando RT-PCR em tempo real. O controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) incluído ajuda a monitorizar a presença de substâncias inibidoras e falhas de sistema, processo ou reagentes. Não é necessária qualquer intervenção do operador depois de o espécime ser carregado no NeuMoDx System.

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

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

As sondas TaqMan foram concebidas de forma a hibridizar dentro de uma região de 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 sua proximidade com o supressor, ultrapassando assim o efeito de supressão devido ao FRET e permitindo a detecção do fluoróforo. O sinal de fluorescência resultante, detetado no termociclador de RT-PCR quantitativa do NeuMoDx System é diretamente proporcional ao fluoróforo libertado e pode ser correlacionado com a quantidade de 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 ARN de VHC. Para detecção do SPC2, 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 um resultado final (POSITIVE [POSITIVO]/NEGATIVE [NEGATIVO]/INDETERMINATE [INDETERMINADO]/UNRESOLVED [NÃO RESOLVIDO]/NO RESULT [SEM RESULTADOS]). Se um resultado for positivo e a concentração calculada se encontrar dentro dos limites de quantificação, o software do NeuMoDx System fornece também um valor quantitativo associado à amostra.

REAGENTES/CONSUMÍVEIS

Material fornecido

REF	Conteúdo	Unidades por embalagem	Testes por unidade	Testes por embalagem
300300	NeuMoDx HCV Quant Test Strip <i>Reagentes de RT-PCR secos contendo iniciadores e sondas TaqMan específicos do VHC e do SPC2</i>	6	16	96

Materiais 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>
800200 ou 800202	NeuMoDx HCV Calibrators <i>Conjuntos de utilização única de calibradores altos e baixos de VHC para estabelecer a validade da curva de calibração</i>
900201 ou 900202	NeuMoDx HCV External Controls <i>Conjuntos de utilização única de controlos positivos e negativos de VHC</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
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 HCV 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 HCV Calibrators) antes de os resultados de teste poderem ser gerados para as amostras clínicas.
- Os NeuMoDx HCV External Controls devem ser processados a cada 24 horas ao longo dos testes com o NeuMoDx HCV Quant Assay.
- O volume mínimo de espécime das alíquotas secundárias depende do tamanho do tubo, do transportador de tubos de espécime e do processamento do volume do espécime, tal como definido abaixo. Volumes inferiores ao mínimo especificado poderão resultar num erro "Quantity Not Sufficient" (Quantidade insuficiente).
- A utilização de espécimes armazenados a temperaturas inadequadas ou para além dos períodos de armazenamento especificados poderá produzir resultados inválidos ou erróneos.
- Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase) de todos os reagentes e consumíveis. Se forem utilizados tubos de espécime secundários, é recomendada a utilização de pipetas de transferência descartáveis estéreis e isentas de RNase. Utilizar uma nova pipeta para cada espécime.
- Para evitar a contaminação, não manusear nem destruir um NeuMoDx Cartridge após a amplificação. Não recuperar NeuMoDx Cartridges do contentor de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 288 Molecular System) ou do recipiente de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 96 Molecular System) em quaisquer circunstâncias. O NeuMoDx Cartridge foi concebido para prevenir a contaminação.
- Nos casos em que são também realizados em laboratório testes de PCR em tubo aberto, é necessário ter especial cuidado para que a NeuMoDx HCV 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 HCV Quant Test Strip, na NeuMoDx Extraction Plate ou na parte superior da superfície do NeuMoDx Lysis Buffer 3. O manuseamento dos consumíveis e reagentes deve ser feito tocando apenas nas superfícies laterais.
- São fornecidas fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS) para cada reagente (conforme aplicável) em www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Lavar muito bem as mãos depois de realizar o teste.
- Não pipetar com a boca. Não fumar, beber ou comer em áreas onde estiverem a ser manuseados espécimes ou reagentes.

- Manusear sempre os espécimes como se fossem infecciosos e de acordo com os procedimentos laboratoriais de segurança, tal como os descritos na publicação *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁸ e no documento M29-A4 do CLSI.⁹
- Eliminar os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, regionais e locais.
- Não reutilizar.



ARMAZENAMENTO, TRATAMENTO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

- As NeuMoDx HCV Quant Test Strips permanecem estáveis dentro da embalagem primária até à data de validade indicada na etiqueta do produto, quando armazenadas a temperaturas entre 4 e 28 °C.
- Não utilizar consumíveis ou reagentes após a data de validade indicada.
- Não utilizar qualquer produto de teste se a embalagem primária ou secundária tiver danos visíveis.
- Não carregue novamente qualquer produto de teste que tenha sido previamente carregado noutra NeuMoDx System.
- Uma vez carregada, a NeuMoDx HCV Quant Test Strip pode permanecer a bordo do NeuMoDx System durante um máximo de 14 dias. O prazo de validade restante de tiras de teste carregadas é controlado pelo software e comunicado ao utilizador em tempo real. O sistema irá solicitar a remoção das tiras de teste que tenham sido utilizadas para além do período permitido.

COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES

1. Manuseie todos os espécimes, calibradores e controlos 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 anticoagulantes ou em tubos para a preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT). Siga as instruções do fabricante do tubo para colheita de espécimes relativamente à preparação e ao armazenamento.
4. Para preparar espécimes de soro, o sangue total deve ser colhido em tubos de soro ou em tubos SST. Siga as instruções do fabricante do tubo para colheita de espécimes relativamente à preparação e ao armazenamento.
5. Os espécimes podem ser testados em tubos de colheita primários ou em tubos de espécime secundários. Recomendado para testes de tubos primários:
 - a. Espécimes de plasma: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD #368589) ou BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
 - b. Espécimes de soro: BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD #367820) ou BD Vacutainer SST™ Tube (BD #367988).
6. Os espécimes preparados podem ser armazenados no NeuMoDx System até 8 horas antes do processamento. Se for necessário tempo adicional de armazenamento, é recomendado que os espécimes sejam refrigerados ou congelados em alíquotas secundárias.
7. Os espécimes preparados devem ser armazenados a temperaturas entre 2–8 °C por um período não superior a 7 dias antes do teste e durante um máximo de 8 horas à temperatura ambiente.
8. Os espécimes preparados em tubos secundários podem ser armazenados a uma temperatura ≤ -20 °C até 24 semanas antes do processamento; os espécimes congelados não devem passar por mais do que dois (2) ciclos de congelamento/descongelamento antes da sua utilização.
 - a. Os espécimes de plasma congelados e que passam por um (1) ciclo de congelamento/descongelamento podem ser armazenados a bordo do sistema por mais 8 horas.
 - b. Os espécimes de plasma congelados e que passam por dois (2) ciclos de congelamento/descongelamento não devem ser armazenados a bordo do sistema mais do que 4 horas.
 - c. Os espécimes de soro congelados e que passam por um (1) ou dois (2) ciclos de congelamento/descongelamento devem ser testados imediatamente após o descongelamento.
 - d. Se as amostras estiverem congeladas, permitir que descongelem à temperatura ambiente (15-30 °C); agitar para gerar uma amostra uniformemente distribuída.
 - e. Não é recomendado o congelamento de plasma/soro em tubos de colheita primários.
9. Se os espécimes forem expeditos, estes devem ser embalados e etiquetados em conformidade com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis.
10. Etiquetar claramente os espécimes e indicar que são para testes de VHC.
11. Avançar para a secção *Preparação para teste*.

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

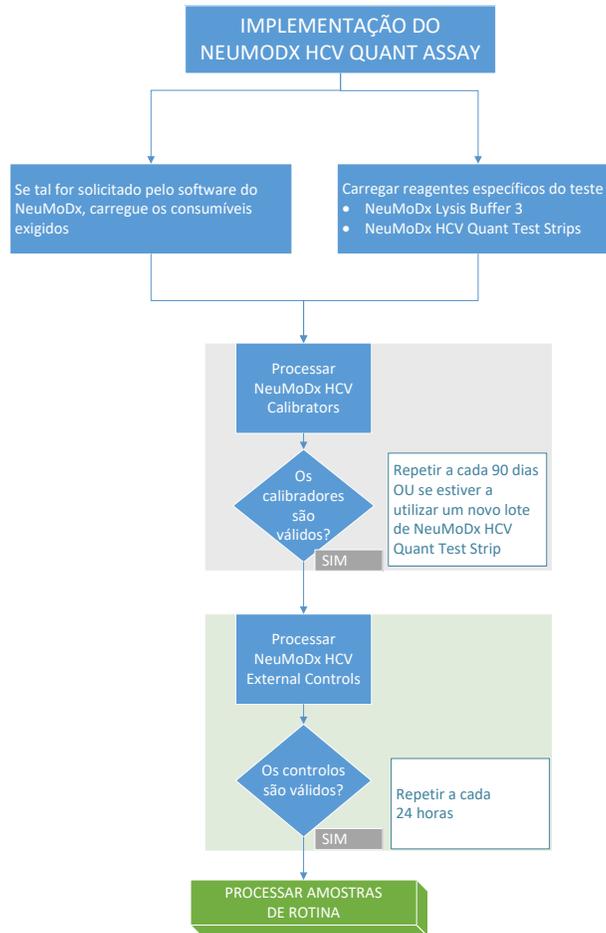


Figura 1: Fluxo de trabalho da implementação do NeuMoDx HCV Quant Assay

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Preparação para teste

O NeuMoDx HCV Quant Assay pode ser processado diretamente a partir de tubos de colheita de sangue primários ou de alíquotas de espécimes em tubos secundários. O processamento pode ser executado utilizando um de dois fluxos de trabalho de processamento de volume de espécimes – fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL ou fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL.

1. Aplicar a etiqueta de código de barras de espécime a um tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System. O tubo de colheita de sangue primário pode ser etiquetado e colocado diretamente num transportador de tubos de espécime de 32 tubos, após a centrifugação, conforme indicado pelo fabricante. Em alternativa, uma alíquota do plasma pode ser transferida para um tubo secundário para processamento no NeuMoDx System.
2. Se estiver a testar o espécime no tubo de colheita primário, colocar o tubo etiquetado com código de barras num transportador de tubos de espécime e garantir que a tampa é removida antes de o carregar no NeuMoDx System. Os volumes mínimos **acima** da camada leucoplaquetária estão descritos abaixo e serão cumpridos se os espécimes forem colhidos e processados de acordo com as instruções do fabricante do tubo. Não é garantido o desempenho em espécimes colhidos de forma desadequada.

Tipo de tubo	Volume mínimo de espécime necessário	
	Fluxo de trabalho de 550 µL	Fluxo de trabalho de 200 µL
SST – 3,5 mL	1550 µL	1200 µL
PPT/SST – 5,0 mL	1800 µL	1450 µL
PPT/SST – 8,5 mL	2500 µL	2200 µL
K ₂ EDTA/Soro – 4,0 mL	1050 µL	700 µL
K ₂ EDTA/Soro – 6,0 mL	1250 µL	900 µL
K ₂ EDTA/Soro – 10,0 mL	1600 µL	1250 µL

3. Se utilizar um tubo secundário:
 - a. Agitar suavemente o espécime para obter uma distribuição uniforme
 - b. Utilizando uma pipeta de transferência para cada espécime, transferir uma alíquota do plasma ou soro para o tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System conforme os volumes definidos abaixo:

Transportador de tubos de espécime	Tamanho do tubo	Volume mínimo de espécime necessário	
		Fluxo de trabalho de 550 µL	Fluxo de trabalho de 200 µL
32-Tube Specimen Tube Carrier (Transportador de tubos de espécime de 32 tubos)	Diâmetro entre 11–14 mm e altura entre 60–120 mm	700 µL	400 µL
24-Tube Specimen Tube Carrier (Transportador de tubos de espécime de 24 tubos)	Diâmetro entre 14,5–18 mm e altura entre 60–120 mm	1100 µL	800 µL
Low Volume Specimen Tube Carrier (Transportador de tubos de espécime de baixo volume)	Tubo de microcentrífuga com base cônica de 1,5 mL	650 µL	300 µL

- c. É necessário ter especial cuidado para não transferir qualquer coágulo da amostra para o tubo de espécime.

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. Carregue o pedido de teste no NeuMoDx System de acordo com o fluxo de trabalho de volume de espécimes e o tipo de tubo de espécime desejados.
 - São testados 550 µL de volume de espécime, definindo o tipo de espécime como "**Plasma**" ou "**Serum**" (Soro)
 - São testados 200 µL de volume de espécime, definindo o tipo de espécime como "**Plasma2**" ou "**Serum2**" (Soro2)
 - Caso não seja definido no pedido de teste, será utilizado o tipo de espécime **Plasma** num **Secondary Tube** (Tubo secundário) como predefinição.
2. Preencher um ou mais transportadores de tiras de teste NeuMoDx System com a(s) NeuMoDx HCV Quant Test Strip(s) e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) de tiras de teste no NeuMoDx System.
3. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, adicionar os consumíveis necessários aos transportadores de consumíveis do NeuMoDx System e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System.
4. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, substituir o NeuMoDx Wash Reagent, o NeuMoDx Release Reagent, esvaziar os resíduos de iniciação, o contentor de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 288 Molecular System), o recipiente de resíduos de pontas (apenas NeuMoDx 96 Molecular System) ou o recipiente de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 96 Molecular System), conforme apropriado.
5. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, processar os NeuMoDx HCV Calibrators e/ou NeuMoDx HCV External Controls. Podem ser encontradas mais informações acerca dos calibradores e controlos na secção *Processamento de resultados*.
6. Carregar o(s) tubo(s) de espécime/calibrador/controlo num transportador de tubos de espécime e garantir que as tampas foram removidas de todos os tubos.

7. Colocar o(s) transportador(es) de tubos de espécime na prateleira do carregador automático e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System. Tal irá iniciar o processamento dos espécimes carregados para os testes identificados, desde que esteja presente no sistema um pedido de teste válido.

LIMITAÇÕES

1. A NeuMoDx HCV Quant Test Strip apenas pode ser utilizada em NeuMoDx Systems.
2. O desempenho da NeuMoDx HCV Quant Test Strip foi estabelecido para espécimes de plasma preparados com EDTA/ACD como anticoagulante ou para espécimes de soro preparados em tubos de separação de soro. A utilização da NeuMoDx HCV Quant Test Strip com outras fontes não foi avaliada e as características de desempenho são desconhecidas com outros tipos de espécimes.
3. O desempenho da NeuMoDx HCV Quant Test Strip foi estabelecido para testes de tubos primários utilizando BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tubes, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tubes, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tubes e BD Vacutainer SST Tubes.
4. O manuseamento de espécimes além das condições de armazenamento pode afetar negativamente a exatidão quantitativa do NeuMoDx HCV Quant Assay, embora tenha menor probabilidade de afetar a taxa de indicação qualitativa (Positivo/Negativo).
5. Armazenar os espécimes de soro a bordo do sistema após um armazenamento congelado prolongado e passar por dois ciclos de congelamento/descongelamento sem testar imediatamente pode afetar negativamente a exatidão quantitativa do NeuMoDx HCV Quant Assay.
6. Foi observado um pequeno aumento no limite de deteção e no limite inferior de quantificação do NeuMoDx HCV Quant Assay ao utilizar um fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL.
7. O NeuMoDx HCV Quant Assay não pode ser utilizado com amostras humanas heparinizadas.
8. Uma vez que a deteção do VHC está dependente do número de partículas virais de ARN alvo presentes na amostra, a obtenção de resultados fiáveis depende da colheita, do tratamento e do armazenamento adequados do espécime.
9. Os NeuMoDx HCV Calibrators e os NeuMoDx HCV External Controls têm de ser processados conforme recomendado nos folhetos informativos quando solicitado pelo software do NeuMoDx System, antes do processamento de amostras clínicas de rotina.
10. Podem ocorrer resultados erróneos devido à colheita, ao manuseamento e ao armazenamento inadequados dos espécimes, a erros técnicos ou à confusão 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 HCV Quant Assay.
11. A operação do NeuMoDx System apenas pode ser realizada por pessoal com formação para utilizar o NeuMoDx System.
12. Se o alvo de VHC e o alvo de SPC2 não amplificarem, é comunicado um resultado inválido (Indeterminate [Indeterminado], No Result [Sem resultados] ou Unresolved [Não resolvido]) e o teste deverá ser repetido.
13. Se o resultado do NeuMoDx HCV Quant Assay for Positivo (Positivo), mas o valor de quantificação estiver para além dos limites de quantificação, o NeuMoDx System irá comunicar se o VHC detetado estava *abaixo* do limite inferior de quantificação (LlDQ) ou *acima* do limite superior de quantificação (LSdQ).
14. Se o VHC detetado estiver *abaixo* do LlDQ, o NeuMoDx HCV Quant Assay pode ser repetido (se pretendido) com outra alíquota do espécime.
15. Se o VHC detetado estiver acima do LSdQ, o NeuMoDx HCV 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 VHC ou Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). A concentração do espécime original é calculada da seguinte forma:
$$\text{concentração do espécime original} = \log_{10}(\text{fator de diluição}) + \text{concentração comunicada da amostra diluída}$$
16. A presença ocasional dos inibidores de PCR em plasma e soro pode resultar num erro de quantificação do sistema. Se isto ocorrer, é recomendável que repita o teste com o mesmo espécime diluído em Basematrix a 1:10 ou 1:100.
17. Um resultado positivo não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. No entanto, um resultado positivo pressupõe a presença de ARN do vírus da hepatite C.
18. Eliminações ou mutações nas regiões conservadas que são alvo do NeuMoDx HCV Quant Assay podem afetar a deteção ou originar um resultado erróneo ao utilizar a NeuMoDx HCV Quant Test Strip.
19. Os resultados do NeuMoDx HCV 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.
20. 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 HCV 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 HCV Assay (HCV Assay Definition File, HCV ADF). Um resultado pode ser comunicado como Negative (Negativo), Positive with a reported HCV concentration (Positivo com uma concentração de VHC comunicada), Positive above ULoQ (Positivo acima do LSdQ), Positive below LLoQ (Positivo abaixo do LIdQ), Indeterminate (Indeterminado, IND), Unresolved (Não resolvido, UNR) ou No Result (Sem Resultados, NR), 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 do ADF, resumido na *Tabela 1* abaixo.

Tabela 1. Resumo do algoritmo de decisão do NeuMoDx HCV Quant Assay

RESULTADO	Alvo do VHC	Controlo de processo de amostra (Sample Process Control 2, SPC2)	Interpretação de resultados
Positive with Reported Concentration (Positivo com concentração comunicada)	Amplified (Amplificado) $0,9 \leq [\text{VHC}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ UI/mL}$ (fluxo de trabalho de 550 μL) $1,5 \leq [\text{VHC}] \leq 8,2 \log_{10} \text{ UI/mL}$ (fluxo de trabalho de 200 μL)	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)	ARN do VHC detetado dentro do intervalo quantitativo
Positive, above ULoQ (Positivo, acima do LSdQ)	Amplified (Amplificado) $[\text{VHC}] > 8,2 \log_{10} \text{ UI/mL}$	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)	ARN do VHC detetado acima do intervalo quantitativo
Positive, below LLoQ (Positivo, abaixo do LIdQ)	Amplified (Amplificado) $[\text{VHC}] < 0,9 \log_{10} \text{ UI/mL}$ (fluxo de trabalho de 550 μL) $[\text{VHC}] < 1,5 \log_{10} \text{ UI/mL}$ (fluxo de trabalho de 200 μL)	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)	ARN do VHC detetado abaixo do intervalo quantitativo
Negative (Negativo)	Not Amplified (Não amplificado)	Amplified (Amplificado)	ARN do VHC não detetado
Indeterminate (Indeterminado)	Not Amplified (Não amplificado), System Error Detected (Erro do sistema detetado), Sample Processing Completed (Processamento de amostras concluído)		Todos os resultados do alvo foram inválidos; testar novamente a amostra†
No Result (Sem resultados)*	Not Amplified (Não amplificado), System Error Detected (Erro do sistema detetado), Sample Processing Aborted (Processamento de amostras interrompido)		O processamento de amostras foi interrompido; testar novamente a amostra†
Unresolved (Não resolvido)	Not Amplified (Não amplificado), No System Error Detected (Nenhum erro do sistema detetado)		Todos os resultados do alvo foram inválidos; testar novamente a amostra†

*O sinalizador No Result (Sem resultados) é apenas comunicado nas versões 1.8 e superiores do software do NeuMoDx System.

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

Cálculo do teste

- Para amostras dentro do intervalo de quantificação do NeuMoDx HCV Quant Assay, a concentração de ARN do VHC nas amostras é calculada utilizando a curva-padrão armazenada em conjunto com o coeficiente de calibração e o volume de espécime.
 - O coeficiente de calibração é calculado com base nos resultados dos NeuMoDx HCV Calibrators processados para estabelecer a validade da curva-padrão para um lote específico da NeuMoDx HCV Quant Test Strip num NeuMoDx System em particular.
 - O coeficiente de calibração está integrado na determinação final da concentração de ARN do VHC.
 - O software do NeuMoDx contabiliza o volume de entrada do espécime ao determinar a concentração de ARN do VHC por mL de espécime.
- Os resultados do NeuMoDx HCV Quant Assay são comunicados em $\log_{10} \text{ UI/mL}$.
- A quantificação resultante das amostras desconhecidas é rastreável de acordo com o 5.º padrão internacional da OMS para o VHC.

Calibração de teste

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

Calibradores

1. Um conjunto de NeuMoDx HCV Calibrators necessita de ser processado com cada novo lote de NeuMoDx HCV Quant Test Strips, se for carregado um novo ficheiro de definição de ensaio VHC no NeuMoDx System, se o conjunto atual de calibradores estiver fora do prazo de validade (definido atualmente em 90 dias) ou se o software do NeuMoDx System tiver sido modificado.
2. O software do NeuMoDx System irá notificar o utilizador quando for necessário processar calibradores. Não é possível utilizar um novo lote de tiras de teste para análise até que os calibradores tenham sido processados com êxito.
3. A validade da calibração é estabelecida da seguinte forma:
 - a) É necessário processar um conjunto de dois calibradores – um (1) alto e um (1) baixo – de forma a estabelecer a validade.
 - b) Pelo menos duas (2) das três (3) réplicas devem originar resultados dentro dos parâmetros predefinidos. O alvo nominal do calibrador baixo é de $3 \log_{10}$ UI/mL e o alvo nominal do calibrador alto é de $5 \log_{10}$ UI/mL.
 - c) É calculado um coeficiente de calibração para ter em conta a variação prevista entre lotes de tiras de teste. Este coeficiente de calibração é utilizado na determinação da concentração final do VHC.
4. 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.
5. Se os calibradores falharem a verificação de validade consecutivamente, 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

1. Os controlos externos positivos e negativos devem ser processados a cada 24 horas ao longo do teste com o NeuMoDx HCV Quant Assay. Se não existir um conjunto válido de resultados de controlos externos, o software do NeuMoDx System irá solicitar ao utilizador que estes controlos sejam processados antes de os resultados da amostra poderem ser comunicados.
2. A validade dos controlos externos irá ser avaliada pelo NeuMoDx System de acordo com o resultado previsto. O controlo positivo deve fornecer um resultado VHC positivo e o controlo negativo um resultado VHC negativo.
3. O tratamento de resultados discrepantes de controlos externos deve ser realizado da seguinte forma:
 - a) Um resultado de teste Positive (Positivo) para uma amostra de controlo negativo indica um problema de contaminação de espécimes.
 - b) Um resultado de teste Negative (Negativo) para uma amostra de controlo positivo pode indicar um problema relacionado com o reagente ou com o instrumento.
 - c) Em ambos os casos acima ou no caso de um resultado Indeterminate (Indeterminado) (IND) ou No Result (Sem resultados) (NR), repita os NeuMoDx HCV External Controls com novos frascos do controlo ou controlos que falharam o teste de validade.
 - d) Se um NeuMoDx HCV External Control positivo continuar a comunicar um resultado Negative (Negativo), contacte a assistência técnica da NeuMoDx.
 - e) Se um NeuMoDx HCV External Control negativo continuar a comunicar um resultado Positive (Positivo), tente eliminar todas as potenciais fontes de contaminação, incluindo a substituição de todos os reagentes, antes de contactar a assistência técnica da NeuMoDx.

Controlos (internos) do processo de amostra

Um controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) exógeno está integrado na NeuMoDx Extraction Plate e passa por todo o processo de extração do ácido nucleico e de amplificação RT-PCR em tempo real com cada amostra. Estão também incluídos os iniciadores e a sonda específicos para o SPC2 em cada uma das NeuMoDx HCV Quant Test Strip, permitindo a deteção da presença do SPC2 em conjunto com o alvo ARN do VHC (se presente) via RT-PCR em tempo real multiplex. A deteção da amplificação do SPC2 permite que o software do NeuMoDx System monitorize a eficácia dos processos de extração de ARN e de amplificação RT-PCR.

Resultados inválidos

Se um NeuMoDx HCV Quant Assay desempenhado no NeuMoDx System falhar na produção de um resultado válido a seguir à conclusão do processamento de amostras, será comunicado como Indeterminate (Indeterminado) (IND), No Result (Sem resultados) (NR) 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, na ausência de erros do sistema, não for detetada uma amplificação válida de ARN do VHC ou do SPC2, o que indica uma possível falha de reagentes ou a presença de inibidores. Caso seja comunicado um resultado UNR, é recomendada, como primeiro passo, a realização de um novo teste. Se o novo teste falhar, pode ser utilizado um espécime diluído para mitigar os efeitos de qualquer inibição da amostra.

Se um NeuMoDx HCV Quant Assay efetuado no NeuMoDx System falhar na produção de um resultado válido e o processamento da amostra for abortado antes da conclusão, será comunicado como No Result (Sem resultados) (NR). Caso seja comunicado um resultado NR (Sem resultados), recomenda-se realizar um novo teste.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica – Limite de detecção utilizando o padrão da OMS

A sensibilidade analítica do NeuMoDx HCV Quant Assay foi caracterizada testando espécimes negativos e uma série de diluições do 5.º padrão internacional da OMS (genótipo 1) em plasma e soro humanos negativos analisados 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 (N288 e N96) processou 18 réplicas em cada nível de diluição por dia. As taxas de detecção estão descritas na *Tabela 2*. Foi executado um estudo adicional para determinar o LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay ao utilizar o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL, os resultados estando apresentados na *Tabela 3*.

Tabela 2. Taxas de detecção positiva para determinação do LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay – Fluxo de trabalho de 550 µL

Concentração do alvo [UI/mL]	Concentração do alvo [\log_{10} UI/mL]	PLASMA			SORO		
		Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de detecção	Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de detecção
30	1,48	108	108	100%	108	108	100%
15	1,18	108	108	100%	108	107	99%
10	1,00	108	105	97%	108	102	94%
7,5	0,88	108	102	94%	108	105	97%
3,75	0,57	108	84	78%	108	86	80%
1,875	0,27	108	47	44%	108	63	58%
NEG	0	108	0	0%	107	1	0,93%

Tabela 3. Taxas de detecção positiva para determinação do LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay – Fluxo de trabalho de 200 µL

Concentração do alvo [UI/mL]	Concentração do alvo [\log_{10} UI/mL]	PLASMA			SORO		
		Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de detecção	Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de detecção
75	1,88	N/D	N/D	N/D	22	22	100%
60	1,78	22	22	100%	22	22	100%
30	1,48	22	21	95,5%	22	20	90,9%
15	1,18	22	17	77,3%	22	19	86,4%
10	1,00	22	13	59,1%	22	15	68,2%
NEG	0	22	0	0%	22	0	0%

O LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay em plasma em todos os genótipos foi determinado como sendo de 7,5 UI/mL (IC de 95% para 6,4 a 9,2 UI/mL) [(0,9 \log_{10} UI/mL) (IC de 95% para 0,8 a 1,0 \log_{10} UI/mL)] tal como testado no NeuMoDx 288 Molecular System utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL (*Figura 2*). O LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay para espécimes de soro foi determinado como sendo de 8,0 UI/mL (IC de 95% para 6,6 a 10,4 UI/mL) [(0,9 \log_{10} UI/mL) (IC de 95% para 0,8–1,0 \log_{10} UI/mL)] utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL (*Figura 2*); a indicação do LdD para ambos os tipos de espécimes utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL é de **8,0 UI/mL (0,9 \log_{10} UI/mL)**.

O LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL foi determinado como sendo de 27,9 UI/mL (IC de 95% para 20,1–81,9) em espécimes de plasma e de 29,8 UI/mL (IC de 95% para 20,5–94,0) em espécimes de soro (*Figura 3*); a indicação do LdD para ambos os tipos de espécimes utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL é de **30,0 UI/mL (1,5 \log_{10} UI/mL)**.

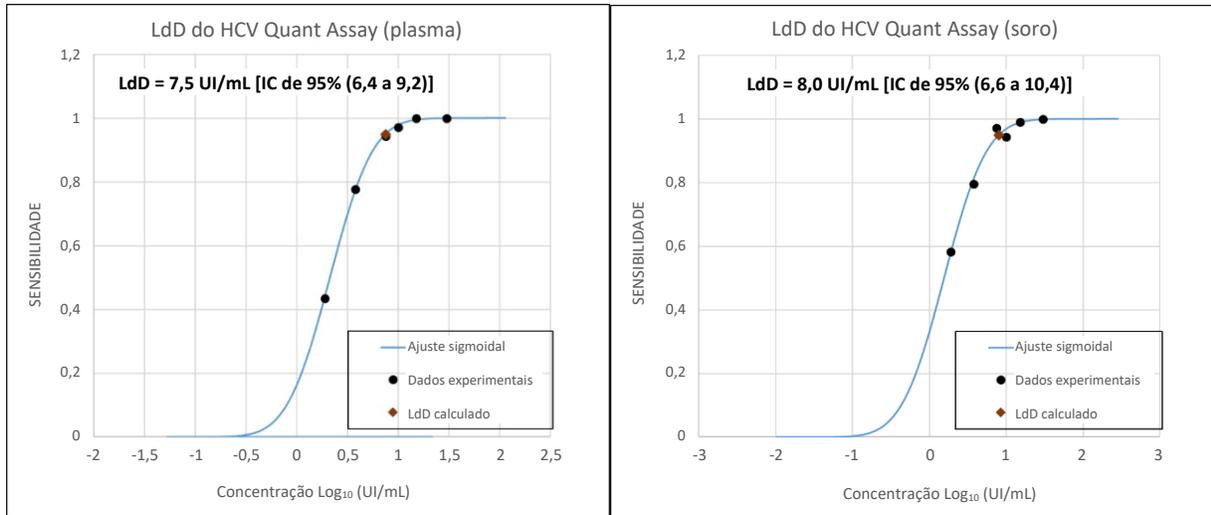


Figura 2: Análise de estilo Probit utilizada para determinar o LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay, Plasma (à esquerda) e Soro (à direita) – Fluxo de trabalho de 550 µL

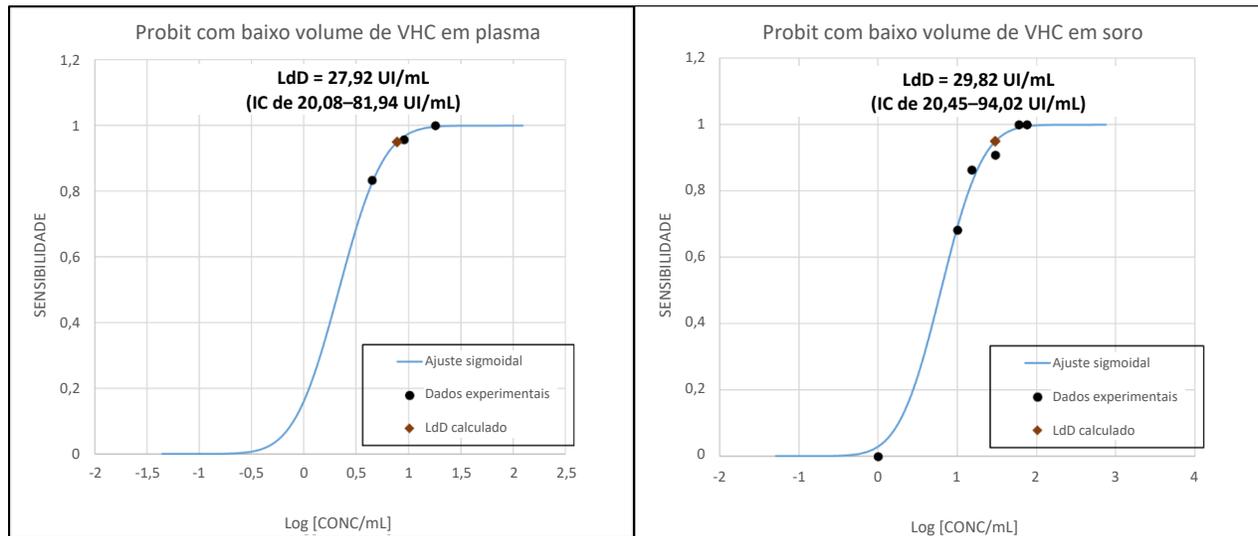


Figura 3: Análise de estilo Probit utilizada para determinar o LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay, Plasma (à esquerda) e Soro (à direita) – Fluxo de trabalho de 200 µL

Sensibilidade analítica – Limite de quantificação – Limite inferior de quantificação (LidQ) utilizando o padrão da OMS

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 ≤1,0. Para determinar o LidQ, o erro analítico total (total analytical error, TAE) foi calculado para cada um dos níveis do alvo de VHC que apresentaram uma detecção >95% como parte do cálculo do LdD. O TAE é definido da seguinte forma:

$$\text{TAE} = \text{tendência} + 2 * \text{DP} \quad \text{[Estatística Westgard]}$$

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 6 níveis de espécimes de VHC em plasma e soro testados no estudo de LidQ utilizando o genótipo 1 com o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL são apresentados na *Tabela 4*. Os resultados de testes adicionais realizados utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL são apresentados na *Tabela 5*.

Tabela 4. LidQ do NeuMoDx HCV Quant Assay com tendência e TAE – Fluxo de trabalho de 550 µL

Conc. do alvo [UI/mL]	Conc. do alvo [log ₁₀ UI/mL]	Plasma					Soro				
		Conc. média [log ₁₀ UI/mL]	Deteção (%)	DP	Tendência	TAE	Conc. média [log ₁₀ UI/mL]	Deteção (%)	DP	Tendência	TAE
30,00	1,48	1,41	100	0,32	0,07	0,71	1,39	100	0,30	0,08	0,69
15,00	1,18	1,24	100	0,36	0,06	0,79	1,23	99	0,32	0,06	0,70
10,00	1,00	1,07	97	0,35	0,07	0,77	1,14	94	0,36	0,14	0,85
7,50	0,88	1,01	94	0,44	0,13	1,02	1,12	97	0,25	0,25	1,09
3,75	0,57	1,08	78	0,43	0,51	1,38	1,17	80	0,58	0,59	1,76
1,88	0,27	1,11	44	0,36	0,83	1,55	1,11	58	0,69	0,84	2,22

Tabela 5. LidQ do NeuMoDx HCV Quant Assay com tendência e TAE – Fluxo de trabalho de 200 µL

Conc. do alvo [UI/mL]	Conc. do alvo [log ₁₀ UI/mL]	Plasma					Soro				
		Conc. média [log ₁₀ UI/mL]	Deteção (%)	DP	Tendência	TAE	Conc. média [log ₁₀ UI/mL]	Deteção (%)	DP	Tendência	TAE
75	1,88	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	1,56	100	0,23	0,32	0,78
60	1,78	1,93	100	0,39	0,15	0,93	1,56	100	0,27	0,22	0,76
30	1,48	1,35	96	0,44	0,11	0,99	1,45	91	0,41	0,03	0,85
15	1,18	1,37	77	0,42	0,18	1,03	1,36	86	0,53	0,18	1,25
10	1,00	1,26	59	0,56	0,25	1,36	1,15	68	0,53	0,15	1,21

O LidQ para o NeuMoDx HCV Quant Assay é determinado como sendo de 7,7 UI/mL (0,9 log₁₀ UI/mL) para plasma e de 8,4 UI/mL (0,9 log₁₀ UI/mL) para soro utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL; o LidQ para plasma e soro é determinado como sendo de **8,4 UI/mL (0,9 log₁₀ UI/mL)** utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL.

O LidQ para o NeuMoDx HCV Quant Assay utilizando o padrão da OMS é determinado como sendo de 30,0 UI/mL (1,5 log₁₀ UI/mL) para plasma e de 29,8 UI/mL (1,37 log₁₀ UI/mL) para soro, utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL; o LidQ para plasma e soro é determinado como sendo de **30,0 UI/mL (0,9 log₁₀ UI/mL)** utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL.

Sensibilidade analítica – LdD e LidQ entre genótipos do VHC

O LdD foi inicialmente estabelecido para o genótipo 1 (5.º padrão internacional da OMS) sendo depois realizados testes adicionais em torno do LdD estabelecido, utilizando cada um dos outros 5 genótipos. Foram testadas trinta e seis (36) réplicas em níveis correspondentes a 2X, 1X e 0,5X do limite superior do IC de 95% do LdD, utilizando o NeuMoDx HCV Quant Assay com plasma e com o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL. A taxa de percentagem positiva para cada um dos genótipos em cada um destes níveis testados foi tabelada e utilizada para calcular o LdD, utilizando uma análise de estilo Probit.

Foi também calculado o erro analítico total a estes níveis. O nível mais baixo com uma detecção positiva de 95% e o TAE calculado ≤1,0 foi novamente considerado como sendo o LidQ do genótipo. Os resultados confirmam que o NeuMoDx HCV Quant Assay teve um desempenho de detecção excelente e equivalente nos seis genótipos com um intervalo de 4,5–7,5 UI/mL, incluindo os resultados obtidos com o 5.º padrão internacional da OMS (Genótipo 1). No geral, o LdD do NeuMoDx HCV Quant Assay nos genótipos foi determinado como sendo de 7,5 UI/mL (0,88 log₁₀ UI/mL) e o LidQ foi determinado como sendo o valor mais elevado, que é 7,7 UI/mL (0,9 log₁₀ UI/mL), conforme reportado para o 5.º padrão internacional da OMS (Genótipo 1, acima). A *Tabela 6* mostra os resultados do LdD e do LidQ nos testes dos genótipos do VHC, conforme determinado em plasma.

Tabela 6. Genótipos do VHC testados em plasma usando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL

GENÓTIPO	LdD [UI/mL]	LidQ [UI/mL]
1	7,5	7,7
2	4,5	5,2
3	7,5	7,5
4	6,0	6,0
5	4,8	5,5
6	4,5	6,7

Com base no resultado dos estudos acima, o NeuMoDx indica um **LdD de 8,0 UI/mL (0,9 log₁₀ UI/mL)** e um **LidQ de 8,4 UI/mL (0,9 log₁₀ UI/mL)** para o NeuMoDx HCV Quant Assay em **plasma e soro** utilizando o **fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL**.

O **LdD** e **LldQ** indicados para o NeuMoDx HCV Quant Assay para **ambos os tipos de espécime (plasma e soro)** utilizando o **fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL é de 30,0 UI/mL (1,5 log₁₀ UI/mL)**.

Sensibilidade analítica – Linearidade e determinação do limite superior de quantificação (LSdQ)

A linearidade e o limite superior de quantificação (LSdQ) do NeuMoDx HCV Quant Assay foram estabelecidos em plasma preparando uma série de diluições com o HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX) e o AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) com rastreabilidade estabelecida de acordo com o 5.º padrão internacional da OMS. Um painel de 11 membros foi preparado em plasma negativo para VHC agrupado em pools de forma a criar um painel que abrangesse um intervalo de concentração de 8,2–1,5 log₁₀ UI/mL. O NeuMoDx HCV Quant Assay demonstrou uma capacidade de quantificar o VHC num intervalo linear de 8 log₁₀ com uma precisão de ± 0,3 log₁₀ UI/mL com base no erro-padrão calculado pelo intervalo de confiança de 95%. Nenhum benefício significativo foi obtido utilizando ajustes de regressão de 2.ª e 3.ª ordem. O LSdQ em plasma foi determinado como sendo de 8,2 log₁₀ UI/mL. Foi realizado um estudo subsequente para demonstrar a equivalência da matriz e a análise comparou os resultados quantitativos do NeuMoDx HCV para amostras preparadas em plasma e soro, utilizando dois modelos de ajuste de regressão diferentes, incluindo a ferramenta de regressão do MS Excel e Passing-Bablok. Os resultados demonstraram uma forte correlação, representada por valores de inclinação e intersecção perto de 1,00 e 0,00, respetivamente, e um valor R2 de 0,99 (ferramenta de regressão do MS Excel) ou um valor p de 0,600 (Passing-Bablok). As concentrações do ensaio HCV comunicadas pelo NeuMoDx System em comparação com os valores esperados são apresentadas na *Figura 4*.

A linearidade e o LSdQ foram avaliados com o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL. As comparações de equivalência foram efetuadas entre as concentrações comunicadas pelo NeuMoDx Software para os fluxos de trabalho de 200 µL e de 550 µL. As análises de regressão de Deming e de Passing-Bablok apresentaram uma excelente correlação e uma inclinação próxima de 1 e intercepções (tendências) mínimas das concentrações comunicadas para amostras de plasma e soro no intervalo linear. Uma comparação Bland-Altman entre a concentração comunicada para o fluxo de 200 µL de volume de espécimes e a concentração média comunicada para fluxos de trabalho de volume de espécimes de 200 µL e 550 µL apresentou uma tendência mínima, atribuindo exatidão ao algoritmo utilizado para gerar resultados para o fluxo de trabalho de 200 µL. Além disso, uma regressão linear simples comparando a concentração prevista com a concentração comunicada para o fluxo de trabalho de 200 µL teve uma inclinação próxima de 1, o que demonstra uma excelente correlação (*Figura 5*). Consideradas em conjunto, estas comparações demonstram uma quantificação exata do VHC no intervalo linear do NeuMoDx HCV Quant Assay, utilizando o fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL.

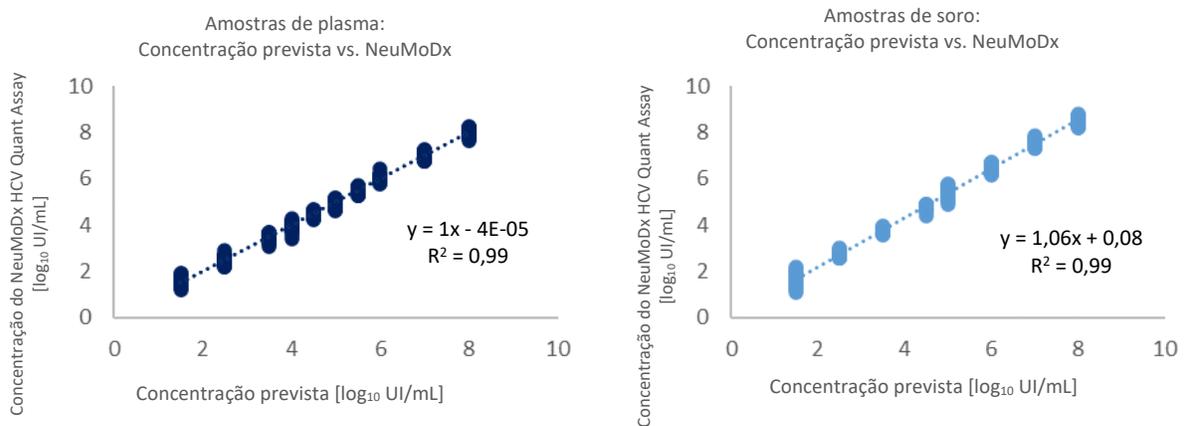


Figura 4: Intervalo linear do NeuMoDx HCV Quant Assay para Plasma (à esquerda) e Soro (à direita) – Fluxo de trabalho de 550 µL

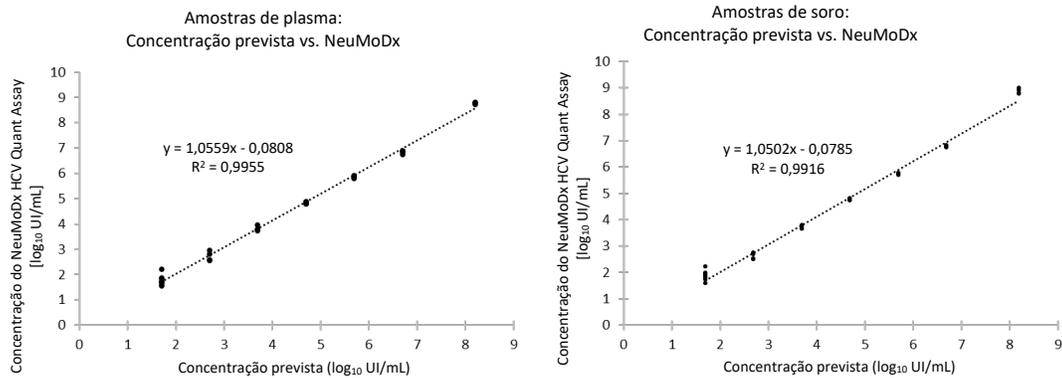


Figura 5: Intervalo linear do NeuMoDx HCV Quant Assay para Plasma (à esquerda) e Soro (à direita) – Fluxo de trabalho de 200 µL

Sensibilidade analítica – Linearidade entre genótipos

A linearidade do NeuMoDx HCV Quant Assay em seis genótipos do VHC foi caracterizada através da análise de pelo menos quatro (4) concentrações diferentes de cada genótipo do VHC, preparadas em plasma negativo para VHC agrupadas em pool. Os níveis testados dos alvos VHC utilizados neste estudo estavam dependentes da concentração do espécime original e, por este motivo, variavam entre genótipos. O estudo foi realizado com cada genótipo a utilizar 6 réplicas em cada nível. A linearidade dos seis genótipos do VHC é apresentada na *Tabela 7* e na *Figura 6*.

Tabela 7. Linearidade do NeuMoDx HCV Quant Assay entre genótipos

Genótipo	Equação de linearidade y = Quantificação do NeuMoDx HCV Assay x = Quantificação esperada	R ²
1	$y = 1,054x + 0,1325$	0,979
2	$y = 1,0792x - 0,0748$	0,985
3	$y = 1,0423x - 0,0439$	0,981
4	$y = 1,0158x + 0,0292$	0,973
5	$y = 0,9873x + 0,1524$	0,994
6	$y = 1,0393x + 0,0396$	0,997

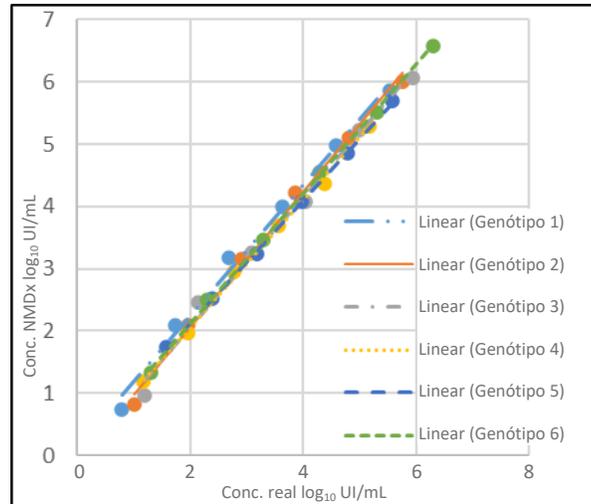


Figura 6: Linearidade do NeuMoDx HCV Quant Assay entre genótipos

Especificidade analítica – Reatividade cruzada

A especificidade analítica foi demonstrada através da análise de 33 organismos habitualmente presentes em espécimes de sangue/plasma, assim como espécies filogeneticamente semelhantes ao VHC no que diz respeito à reatividade cruzada. Os organismos foram preparados em pools de entre 4 e 6 organismos e testados a uma elevada concentração. Os organismos testados são apresentados na *Tabela 8*. Nenhuma reatividade cruzada foi observada com qualquer um dos organismos testados, confirmando uma especificidade analítica de 100% do NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabela 8. Patogénicos utilizados para demonstrar a especificidade analítica

Organismos não alvo						
Adenovírus 2	Dengue V1	Hepatite A	Vírus da imunodeficiência humana 2	Vírus T-linfotrópico humano 1	Propionibacterium acnes	Vírus do Nilo Ocidental
Adenovírus 5	Dengue V2	Hepatite B	Vírus do papiloma humano 16	Vírus T-linfotrópico humano 2	Rubéola	Febre amarela
Candida albicans	Dengue V3	Vírus do herpes simplex (VHS) 1	Vírus do papiloma humano 18	Influenza A	Encefalite de São Luís	Vírus Zika
Chlamydia trachomatis	Dengue V4	Vírus do herpes simplex (VHS) 2	Vírus herpes humano 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Citomegalovírus	Vírus Epstein-Barr	Vírus da imunodeficiência humana 1	Vírus herpes humano 8	Parvovírus B19	Staphylococcus epidermidis	

Especificidade analítica – Substâncias interferentes, organismos patogénicos

O NeuMoDx HCV 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 8*. O plasma negativo para VHC foi enriquecido com organismos agrupados em pools de 4–6 e também com controlo positivo para VHC a uma concentração de 1,4 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 HCV 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 9*. Cada uma das substâncias foi adicionada ao plasma humano analisado negativo para VHC, enriquecido com 1,7 log₁₀ UI/mL de VHC e as amostras foram analisadas em relação à interferência. Além disso, foi também testado plasma comum em estado de doença associada à infeção por hepatite C em relação a possíveis interferências. A concentração e a tendência médias de todas as substâncias testadas estão indicadas na *Tabela 10*. Nenhuma das substâncias endógenas e exógenas afetou a especificidade do NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabela 9. Teste de interferência – Agentes exógenos (classificação de medicamentos)

	Produto	Classificação		Produto	Classificação
Pool 1	Sofosbuvir	Antiviral do VHC de ação direta	Pool 2	Paritaprevir	Inibidor da protease NS3/4A do VHC
	Ledipasvir	Inibidor do VHC		Ombitasvir	Antiviral do VHC
	Velpatasvir	Inibidor de NSSA do VHC		Ritonavir	Inibidor da protease do VIH
	Clarithromicina	Antibiótico		Sulfato de abacavir	Inibidor da transcriptase reversa
	Interferão alfa-2a	Modulador imune		Ribavirina	Modulador imune
Pool 3	Grazoprevir	Inibidor da protease NS3/4A do VHC	Pool 4	Efavirenz	Inibidor da transcriptase reversa
	Elbasvir	Inibidor de NSSA do VHC		Lopinavir	Inibidor da protease
	Tenofovir disoproxil	Antiviral do VHB/VIH		Azitromicina	Antibiótico
	Lamivudina	Antiviral do VHB/VIH		Dolutegravir	Antiviral do VIH
	Valganciclovir	Antiviral do CMV		Simeprevir	Inibidor da protease NS3/4A do VHC
Pool 5	Emtricitabina	Antiviral do VIH			
	Raltegravir	Antiviral do VIH			
	Amoxicilina	Antibiótico			
	Rilpivirina	Antiviral do VIH			
	Dasabuvir	Antiviral do VHC de ação direta			
	Glecaprevir	Inibidor da protease NS3/4A do VHC			

Tabela 10. Teste de interferência – Agentes endógenos e exógenos

Endógenas	Conc. média log₁₀ UI/mL	Tendência log₁₀ UI/mL
Hemoglobina	1,61	0,28
Triglicéridos	1,31	-0,02
Bilirrubina	1,47	0,14
Albumina	1,47	0,14
Exógenos (medicamentos)	Conc. média log₁₀ UI/mL	Tendência log₁₀ UI/mL
Pool 1: Zidovudina (ZDV), Saquinavir, Ritonavir, Claritromicina, Interferão alfa-2a, Interferão alfa-2b	1,48	0,15
Pool 2: Sulfato de abacavir, Amprenavir, Ribavirina, Entecavir, Fluoxetina, Cloridrato de valaciclovir	1,40	0,07
Pool 3: Tenofovir disoproxil, Lamivudina, Ganciclovir, Valganciclovir, Nevirapina	1,40	0,07
Pool 4: Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtida, Ciprofloxacina, Paroxetina,	1,51	0,18
Pool 5: Adefovir (dipivoxil), Azitromicina, Sulfato de indinavir, Sertalina	1,40	0,07
Estado de doença	Conc. média log₁₀ UI/mL	Tendência log₁₀ UI/mL
Anticorpo antinuclear (ANA)	1,53	0,18
Lúpus eritematoso sistêmico (LES)	1,29	-0,06
Artrite reumatoide	1,39	0,04
Anticorpos VHB	1,45	0,10
Cirrose hepática	1,43	0,08
Fator reumatoide	1,43	0,08
Esteatose hepática não alcoólica (EHNA)	1,32	-0,03

Precisão intralaboratorial

A precisão do NeuMoDx HCV Quant Assay foi determinada testando um painel de 7 membros de espécimes de VHC preparados (integrando o HCV Armored RNA e o AcroMetrix HCV Control) em três NeuMoDx Systems ao longo de 12 dias. Foram caracterizadas as precisões intraensaio, intradiária e intrassistema, e o desvio-padrão geral foi determinado como sendo $\leq 0,26 \log_{10}$ UI/mL. Nenhuma diferença significativa foi observada no desempenho entre sistemas, dias ou processamentos, tal como apresentado na *Tabela 11*. 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 11. Precisão intralaboratorial – NeuMoDx HCV Quant Assay nos NeuMoDx Systems

	Conc. do alvo [log ₁₀ UI/mL]	Conc. média [log ₁₀ UI/mL]	DP intrassistema	DP intradiário	DP intraensaio	DP intralaboratorial (geral)
ARMORED	6	5,95	0,17	0,13	0,10	0,17
	5	4,87	0,20	0,14	0,12	0,20
	3	2,89	0,19	0,17	0,17	0,19
ACROMETRIX	4,4	4,45	0,12	0,10	0,08	0,13
	3,4	3,45	0,12	0,12	0,11	0,13
	2,4	2,41	0,17	0,15	0,15	0,17
	1,4	1,40	0,26	0,25	0,25	0,24

Reprodutibilidade lote a lote

A reprodutibilidade lote a lote do NeuMoDx HCV Quant Assay foi determinada utilizando três lotes diferentes dos principais reagentes: NeuMoDx Lysis Buffer 3, NeuMoDx Extraction Plates e NeuMoDx HCV Quant Test Strips. Foi utilizado um painel de 7 membros do VHC (integrando o HCV Armored RNA e o AcroMetrix HCV 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 12*. A tendência geral máxima foi de $0,24 \log_{10}$ UI/mL e o DP geral máximo foi de $0,33 \log_{10}$ UI/mL. Nenhuma diferença significativa foi observada no desempenho entre lotes, uma vez que a quantificação de todos os membros do painel se encontrava dentro da especificação de tolerância.

Tabela 12. Reprodutibilidade lote a lote – NeuMoDx HCV Quant Assay

	Conc. do alvo [log ₁₀ UI/mL]	Conc. média GERAL [log ₁₀ UI/mL]	n (Resultados válidos por lote)	TENDÊNCIA ABS.	DP entre lotes	DP intralote	DP geral
ARMORED	6	5,76	36	0,24	0,35	0,13	0,37
	5	4,84	36	0,16	0,16	0,22	0,27
	3	2,81	36	0,19	0,31	0,16	0,35
ACROMETRIX	4,4	4,35	36	0,05	0,21	0,11	0,24
	3,4	3,31	36	0,09	0,17	0,11	0,20
	2,4	2,33	36	0,07	0,24	0,13	0,27
	1,4	1,38	36	0,02	0,23	0,13	0,33

Eficácia do controle

O SPC2 está incluído no NeuMoDx HCV 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 ($3 \log_{10}$ UI/mL) e negativos foram contestados na presença de um controlo nas seguintes condições: presença do inibidor, sem fornecimento do reagente de lavagem e sem expulsão da solução de lavagem. As ineficácias do processo que tiveram um efeito adverso na detecção/quantificação de VHC foram refletidas pelo desempenho do alvo de SPC2, tal como apresentado na *Tabela 13*. 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 detecção do SPC2, quer na detecção e quantificação do VHC. Por este motivo, o SPC2 demonstrou ser bem-sucedido na monitorização eficaz do desempenho do ensaio no NeuMoDx System.

Tabela 13. Eficácia do controle de processo de amostra

Falha do passo do processo testada	Estado de amplificação do controle de processo de amostra	Estado de amplificação do alvo do VHC	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 0.3 Log ₁₀ IU/mL of Control (Positivo com quantificação dentro de 0,3 Log ₁₀ UI/mL do controle)

Taxa de resultados válidos

Foi utilizada uma análise retrospectiva dos dados obtidos durante a avaliação do desempenho do NeuMoDx HCV Quant Assay nos NeuMoDx Systems para determinar a percentagem de resultados válidos. Os resultados válidos dos testes serão apresentados como Positive (Positivo) ou Negative (Negativo). Os resultados inválidos dos testes poderão ser apresentados como Indeterminate (Indeterminado, IND) ou Unresolved (Não resolvido, UNR) com base no estado de amplificação do alvo e do controle de processo de amostra. Um resultado IND é geralmente causado por um erro do instrumento que origina uma falha do alvo e/ou do controle de processo interno a amplificar. Um resultado UNR é atribuído a amostras quando o alvo e o controle de processo interno falham na amplificação e não há uma falha do instrumento detetada. Foram incluídos 1962 resultados individuais do NeuMoDx HCV Quant Assay na análise retrospectiva, que incluíram dados obtidos dos espécimes de soro e plasma no NeuMoDx 288 System e no NeuMoDx 96 System. A taxa de UNR foi determinada como sendo de 0,61% (12/1962) e a taxa de IND foi determinada como sendo de 0,41% (8/1962), cumprindo os critérios de aceitação da análise. Assim, a taxa de resultados válidos do NeuMoDx HCV Quant Assay nas matrizes clínicas e nos NeuMoDx Systems foi concluída como sendo de 99,0% com um IC de 95% (98,4 a 99,3).

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada do NeuMoDx HCV Quant Assay foi determinada testando três conjuntos de espécimes de VHC, contendo espécimes alternados altamente positivos e negativos. No total, isto envolveu a análise de 144 réplicas de espécimes humanos negativos para VHC e 144 réplicas de espécimes de elevada titulação de VHC a 8,2 log₁₀ UI/mL. Todas as 144 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 etilenodiaminotetracético (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), assim como entre espécimes de soro recém-colhidos e congelados. Os espécimes recém-colhidos foram mantidos a 4 °C até serem enriquecidos com quatro níveis de VHC 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 soro e plasma recém-colhidos vs. congelados e os 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, entre espécimes de plasma recém-colhidos e congelados e entre espécimes de soro recém-colhidos e congelados.

Foram realizados testes adicionais para demonstrar a equivalência do desempenho do NeuMoDx HCV Quant Assay em espécimes primários vs. espécimes secundários. Primeiro, foram processados painéis de espécimes de dadores negativos quanto a VHC enriquecidos com alvo VHC (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) e painéis de espécimes de dadores positivos quanto a VHC a partir dos tubos de espécime primários. Após o processamento dos tubos primários, o plasma ou o soro restante de cada espécime foi separado em alíquotas para um tubo de espécime secundário e novamente processado. Não foi observada qualquer diferença significativa nos resultados comunicados entre o processamento dos tubos de espécimes primários e secundários.

Comparação do método clínico

O desempenho qualitativo e quantitativo do NeuMoDx HCV Quant Assay foi avaliado em comparação com ensaios comparativos aprovados pela FDA/CE, testando espécimes clínicos não diluídos de pacientes infetados com VHC. O teste foi realizado internamente na NeuMoDx através de um estudo cego único de espécimes residuais clínicos anonimizados, obtidos de seis laboratórios externos de referência. Foi processado um total de 323 espécimes de plasma e 336 espécimes de soro, utilizando o NeuMoDx HCV Quant Assay de forma cega (única) em vários NeuMoDx Molecular Systems. De entre estas amostras, 35 amostras de plasma e 13 amostras de soro foram processadas TANTO no NeuMoDx 288 Molecular System COMO no NeuMoDx 96 Molecular System. Algumas das amostras que apresentaram um resultado INVALID (INVÁLIDO) não puderam ser novamente processadas devido à falta de disponibilidade de amostras suficientes.

Os erros de processamento e de sistema obtidos nos NeuMoDx Molecular Systems foram mínimos e cumpriram os critérios. Foi inicialmente obtido um total de 4 resultados INDETERMINATE (INDETERMINADOS) (IND) para as amostras de plasma e 4 resultados IND para as amostras de soro, o que resultou numa taxa inicial geral IND de 1% (IC de 95% de 0,5–3%) para plasma e 1% (IC de 95% de 0,4–3%) para soro. Foi inicialmente obtido um total de 3 resultados UNRESOLVED (NÃO RESOLVIDOS) (UNR) para as amostras de plasma e 5 UNR para as amostras de soro, o que produziu uma taxa geral de 1% (IC de 95% de 0,2–3%) para plasma e 1% (IC de 95% de 0,6–4%) para soro.

Os espécimes que apresentaram resultados inválidos (IND/UNR) ou um "Quantitation Error" (Erro de quantificação) foram novamente testados quando restava um volume suficiente; em algumas amostras, foi adicionado um passo de diluição de forma a produzir resultados válidos. Foi obtido um resultado válido dos 13 espécimes com volume suficiente para serem repetidos (diluídos OU puros).

Dos 321 resultados válidos obtidos para espécimes de plasma e 334 resultados válidos obtidos para amostras de soro, 206 amostras de plasma e 154 amostras de soro foram declaradas como POSITIVE (Positivas) pelo NeuMoDx HCV Quant Assay, com os valores de concentração correspondentes atribuídos pelos testes de referência. 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 HCV Quant Assay e os valores foram reportados pelos testes de referência para amostras de soro e plasma.

Foram criados gráficos de equivalência para representar a correlação entre as concentrações do NeuMoDx HCV 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 de Passing-Bablok, sendo apresentados na *Figura 7* e na *Figura 8*. A qualidade do ajuste de regressão de Deming é ilustrada pelo coeficiente de inclinação de 1,00 com um IC de 95% (0,97 a 1,03) e uma intersecção (tendência) de -0,16 com um IC de 95% (-0,37 a 0,06), demonstrando que os resultados de concentração obtidos entre o NeuMoDx HCV 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 1,02 com um IC de 95% (0,99 a 1,05) e uma intersecção (tendência) de -0,28 com um IC de 95% (-0,43 a -0,14), demonstrando que os resultados de concentração obtidos entre o NeuMoDx HCV Quant Assay e os testes de referência estão altamente correlacionados e possuem uma tendência aceitável, tal como apresentado na *Tabela 14*.

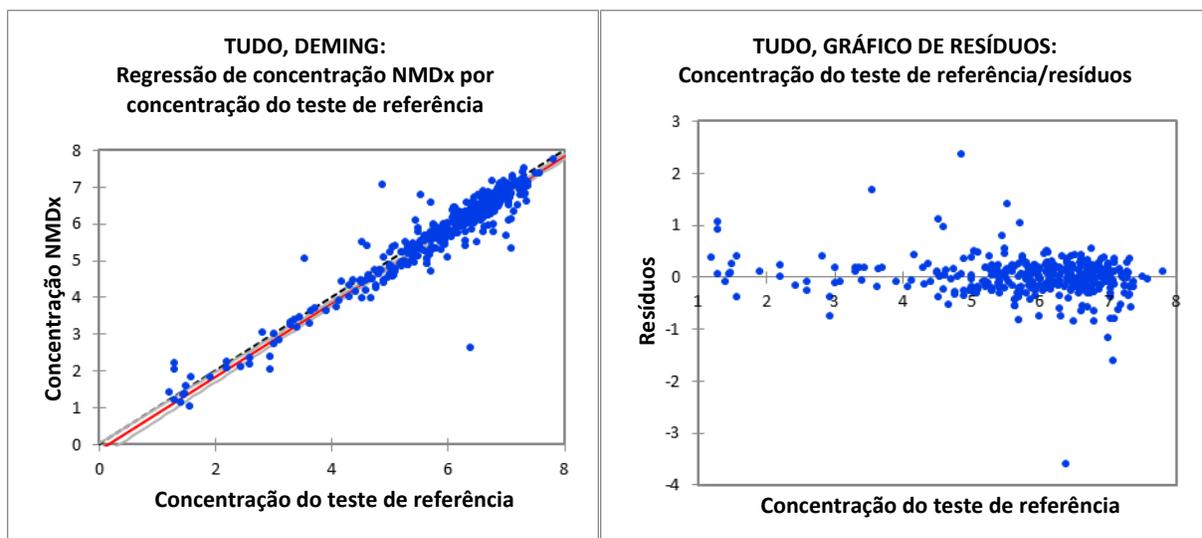


Figura 7: Gráficos de equivalência (à esquerda) e resíduos (à direita) – Análise cumulativa (em ambos os NeuMoDx Systems) dos resultados do NeuMoDx HCV Quant Assay em comparação com os resultados do teste de referência para TODAS as amostras, com base na análise de regressão de Deming.

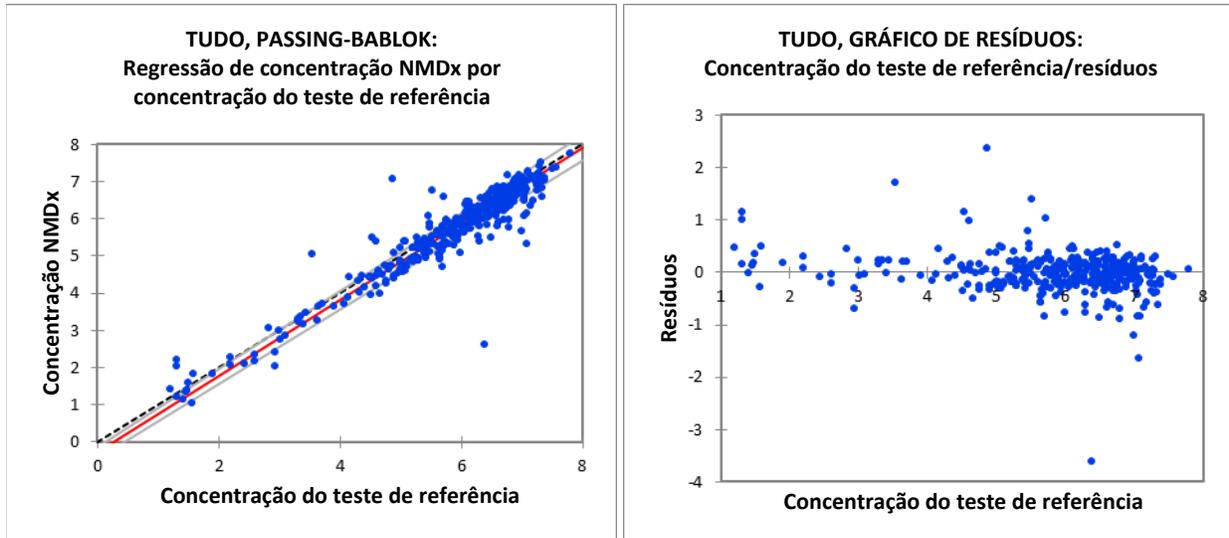


Figura 8: Gráficos de equivalência (à esquerda) e resíduos (à direita) – Análise cumulativa (em ambos os NeuMoDx Systems) dos resultados do NeuMoDx HCV Quant Assay em comparação com os resultados do teste de referência para TODAS as amostras, com base na análise de regressão de Passing-Bablok.

Tabela 14. 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
CUMULATIVO (Tudo Plasma + Soro)	-0,16 IC de 95% (-0,37, 0,06)	1,00 IC de 95% (0,97, 1,03)	-0,28 IC de 95% (-0,43, -0,14)	1,02 IC de 95% (0,99, 1,05)

Dos 655 resultados válidos obtidos de espécimes de plasma e soro utilizando o NeuMoDx HCV Quant Assay, 361 foram declarados como positivos pelos testes de referência para o VHC e 294 foram declarados como negativos. A sensibilidade e a especificidade do NeuMoDx HCV Quant Assay foram calculadas utilizando os dados de todas as amostras clínicas válidas em relação ao teste de referência e são compiladas e apresentadas na Tabela 15. Das 361 amostras positivas testadas, 360 foram também declaradas como positivas pelo NeuMoDx HCV Quant Assay, demonstrando uma sensibilidade de 99,7% com um IC de 95% (98,2% a 100%). Das 294 amostras negativas testadas, 271 foram também declaradas como negativas pelo NeuMoDx HCV Quant Assay, demonstrando uma especificidade de 92,2% com um IC de 95% (88,3% a 94,9%).

A equivalência do NeuMoDx HCV Quant Assay foi demonstrada através de resultados altamente correlacionados do desempenho do ensaio entre o NeuMoDx 288 Molecular System, o NeuMoDx 96 Molecular System e os testes de referência para espécimes de soro e plasma.

Tabela 15. Resultados da comparação do método qualitativo para o NeuMoDx HCV Quant Assay em comparação com os testes de referência – Plasma e Soro

	Ensaio de referência (POS)	Ensaio de referência (NEG)	TOTAL
NeuMoDx HCV Quant Assay (POS)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
TOTAL	361	294	655
SENSIBILIDADE = 99,7% IC de 95% (98,2–100%) *ESPECIFICIDADE = 92,2% IC de 95% (88,3–94,9%)			

***NOTA:** *O LidQ do NeuMoDx HCV Quant Assay é de 0,9 Log₁₀ UI/mL, menor do que o ensaio comparativo utilizado como teste de referência. Uma análise subsequente foi realizada excluindo 9 amostras onde o VHC foi detetado pela NeuMoDx, mas reportado como negativo pelo ensaio comparativo. À exceção destas 9 amostras, a especificidade do NeuMoDx HCV Quant Assay foi recalculada como sendo de 95,1% com um IC de 95% (91,7 a 97,2).*

Teste de espécimes artificiais – fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL

A correlação quantitativa entre fluxos de trabalho de volume de espécimes de 200 µL e 550 µL foi confirmada utilizando um painel constituído por amostras individuais de soro e plasma negativas para VHC enriquecidas com quatro níveis conhecidos de material Accuplex HCV Control, rastreável de acordo com o 5.º padrão internacional da OMS para testes de ácido nucleico de ARN de VHC. Estes espécimes individuais de soro e plasma foram processados utilizando fluxos de trabalho de volume de espécime de 200 µL e 550 µL num total de 324 testes efetuados. As comparações de equivalência entre a concentração comunicada pelo software do NeuMoDx para fluxos de trabalho de volume de espécimes de 200 µL e 550 µL com o painel artificial foram efetuadas numa base individual de amostras. As análises de regressão de Deming e de Passing-Bablok tiveram uma inclinação de 1,003 e 1,000 com intersecções de -0,082 e -0,085, respetivamente em plasma, e 0,974 e 0,984 com intersecções de 0,086 e 0,037, respetivamente em soro, o que demonstra uma excelente concordância das quantificações de VHC entre os dois fluxos de trabalho de volume de processamento. Uma comparação Bland-Altman apresentou uma tendência mínima entre os dois fluxos de trabalho. Além disso, análises de regressão linear simples com concentração prevista e concentração comunicada para fluxos de trabalho de 200 µL tiveram uma inclinação de 1,0432 e um coeficiente de correlação de 0,994 (plasma) e de 1,0007 e 0,993 (soro), reforçando o excelente desempenho do NeuMoDx HCV Quant Assay em fluxos de trabalho de volume de espécimes de 200 µL. Os resultados destes estudos estão resumidos abaixo na *Figura 9* e na *Figura 10*.

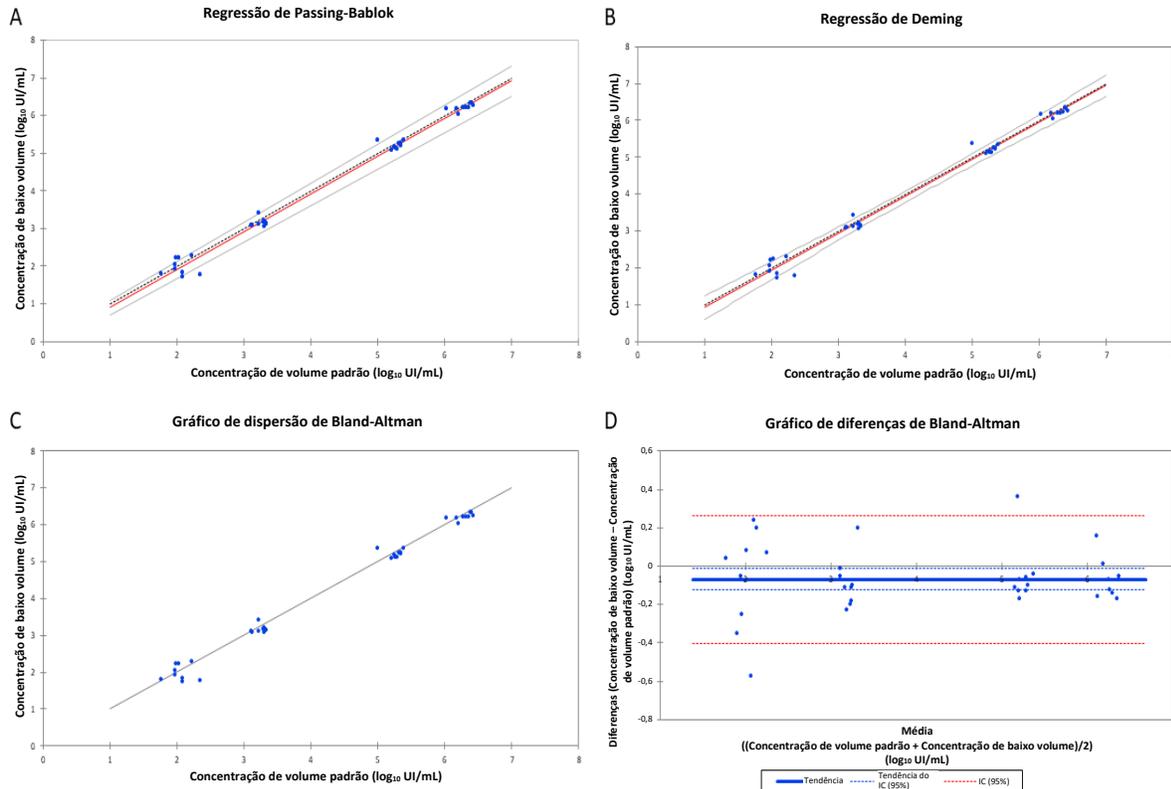


Figura 9: Comparações do gráfico de equivalências das concentrações comunicadas do fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL com as concentrações comunicadas do fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL. A) Regressão de Passing-Bablok. B) Regressão de Deming. C) Gráfico de dispersão de Bland-Altman D) Gráfico de diferenças de Bland-Altman – Espécimes de plasma

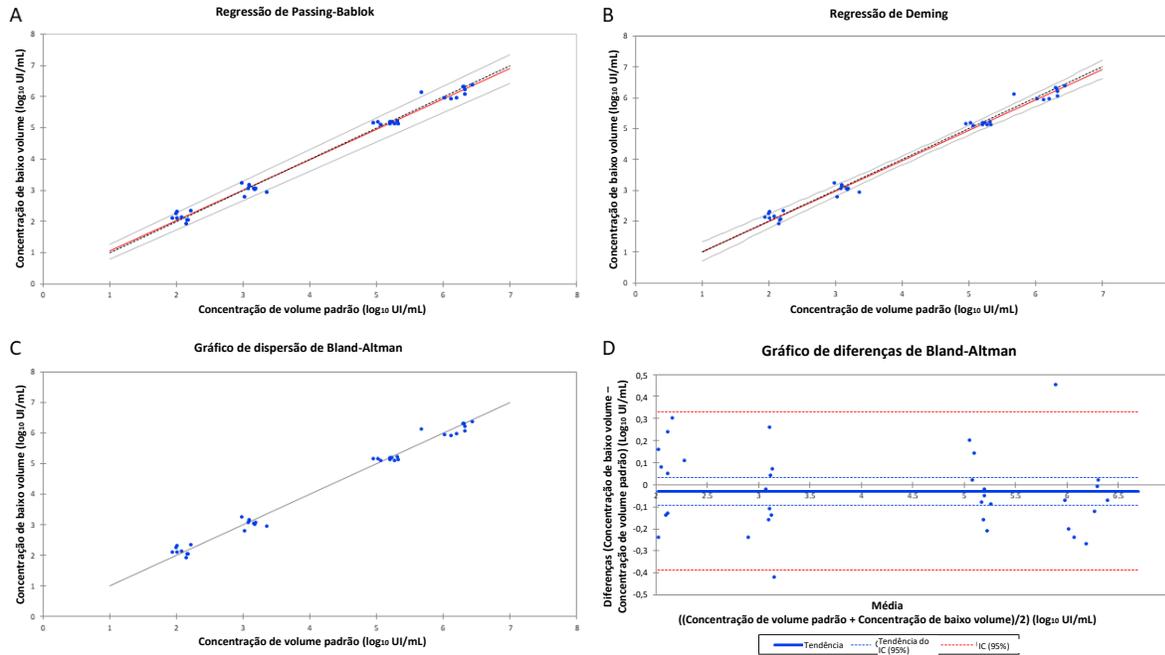


Figura 10: Comparações do gráfico de equivalências das concentrações comunicadas do fluxo de trabalho de volume de espécimes de 200 µL com as concentrações comunicadas do fluxo de trabalho de volume de espécimes de 550 µL. A) Regressão de Passing-Bablok. B) Regressão de Deming. C) Gráfico de dispersão de Bland-Altman D) Gráfico de diferenças de Bland-Altman – Espécimes de soro

REFERÊNCIAS

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

MARCAS COMERCIAIS

NeuMoDx™ e NeuDry™ são marcas comerciais da NeuMoDx Molecular, Inc.
 AcroMatrix™ é uma marca comercial da Thermo Fisher Scientific.
 Armored RNA® é uma marca comercial registrada da Asuragen, Inc.
 BD Vacutainer® é uma marca comercial registrada da Becton, Dickinson and Company
 BD, PPT™ e SST™ são marcas comerciais da Becton, Dickinson and Company
 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.

SÍMBOLO

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