

REF 300300 NeuMoDx™ HCV Quant Test Strip**R only**

PRECAUCIÓN: Para exportaciones de EE. UU. exclusivamente

IVD Para uso diagnóstico *in vitro* con el NeuMoDx 288 y el NeuMoDx 96 Molecular System*Para ver actualizaciones en los folletos adjuntos, vaya a: www.qiagen.com/neumodx-ifu**Para obtener instrucciones detalladas, consulte el Manual del operador del NeuMoDx 288 Molecular System; ref. 40600108**Para obtener instrucciones detalladas, consulte el Manual del operador del NeuMoDx 96 Molecular System; ref. 40600317***USO PREVISTO**

El NeuMoDx HCV Quant Assay es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* automatizada para la cuantificación del ARN del virus de la hepatitis C (HCV) en muestras de plasma y suero humano para los genotipos positivos del 1 al 6 del anticuerpo contra HCV en personas infectadas por HCV. El NeuMoDx HCV Quant Assay implementado en el NeuMoDx 288 Molecular System y en el NeuMoDx 96 Molecular System (NeuMoDx Systems) incorpora la extracción automatizada de ARN para aislar el ácido nucleico diana de la muestra y la reacción en cadena de la polimerasa inmediata con transcriptasa inversa (RT-RPC) para tratar las secuencias altamente conservadas en el genoma del virus de la hepatitis C.

El NeuMoDx HCV Quant Assay está diseñado para utilizarse como ayuda en el tratamiento de pacientes con infecciones por HCV. Los resultados del NeuMoDx HCV Quant Assay se deben interpretar en el contexto de todos los hallazgos de laboratorio y clínicos relevantes. El NeuMoDx HCV Quant Assay no está diseñado para su uso como prueba de detección en sangre o en hemoderivados ni para diagnosticar el estado clínico de la infección por HCV.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La sangre completa humana extraída en tubos estériles de recogida de sangre que contienen ácido etilendiaminetetracético (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) o solución con ácido cítrico, citrato sódico y glucosa (Acid Citrate-Dextrose, ACD) como anticoagulantes, o en tubos de preparación de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT), se puede utilizar para la preparación del plasma; mientras que el suero se debe recoger en tubos de suero o tubos de separación de suero (Serum Separation Tubes, SST). Para preparar el análisis, el plasma o el suero recogido en un tubo de muestras secundario o la sangre fraccionada recogida en un tubo de muestras primario compatibles con el NeuMoDx System se carga en el NeuMoDx System mediante un soporte de tubos de muestras compatible. Para cada muestra, se mezcla una alícuota de muestra de plasma/suero con el NeuMoDx Lysis Buffer 3 y el NeuMoDx System realiza automáticamente todos los pasos necesarios para extraer el ácido nucleico diana, preparar el ARN aislado para la amplificación mediante RT-RPC inmediata y, si corresponde, amplificar y detectar los productos de la amplificación. El NeuMoDx HCV Quant Assay actúa en dos regiones altamente conservadas del genoma del HCV para aumentar la solidez del ensayo. El NeuMoDx HCV Quant Assay también incluye un control de proceso de muestras (Sample Process Control, SPC2) de ARN para ayudar a supervisar la presencia de posibles sustancias inhibitoras, así como los fallos de los reactivos o del NeuMoDx System que pueden encontrarse durante los procesos de extracción y amplificación.

El HCV es virus ARN monocatenario positivo capaz de ocasionar infecciones agudas y crónicas.¹ Actualmente no existe ninguna vacuna contra la hepatitis C. Aunque la infección aguda suele ser asintomática y en pocos casos se asocia con enfermedades potencialmente mortales, en más de la mitad de las personas infectadas por el HCV se desarrolla infección crónica. De esas personas con infección crónica por el HCV, el riesgo de cirrosis hepática es del 15-30 % en un periodo de 20 años. Se sospecha que en el mundo hay cerca de 71 millones de personas con infección crónica por el HCV, de las cuales se prevé que gran parte contraerá cirrosis hepática o cáncer hepático.²⁻⁴ Por ser un virus de transmisión hemática, el HCV se ha transmitido principalmente a través de la sangre o de hemoderivados. La adopción generalizada de pruebas de análisis de sangre ha reducido en gran medida las infecciones de sangre donada.¹

La detección de anticuerpos contra el HCV no diferencia entre infecciones activas y eliminadas. Como consecuencia, es necesario que los algoritmos de los laboratorios para el análisis del HCV realicen el diagnóstico de infecciones activas por el HCV en sujetos con anticuerpos positivos anti-HCV mediante la detección de ARN del HCV en plasma o suero antes de iniciar la terapia (si es necesario). En la actualidad, la cuantificación del ARN del HCV (carga vírica) se utiliza de manera sistemática para establecer y supervisar un tratamiento satisfactorio contra el HCV.

Las directrices actuales para la gestión y el tratamiento de infecciones por el HCV recomiendan realizar pruebas cuantitativas del ARN del HCV antes de iniciar la terapia antivírica a fin de establecer unos valores de línea base, y a las 12 semanas o después de terminar el tratamiento. En ocasiones se recomiendan puntos temporales adicionales. La finalidad del tratamiento contra el HCV es obtener una respuesta vírica sostenida (Sustained Virologic Response, SVR), la cual se define como una concentración de ARN del HCV indetectable (con un ensayo que tiene un límite de detección <25 UI/ml) después del tratamiento.⁵⁻⁷ Las directrices recientes de la American Association for the Study of Liver Diseases sugieren realizar el análisis de ARN del HCV no solo en la valoración de línea base, sino también periódicamente durante el tratamiento (por ejemplo, cada 4 semanas) y a las 12 semanas luego de terminar el tratamiento. Para identificar una infección activa por el HCV se usan pruebas para detectar el ARN del HCV en combinación con pruebas serológicas.⁶

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El NeuMoDx HCV Quant Assay combina la extracción automatizada de ARN, la amplificación y la detección mediante RT-RPC inmediata. Se recogen muestras de sangre completa en tubos con EDTA o con ACD, o en tubos PPT para la preparación del plasma y/o en tubos SST para la preparación del suero. Se etiqueta la muestra de sangre primaria (fraccionada), o una alícuota de plasma/suero recogida en un tubo de muestras secundario compatible, con un código de barras y se coloca en el NeuMoDx System. El NeuMoDx System aspira automáticamente una alícuota del plasma/suero para mezclarla con el NeuMoDx Lysis Buffer 3 y los agentes que contiene la NeuMoDx Extraction Plate para empezar el procesamiento. El NeuMoDx System automatiza e integra la extracción y la concentración de ARN, la preparación de los reactivos, y la amplificación y la detección del ácido nucleico de las secuencias del analito mediante RT-RPC inmediata. El control de proceso de muestras (Sample Process Control, SPC2) incluido ayuda a supervisar la presencia de posibles sustancias inhibitoras, así como los fallos de los reactivos, del proceso o del sistema. No es necesaria la intervención del operador una vez cargada la muestra en el NeuMoDx System.

El NeuMoDx System utiliza una combinación de calor, enzimas líticas y reactivos de extracción para realizar automáticamente la lisis, la extracción del ARN y la eliminación de inhibidores. Las partículas paramagnéticas capturan los ácidos nucleicos liberados. Las partículas, con ácido nucleico unido, se cargan en el NeuMoDx Cartridge donde los elementos no unidos se eliminan con el NeuMoDx Wash Reagent. A continuación, el ARN unido se eluye utilizando el NeuMoDx Release Reagent. El NeuMoDx System utiliza el ARN eluido para rehidratar los reactivos de amplificación NeuDry™ patentados que contienen todos los elementos necesarios para la amplificación de los analitos de HCV y SPC2. Esto permite la amplificación y la detección simultáneas tanto del analito como de las secuencias de ARN de control. Tras la reconstitución de los reactivos secos de la RPC con retrotranscriptasa, el NeuMoDx System dispensa la mezcla preparada para la RT-RPC en una cámara de RPC (por muestra) del NeuMoDx Cartridge. La transcripción inversa, la amplificación y la detección de las secuencias del analito y de control (si están presentes) tienen lugar en la cámara de RCP. El NeuMoDx Cartridge está diseñado para contener el amplicón tras la RCP, eliminando prácticamente el riesgo de contaminación después de la amplificación.

Los analitos amplificados se detectan en tiempo real utilizando productos químicos de sonda de hidrólisis (frecuentemente denominados productos químicos TaqMan®) con moléculas de sonda de oligonucleótidos fluorógenos específicas de los amplicones para sus respectivos analitos. Las sondas TaqMan constan de un fluorocromo unido covalentemente al extremo 5' de la sonda de oligonucleótidos y un supresor de la señal en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, el fluorocromo y el supresor de la señal están cerca, permitiendo que la molécula supresora de la señal extinga la fluorescencia que emite el fluorocromo mediante la transferencia de energía de resonancia de Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Las sondas TaqMan están diseñadas para hibridarse en una región de ADN amplificada por un conjunto específico de cebadores. A medida que la polimerasa de ADN Taq extiende el cebador y sintetiza la nueva hebra, la actividad de la exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa de ADN Taq degrada la sonda que se ha hibridado con la plantilla. La degradación de la sonda libera el fluorocromo y rompe su proximidad con el supresor de la señal, por lo que se vence el efecto supresor debido a la FRET y se permite la detección del fluorocromo. La señal fluorescente resultante detectada en el termociclador de RT-RPC cuantitativa del NeuMoDx System es directamente proporcional al fluorocromo liberado y se puede correlacionar con la cantidad de analito presente.

Se utiliza una sonda TaqMan marcada con un fluorocromo (excitación: 490 nm y emisión: 521 nm) en el extremo 5' y un supresor de la señal oscuro en el extremo 3' para detectar el ARN del HCV. Para detectar el SPC2, la sonda TaqMan está marcada con un colorante fluorescente alternativo (excitación: 535 nm y emisión: 556 nm) en el extremo 5' y un supresor de la señal oscuro en el extremo 3'. El software del NeuMoDx System supervisa la señal fluorescente que emiten las sondas TaqMan al final de cada ciclo de amplificación. Una vez finalizada la amplificación, el software del NeuMoDx System analiza los datos y genera un informe final del resultado (POSITIVE [Positivo], NEGATIVE [Negativo], INDETERMINATE [Indeterminado], UNRESOLVED [No resuelto], NO RESULT [Sin resultado]). Si un resultado es positivo y la concentración calculada está dentro de los límites de la cuantificación, el software del NeuMoDx System también proporciona un valor cuantitativo asociado a la muestra.

REACTIVOS/CONSUMIBLES

Materiales suministrados

REF	Contenido	Unidades por paquete	Pruebas por unidad	Pruebas por paquete
300300	NeuMoDx HCV Quant Test Strip <i>Reactivos secos de la RCP con retrotranscriptasa que contienen cebadores y sondas TaqMan específicos para HCV y SPC2</i>	6	16	96

Materiales necesarios pero no suministrados (disponibles por separado en NeuMoDx)

REF	Contenido
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Partículas paramagnéticas, enzima lítica y controles de proceso de muestras secas</i>
800200 o 800202	NeuMoDx HCV Calibrators <i>Conjuntos de calibradores altos y bajos de HCV de un solo uso para establecer la validez de la curva de calibración</i>
900201 o 900202	NeuMoDx HCV External Controls <i>Conjuntos de controles positivos y negativos de HCV de un solo uso</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Puntas Hamilton CO-RE/CO-RE II (300 µl) con filtros
235905	Puntas Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µl) con filtros

Instrumentos necesarios

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



PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- La NeuMoDx HCV Quant Test Strip es para uso diagnóstico *in vitro* con los NeuMoDx Systems exclusivamente.
- No utilice los reactivos o consumibles después de la fecha de caducidad indicada.
- No utilice los reactivos si el sello de seguridad está roto o si el embalaje está dañado en el momento de su recepción.
- No utilice consumibles o reactivos si la bolsa protectora está abierta o rota en el momento de su recepción.
- Debe haber una calibración de prueba válida (generada mediante el procesamiento de calibradores altos y bajos de los NeuMoDx HCV Calibrators) para que puedan generarse resultados de la prueba para muestras clínicas.
- Los NeuMoDx HCV External Controls se deben procesar cada 24 horas a lo largo del análisis con el NeuMoDx HCV Quant Assay.
- El volumen mínimo de la muestra de las alícuotas secundarias depende del tamaño del tubo, del soporte del tubo de muestras y del procesamiento del volumen de la muestra tal y como se define a continuación. Un volumen por debajo del valor mínimo especificado podría dar lugar al error "Quantity Not Sufficient" (Cantidad no suficiente).
- El uso de muestras almacenadas a temperaturas inadecuadas o más allá de los tiempos de almacenamiento especificados puede producir resultados erróneos o no válidos.
- Evite en todo momento la contaminación de todos los reactivos y consumibles con microbios y ribonucleasa. Se recomienda el uso de pipetas de transferencia estériles y desechables sin ribonucleasa cuando se utilizan tubos de muestras secundarios. Utilice una pipeta nueva para cada muestra.
- Para evitar la contaminación, no manipule ni separe los NeuMoDx Cartridge después de la amplificación. No recupere los NeuMoDx Cartridges del contenedor para desechos con riesgo biológico (NeuMoDx 288 Molecular System) ni del recipiente para desechos con riesgo biológico (NeuMoDx 96 Molecular System) bajo ninguna circunstancia. El NeuMoDx Cartridge está diseñado para evitar la contaminación.
- En caso de que el laboratorio también realice pruebas de la RCP con el tubo abierto, debe prestarse atención para garantizar que la NeuMoDx HCV Quant Test Strip, los consumibles y reactivos adicionales necesarios para las pruebas, el equipo de protección individual como los guantes y las batas de laboratorio y el NeuMoDx System no estén contaminados.
- Se deben llevar guantes limpios de nitrilo sin talco al manipular los reactivos y consumibles NeuMoDx. Se debe tener cuidado de no tocar la superficie superior del NeuMoDx Cartridge, la superficie del sello metálico de la NeuMoDx HCV Quant Test Strip o de la NeuMoDx Extraction Plate, o la superficie superior del NeuMoDx Lysis Buffer 3; para manipular los consumibles y los reactivos, solo se deben tocar superficies laterales.
- Se proporcionan las fichas de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) de cada reactivo (según proceda) en www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Lavarse bien las manos después de realizar la prueba.
- No pipetear con la boca. No fumar, beber ni comer en zonas en las que se estén manipulando las muestras o los reactivos.
- Manipule siempre las muestras como material infeccioso y de acuerdo con los procedimientos seguros de laboratorio, como los que se describen en *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁸ y en el documento M29-A4 del CLSI.⁹
- Eliminar los reactivos no utilizados y los desechos de conformidad con la normativa nacional, provincial, regional y local.
- No reutilizar.



ALMACENAMIENTO, MANIPULACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS PRODUCTOS

- Las NeuMoDx HCV Quant Test Strips permanecen estables en el embalaje primario hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa del producto cuando se almacenan a una temperatura de 4 a 28 °C.
- No utilice consumibles ni reactivos que estén caducados.
- No utilice productos para pruebas si el embalaje primario o secundario no está visualmente intacto.
- No vuelva a cargar ningún producto para pruebas que se haya cargado previamente en otro NeuMoDx System.
- Una vez cargada, la NeuMoDx HCV Quant Test Strip puede permanecer en el NeuMoDx System hasta 14 días. La vida útil restante de las tiras reactivas cargadas la controla el software, que informa al usuario en tiempo real. La retirada de una tira reactiva que se ha utilizado más tiempo del permitido la solicitará el sistema.

RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

1. Manipule todas las muestras, calibradores y controles como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos.
2. No congele la sangre completa ni ninguna muestra almacenada en los tubos primarios.
3. Para preparar las muestras de plasma, la sangre completa se debe recoger en tubos estériles con EDTA o ACD como anticoagulantes o en tubos de preparación de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT). Siga las instrucciones del fabricante relativas a los tubos de recogida de muestras para su preparación y almacenamiento.
4. Para preparar muestras de suero, la sangre completa se debe recoger en tubos de suero o tubos SST. Siga las instrucciones del fabricante relativas a los tubos de recogida de muestras para su preparación y almacenamiento.

5. Las muestras se pueden analizar en tubos de recogida primarios o en tubos de muestras secundarios. Para el análisis de tubos principales, se recomienda lo siguiente:
 - a. Muestras de plasma: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD n.º 368589) o BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD n.º 362799).
 - b. Muestras de suero: BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tube (BD n.º 367820) o BD Vacutainer SST™ Tube (BD n.º 367988).
6. Las muestras preparadas se pueden almacenar en el NeuMoDx System hasta 8 horas antes del procesamiento. Si es necesario extender el tiempo de almacenamiento, se recomienda refrigerar o congelar las muestras en alícuotas secundarias.
7. Las muestras preparadas deben almacenarse a una temperatura de 2–8 °C durante 7 días como máximo antes de realizar el análisis y durante 8 horas como máximo a temperatura ambiente.
8. Las muestras preparadas pueden almacenarse en tubos secundarios a una temperatura ≤ -20 °C durante un máximo de 24 semanas antes del procesamiento; las muestras congeladas no deben someterse a más de dos (2) ciclos de congelación/descongelación antes del uso.
 - a. Las muestras de plasma congeladas y sometidas a un (1) ciclo de congelación/descongelación pueden almacenarse en el sistema 8 horas adicionales.
 - b. Las muestras de plasma congeladas y sometidas a dos (2) ciclos de congelación/descongelación no deben almacenarse en el sistema más de 4 horas.
 - c. Las muestras de suero congeladas y sometidas a uno (1) o dos (2) ciclos de congelación/descongelación deben analizarse inmediatamente después de la descongelación.
 - d. Si las muestras están congeladas, deje que se descongelen por completo a temperatura ambiente (15-30 °C); agite en vórtex para generar una muestra distribuida de manera uniforme.
 - e. No se recomienda la congelación de plasma/suero en tubos de recogida primarios.
9. Si las muestras se van a transportar, deben empaquetarse y etiquetarse de conformidad con las normativas nacionales y/o internacionales que correspondan.
10. Etiquete claramente las muestras e indique que son para análisis del HCV.
11. Continúe con la sección *Preparación de las pruebas*.

El proceso general para la implementación del NeuMoDx HCV Quant Assay se resume a continuación en la *figura 1*.

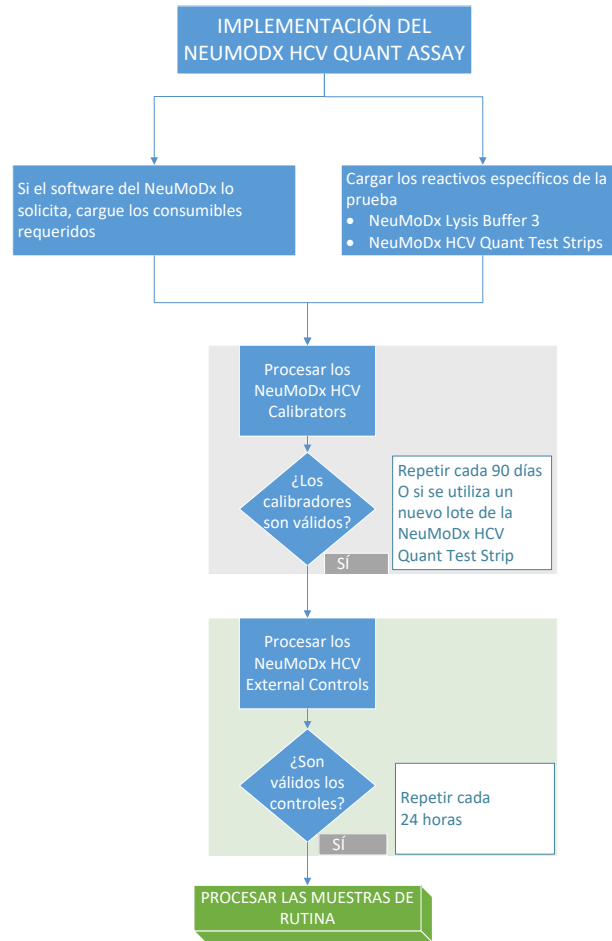


Figura 1: Flujo de trabajo de la implementación del NeuMoDx HCV Quant Assay

INSTRUCCIONES DE USO

Preparación de las pruebas

El NeuMoDx HCV Quant Assay se puede ejecutar directamente desde tubos de recogida de sangre primarios o desde alícuotas de muestras en tubos secundarios. El procesamiento se puede ejecutar siguiendo uno de los dos flujos de trabajo para el procesamiento de volumen de muestras: flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 μ l o 200 μ l.

1. Aplique la etiqueta de código de barras de muestra a un tubo de muestras compatible con el NeuMoDx System. El tubo de recogida de sangre primario puede etiquetarse y colocarse directamente en un soporte de tubos de muestras de 32 tubos tras la centrifugación según indique el fabricante. Como alternativa, una alícuota del plasma se puede transferir a un tubo secundario para su procesamiento en el NeuMoDx System.
2. Si realiza el análisis de la muestra en el tubo de recogida primario, coloque el tubo etiquetado con el código de barras en un soporte de tubos de muestras y asegúrese de que se quite el tapón antes de cargarlo en el NeuMoDx System. A continuación, se definen los volúmenes mínimos **sobre** la capa leucoplaquetaria, los cuales se cumplirán si las muestras se recogen y procesan de acuerdo con las instrucciones del fabricante de tubos. El rendimiento no está garantizado para las muestras que no se recojan correctamente.

Tipo de tubo	Volumen de muestra mínimo necesario	
	Flujo de trabajo de 550 µl	Flujo de trabajo 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/suero: 4,0 ml	1050 µl	700 µl
K ₂ EDTA/suero: 6,0 ml	1250 µl	900 µl
K ₂ EDTA/suero: 10,0 ml	1600 µl	1250 µl

3. Si se utiliza un tubo secundario:
 - a. Mezcle la muestra suavemente en vórtex hasta obtener una distribución uniforme.
 - b. Con una pipeta de transferencia nueva para cada muestra, transfiera una alícuota de plasma o suero al tubo de muestra con código de barras compatible con el NeuMoDx System de acuerdo con los volúmenes que se definen a continuación:

Soporte de tubos de muestras	Tamaño del tubo	Volumen de muestra mínimo necesario	
		Flujo de trabajo de 550 µl	Flujo de trabajo de 200 µl
32-Tube Specimen Tube Carrier (Soporte de tubos de muestras de 32 tubos)	11-14 mm de diámetro por 60-120 mm de altura	700 µl	400 µl
24-Tube Specimen Tube Carrier (Soporte de tubos de muestras de 24 tubos)	14,5-18 mm de diámetro por 60-120 mm de altura	1100 µl	800 µl
Low Volume Specimen Tube Carrier (Soporte de tubos de muestras de volumen bajo)	Tubo de microcentrifuga de fondo cónico de 1,5 ml	650 µl	300 µl

- c. Se debe tener cuidado de no transferir ningún coágulo de la muestra al tubo de muestras.

Funcionamiento del NeuMoDx System

Para obtener instrucciones detalladas, consulte los Manuales del operador del NeuMoDx 288 y del 96 Molecular System (ref. 40600108 y 40600317)

1. Cargue el pedido de pruebas en el NeuMoDx System según el flujo de trabajo para el volumen de muestras deseado y el tipo de tubo de muestras.
 - El volumen de la muestra de 550 µl se prueba definiendo el tipo de muestra como “Plasma” o “Serum” (Suero).
 - El volumen de la muestra de 200 µl se prueba definiendo el tipo de muestra como “Plasma2” (Plasma 2) o “Serum2” (Suero 2).
 - Si no se define en el pedido de prueba, se utilizará el tipo de muestra **Plasma** en un **Secondary Tube** (Tubo secundario) por defecto.
2. Rellene uno o más soportes de NeuMoDx System Test Strip con las NeuMoDx HCV Quant Test Strips y utilice la pantalla táctil para cargar los soportes de tiras reactivas en el NeuMoDx System.
3. Si se lo pide el software del NeuMoDx System, añada los consumibles necesarios a los soportes de consumibles del NeuMoDx System y utilice la pantalla táctil para cargar los soportes en el NeuMoDx System.
4. Si se lo pide el software del NeuMoDx System, sustituya el NeuMoDx Wash Reagent y el NeuMoDx Release Reagent, y vacíe los residuos de cebado, el contenedor para desechos con riesgo biológico (solo el NeuMoDx 288 Molecular System), el recipiente para puntas de desecho (solo el NeuMoDx 96 Molecular System) o el recipiente para desechos con riesgo biológico (solo el NeuMoDx 96 Molecular System), según resulte adecuado.
5. Si el software del NeuMoDx System lo solicita, procese los NeuMoDx HCV Calibrators y/o NeuMoDx HCV External Controls. Puede encontrar más información sobre los calibradores y los controles en la sección *Procesamiento de los resultados*.
6. Cargue los tubos de muestras/calibrador/control en un soporte de tubos de muestras y asegúrese de que se hayan retirado los tapones de todos los tubos.
7. Coloque los soportes de tubos de muestras en el estante del cargador automático y utilice la pantalla táctil para cargar los soportes en el NeuMoDx System. De ese modo, se iniciará el procesamiento de las muestras cargadas para los análisis identificados, dado que hay un pedido de prueba válido en el sistema.

LIMITACIONES

1. La NeuMoDx HCV Quant Test Strip solo puede utilizarse en NeuMoDx Systems.
2. Se ha establecido el rendimiento de la NeuMoDx HCV Quant Test Strip para muestras de plasma preparadas con EDTA/ACD como anticoagulantes o muestras de suero preparadas en tubos de separación de suero. No se ha evaluado el uso de la NeuMoDx HCV Quant Test Strip con otras fuentes y se desconocen las características del rendimiento para otros tipos de muestras.
3. Se ha establecido el rendimiento de la NeuMoDx HCV Quant Test Strip para el análisis de tubos primarios mediante el uso de BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tubes, BD Vacutainer PPT Plasma Preparation Tubes, BD Vacutainer Plus Plastic Serum Tubes y BD Vacutainer SST Tubes.
4. La manipulación de las muestras cuando se han superado las condiciones de almacenamiento puede afectar negativamente la precisión cuantitativa del NeuMoDx HCV Quant Assay, pero hay menos probabilidades de que afecte la tasa de resultados cualitativos (positivos/negativos).
5. Almacenar las muestras de suero en el sistema después de haberse almacenado congeladas a largo plazo y haber sido sometidas a dos ciclos de congelación/descongelación sin realizar el análisis de manera inmediata puede afectar negativamente la precisión cuantitativa del NeuMoDx HCV Quant Assay.
6. Se ha observado un pequeño aumento en el límite de detección y en el límite inferior de cuantificación del NeuMoDx HCV Quant Assay cuando se utiliza el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl.
7. El NeuMoDx HCV Quant Assay no se debe utilizar con muestras heparinizadas de seres humanos.
8. Dado que la detección del HCV depende del número de partículas víricas de ARN diana presentes en la muestra, los resultados fiables dependen de una recogida, una manipulación y un almacenamiento correctos de las muestras.
9. Los NeuMoDx HCV Calibrators y los NeuMoDx HCV External Controls deben procesarse según lo recomendado en los prospectos cuando lo solicite el software del NeuMoDx System antes del procesamiento de muestras clínicas de rutina.
10. Los resultados erróneos se podrían deber a una recogida, una manipulación o un almacenamiento incorrectos de la muestra, o bien a un error técnico o a la confusión de los tubos de muestras. Además, podrían producirse resultados negativos falsos debido a que el número de partículas víricas en la muestra es inferior al límite de detección del NeuMoDx HCV Quant Assay.
11. El funcionamiento del NeuMoDx System solo puede estar a cargo de personal con formación en el uso del NeuMoDx System.
12. Si tanto la diana del HCV como la diana del SPC2 no se amplifican, se notificará un resultado no válido (Indeterminate [Indeterminado], No Result [Sin resultado] o Unresolved [No resuelto]) y deberá repetirse la prueba.
13. Si el resultado del NeuMoDx HCV Quant Assay es Positive (Positivo), pero el valor de cuantificación supera los límites de la cuantificación, el NeuMoDx System informará si el HCV detectado estaba *por debajo* del límite inferior de cuantificación (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) o *por encima* del límite superior de cuantificación (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).
14. En caso de que el HCV detectado esté *por debajo* del LLoQ, el NeuMoDx HCV Quant Assay puede repetirse, si se desea, con otra alícuota de la muestra.
15. En caso de que el HCV detectado estuviera por encima del límite superior de cuantificación (Upper Limit of Quantitation, ULoQ), el NeuMoDx HCV Quant Assay puede repetirse con una alícuota diluida de la muestra original. Se recomienda una dilución de 1:100 o de 1:1000 en plasma negativo para HCV o diluyente Basematrix 53 (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). La concentración de la muestra original se calcula de la siguiente forma:

$$\text{concentración de la muestra original} = \log_{10}(\text{factor de dilución}) + \text{concentración notificada de la muestra diluida}$$
16. La presencia ocasional de inhibidores de la RPC en plasma y suero puede causar un error de cuantificación en el sistema. Si esto sucede, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra diluida en Basematrix en una proporción de 1:10 o de 1:100.
17. Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Sin embargo, un resultado positivo puede indicar la presencia de ARN del virus de la hepatitis C.
18. La eliminación o las mutaciones en las regiones conservadas diana del NeuMoDx HCV Quant Assay pueden afectar a la detección o podrían dar lugar a un resultado erróneo con la NeuMoDx HCV Quant Test Strip.
19. Los resultados del NeuMoDx HCV Quant Assay deben utilizarse como complemento de las observaciones clínicas y otra información que el médico tenga a su disposición; la prueba no está diseñada para diagnosticar la infección.
20. Para evitar la contaminación, se recomienda seguir las prácticas recomendadas de laboratorio, entre las que se incluye cambiar de guantes entre la manipulación de las muestras de pacientes.

PROCESAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los resultados disponibles se pueden ver o imprimir desde la pestaña 'Results' (Resultados), en la ventana Results (Resultados) en la pantalla táctil del NeuMoDx System. El software del NeuMoDx System genera automáticamente los resultados del NeuMoDx HCV Quant Assay utilizando el algoritmo de decisión y los parámetros de procesamiento de los resultados especificados en el archivo de definición de ensayo de NeuMoDx HCV (HCV Assay Definition File, CMV ADF). Un resultado puede notificarse como Negative (Negativo), Positive (Positivo) con una concentración de HCV notificada, Positive (Positivo) por encima del ULoQ, Positive (Positivo) por debajo del LLoQ, Indeterminate (IND [Indeterminado]), Unresolved (UNR [No resuelto]) o No Result (NR [Sin resultado]) en función del estado de amplificación del analito y el control de proceso de muestras. Los resultados se notifican en función del algoritmo de decisión del archivo de definición de ensayo (Assay Definition File, ADF), como se resume a continuación en la *tabla 1*.

Tabla 1. Resumen del algoritmo de decisión del NeuMoDx HCV Quant Assay

RESULTADO	Analito de HCV	Control de proceso de muestras (Sample Process Control, SPC2)	Interpretación del resultado
Positive (Positivo) con concentración notificada	Amplified (Amplificado) 0,9 ≤[HCV] ≤8,2 log ₁₀ UI/ml (flujo de trabajo de 550 µl) 1,5 ≤[HCV] ≤8,2 log ₁₀ UI/ml (flujo de trabajo de 200 µl)	Amplified (Amplificado) o Not Amplified (No amplificado)	ARN de HCV detectado dentro del intervalo cuantitativo
Positive (Positivo), por encima del ULoQ	Amplified (Amplificado) [HCV] >8,2 log ₁₀ UI/ml	Amplified (Amplificado) o Not Amplified (No amplificado)	ARN de HCV detectado por encima del intervalo cuantitativo
Positive (Positivo), por debajo del LLoQ	Amplified (Amplificado) [HCV] <0,9 log ₁₀ UI/ml (flujo de trabajo de 550 µl) [HCV] <1,5 log ₁₀ UI/ml (flujo de trabajo de 200 µl)	Amplified (Amplificado) o Not Amplified (No amplificado)	ARN de HCV detectado por debajo del intervalo cuantitativo
Negative (Negativo)	Not Amplified (No amplificado)	Amplified (Amplificado)	ARN de HCV no detectado
Indeterminate (Indeterminado)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (No amplificado, se ha detectado un error del sistema, procesamiento de la muestra completado)		Todos los resultados del analito fueron no válidos; vuelva a analizar la muestra†
No Result* (Sin resultado)	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Aborted (No amplificado, se ha detectado un error del sistema, procesamiento de la muestra anulado)		El procesamiento de la muestra fue anulado; vuelva a realizar la muestra†
Unresolved (No resuelto)	Not Amplified, No System Error Detected (No amplificado, No se ha detectado ningún error del sistema)		Todos los resultados del analito fueron no válidos; vuelva a analizar la muestra†

*La indicación No Result (Sin resultado) solo se notifica en las versiones de software 1.8 y superiores del NeuMoDx System.

†El NeuMoDx System está equipado con una función Rerun/Repeat (Nuevo análisis/Repetición) automática que el usuario final puede elegir para asegurar que se vuelva a procesar de manera automática un resultado IND/UNR/NR (Indeterminado/No resuelto/Sin resultado) para así minimizar los retrasos en el informe de resultados.

Cálculo de la prueba

- En el caso de las muestras comprendidas dentro del intervalo de cuantificación del NeuMoDx HCV Quant Assay, la concentración de ARN del HCV en las muestras se calcula usando la curva estándar guardada junto con el coeficiente de calibración y el volumen de la muestra.
 - Se calcula un coeficiente de calibración en función de los resultados de los NeuMoDx HCV Calibrators procesados para establecer la validez de la curva estándar para un lote determinado de la NeuMoDx HCV Quant Test Strip en un NeuMoDx System específico.
 - El coeficiente de calibración se incorpora en la determinación final de la concentración de ARN del HCV.
 - El software NeuMoDx contabiliza el volumen de entrada de la muestra cuando determina la concentración de ARN del HCV por ml de muestra.
- Los resultados del NeuMoDx HCV Quant Assay se indican en log₁₀ UI/ml.
- La cuantificación resultante de las muestras desconocidas concuerda con el 5.º estándar internacional de la OMS para el HCV.

Calibración de prueba

Se requiere una calibración válida basada en la curva estándar para cuantificar el ARN del HCV en las muestras. Para generar resultados válidos, se debe llevar a cabo una calibración de prueba con los calibradores externos proporcionados por NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibradores

1. Se debe procesar un conjunto de NeuMoDx HCV Calibrators con cada lote nuevo de NeuMoDx HCV Quant Test Strips si se carga un nuevo archivo de definición de ensayo del HCV en el NeuMoDx System, si el conjunto de calibradores actual ha superado el periodo de validez (establecido actualmente en 90 días) o si se modifica el software del NeuMoDx System.
2. El software del NeuMoDx System notificará al usuario cuando los calibradores deban procesarse. No se puede utilizar un nuevo lote de tiras reactivas para realizar el análisis hasta que los calibradores se hayan procesado correctamente.
3. La validez de la calibración se establece de la siguiente manera:
 - a) Es necesario procesar un conjunto de dos calibradores, uno (1) alto y uno (1) bajo, para establecer la validez.
 - b) Al menos dos (2) de las tres (3) réplicas deben proporcionar resultados dentro de los parámetros predefinidos. El objetivo nominal del calibrador bajo es de $3 \log_{10}$ UI/ml y el del calibrador alto es de $5 \log_{10}$ UI/ml.
 - c) Se calcula un coeficiente de calibración para contemplar la variación esperada entre los lotes de tiras reactivas. Este coeficiente de calibración se utiliza para determinar la concentración final del HCV.
4. Si uno o ambos calibradores no superan la comprobación de validez, repita el procesamiento de los calibradores no aprobados con un nuevo vial. En caso de que un solo calibrador no supere la comprobación de validez, es posible repetir únicamente el calibrador no aprobado, ya que el sistema no requiere que el usuario procese ambos calibradores de nuevo.
5. Si los calibradores no superan la comprobación de validez de forma consecutiva, póngase en contacto con NeuMoDx Molecular, Inc.

Control de calidad

La normativa local específica habitualmente que el laboratorio es responsable de los procedimientos de control que supervisan la exactitud y la precisión del proceso analítico completo, y debe establecer el número, el tipo y la frecuencia de los materiales de control de las pruebas mediante especificaciones de rendimiento verificadas para un sistema de pruebas no modificado y aprobado.

Controles externos

1. Los controles externos positivos y negativos se deben procesar cada 24 horas durante el análisis con el NeuMoDx HCV Quant Assay. Si no existe un conjunto de resultados de controles externos válidos, el software del NeuMoDx System indicará al usuario que se deben procesar los controles para que puedan notificarse los resultados de las muestras.
2. El NeuMoDx System evaluará la validez de los controles externos en función del resultado esperado. El control positivo debe proporcionar un resultado Positive (Positivo) para HCV y el control negativo debe proporcionar un resultado Negative (Negativo) para HCV.
3. La gestión de resultados discrepantes para los controles externos debe realizarse de la siguiente manera:
 - a) El resultado positivo de una prueba notificado para una muestra de control negativo indica que existe un problema de contaminación de la muestra.
 - b) El resultado Negative (Negativo) de una prueba notificado para una muestra de control positivo puede indicar que existe un problema relacionado con un reactivo o con el instrumento.
 - c) En cualquiera de los casos anteriores, o en el caso de un resultado Indeterminate (IND [Indeterminado]) o No Result (NR [Sin resultado]), repita los NeuMoDx HCV External Controls con viales nuevos de los controles que no superaron la prueba de validez.
 - d) Si el NeuMoDx HCV External Control positivo sigue notificando un resultado Negative (Negativo), póngase en contacto con el servicio técnico de NeuMoDx.
 - e) Si el NeuMoDx HCV External Control negativo sigue notificando un resultado Positive (Positivo), intente eliminar todas las fuentes de posible contaminación, lo que incluye sustituir todos los reactivos antes de ponerse en contacto con el servicio técnico de NeuMoDx.

Controles (internos) de proceso de muestras

Se incorpora un control de proceso de muestras (Sample Process Control, SPC2) exógeno a la NeuMoDx Extraction Plate y se somete a todo el proceso de extracción del ácido nucleico y amplificación mediante RT-RPC en tiempo real con cada muestra. La sonda y los cebadores específicos para el SPC2 también se incluyen en cada NeuMoDx HCV Quant Test Strip, lo que permite detectar la presencia del SPC2 junto con el ARN del HCV diana (si está presente) mediante RT-RPC múltiple inmediata. La detección de la amplificación del SPC2 permite al software del NeuMoDx System supervisar la eficacia de los procesos de extracción de ARN y amplificación por RT-RPC.

Resultados no válidos

Si un NeuMoDx HCV Quant Assay realizado en el NeuMoDx System no logra generar un resultado válido tras el procesamiento de la muestra, se notificará como Indeterminate (IND [Indeterminado]), No Result (NR [Sin resultado]) o Unresolved (UNR [No resuelto]) en función del tipo de error que se haya presentado.

Se notificará un resultado IND (Indeterminado) si se detecta un error del NeuMoDx System durante el procesamiento de la muestra. En el caso de que se notifique un resultado IND (Indeterminado), se recomienda repetir la prueba.

Se notificará un resultado UNR (No resuelto) si no se detecta ninguna amplificación válida del ARN del HCV ni del SPC2 sin que haya errores del sistema, lo que indica un posible fallo de los reactivos o la presencia de inhibidores. En caso de que se notifique un resultado UNR (No resuelto), se recomienda repetir la prueba como primer paso. Si una nueva prueba falla, puede utilizarse una muestra diluida para mitigar los efectos de cualquier inhibición de la muestra.

Si un NeuMoDx HCV Quant Assay realizado en el NeuMoDx System no logra generar un resultado válido y el procesamiento de la muestra se cancela antes de que finalice, se notificará como No Result (NR [Sin resultado]). En el caso de que se notifique un resultado NR (Sin resultado), se recomienda repetir la prueba.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección con el estándar de la OMS

La sensibilidad analítica del NeuMoDx HCV Quant Assay se caracterizó analizando muestras negativas y diluciones sucesivas del 5.º estándar internacional de la OMS (genotipo 1) en suero y plasma humano de cribado negativo para determinar el límite de detección (Limit of Detection, LoD) en los NeuMoDx Systems. El LoD se definió como el nivel de diana más bajo que se detecta en una tasa del 95 % según lo determinado mediante el análisis probit. El estudio se realizó durante 3 días en varios sistemas con varios lotes de reactivos NeuMoDx. Cada sistema (N288 y N96) procesó 18 réplicas en cada nivel de dilución por día. Las tasas de detección se muestran en la *tabla 2*. Se realizó un estudio adicional para determinar el LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay cuando se utiliza el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl y los resultados se muestran en la *tabla 3*.

Tabla 2. Tasas de detección positivas para la determinación del LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay (flujo de trabajo de 550 µl)

Concentración de analitos [UI/ml]	Concentración de analitos [\log_{10} UI/ml]	PLASMA			SUERO		
		Número de pruebas válidas	Número de pruebas positivas	Tasa de detección	Número de pruebas válidas	Número de pruebas positivas	Tasa de detección
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 %

Tabla 3. Tasas de detección positivas para la determinación del LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay (flujo de trabajo de 200 µl)

Concentración de analitos [UI/ml]	Concentración de analitos [\log_{10} UI/ml]	PLASMA			SUERO		
		Número de pruebas válidas	Número de pruebas positivas	Tasa de detección	Número de pruebas válidas	Número de pruebas positivas	Tasa de detección
75	1,88	N/A (N/D)	N/A (N/D)	N/A (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 %

El LoD of the NeuMoDx HCV Quant Assay en plasma en todos los genotipos era de 7,5 UI/ml (IC del 95 % de 6,4 a 9,2 UI/ml) [(0,9 \log_{10} UI/ml) (IC del 95 % de 0,8 a 1,0 \log_{10} UI/ml)] según el análisis realizado en el NeuMoDx 288 Molecular System mediante el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µl (*Figura 2*). El LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay para las muestras de suero era de 8,0 UI/ml (IC del 95 % de 6,6 a 10,4 UI/ml) [(0,9 \log_{10} UI/ml) (IC del 95 % de 0,8 a 1,0 \log_{10} UI/ml)] para el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µL (*Figura 2*); el LoD atribuido para los dos tipos de muestra para el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µl es de **8,0 UI/ml (0,9 \log_{10} UI/ml)**.

El LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay para el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl era de 27,9 UI/ml (IC del 95 % de 20,1 a 81,9) en muestras de plasma y 29,8 UI/ml (IC del 95 % de 20,5 a 94,0) en muestras de suero (*Figura 3*); el LoD atribuido para los dos tipos de muestra para el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl es de **30,0 UI/ml (1,5 \log_{10} UI/ml)**.

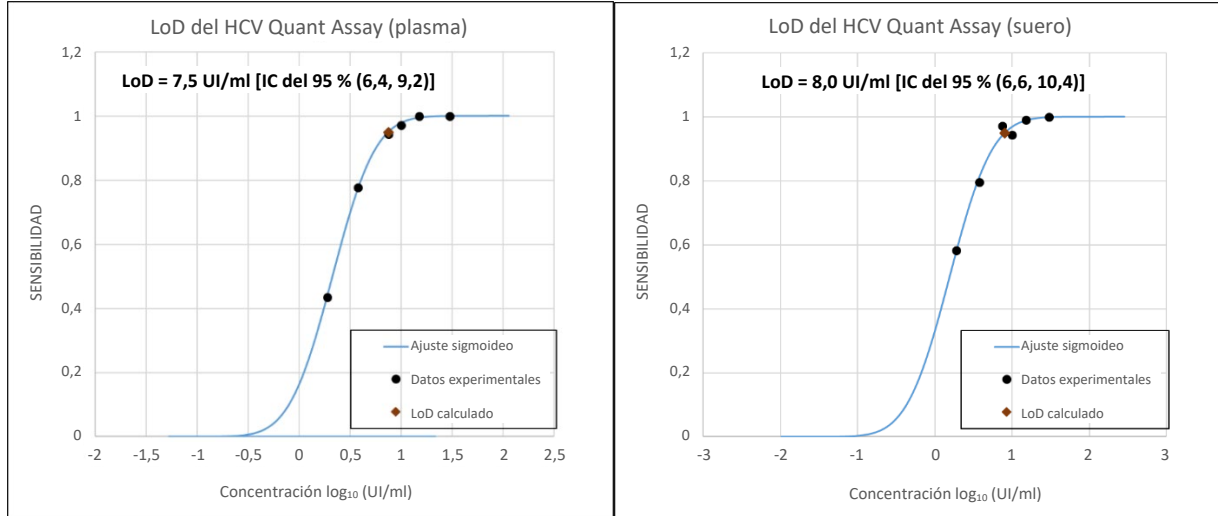


Figura 2: Análisis probit utilizado para determinar el LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay en plasma (izquierda) y suero (derecha); flujo de trabajo de 550 µl

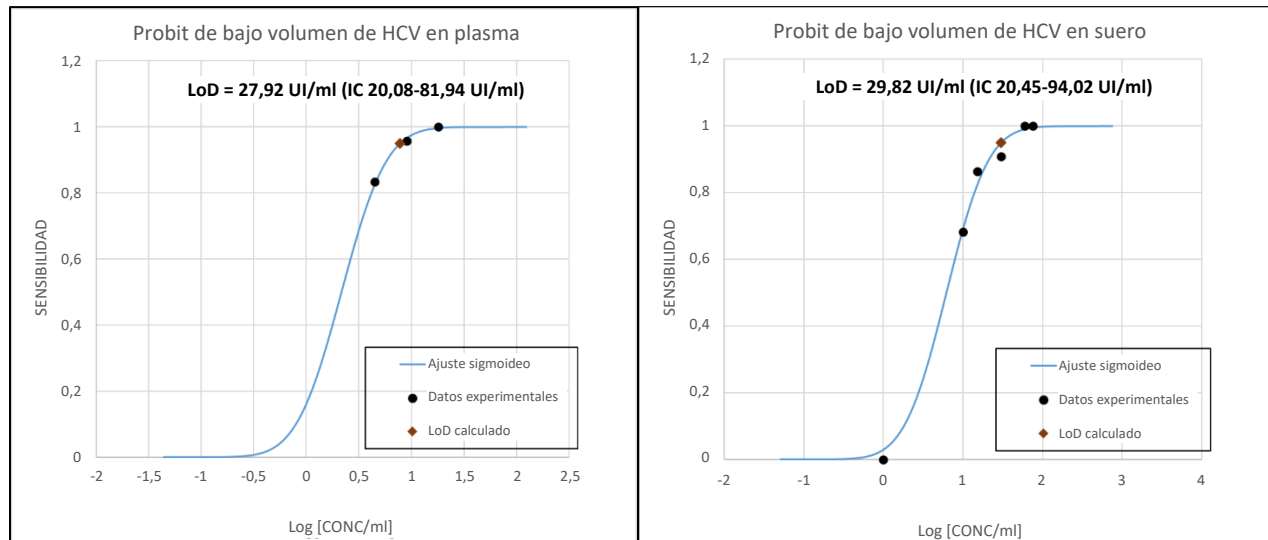


Figura 3: Análisis probit utilizado para determinar el LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay en plasma (izquierda) y suero (derecha); flujo de trabajo de 200 µl

Sensibilidad analítica; límite de cuantificación; límite inferior de cuantificación (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) con el estándar de la OMS

El límite inferior de cuantificación (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) se define como el nivel de diana más bajo en el que se logra una detección >95 % Y el error analítico total (Total Analytical Error, TAE) es ≤1,0. Para determinar el LLoQ, se calculó el error analítico total (Total Analytical Error, TAE) para cada uno de los niveles del analito del HCV que notificaron una detección >95 % como parte del cálculo del LoD. El TAE se define de la siguiente forma:

$$TAE = \text{sesgo} + 2 * SD \quad [\text{Estadística Westgard}]$$

El sesgo es el valor absoluto de la diferencia entre el promedio de la concentración calculada y la concentración esperada. SD se refiere a la desviación estándar (Standard Deviation, SD) del valor cuantificado de la muestra.

En la *tabla 4* se muestran los resultados recopilados de los 6 niveles de las muestras de plasma y suero de HCV en el estudio de LLoQ que utilizan el genotipo 1 mediante el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µl. En la *tabla 5* se muestran los resultados de análisis adicionales en los que se utiliza un flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl.

Tabla 4. LLoQ del NeuMoDx HCV Quant Assay, con sesgo y TAE; flujo de trabajo de 550 µl

Conc. deseada [UI/ml]	Conc. deseada [log ₁₀ UI/ml]	Plasma					Suero				
		Conc. media [log ₁₀ UI/ml]	Detección (%)	SD	Sesgo	TAE	Conc. media [log ₁₀ UI/ml]	Detección (%)	SD	Sesgo	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

Tabla 5. LLoQ del NeuMoDx HCV Quant Assay, con sesgo y TAE; flujo de trabajo de 200 µl

Conc. deseada [UI/ml]	Conc. deseada [log ₁₀ UI/ml]	Plasma					Suero				
		Conc. media [log ₁₀ UI/ml]	Detección (%)	SD	Sesgo	TAE	Conc. media [log ₁₀ UI/ml]	Detección (%)	SD	Sesgo	TAE
75	1,88	N/A (N/D)	N/A (N/D)	N/A (N/D)	N/A (N/D)	N/A (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

Se determinó que el LLoQ del NeuMoDx HCV Quant Assay es de 7,7 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml) para plasma, y de 8,4 UI/ml, (0,9 log₁₀ UI/ml) para suero mediante el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µl; se determinó que el LLoQ para el plasma y el suero era de 8,4 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml) usando un flujo de trabajo con volumen de muestra de 550 µl.

Se determinó que el LLoQ del NeuMoDx HCV Quant Assay que sigue el estándar de la OMS es de 30,0 UI/ml (1,5 log₁₀ UI/ml) para plasma, y de 29,8 UI/ml, (1,37 log₁₀ UI/ml) para suero mediante el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl; se determinó que el LLoQ para plasma y suero es de **30,0 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml)** mediante el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl.

Sensibilidad analítica: LoD y LLoQ en los genotipos del HCV

Se estableció inicialmente el LoD para el genotipo 1 (5.º estándar internacional de la OMS) y luego se realizaron análisis adicionales en torno al LoD establecido utilizando los otros 5 genotipos. Se analizaron treinta y seis (36) réplicas a niveles correspondientes a 2 veces, 1 vez y 0,5 veces el límite superior del IC del 95 % del LoD utilizando el NeuMoDx HCV Quant Assay con plasma mediante el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µl. La tasa de porcentaje positivo para cada genotipo en cada uno de estos niveles analizados se representó en tablas y se usó para calcular el LoD utilizando un análisis probit.

También se calculó el error analítico total en estos niveles analizados. El nivel más bajo con una detección positiva del 95 % y un TAE calculado de ≤ 1,0 se consideró nuevamente como el LLoQ para el genotipo. Estos resultados confirman que el NeuMoDx HCV Quant Assay tiene un rendimiento de detección excelente y equivalente en los seis genotipos con un intervalo de 4,5-7,5 UI/ml, incluidos los resultados obtenidos con el 5.º estándar internacional de la OMS (genotipo 1). En general, se determinó que el LoD del NeuMoDx HCV Quant Assay en los genotipos era de 7,5 UI/ml (0,88 log₁₀ UI/ml) y que el LLoQ era el valor más alto, de 7,7 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml), tal como se notificó para el 5.º estándar internacional de la OMS (genotipo 1, mencionado anteriormente). En la *tabla 6* se muestran los resultados de LoD y LLoQ de los análisis realizados en genotipos del HCV, según se determinó en plasma.

Tabla 6. Genotipos del HCV analizados en plasma para un flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µl

GENOTIPO	LoD [UI/ml]	LLoQ [UI/ml]
1	7,5	7,7
2	4,5	5,2
3	7,5	7,5
4	6,0	6,0
5	4,8	5,5
6	4,5	6,7

Basándose en los resultados de los estudios mencionados anteriormente, NeuMoDx afirma un **LoD de 8,0 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml)** y un **LLOQ de 8,4 UI/ml (0,9 log₁₀ UI/ml)** para el NeuMoDx HCV Quant Assay en **plasma y suero** mediante el **flujo de trabajo con un volumen de muestra de 550 µl**.

El **LoD y LLOQ** declarados del NeuMoDx HCV Quant Assay para **ambos tipos de muestra (plasma y suero)** mediante el **flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl es 30,0 UI/ml (1,5 log₁₀ UI/ml)**.

Sensibilidad analítica: linealidad y determinación del límite superior de cuantificación (Upper Limit of Quantitation, ULOQ)

La linealidad y el límite superior de cuantificación (Upper Limit of Quantitation, ULOQ) del NeuMoDx HCV Quant Assay se determinaron en plasma preparando una serie de diluciones con HCV Armored RNA® (Asuragen Inc., Austin, TX) y AcroMetrix™ High Control HCV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) con una concordancia establecida con el 5.º estándar internacional de la OMS. Se preparó un panel de 11 componentes en plasma negativo combinado para el HCV a fin de crear un panel que cubriera un intervalo de concentración de 8,2-1,5 log₁₀ UI/ml. El NeuMoDx HCV Quant Assay puso de manifiesto la capacidad de cuantificar el HCV en el intervalo lineal de 8 log₁₀ con una precisión de ± 0,3 log₁₀ UI/ml en función del error estándar según lo calculado por el intervalo de confianza del 95 %. No se obtuvo ningún beneficio significativo utilizando los ajustes de regresión de segundo y tercer orden. Se determinó que el ULOQ en plasma era de 8,2 log₁₀ UI/ml. Se llevó a cabo un estudio posterior para mostrar la equivalencia de la matriz y el análisis en comparación con los resultados cuantitativos de NeuMoDx HCV para muestras preparadas en plasma y suero usando dos modelos de ajustes de regresión diferentes, incluida la herramienta de regresión de MS Excel y Passing-Bablok. En los resultados se mostró una estrecha correlación representada por la pendiente y valores de intersección muy próximos a 1,00 y 0,00 respectivamente; además de un valor R² de 0,99 (herramienta de regresión de MS Excel) o un valor p de 0,600 (Passing-Bablok). Las concentraciones del ensayo de HCV notificadas por el NeuMoDx System en comparación con los valores esperados se presentan en la *figura 4*.

Se evaluaron la linealidad y el ULOQ mediante el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl. Las comparaciones de las equivalencias se realizaron entre las concentraciones que notificó el software NeuMoDx para los flujos de trabajo de 200 µl y 550 µl. Los análisis de regresión de Deming y Passing-Bablok mostraron una excelente correlación y una pendiente próxima a 1 e intersecciones mínimas (sesgo) de las concentraciones notificadas tanto de las muestras de plasma como de las de suero en el intervalo lineal. En una comparación Bland-Altman de la concentración notificada para el flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl con la concentración media notificada para los flujos de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl y 550 µl se mostró un sesgo mínimo, y la precisión se atribuyó al algoritmo utilizado para generar resultados a partir del flujo de trabajo de 200 µl. Además, en una regresión lineal simple en la que se comparó la concentración esperada con la concentración notificada para el flujo de trabajo de 200 µl, la pendiente estaba próxima a 1, lo que demuestra una excelente correlación (*figura 5*). En conjunto, estas comparaciones muestran una cuantificación precisa del HCV en el intervalo lineal del NeuMoDx HCV Quant Assay cuando se sigue un flujo de trabajo con un volumen de muestra de 200 µl.

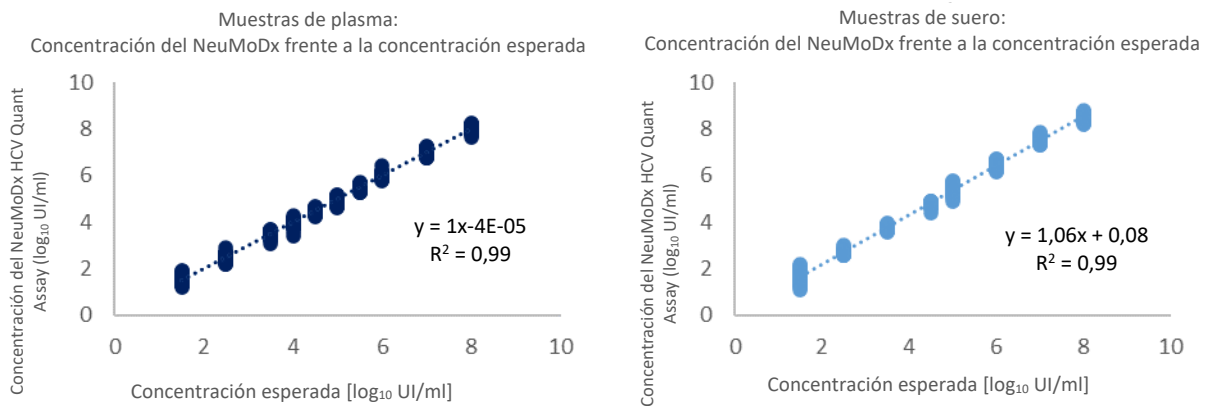


Figura 4: Intervalo lineal del NeuMoDx HCV Quant Assay en plasma (izquierda) y suero (derecha); flujo de trabajo de 550 µl

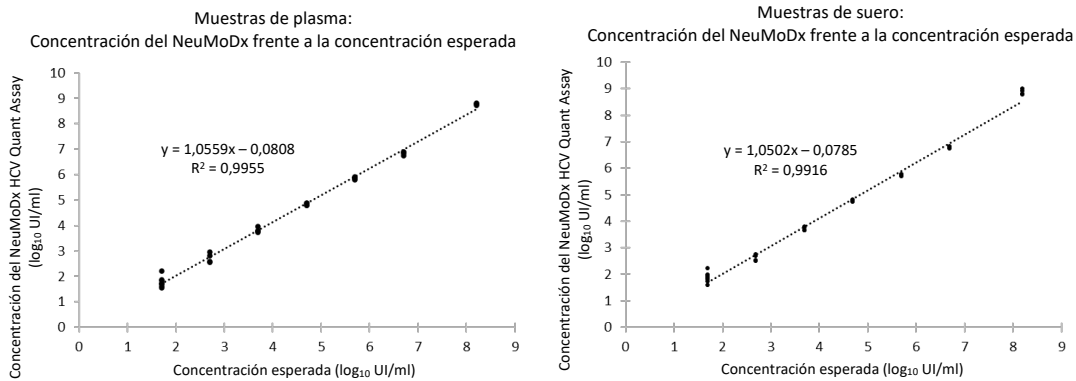


Figura 5: Intervalo lineal del NeuMoDx HCV Quant Assay en plasma (izquierda) y suero (derecha); flujo de trabajo de 200 µl

Sensibilidad analítica: linealidad en los genotipos

La linealidad del NeuMoDx HCV Quant Assay en seis genotipos del HCV se caracterizó mediante el análisis de al menos cuatro (4) concentraciones diferentes de cada genotipo del HCV preparadas en plasma negativo para el HCV. Los niveles de los analitos del HCV analizados en este estudio dependían de la concentración de la muestra original y, por lo tanto, fueron diferentes entre los genotipos. El estudio se realizó con cada genotipo utilizando 6 réplicas en cada nivel. La linealidad en los seis genotipos de HCV se presenta en la *tabla 7* y la *figura 6*.

Tabla 7. Linealidad del NeuMoDx HCV Quant Assay entre los genotipos

Genotipo	Ecuación de linealidad y = cuantificación del NeuMoDx HCV Assay x = cuantificación 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

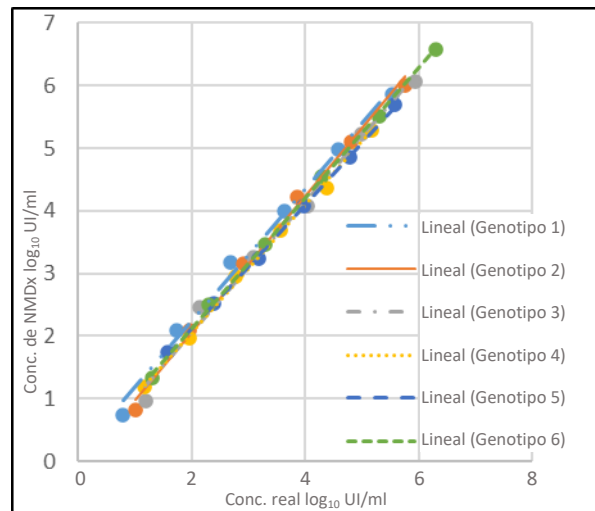


Figura 6: Linealidad del NeuMoDx HCV Quant Assay entre los genotipos

Especificidad analítica: reactividad cruzada

La especificidad analítica se mostró mediante el análisis de 33 microorganismos que pueden encontrarse frecuentemente en las muestras de sangre y plasma, así como en especies filogenéticamente similares al HCV para determinar la reactividad cruzada. Los microorganismos se prepararon en grupos de 4 a 6 microorganismos y se analizaron a una concentración elevada. Los microorganismos analizados se muestran en la *tabla 8*. No se observó reactividad cruzada con ninguno de los microorganismos analizados, lo que confirma una especificidad analítica del 100 % del NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabla 8. Patógenos utilizados para mostrar la especificidad analítica

Microorganismos no diana						
Adenovirus 2	Dengue V1	Hepatitis A	Virus de la inmunodeficiencia humana 2	Virus linfotrópico humano 1	Propionibacterium acnes	Virus del Nilo Occidental
Adenovirus 5	Dengue V2	Hepatitis B	Virus del papiloma humano 16	Virus linfotrópico humano 2	Rubéola	Fiebre amarilla
Candida albicans	Dengue V3	Virus del herpes simple (VHS) 1	Virus del papiloma humano 18	Gripe A	Encefalitis de San Luis	Virus de Zika
Chlamydia trachomatis	Dengue V4	Virus del herpes simple (VHS) 2	Virus del herpes humano 6b	Neisseria gonorrhoeae	Staphylococcus aureus	
Citomegalovirus	Virus de Epstein-Barr	Virus de la inmunodeficiencia humana 1	Virus del herpes humano 8	Parvovirus B19	Staphylococcus epidermidis	

Especificidad analítica: sustancias causantes de interferencias, microorganismos comensales

Se evaluó el NeuMoDx HCV Quant Assay para determinar interferencias en presencia de microorganismos no diana utilizando los mismos grupos de microorganismos que aquellos preparados para evaluar la reactividad cruzada que aparecen arriba en la *tabla 8*. Al plasma negativo para el HCV se le añadieron los microorganismos distribuidos en grupos de 4-6; y también se añadió un control positivo de HCV en una concentración de 1,4 log₁₀ UI/ml. No se observaron interferencias significativas en presencia de estos microorganismos comensales, tal como indica la desviación mínima de la cuantificación con respecto a las muestras de control que no contenían agentes causantes de interferencias.

Especificidad analítica: sustancias causantes de interferencias, sustancias endógenas y exógenas

Se evaluó el rendimiento del NeuMoDx HCV Quant Assay en presencia de sustancias exógenas y endógenas típicas causantes de interferencias que se encuentran en muestras clínicas de plasma del HCV. Estas incluían niveles anormalmente altos de hemoderivados y también de medicamentos antiviricos comunes, los cuales se clasifican en la *tabla 9*. Cada sustancia se añadió a plasma humano negativo cribado para el HCV al que se añadió 1,7 log₁₀ UI/ml de HCV y las muestras se analizaron para detectar interferencias. Además, también se analizaron muestras de plasma con enfermedades comunes asociadas con la infección por hepatitis C para detectar posibles interferencias. La concentración promedio y el sesgo de todas las sustancias analizadas se informan en la *tabla 10*. Ninguna de las sustancias endógenas y exógenas influyó en la especificidad del NeuMoDx HCV Quant Assay.

Tabla 9. Análisis de interferencias: agentes exógenos (clasificaciones farmacológicas)

	Producto	Clasificación		Producto	Clasificación
Grupo 1	Sofosbuvir	Antivirico para HCV de acción directa	Grupo 2	Paritaprevir	Inhibidor de la NS3/4A proteasa del HCV
	Ledipasvir	Inhibidor de HCV		Ombitasvir	Antivirico para HCV
	Velpatasvir	Inhibidor NS5A de HCV		Ritonavir	Inhibidor de la proteasa del VIH
	Claritromicina	Antibiótico		Sulfato de abacavir	Inhibidor de la transcriptasa inversa
	Interferón α 2a	Inmunomodulador		Ribavirina	Inmunomodulador
Grupo 3	Grazoprevir	Inhibidor de la NS3/4A proteasa del HCV	Grupo 4	Efavirenz	Inhibidor de la transcriptasa inversa
	Elbasvir	Inhibidor NS5A de HCV		Lopinavir	Inhibidor de la proteasa
	Tenofovir disoproxilo	Antiviral para HBV/VIH		Azitromicina	Antibiótico
	Lamivudina	Antiviral para HBV/VIH		Dolutegravir	Antivirico para HIV
	Valganciclovir	Antivirico para CMV		Simeprevir	Inhibidor de la NS3/4A proteasa del HCV
Grupo 5	Emtricitabina	Antivirico para HIV			
	Raltegravir	Antivirico para HIV			
	Amoxicilina	Antibiótico			
	Rilpivirina	Antivirico para HIV			
	Dasabuvir	Antivirico de acción directa para HCV			
	Glecaprevir	Inhibidor de la NS3/4A proteasa del HCV			

Tabla 10. Análisis de interferencias: agentes exógenos y endógenos

Endógena	Conc. media log ₁₀ UI/ml	Sesgo log ₁₀ UI/ml
Hemoglobina	1,61	0,28
Triglicéridos	1,31	-0,02
Bilirrubina	1,47	0,14
Albúmina	1,47	0,14
Exógenos (fármacos)	Conc. media log ₁₀ UI/ml	Sesgo log ₁₀ UI/ml
Grupo 1: Zidovudina (ZDV), saquinavir, ritonavir, claritromicina, interferón α 2a, interferón α 2b	1,48	0,15
Grupo 2: Sulfato de abacavir, amprenavir, ribavirina, entecavir, fluoxetina, clorhidrato de valaciclovir	1,40	0,07
Grupo 3: Tenofovir disoproxil, lamivudina, ganciclovir, valganciclovir, nevirapina	1,40	0,07
Grupo 4: Efavirenz, lopinavir, enfuvirtida, ciprofloxacino, paroxetina,	1,51	0,18
Grupo 5: Adefovir (dipivoxil), azitromicina, sulfato de indinavir, sertralina	1,40	0,07
Estado de la enfermedad	Conc. media log ₁₀ UI/ml	Sesgo log ₁₀ UI/ml
Anticuerpo antinuclear (ANA)	1,53	0,18
Lupus eritematoso sistémico (LES)	1,29	-0,06
Artritis reumatoide	1,39	0,04
Anticuerpos contra HBV	1,45	0,10
Cirrosis alcohólica	1,43	0,08
Factor reumatoide	1,43	0,08
Esteatohepatitis no alcohólica (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)	1,32	-0,03

Precisión en el laboratorio

La precisión del NeuMoDx HCV Quant Assay se determinó al analizar un panel de 7 componentes de muestras de HCV preparadas (mediante la incorporación de HCV Armored RNA y AcroMetrix HCV Control) con tres NeuMoDx Systems durante 12 días. Se determinaron las precisiones dentro de la serie, en el día y dentro del sistema, y se determinó que la desviación estándar general fue $\leq 0,26 \log_{10}$ UI/ml. No se observó ninguna diferencia significativa en el rendimiento de los sistemas, en los días o en las series, tal y como se muestra en la *tabla 11*. No se determinó la precisión entre operadores, ya que el operador no desempeña un papel importante en el procesamiento de las muestras con el NeuMoDx System.

Tabla 11. Precisión en el laboratorio: NeuMoDx HCV Quant Assay en los NeuMoDx Systems

	Conc. deseada [log ₁₀ UI/ml]	Conc. media [log ₁₀ UI/ml]	SD dentro del sistema	SD en el día	SD en la serie analítica	SD dentro del laboratorio (general)
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

Reproducibilidad entre lotes

Se determinó la reproducibilidad entre lotes del NeuMoDx HCV Quant Assay con tres lotes de reactivos clave distintos: NeuMoDx Lysis Buffer 3, NeuMoDx Extraction Plates y las NeuMoDx HCV Quant Test Strips. Se usó un panel de 7 componentes de HCV (que incorpora HCV Armored RNA Control y AcroMetrix HCV Control) para evaluar el rendimiento. El análisis se llevó a cabo con los tres lotes de reactivos en los tres sistemas durante 6 días. Se analizó la variabilidad del mismo lote y entre lotes distintos y los resultados se presentan en la *tabla 12*. El sesgo máximo total fue de $0,24 \log_{10}$ UI/ml y la SD máxima total fue de $0,33 \log_{10}$ UI/ml. No se observó ninguna diferencia significativa en el rendimiento entre lotes, ya que la cuantificación de todos los componentes del panel estaba dentro de la especificación de la tolerancia.

Tabla 12. Reproducibilidad entre lotes: NeuMoDx HCV Quant Assay

	Conc. deseada [log ₁₀ UI/ml]	Conc. media GENERAL [log ₁₀ UI/ml]	n (Resultados válidos por lote)	SESGO ABS	SD entre lotes	SD dentro del lote	SD general
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

Eficacia del control

El SPC2 está incluido en el NeuMoDx HCV Quant Assay para notificar cualquier fallo en los pasos del proceso o inhibición que afecte al rendimiento del ensayo. Se analizó la eficacia en condiciones representativas de fallos críticos de los pasos del proceso que podrían producirse durante el procesamiento de las muestras y que *es posible que no sean detectados* por los sensores que controlan el rendimiento del NeuMoDx System. Se pusieron a prueba muestras positivas (3 log₁₀ UI/ml) y muestras negativas en presencia de un control en las siguientes condiciones: presencia de inhibidor, sin administración de reactivo de lavado y sin expulsión de lavado. Las ineficiencias del proceso que tenían un efecto adverso en la detección o la cuantificación de HCV se reprodujeron en el rendimiento del valor diana del SPC2, tal como se muestra en la *tabla 13*. En todos los casos analizados, se mostró que el control de proceso de muestras supervisó adecuadamente las ineficiencias del proceso y la presencia de inhibidores o que la ineficiencia anticipada del proceso no tuvo un efecto adverso significativo sobre la detección del SPC2 ni sobre la detección y la cuantificación de HCV. Por tanto, el SPC2 puso de manifiesto ser satisfactorio a la hora de supervisar eficazmente el rendimiento del ensayo en el NeuMoDx System.

Tabla 13. Efectividad del control de procesos de muestras

Fallo del paso del proceso analizado	Estado de amplificación de control de procesos de muestras	Estado de la amplificación del analito del HCV	Resultado del ensayo
Presence of Inhibitor (Presencia de inhibidor)	Not Amplified (No amplificado)	Not Amplified (No amplificado)	Unresolved (No resuelto)
No Wash Delivered (Sin administración de lavado)	Not Amplified (No amplificado)	Not Amplified (No amplificado)	Unresolved (No resuelto)
No Wash Blowout (Sin expulsión de lavado)	Amplified (Amplificado)	Amplified (Amplificado)	Positive (Positivo) con cuantificación dentro de 0,3 log ₁₀ UI/ml de control

Tasa de resultados válidos

Se utilizó un análisis retrospectivo de los datos obtenidos durante la evaluación de rendimiento del NeuMoDx HCV Quant Assay en los NeuMoDx Systems para la determinación del porcentaje de los resultados válidos. Los resultados válidos de la prueba se denominarán Positive (Positivo), Negative (Negativo), los resultados no válidos de la prueba pueden notificarse como Indeterminate (IND) (Indeterminado [IND]) o Unresolved (UNR) (No resuelto [UNR]) en función del estado de la amplificación del analito y el control de proceso de la muestra. Un resultado IND suele ser el resultado de un error del instrumento que da lugar a un fallo de amplificación del analito y/o del control del proceso interno. Se asigna un resultado UNR a las muestras cuando tanto el analito como el control de proceso interno no pueden realizar la amplificación en ausencia de un error de instrumento detectado. En el análisis retrospectivo se incluyeron 1962 resultados individuales de NeuMoDx HCV Quant Assay, que incluían datos obtenidos tanto de muestras de suero como de plasma en el NeuMoDx 288 System y el NeuMoDx 96 System. Se determinó que la tasa de UNR era del 0,61 % (12/1962) y que la tasa de IND era del 0,41 % (8/1962); con lo cual se cumple con el criterio de aceptación del análisis. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que la tasa de resultados válidos del NeuMoDx HCV Quant Assay en las matrices clínicas y los NeuMoDx Systems era del 99,0 % con IC del 95 % (98,4-99,3).

Contaminación cruzada

La tasa de contaminación cruzada del NeuMoDx HCV Quant Assay se determinó mediante el análisis de tres conjuntos de muestras de HCV con muestras negativas y positivas altas alternas. En total, esto incluyó el análisis de 144 réplicas de una muestra humana negativa para el HCV y 144 réplicas de una muestra de HCV de valor cuantitativo alto a 8,2 log₁₀ UI/ml. Las 144 réplicas de la muestra negativa resultaron ser negativas, lo que demuestra que no se produjo una contaminación cruzada durante el procesamiento de las muestras en el NeuMoDx System.

Equivalencia de la matriz de muestra

Se realizaron análisis para poner de manifiesto la equivalencia de la matriz de muestras entre la sangre completa recogida en tubos de recogida con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y ácido citrato-dextrosa (ACD) para la preparación del plasma. Se realizaron análisis adicionales para determinar la equivalencia entre las muestras de plasma frescas y congeladas (recogidas en los dos tipos de tubos), así como de muestras de suero frescas y congeladas. Las muestras frescas se mantuvieron a una temperatura de 4 °C hasta que se les añadieron cuatro niveles de HCV y se analizaron para determinar la equivalencia. A continuación, se congelaron las muestras durante un mínimo de 24 horas a -20 °C. Tras este periodo de almacenamiento bajo congelación, se descongelaron las muestras y se volvieron a analizar. Los resultados de las muestras de suero y plasma frescas frente a congeladas y también de las muestras de plasma con EDTA frente a ACD se compararon mediante un análisis de regresión para determinar la equivalencia. Los datos demostraron una equivalencia excelente entre muestras de plasma con EDTA y ACD, muestras de plasma frescas y congeladas, y muestras de suero frescas y congeladas.

Se realizaron análisis adicionales para determinar la equivalencia del rendimiento del NeuMoDx HCV Quant Assay de las muestras primarias frente a las muestras secundarias. Se procesaron primero los paneles de muestras de donantes negativas para el HCV mezcladas con el analito del HCV (AccuPlex™ Recombinant HCV Control) y de muestras de donantes positivas para el HCV de los tubos de muestras primarios. Tras el procesamiento de los tubos primarios, el plasma o suero restante de cada muestra se distribuyó en partes alícuotas en un tubo de muestras secundario y se volvió a procesar. No se observó ninguna diferencia significativa en los resultados notificados entre el procesamiento de los tubos de muestras principales y secundarios.

Comparación del método clínico

Se evaluó el rendimiento cualitativo y cuantitativo del NeuMoDx HCV Quant Assay comparándolo con ensayos comparativos aprobados por la FDA/CE mediante el análisis de las muestras clínicas de plasma no diluidas de pacientes con infección por el HCV. El análisis se realizó internamente en NeuMoDx mediante un estudio con enmascaramiento único de muestras clínicas residuales no identificadas obtenidas de seis laboratorios de referencia externos. Se procesaron en total 323 muestras de plasma y 336 muestras de suero con el NeuMoDx HCV Quant Assay con enmascaramiento (simple) en varios NeuMoDx Molecular Systems. De estas muestras, se procesaron 35 muestras de plasma y 13 muestras de suero, tanto en el NeuMoDx 288 Molecular System como en el NeuMoDx 96 Molecular System. No fue posible procesar algunas de las muestras cuyo resultado fue INVALID (no válido) porque la cantidad de la muestra no era suficiente.

Los errores de procesamiento y del sistema obtenidos en los NeuMoDx Molecular Systems fueron mínimos y se cumplieron los criterios. Inicialmente, se obtuvieron 4 resultados INDETERMINATE (IND) (Indeterminado) para las muestras de plasma y 4 resultados IND para las muestras de suero, lo cual generó una tasa de IND inicial del 1 % (IC del 95 %: 0,5 %-3 %) para plasma y 1 % (IC del 95 %: 0,4 %-3 %) para suero. Inicialmente, se obtuvieron 3 resultados UNRESOLVED (UNR) (No resuelto) para las muestras de plasma y 5 resultados UNR para las muestras de suero, lo cual arrojó una tasa general del 1 % (IC del 95 %: 0,2 %-3 %) para plasma y 1 % (IC del 95 %: 0,6 %-4 %) para suero.

Las muestras que arrojaron resultados no válidos (IND/UNR) o un "Quantitation Error" (Error de cuantificación) e volvieron a analizar si quedaba un volumen suficiente, y en algunas muestras se realizó un paso de dilución para generar resultados válidos. En las 13 muestras con volumen suficiente para repetir el análisis (en estado puro o diluido), se obtuvo un resultado válido.

De los 321 resultados válidos obtenidos de las muestras de plasma y los 334 resultados válidos obtenidos de las muestras de suero, se notificaron 206 muestras de plasma y 154 muestras de suero como POSITIVE (POSITIVAS) con el NeuMoDx HCV Quant Assay, con sus valores de concentración correspondientes asignados mediante las pruebas de referencia. Se utilizaron los análisis de regresión de Deming y Passing-Bablok para establecer una correlación entre los valores de concentración del NeuMoDx HCV Quant Assay y los valores notificados por las pruebas de referencia, tanto para las muestras de plasma como de suero.

Se generaron gráficos de equivalencia para representar la correlación entre las concentraciones del NeuMoDx HCV Quant Assay y los valores de concentración de las pruebas de referencia para todas las muestras analizadas con el ajuste de regresión de Deming y Passing-Bablok, tal como se muestra en la *figura 7* y la *figura 8*. La calidad del ajuste de regresión de Deming se indica mediante un coeficiente de pendiente de 1,00 con un IC del 95 % (0,97; 1,03) y una intersección (sesgo) de -0,16 con un IC del 95 % (-0,37; 0,06), lo que muestra que los resultados de la concentración obtenidos entre el NeuMoDx HCV Quant Assay y las pruebas de referencia están altamente correlacionados y con un sesgo aceptable. La calidad del ajuste lineal de Passing-Bablok se indica mediante un coeficiente de pendiente de 1,02 con un IC del 95 % (0,99, 1,05) y una intersección (sesgo) de -0,28 con un IC del 95 % (-0,43, -0,14), lo que muestra que los resultados de la concentración obtenidos entre el NeuMoDx HCV Quant Assay y las pruebas de referencia están altamente correlacionados y con un sesgo aceptable, tal y como se muestra en la *tabla 14*.

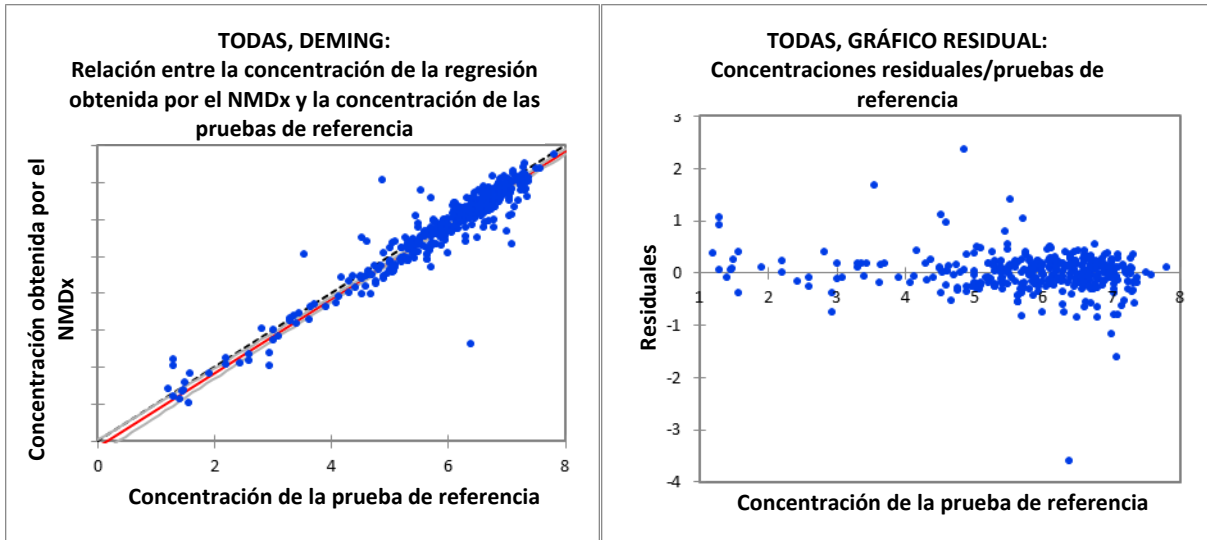


Figura 7: Gráficos de equivalencia (izquierda) y residual (derecha): análisis acumulativo (en ambos NeuMoDx Systems) de los resultados del NeuMoDx HCV Quant Assay en comparación con los resultados de la prueba de referencia de TODAS las muestras basado en el análisis de regresión de Deming.

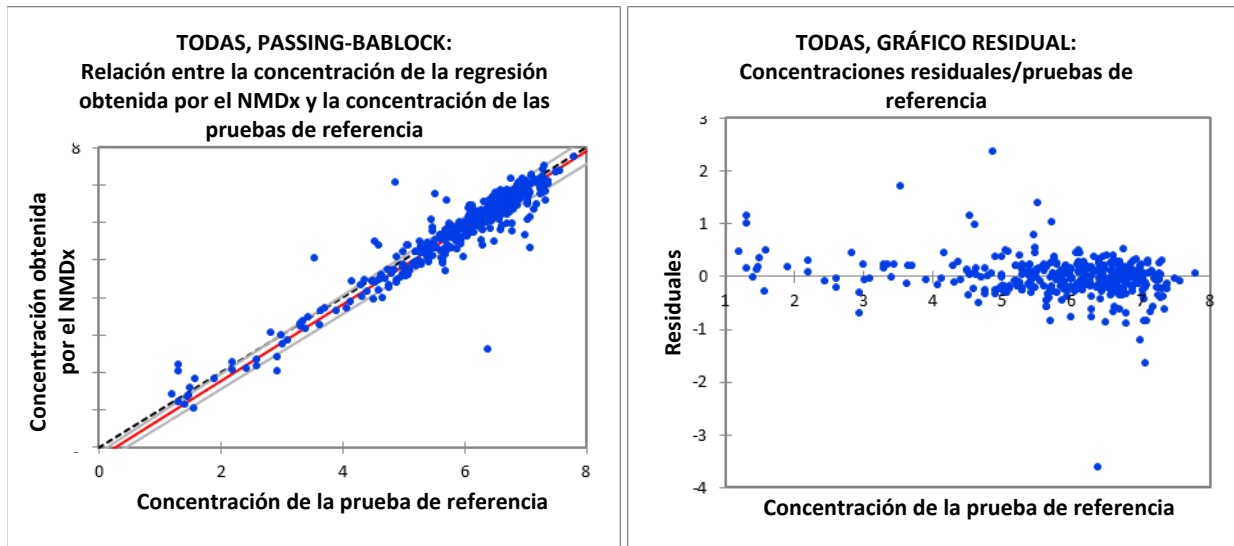


Figura 8: Gráficos de equivalencia (izquierda) y residual (derecha): análisis acumulativo (en ambos NeuMoDx Systems) de los resultados del NeuMoDx HCV Quant Assay en comparación con los resultados de la prueba de referencia de TODAS las muestras basado en el análisis de regresión de Passing-Bablok.

Tabla 14. Resumen del análisis de regresión lineal de Deming y Passing-Bablok

	Análisis de Deming		Análisis de Passing-Bablok	
	Intersección	Coefficiente de pendiente	Intersección	Coefficiente de pendiente
ACUMULATIVO (Todas las muestras de plasma + suero)	-0,16 IC del 95 % (-0,37; 0,06)	1,00 IC del 95 % (0,97; 1,03)	-0,28 IC del 95 % (-0,43; -0,14)	1,02 IC del 95 % (0,99; 1,05)

De los 655 resultados válidos obtenidos para las muestras de plasma y suero con el NeuMoDx HCV Quant Assay, se notificaron 361 positivos mediante las pruebas de referencia para HCV y se notificaron 294 negativos. La sensibilidad y la especificidad del NeuMoDx HCV Quant Assay se calcularon a partir de la comparación entre los datos de todas las muestras clínicas válidas y la prueba de referencia, que se recopila y se presenta en la *tabla 15*. De las 361 muestras positivas analizadas, también se notificaron 360 como positivas con el NeuMoDx HCV Quant Assay, lo que pone de manifiesto una sensibilidad del 99,7 % con un IC del 95 % (98,2 %-100 %). De las 294 muestras negativas analizadas, también se notificaron 271 como negativas con el NeuMoDx HCV Quant Assay, lo que pone de manifiesto una especificidad del 92,2 % con un IC del 95 % (88,3 %-94,9 %).

Se puso de manifiesto la equivalencia del NeuMoDx HCV Quant Assay a través de resultados altamente correlacionados de rendimiento del ensayo entre el NeuMoDx 288 Molecular System, el NeuMoDx 96 Molecular System y la prueba de referencia, tanto para las muestras de plasma como de suero.

Tabla 15. Resultados de la comparación de métodos cualitativos para el NeuMoDx HCV Quant Assay frente a las pruebas de referencia: plasma y suero

	Ensayo de referencia (POS)	Ensayo de referencia (NEG)	TOTAL
NeuMoDx HCV Quant Assay (POS)	360	23	383
NeuMoDx HCV Quant Assay (NEG)	1	271	272
TOTAL	361	294	655
SENSIBILIDAD = 99,7 % IC del 95 % (98,2 %-100 %) *ESPECIFICIDAD = 92,2 % IC del 95 % (88,3 %-94,9 %)			

***NOTA:** El LLoQ para NeuMoDx HCV Quant Assay es de 0,9 log₁₀ UI/ml, que es más bajo que el ensayo de comparación que se utiliza como prueba de referencia. Se realizó un análisis posterior en el que se excluyeron 9 muestras en las que NeuMoDx detectó el HCV, pero se notificaron como negativas mediante el ensayo de comparación. Al excluir estas 9 muestras, se calculó nuevamente la especificidad del NeuMoDx HCV Quant Assay y se estimó que era del 95,1 % con un IC del 95 % (91,7-97,2).

Pruebas de muestras elaboradas: flujo de trabajo utilizando un volumen de muestra de 200 µl

La correlación cuantitativa entre los flujos de trabajo utilizando un volumen de muestra de 200 µl y 550 µl se confirmó con un panel formado por muestras individuales de suero y plasma negativo para el HCV mezcladas con cuatro niveles conocidos de material de Accuplex HCV Control según lo establecido por el 5.º estándar internacional de la OMS para ARN del HCV para pruebas de ácidos nucleicos. Estas muestras individuales de suero y plasma se procesaron siguiendo flujos de trabajo para volúmenes de muestra de 550 µl y 200 µl para un total de 324 pruebas realizadas. Las comparaciones de las equivalencias entre la concentración notificada por el software NeuMoDx para los flujos de trabajo con volúmenes de muestras de 200 µl y 550 µl con el panel elaborado se realizaron en base a una muestra individual. Los análisis de regresión de Deming y Passing-Bablok tenían una pendiente de 1,003 y 1,000 con intersecciones de -0,082 y -0,085, respectivamente en plasma, y de 0,974 y 0,984 con intersecciones de 0,086 y 0,037 respectivamente en suero, lo que demuestra una excelente concordancia de las cuantificaciones de HCV entre los dos flujos de trabajo de volumen de procesamiento. Según una comparación Bland-Altman, el sesgo entre los dos flujos de trabajo fue mínimo. Asimismo, los análisis de regresión lineal simple con la concentración esperada y la concentración notificada para el flujo de trabajo de 200 µl tuvieron una pendiente de 1,0432 y un coeficiente de correlación de 0,994 (en el caso de plasma) y de 1,0007 y 0,993 (en el caso de suero), lo que confirma una vez más un excelente rendimiento cuando se sigue el flujo de trabajo utilizando un volumen de muestra de 200 µl para el NeuMoDx HCV Quant Assay. A continuación, en la *figura 9* y en la *figura 10* se resumen los resultados de estos estudios.

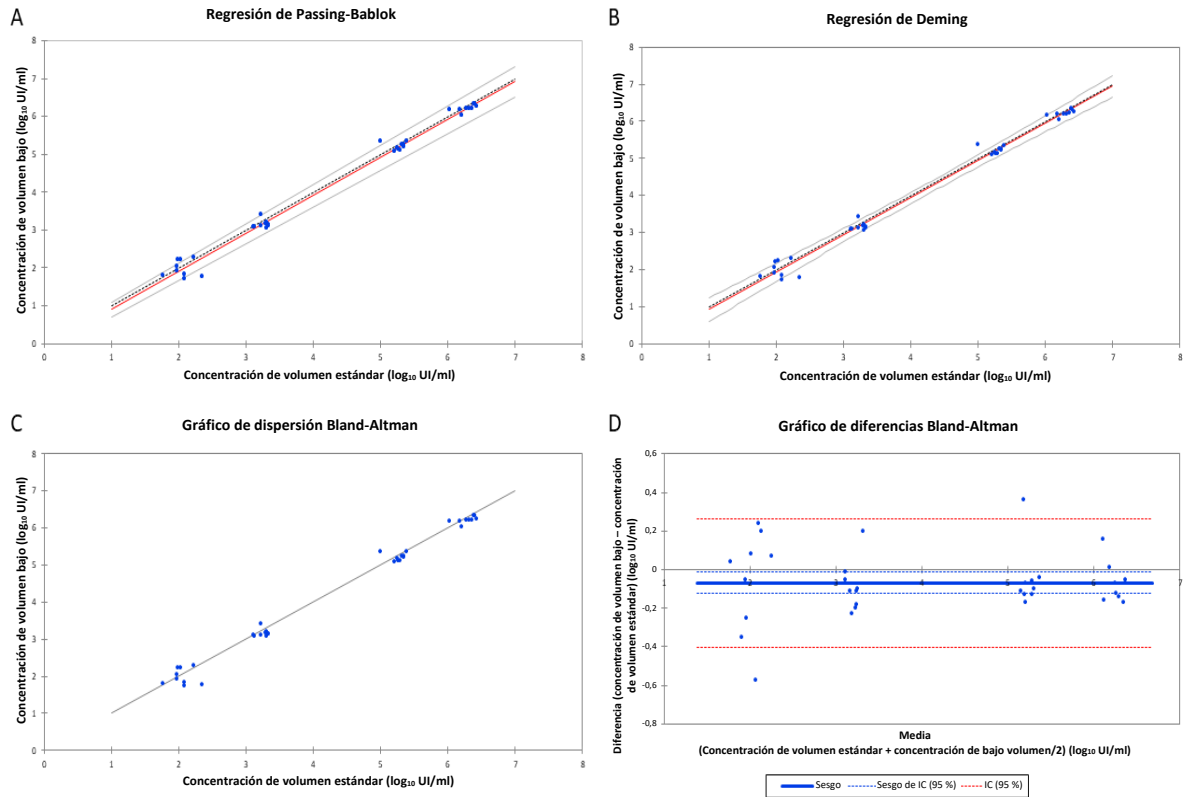


Figura 9: Comparaciones del gráfico de equivalencias entre concentraciones notificadas de un flujo de trabajo con volumen de muestra de 200 μ l y concentraciones notificadas de un flujo de trabajo con volumen de muestra de 550 μ L. A) Regresión de Passing-Bablok. B) Regresión de Deming. C) Gráfico de dispersión Bland-Altman D) Gráfico de diferencias Bland-Altman: muestras de plasma

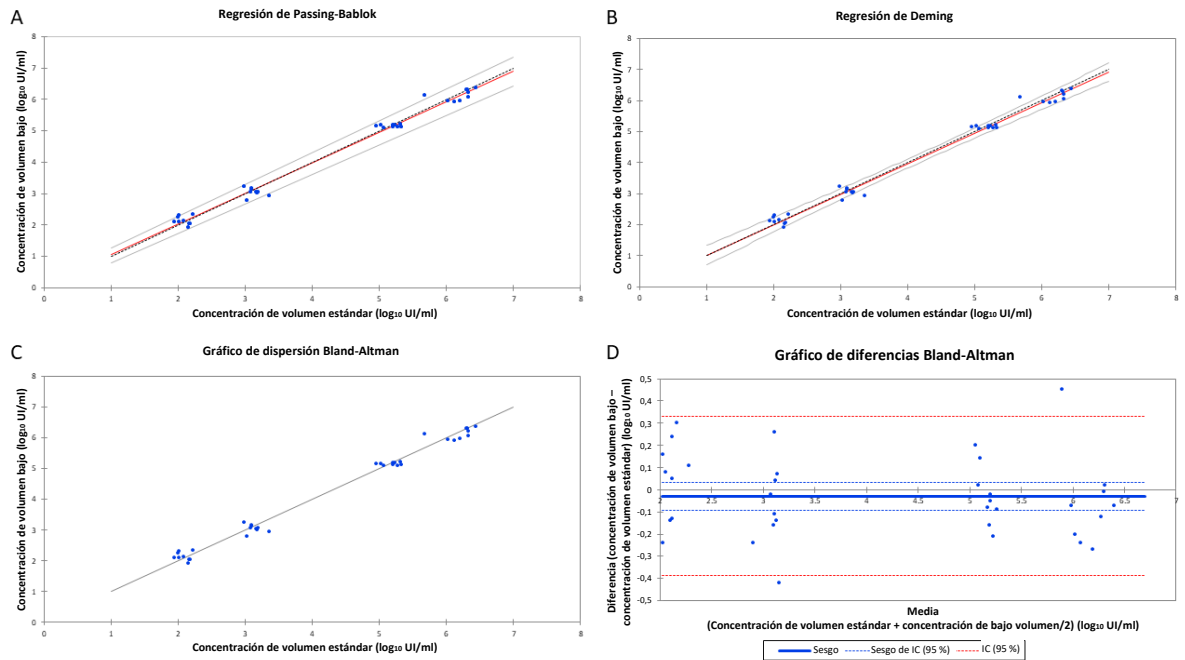


Figura 10: Comparaciones del gráfico de equivalencias entre concentraciones notificadas de un flujo de trabajo con volumen de muestra de 200 μ l y concentraciones notificadas de un flujo de trabajo con volumen de muestra de 550 μ L. A) Regresión de Passing-Bablok. B) Regresión de Deming. C) Gráfico de dispersión Bland-Altman D) Gráfico de diferencias Bland-Altman: muestras de suero

REFERENCIAS














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 COMERCIALES

NeuMoDx™ y NeuDry™ son marcas comerciales de NeuMoDx Molecular, Inc.
 AcroMetrix™ es una marca comercial de Thermo Fisher Scientific.
 Armored RNA® es una marca comercial registrada de Asuragen, Inc.
 BD Vacutainer® es una marca comercial registrada de Becton, Dickinson and Company
 BD, PPT™ y SST™ son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company
 TaqMan® es una marca comercial registrada de Roche Molecular Systems, Inc.

El resto de los nombres de productos, marcas comerciales y marcas comerciales registradas que pueden aparecer en este documento son propiedad de sus respectivos dueños.

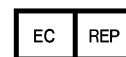
CLAVE DE SÍMBOLOS

R only	Solo para uso prescriptivo		Límite de temperatura
	Fabricante		No reutilizar
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Contenido suficiente para <n> pruebas
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Consultar las instrucciones de uso
	Número de referencia		Precaución
	Código de lote		Riesgos biológicos
	Fecha de caducidad		Marca CE



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

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



Emergo Europe B.V.
 Westervoortsedijk 60
 6827 AT Arnhem
 The Netherlands



Servicio técnico/Informes de vigilancia: support@qiagen.com

Patente: www.neumodx.com/patents