

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

CUIDADO: Apenas para distribuição fora dos EUA

IVD**Para uso em diagnóstico *in vitro* com os NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular Systems**Versão eletrônica disponível em www.qiaagen.com/neumodx-ifu

Para obter instruções detalhadas, consulte o Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System; nº ref. 40600108

Para obter instruções detalhadas, consulte o Manual do operador NeuMoDx 96 Molecular System; nº ref. 40600317

USO PREVISTO

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay é um teste de diagnóstico de RT-PCR em tempo real *in vitro* multiplex destinado à detecção e diferenciação qualitativa simultânea do RNA do vírus influenza A (Flu A), vírus influenza B (Flu B), vírus sincicial respiratório (Respiratory Syncytial Virus, RSV) e SARS-CoV-2 a partir de espécimes de swab nasofaríngeo (NF) coletados em meio de transporte, de indivíduos com sinais e sintomas de uma doença semelhante à influenza (Influenza like illness, ILI).

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay, conforme realizado no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System, incorpora a extração automatizada de RNA para isolar os ácidos nucleicos alvo do espécime e a RT-PCR em tempo real, tendo como alvo uma única região conservada para a Flu A e o RSV e duas regiões conservadas para o SARS-CoV-2 e a Flu B.

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

Os resultados negativos não excluem a infecção por Flu A, Flu B, RSV ou SARS-CoV-2 e não devem ser usados como o único fundamento para o diagnóstico, tratamento ou outras decisões de gestão do paciente. Os resultados negativos devem ser combinados com observações clínicas, histórico do paciente e/ou informações epidemiológicas.

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay destina-se a ser usado por pessoal de laboratório clínico qualificado, especificamente instruído e treinado nas técnicas de RT-PCR em tempo real e procedimentos de diagnóstico *in vitro* e/ou nos NeuMoDx Molecular Systems. O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay não é destinado a autotestes ou testes descentralizados (point-of-care, POC).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay é um ensaio qualitativo para uso nos sistemas de instrumentos NeuMoDx 96 e NeuMoDx 288 para a detecção de RNA do SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e/ou RSV em amostras de swab nasofaríngeo. O ensaio não diferencia entre o RNA do RSV A e do RSV B. Os espécimes de swab nasofaríngeo são coletados em Copan Universal Transport Medium (UTM-RT®) (Copan UTM-RT, Copan, CA, EUA) ou BD™ Universal Viral Transport System (UVT) (BD™ UVT, BD, NJ, EUA). O teste usa um Controle de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) de RNA interno que é incorporado durante o preparo da amostra e tem a função de monitorar todo o processo de preparo da amostra, transcrição reversa e amplificação por PCR. O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay permite fluxos de trabalho de processamento de até dois espécimes com base nas necessidades do laboratório: um fluxo de trabalho Direct (Direto) e um fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado). O NeuMoDx Molecular System realiza automaticamente todas as etapas necessárias para extrair o ácido nucleico alvo, prepara o RNA isolado para a transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real e, se presentes, amplifica e detecta os produtos de amplificação. O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay tem como alvo as regiões conservadas dos genes Nsp2 e O-ribose metiltransferase do SARS-CoV-2, regiões na proteína da matriz do vírus influenza A e do vírus sincicial respiratório e os genes da proteína da matriz e da proteína não estrutural NS1 do vírus Influenza B.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

A técnica mais moderna para a detecção da infecção aguda por FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 é a amplificação de ácido nucleico de regiões conservadas dentro do genoma-alvo, que está em consonância com a transcrição reversa seguida de PCR em tempo real utilizada pelo NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay, conforme realizado no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System.

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay combina a extração automatizada de RNA com a amplificação/detecção de RNA do SARS-CoV-2, Flu A, Flu B e/ou RSV por meio de RT-PCR em tempo real. As amostras de swab nasofaríngeo são coletadas no Copan UTM-RT System ou no BD™ UVT System. O fluxo de trabalho Direct (Direto) permite que o tubo de coleta de swab ou uma alíquota do meio de transporte em um tubo secundário seja identificado por código de barras e carregado no NeuMoDx System para processamento. Alternativamente, um espécime de swab em meio de transporte pode ser inicialmente tratado com um volume igual de NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) antes de ser carregado no sistema sem mais intervenções do usuário. O NeuMoDx System aspira automaticamente uma alíquota de espécime para misturar com NeuMoDx Lysis Buffer 3 para o fluxo de trabalho Direct (Direto) ou uma alíquota de espécime pré-tratado para misturar com Lysis Buffer 2 e os reagentes contidos na NeuMoDx Extraction Plate para iniciar o processamento. Para o uso específico do fluxo de trabalho Direct (Direto), o tubo de coleta primário (com o swab e a tampa removidos) ou uma alíquota do meio de amostra em um tubo secundário é identificado com código de barras e carregado no NeuMoDx System usando um transportador de tubos de espécime designado. Para o fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado), o espécime em meio de transporte é inicialmente tratado com um volume igual de NeuMoDx VVLB antes de ser carregado no sistema. Para o fluxo de trabalho Direct (Direto), uma alíquota de 400 µL da amostra é aspirada pelo NeuMoDx System e misturada com um volume igual de NeuMoDx Lysis Buffer 3, enquanto para o fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado), 550 µL da amostra pré-tratada são combinados com um volume igual de Lysis Buffer 2. O NeuMoDx System automatiza e integra a extração e concentração de RNA, a preparação de reagentes e a amplificação/detecção de ácidos nucleicos das sequências-alvo usando RT-PCR em tempo real. O Controle de processo de amostras (Sample Process Control 2, SPC2) ajuda a monitorar a presença de substâncias inibidoras e falhas de sistema, processos ou reagentes. Não é necessária qualquer intervenção do operador uma vez que o espécime estiver carregado no NeuMoDx System.

O NeuMoDx System usa uma combinação de calor, enzima lítica e reagentes de extração para efetuar automaticamente a lise, a extração de RNA e a remoção de inibidores. Os ácidos nucleicos liberados são capturados por partículas paramagnéticas. As partículas com ácido nucleico ligado são carregadas no NeuMoDx Cartridge, no qual os elementos não ligados são retirados por lavagem usando o NeuMoDx Wash Reagent. O RNA ligado é, em seguida, eluído usando o NeuMoDx Release Reagent. O NeuMoDx System usa o RNA eluído para reidratar reagentes de amplificação NeuDry™ patenteados contendo todos os elementos necessários para a amplificação dos alvos específicos da Flu A, Flu B, RSV, SARS-CoV-2 e SPC2. Isso permite a amplificação e a detecção simultâneas de todas as sequências de RNA dos alvos e do controle de processo de amostras. Após a reconstituição dos reagentes de RT-PCR secos, o NeuMoDx System dispensa a mistura preparada pronta para RT-PCR em uma câmara de PCR (por espécime) do NeuMoDx Cartridge. A transcrição reversa, a amplificação e a detecção das sequências do controle e do alvo (se presentes) ocorrem na área da câmara de PCR. O NeuMoDx Cartridge foi projetado para conter o amplicon gerado após a RT-PCR em tempo real, eliminando praticamente o risco de contaminação pós-amplificação.

Os alvos amplificados são detectados em tempo real usando química de sondas de hidrólise (comumente chamada de química TaqMan®) usando moléculas de sonda fluorogênica de oligonucleotídeos específicas dos amplicons dos respectivos alvos. As sondas TaqMan consistem em um fluoróforo covalentemente ligado à extremidade 5' da sonda de oligonucleotídeos e um supressor na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, o fluoróforo e o supressor estão próximos, permitindo que a molécula supressora suprima a fluorescência emitida pelo fluoróforo via transferência de energia por ressonância de Förster. Transferência de energia por ressonância de Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

As sondas TaqMan foram projetadas de forma que se anelem dentro de uma região de cDNA amplificada por um conjunto específico de primers. À medida que a Taq DNA polimerase expande o primer e sintetiza a nova cadeia, a atividade exonuclease de 5' a 3' da Taq DNA polimerase degrada a sonda que se anelou ao modelo. A degradação da sonda libera o fluoróforo e quebra a sua proximidade com o supressor, superando assim o efeito de supressão devido à FRET e permitindo a detecção do fluoróforo. O sinal fluorescente resultante detectado no termociclador de RT-PCR do NeuMoDx System é diretamente proporcional ao fluoróforo liberado e pode ser correlacionado à quantidade de alvo presente.

O canal de detecção de fluorescência para cada alvo do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay é apresentado na tabela abaixo. O software do NeuMoDx System monitora o sinal fluorescente emitido pelas sondas TaqMan no final de cada ciclo de amplificação. Quando a termociclagem é concluída, o software do NeuMoDx System analisa os dados e relata um resultado (POSITIVE [Positivo]/NEGATIVE [Negativo]/INDETERMINATE [Indeterminado]/NO RESULT [Sem resultado]/UNRESOLVED [Não resolvido]).

Tabela 1. Canais de detecção

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

REAGENTES/CONSUMÍVEIS

Material fornecido

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

Materiais necessários, mas não fornecidos (disponibilizados separadamente pela NeuMoDx)

REF	Conteúdo
901200	NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls <i>Conjuntos de uso único de controles positivos e negativos de FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 para estabelecer a validade diária do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (1 frasco de cada controle = 1 conjunto)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Partículas paramagnéticas, enzima lítica e controles de processo de amostras secas</i>
400500**	NeuMoDx Lysis Buffer 2
400600*	NeuMoDx Lysis Buffer 3
401500**	NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Hamilton® CO-RE / CO-RE II Tips (300 µL) with Filters
235905	Hamilton CO-RE / CO-RE II Tips (1000 µL) with Filters

* Só é necessário para o processamento de amostras usando o fluxo de trabalho Direct (Direto), sem uma etapa de pré-tratamento. Consulte a seção "Instruções de uso" abaixo.

** Só é necessário para o processamento de amostras usando o fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado), com uma etapa de pré-tratamento. Consulte a seção "Instruções de uso" abaixo.

Swabs e meio de transporte (não fornecidos)

Tipo de amostra	Dispositivo de coleta recomendado	Swab recomendado
Swab nasofaríngeo	3 mL de Universal Transport Medium (Meio de transporte universal) (Copan UTM-RT, Copan, CA, EUA, 305C) ou 3 mL de Universal Viral Transport System (Sistema de transporte viral universal) (BD UVT, BD, NJ, EUA, BD 220531)	Flexible Minitip Nylon® Flocked Swab (Copan, CA, EUA) ou Flexible Minitip Flocked Swab (BD, NJ, EUA)

Instrumentos necessários

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



AVISOS E PRECAUÇÕES

- O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay destina-se ao uso em diagnóstico *in vitro* exclusivamente com os NeuMoDx Systems.
- Não use os reagentes ou consumíveis após a data de validade indicada.
- Não use um reagente se o respectivo selo de segurança estiver rompido ou se a embalagem estiver danificada no momento da entrega.
- Não use consumíveis ou reagentes se a respectiva bolsa protetora estiver aberta ou quebrada no momento da entrega.
- O volume mínimo de espécime de alíquotas secundárias depende do tamanho do tubo/transportador de tubos de espécime, conforme definido abaixo. Volumes de espécime inferiores ao mínimo especificado poderão resultar em um erro "Quantity Not Sufficient" (Quantidade insuficiente).
- O uso de espécimes armazenados a temperaturas inadequadas ou além dos prazos de armazenamento especificados poderá produzir resultados inválidos ou errôneos.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase) de todos os reagentes e consumíveis. É recomendado o uso de pipetas de transferência descartáveis estéreis e livres de RNase ao usar tubos secundários. Use uma pipeta nova para cada espécime.
- Para evitar contaminação, não manuseie ou destrua qualquer NeuMoDx Cartridge pós-amplificação. Sob nenhuma circunstância recolha os NeuMoDx Cartridges do recipiente de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 288 Molecular System) ou da lixeira de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 96 Molecular System). O NeuMoDx Cartridge foi projetado para evitar contaminação.
- Caso o laboratório também realize testes de PCR em tubo aberto, é necessário ter cuidado para garantir que a NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip, os consumíveis e reagentes adicionais necessários para a testagem, o equipamento de proteção individual, como luvas e jalecos, e o NeuMoDx System não sejam contaminados.
- Devem ser usadas luvas de nitrila limpas e sem talco ao manusear reagentes e consumíveis NeuMoDx. Deve-se ter especial cuidado para não tocar na superfície superior do NeuMoDx Cartridge, na superfície do selo de papel alumínio da NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip e da NeuMoDx Extraction Plate ou na superfície superior do recipiente do NeuMoDx Lysis Buffer; os consumíveis e reagentes devem ser manuseados tocando somente nas superfícies laterais.
- Os NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls [REF 901200] devem ser processados a cada 24 horas ao realizar a testagem com o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
- As Fichas de dados de segurança (FDS) de cada reagente (conforme aplicável) estão disponíveis em www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Lave muito bem as mãos após realizar o teste.
- Não pipete com a boca. Não fume, beba ou coma em áreas onde estão sendo manuseados espécimes ou reagentes.
- Sempre manuseie os espécimes como se fossem infecciosos e de acordo com procedimentos laboratoriais de segurança como os descritos na publicação *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹ e no Documento M29-A4 do CLSI.²
- Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de segurança. Para obter mais informações, consulte as Fichas de dados de segurança (SDS) apropriadas.
- Descarte os resíduos e os reagentes não utilizados de acordo com os regulamentos nacionais, federais, regionais, estaduais e locais.

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



Contém: ácido bórico; nonilfenol etoxilado. Perigo! Causa irritação cutânea. Causa irritação ocular grave. Pode prejudicar a fertilidade ou o feto. Nocivo à vida aquática com efeitos duradouros. Obtenha instruções especiais antes de usar. Não manuseie antes de ler e compreender todas as precauções de segurança. Use luvas de proteção/roupas de proteção/proteção ocular/proteção facial. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Consulte um médico. Armazene trancado. Descarte o conteúdo/recipiente em um local de descarte de resíduos aprovado.

Informações de emergência

CHEMTREC

Fora dos EUA e Canadá +1 703-527-3887

Descarte

O produto contém nonilfenol etoxilado, uma substância perturbadora para o sistema endócrino que pode ser prejudicial ao meio ambiente.

Descarte-o como resíduo perigoso de acordo com os regulamentos locais e nacionais. Isso também se aplica a produtos não usados.

Não descarte resíduos líquidos no sistema de esgoto.

Siga as recomendações da Ficha de dados de segurança (FDS).



ARMAZENAMENTO, MANUSEIO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

- As NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips permanecem estáveis na sua embalagem primária até a data de validade indicada no rótulo do produto quando armazenadas entre 15 °C e 28 °C.
- Não carregue novamente nenhum produto de teste que tenha sido carregado anteriormente em outro NeuMoDx System.
- Uma vez carregada, a NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip pode permanecer dentro do NeuMoDx System por 14 dias. A vida útil restante das tiras de teste carregadas é controlada pelo software e informada ao usuário em tempo real. O NeuMoDx System solicitará a remoção de tiras de teste que tenham sido usadas além do prazo permitido.

COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES

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

1. Os espécimes devem ser coletados usando o Copan UTM-RT® System ou BD™ UVT System com os swabs flocados de nylon validados (consulte Swabs e meio de transporte). Além disso, são aceitáveis os tipos de swab flocado, de poliéster e de nylon. Siga as instruções do fabricante quanto a coleta, transporte e armazenamento de espécimes.
2. Os espécimes podem ser testados em tubos de coleta primários ou tubos de espécime secundários compatíveis.
3. Os espécimes podem ser armazenados no NeuMoDx System por até 8 horas antes do processamento. Se for necessário tempo adicional de armazenamento, é recomendado que os espécimes sejam refrigerados ou congelados como alíquotas secundárias.
4. Os espécimes preparados devem ser armazenados entre 2 e 8 °C por no máximo 7 dias antes dos testes.
5. Se os espécimes forem expedidos, eles devem ser embalados e rotulados de acordo com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis.
6. Avance para a seção *Preparação para teste*.

PREPARAÇÃO PARA TESTE

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay acomoda dois fluxos de trabalho diferentes, dependendo da preferência do usuário/laboratório:

Fluxo de trabalho 1: **DIRECT** (Direto) – o espécime de swab em meio de transporte é carregado diretamente no NeuMoDx System em um tubo de coleta primário ou em um tubo de espécime secundário

-ou-

Fluxo de trabalho 2: **PRETREATED** (Pré-tratado) – o espécime de swab em meio de transporte é pré-tratado com o NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer antes de ser carregado no NeuMoDx System em um tubo de coleta primário ou em um tubo de espécime secundário

Preparação para teste – Fluxo de trabalho DIRECT (Direto) para espécimes de swab diretos

1. Aplique uma etiqueta de código de barras de espécime em um tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System, conforme descrito na etapa 3 abaixo.
2. Se estiver testando o espécime no tubo de coleta primário, coloque o tubo com código de barras em um transportador de tubos de espécime e certifique-se de remover a tampa e o swab antes de carregar no NeuMoDx System.
3. Alternativamente, uma alíquota do meio de transporte pode ser transferida para um tubo secundário com código de barras e colocada em um transportador de tubos de espécime. Se estiver usando um tubo secundário, transfira uma alíquota do meio de transporte para o tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System de acordo com os volumes definidos abaixo:
 - Transportador de tubos de espécime (32 tubos): 11–14 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura; volume mínimo de capacidade ≥600 µL
 - Transportador de tubos de espécime (24 tubos): 14,5–18 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura; volume mínimo de capacidade ≥1000 µL
 - Transportador de tubos de espécime de baixo volume (32 tubos): tubo para microcentrífuga de fundo cônico de 1,5 mL; volume mínimo de capacidade ≥500 µL

Preparação para teste – Fluxo de trabalho PRETREATED (Pré-tratado) para espécimes de swab pré-tratados

Nota: Permita que o Vantage Viral Lysis Buffer alcance a temperatura ambiente (15 a 30 °C) antes de usá-lo.

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

1. Trate previamente o meio de transporte de espécime com um volume de 1:1 de NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. Isso pode ser feito no tubo de coleta de swab primário se o volume de meio de transporte for conhecido. Alternativamente, o pré-tratamento pode ser feito em um tubo secundário combinando uma alíquota do meio de transporte com um volume igual de NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer. A mistura resultante deve atender aos requisitos de volume mínimo especificados na etapa 4 abaixo.
2. Misture suavemente com a pipeta para garantir uma distribuição uniforme do NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer.
3. Se estiver testando o espécime pré-tratado no tubo de coleta primário, coloque o tubo com código de barras em um transportador de tubos de espécime e certifique-se de remover a tampa e o swab antes de carregar no NeuMoDx System.
4. Se estiver usando um tubo secundário, transfira uma alíquota da amostra pré-tratada para um tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System e coloque-o em um transportador de tubos de espécime de acordo com os volumes definidos abaixo:
 - Transportador de tubos de espécime (32 tubos): 11–14 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura; volume mínimo de capacidade $\geq 750 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime (24 tubos): 14,5–18 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura; volume mínimo de capacidade $\geq 1100 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime de baixo volume (32 tubos): tubo para microcentrífuga de fundo cônico de 1,5 mL; volume mínimo de capacidade $\geq 650 \mu\text{L}$

Operação do NeuMoDx System

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

1. Carregue o pedido de teste no NeuMoDx System de acordo com fluxo de trabalho usado na preparação para teste:
 - Os espécimes de swab puros e não tratados, preparados usando o fluxo de trabalho DIRECT (Direto), são testados definindo o espécime como "**Transport Medium**" (Meio de transporte)
 - Os espécimes de swab pré-tratados com NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer usando o fluxo de trabalho PRETREATED (Pré-tratado) são testados definindo o espécime como "**UserSpecified1**" (Especificado pelo usuário 1)Se não for definido no pedido de teste, o tipo de espécime Transport Medium (Meio de transporte) (fluxo de trabalho direto) em um **Secondary Tube** (Tubo secundário) será definido como padrão.
2. Preencha um ou mais NeuMoDx System Test Strip Carrier(s) com NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip(s) e use a tela sensível ao toque para carregar o(s) transportador(es) de tiras de teste no NeuMoDx System.
3. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, adicione os consumíveis necessários aos transportadores de consumíveis do NeuMoDx System e use a tela sensível ao toque para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System.
4. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, reponha o NeuMoDx Wash Reagent e/ou NeuMoDx Release Reagent e esvazie os resíduos de preparação, o recipiente de resíduos de risco biológico (somente NeuMoDx 288 Molecular System), a lixeira de resíduos de ponteiros (somente NeuMoDx 96 Molecular System) e/ou a lixeira de resíduos de risco biológico (somente NeuMoDx 96 Molecular System), conforme apropriado.
5. Carregue o(s) tubo(s) de espécime em um transportador de tubos de espécime e certifique-se de remover as tampas e os swabs de todos os tubos.
6. Coloque o(s) transportador(es) de tubos de espécime na prateleira de autocarregamento e use a tela sensível ao toque para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System. Isso iniciará o processamento dos espécimes carregados para os testes identificados, desde que haja um pedido de teste válido no sistema.

LIMITAÇÕES

1. A NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip só pode ser usada em NeuMoDx Systems.
2. O desempenho da NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip foi estabelecido para espécimes de swab nasofaríngeo coletados por um clínico em meio de transporte. O uso da NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip com outros tipos de espécimes e meios de coleta não foi avaliado e as características de desempenho são desconhecidas.
3. Visto que a detecção de alvos virais geralmente depende do número de partículas virais presentes na amostra, a confiabilidade dos resultados depende da coleta, do manuseio e do armazenamento adequados do espécime.
4. Podem ocorrer resultados errôneos devido a problemas de coleta, manuseio, armazenamento, erro técnico ou confusão entre tubos de espécime. Além disso, podem ocorrer resultados falso-negativos devido a uma quantidade de partículas virais na amostra inferior ao limite de detecção do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.
5. A operação do NeuMoDx System está limitada a pessoal com treinamento para utilizar o NeuMoDx System.

6. Se os alvos de Flu A, Flu B, RSV, SARS-CoV-2 e SPC2 não forem amplificados, é relatado um resultado inválido (Indeterminate [Indeterminado] ou Unresolved [Não resolvido]), e o teste deverá ser repetido.
7. Se ocorrer um erro de sistema antes da conclusão do processamento da amostra, "No Result" (Sem resultado) será relatado e o teste deverá ser repetido.
8. Um resultado positivo não indica necessariamente a presença de influenza A, influenza B, SARS-CoV-2 e/ou RSV viáveis. Contudo, um resultado positivo pressupõe a presença de RNA da influenza A, influenza B, SARS-CoV-2 e/ou RSV.
9. As exclusões ou mutações nas regiões conservadas que são alvo do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay podem afetar a detecção ou levar a um resultado errôneo.
10. Os resultados do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay devem ser usados como um complemento às observações clínicas e outras informações à disposição do médico.
11. É recomendável aplicar boas práticas de laboratório, incluindo a troca de luvas entre o manuseio de espécimes de pacientes para evitar contaminação.

RESULTADOS

Os resultados disponíveis podem ser visualizados ou impressos na guia "Results" (Resultados) da janela "Results" (Resultados) na tela sensível ao toque do NeuMoDx System. Os resultados do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay são gerados automaticamente pelo software do NeuMoDx System usando o algoritmo de decisão e parâmetros de processamento de resultados especificados no arquivo de definições do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay (FluA-B-RSV-CoV-2 ADF, versão 4.0.0 ou superior). Um resultado do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay pode ser relatado como Negative (Negativo), Positive (Positivo), Indeterminate (Indeterminado), No Result (Sem resultado) ou Unresolved (Não resolvido) com base no estado de amplificação do alvo e do SPC2. Os resultados são relatados com base no algoritmo de decisão de processamento de resultados do ADF, resumidos abaixo na *Tabela 2*.

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

RESULTADO GLOBAL	ALVO 1 (Flu A) FAM	ALVO 2 (Flu B) HEX	ALVO 3 (SARS-CoV-2) TX RED	ALVO 4 (RSV) Far Red	CONTROLE DE PROCESSO (SPC2) Red	INTERPRETAÇÃO
POSITIVE (Target RNA Detected) (Positivo [RNA-alvo detectado])	AMPLIFIED (Amplificado) [5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR > 2,0 AND (E) EP ≥ 750] OR (OU) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND [E] EP ≥ 750)	N/A	N/A	N/A	N/A	RNA de Flu A detectado
	N/A	AMPLIFIED (Amplificado) [5 ≤ Ct < 28 AND (E) EPR > 1,5 AND (E) EP ≥ 600] OR (OU) [28 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 600]	N/A	N/A	N/A	RNA de influenza B detectado
	N/A	N/A	AMPLIFIED (Amplificado) [5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR > 1,5 AND (E) EP ≥ 1200] OR (OU) [25 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 1200]	N/A	N/A	RNA do SARS-CoV-2 detectado
	N/A	N/A	N/A	AMPLIFIED (Amplificado) [5 ≤ Ct < 30 AND (E) EPR > 1,15 AND (E) EP ≥ 1200] OR (OU) [30 ≤ Ct ≤ 37 AND (E) EP ≥ 1200]	N/A	RNA de RSV detectado
NEGATIVE (Target RNA Not Detected) (Negativo [RNA-alvo não detectado])	NOT AMPLIFIED (Não amplificado) N/A OR (OU) (5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR ≤ 2,0) OR (OU) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND [E] EP < 750) OR (OU) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (Não amplificado) N/A OR (OU) (5 ≤ Ct < 28 AND (E) EPR ≤ 1,5) OR (OU) (28 ≤ Ct ≤ 37 AND [E] EP < 600) OR (OU) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (Não amplificado) N/A OR (OU) (5 ≤ Ct < 25 AND (E) EPR ≤ 1,5) OR (OU) (25 ≤ Ct ≤ 37 AND [E] EP < 1200) OR (OU) (Ct > 37)	NOT AMPLIFIED (Não amplificado) N/A OR (OU) (5 ≤ Ct < 30 AND (E) EPR ≤ 1,15) OR (OU) (30 ≤ Ct ≤ 37 AND [E] EP < 1200) OR (OU) (Ct > 37)	AMPLIFIED (Amplificado) (24 ≤ Ct ≤ 31 AND (E) EP ≥ 1800)	RNA de Flu A, Flu B, RSV e SARS-CoV-2 não detectado
NR*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Não amplificado, Erro de sistema detectado, Processamento da amostra cancelado)					O processamento da amostra foi cancelado; testar novamente a amostra
IND*	Not Amplified, System Error Detected, Sample Processing Completed (Não amplificado, Erro de sistema detectado, Processamento da amostra concluído)					Todos os resultados do alvo foram inválidos; testar novamente a amostra
UNR*	Not Amplified, No System Errors Noted (Não amplificado, Nenhum erro de sistema detectado)					Todos os resultados do alvo foram inválidos; testar novamente a amostra

* O sistema possui a capacidade opcional de reexecução/repetição para permitir o reprocessamento automático no caso de um resultado inválido (Inválido) para minimizar atrasos no relato de resultados.

Resultados inválidos

Se um NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay realizado no NeuMoDx System não gerar um resultado válido, ele será relatado como Indeterminate (Indeterminado), No Result (Sem resultado) ou Unresolved (Não resolvido), com base no tipo de erro ocorrido, e o teste deverá ser repetido a fim de obter um resultado válido.

Um resultado Indeterminate (Indeterminado) será relatado se um erro do NeuMoDx System for detectado durante o processamento da amostra. No caso de um resultado Indeterminate (Indeterminado), é recomendável repetir o teste.

Um resultado No Result (Sem resultado) será relatado se um erro do NeuMoDx System for detectado e o processamento da amostra for cancelado. No caso de um resultado No Result (Sem resultado), é recomendável repetir o teste.

Um resultado Unresolved (Não resolvido) será relatado se nenhum alvo for detectado e não houver amplificação do controle de processo de amostras, o que indica uma possível falha dos reagentes ou a presença de inibidores. No caso de um resultado Unresolved (Não resolvido), um primeiro passo recomendável é repetir o teste. Se a repetição do teste falhar, é possível utilizar um espécime diluído para mitigar os efeitos de uma possível inibição.

Consulte o Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System (nº ref.: 40600108) ou o Manual do operador do NeuMoDx 96 Molecular System (nº ref.: 40600317) para obter uma lista de códigos de erro que podem estar associados a qualquer resultado inválido.

O NeuMoDx System está equipado com a capacidade automática de reexecução/repetição que o usuário final pode optar por usar para garantir que um resultado INVALID (Inválido) seja reprocessado automaticamente para minimizar atrasos no relato de resultados.

Controle de qualidade

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

Controles externos

- 1) É necessário que os usuários processem um conjunto de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Controls [REF 901200] a cada 24 horas e antes de processar amostras de pacientes. Se não houver um conjunto de resultados de controles externos válido, o software do NeuMoDx System solicitará que o usuário processe os controles antes de ser possível relatar resultados de amostras.
- 2) Se forem necessários controles externos, processe-os (1 controle positivo e 1 controle negativo):

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

- 3) Ao processar controles externos, coloque os controles em um transportador de tubos de espécime e use a tela sensível ao toque para carregar o transportador no NeuMoDx System a partir da prateleira de autocarregamento. O NeuMoDx System reconhecerá os códigos de barras e iniciará o processamento dos controles, a não ser que os reagentes ou consumíveis necessários para os testes não estejam disponíveis.
- 4) A validade desses controles externos será avaliada pelo NeuMoDx System com base nos resultados esperados.

NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 External Control	Resultado de FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2	Resultado de SPC2
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Positive Control(s)	FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 RNA Detected (RNA de FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 detectado)	N/A
NeuMoDx Flu A/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Negative Control(s)	FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 RNA Not Detected (RNA de FluA, FluB, RSV, SARS-CoV-2 não detectado)	SPC2 Positive (Positivo para SPC2)

- 5) Os resultados discrepantes de controles externos devem ser gerenciados da seguinte forma:
 - a) Um resultado de teste Positive (Positivo) relatado para uma amostra de controle negativo pode indicar contaminação e os procedimentos de controle de qualidade do laboratório precisam ser analisados a fim de encontrar a raiz do problema. Certifique-se de usar áreas separadas para a preparação de amostras, manuseio de controles e preparação da RT-PCR. Para obter mais dicas de solução de problemas, consulte o Manual do operador do *NeuMoDx 288 ou 96 Molecular System*.
 - b) Um resultado de teste Negative (Negativo) relatado para uma amostra de controle positivo pode indicar um problema relacionado com o reagente ou com o NeuMoDx System. Para obter dicas de solução de problemas, consulte o *Manual do operador do NeuMoDx 288 ou 96 Molecular System*.
 - c) Em qualquer dos casos acima, ou no caso de um resultado No Result (Sem resultado, NR), Unresolved (Não resolvido, UNR) ou Indeterminate (Indeterminado, IND), repita o controle que falhou com frasco(s) recém-descongelado(s) do(s) controle(s) que tenha(m) falhado o teste de validação.

- d) Se o Controle positivo continuar relatando um resultado de teste Negativo (Negativo), entre em contato com o suporte técnico da QIAGEN.
- e) Se o Controle negativo continuar relatando um resultado de teste Positivo (Positivo), tente eliminar todas as potenciais fontes de contaminação, incluindo a reposição de todos os reagentes e a repetição da execução antes de entrar em contato com o suporte técnico da QIAGEN.
- f) Se os Controles externos não apresentarem os resultados esperados, será necessário repetir um conjunto de controles positivos e negativos. Os resultados dos pacientes não serão relatados caso os controles não apresentem os resultados esperados.

Controles (internos) de processo de amostras

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

Antes da RT-PCR, o NeuMoDx System executa automaticamente uma "FILL CHECK" (Verificação de enchimento) para garantir que a câmara de PCR esteja cheia com solução e contenha uma quantidade adequada de sonda fluorescente.

O software do NeuMoDx System monitora continuamente os sensores e atuadores integrados para garantir uma operação segura e eficaz do sistema.

São implementados vários modos de recuperação de erros de fluidos pelo monitoramento ativo das operações de aspiração e dispensação para garantir que o sistema possa concluir o processamento de todas as amostras de maneira segura e eficaz ou fornecer um código de erro apropriado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica

A Sensibilidade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay nos NeuMoDx Molecular Systems foi caracterizada em duas partes. O limite de detecção (LdD) foi caracterizado usando espécimes de swab nasofaríngeo clínicos negativos desidentificados restantes agrupados coletados na matriz UVT e cepas modelo de cada alvo. As cepas modelo usadas para cada alvo são apresentadas na *Tabela 3*. Primeiro, uma série de diluições usando cepas modelo de cada alvo em UVT foi preparada com os fluxos de trabalho Direct (Direto) e Pretreated (Pré-tratado) e, em seguida, processada pelo NeuMoDx System para determinar um valor preliminar de limite de detecção (LdD). Na segunda parte dos testes, esses valores preliminares de LdD foram confirmados usando um estudo de taxa de identificação nos NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular Systems para ambos os fluxos de trabalho. O LdD preliminar era aceito se os testes de taxa de identificação alcançassem uma taxa de 95% de positividade para ambos os fluxos de trabalho em ambos os sistemas. As taxas de detecção para o LdD preliminar são apresentadas na *Tabela 4*, enquanto a *Tabela 5* detalha a confirmação da taxa de identificação para o N288 System e a *Tabela 6* detalha a confirmação da taxa de identificação para o N96 System. As declarações de LdD finais na *Tabela 4* aparecem em **negrito**.

Tabela 3. Cepa usada para cada alvo

Alvo/cepa	Fonte	Nº de cat.	Nº de lote	Tipo de material
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1688	70031602	Sobrenadante clarificado de células infectadas
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	IRR	FR-1690	70032253	Sobrenadante clarificado de células infectadas
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	Virapur	N/A	B1904J	Vírus bruto vivo
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	Virapur	N/A	C2030D	Vírus bruto vivo
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	IRR	FR-1619	70015942	Sobrenadante clarificado de células infectadas
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	IRR	FR-1592	70013310	Sobrenadante clarificado de células infectadas
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	ATCC	VR-1931	70020870	Fluido de cultura clarificado e lisado celular
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	Virapur	N/A	B1904N	Vírus bruto vivo
RSV A2	ATCC	VR-1540	60430286	Fluido de cultura e lisado celular
RSV B (WV/14617/85)	ATCC	VR-1400	70013461	Fluido de cultura e lisado celular
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	NIBSC	20/146	N/A	Ácido liofilizado e vírus inativado por calor
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	BEI	NR-52285	70037779	Vírus inativado por calor

Tabela 4. Taxas de detecção positiva para a determinação do LdD preliminar do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – (a) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado); (b) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

(a) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

Alvo/cepa	Nível	Unidade	Nº de resultados válidos (n/N)	Nº pos.	% pos.	Méd. de Ct	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /mL	10/10	7	70%	33,97	0,90
	0,06		10/10	10	100%	33,36	0,96
	0,17		10/10	10	100%	32,17	0,45
	0,5		10/10	10	100%	31,05	0,42
	1,5		10/10	10	100%	31,01	0,45
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	33,72	1,00
	0,5		10/10	10	100%	32,97	0,51
	1,5		10/10	10	100%	32,28	0,60
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	32,81	0,38
	0,5		10/10	10	100%	31,68	0,84
	1,5		10/10	10	100%	31,69	0,65
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	20/20	15	75%	32,15	1,70
	0,5		10/10	9	90%	32,37	0,50
	1,5		10/10	10	100%	32,63	1,35
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	32,90	1,27
	0,03		10/10	10	100%	32,26	0,48
	0,08		10/10	10	100%	31,48	0,78
	0,25		10/10	10	100%	30,59	0,40
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /mL	10/10	10	100%	33,97	0,58
	0,01		10/10	10	100%	33,90	0,39
	0,03		10/10	10	100%	33,85	0,56
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	34,39	0,84
	0,25		10/10	10	100%	32,53	0,21
	0,75		10/10	10	100%	32,57	0,40
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,33	TCID ₅₀ /mL	20/20	15	75%	33,58	1,50
	1		10/10	10	100%	34,03	0,69
	3		10/10	10	100%	32,30	0,66
RSV A2	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	5	50%	32,68	0,43
	0,5		10/10	10	100%	31,72	0,85
	1,5		10/10	10	100%	31,71	1,35
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /mL	10/10	5	50%	32,20	1,10
	0,05		10/10	10	100%	31,50	0,49
	0,15		10/10	10	100%	29,94	0,93
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	50	UI/mL	10/10	6	60%	34,36	0,64
	150		10/10	10	100%	34,20	0,31
	450		10/10	10	100%	33,04	0,63
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	50	cópias/mL	10/10	6	60%	34,20	1,19
	150		10/10	10	100%	33,46	0,58
	450		10/10	10	100%	32,62	1,06

(b) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

Alvo/cepa	Nível	Unidade	Nº de resultados válidos (n/N)	Nº pos.	% pos.	Méd. de Ct	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,02	TCID ₅₀ /mL	20/20	17	85%	33,11	1,30
	0,06		10/10	10	100%	33,18	0,86
	0,17		10/10	10	100%	32,63	1,14
	0,5		10/10	10	100%	31,33	0,74
	1,5		10/10	10	100%	30,79	0,31
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,17	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	33,41	1,10
	0,5		10/10	9	90%	32,54	1,03
	1,5		10/10	10	100%	32,05	0,26
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	7	70%	33,39	0,16
	0,5		10/10	10	100%	32,70	1,01
	1,5		10/10	10	100%	31,12	1,07
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,17	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	34,11	0,69
	0,5		10/10	10	100%	33,68	0,50
	1,5		10/10	10	100%	32,27	1,29
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	33,31	0,95
	0,03		10/10	10	100%	31,51	0,94
	0,08		10/10	10	100%	31,76	0,46
	0,25		10/10	10	100%	30,11	0,45
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,003	TCID ₅₀ /mL	10/10	9	90%	34,82	0,39
	0,01		10/10	10	100%	34,37	0,55
	0,03		10/10	10	100%	33,64	0,34
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,083	TCID ₅₀ /mL	20/20	18	90%	33,78	1,11
	0,25		10/10	10	100%	33,89	0,69
	0,75		10/10	10	100%	32,38	0,47
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,25	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	33,23	1,17
	0,75		20/20	19	95%	32,63	1,22
	2,25		10/10	10	100%	31,24	1,58
RSV A2	0,42	TCID ₅₀ /mL	10/10	7	70%	32,61	0,70
	1,25		10/10	10	100%	30,99	1,55
	3,75		10/10	10	100%	31,49	1,04
RSV B (WV/14617/85)	0,017	TCID ₅₀ /mL	10/10	6	60%	33,63	1,49
	0,05		10/10	10	100%	32,42	1,12
	0,15		10/10	10	100%	31,81	0,81
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	50	UI/mL	10/10	7	70%	34,80	0,56
	150		20/20	19	95%	32,88	1,22
	450		10/10	10	100%	33,38	0,46
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	66,7	cópias/mL	10/10	7	70%	33,53	0,58
	200		10/10	10	100%	32,63	1,25
	600		10/10	10	100%	32,69	0,86

Tabela 5. Taxas de detecção positiva para a determinação do LdD confirmatório do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N288, (a) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado); (b) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

(a) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

Alvo/cepa	Nível	Unidade	Nº de resultados válidos (n/N)	Nº pos.	% de detecção	Méd. de Ct	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,89	0,57
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,81	0,44
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,17	0,47
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,77	0,52
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	29/30	29	100%	32,32	1,09
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	34,50	0,68
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,83	0,44
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /mL	29/30	29	100%	33,04	0,69
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,17	1,23
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,39	0,41
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	30	100%	33,63	0,61
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	150	cópias/mL	29/30	28	96,6%	33,59	1,01

(b) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

Alvo/cepa	Nível	Unidade	Nº de resultados válidos (n/N)	Nº pos.	% de detecção	Méd. de Ct	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,92	0,69
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,75	0,57
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,96	0,48
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,67	0,48
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	29/30	28	96,6%	31,74	1,19
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /mL	10/10	8	80%	34,88	0,95
	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	34,22	0,51
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,55	0,38
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,33	0,74
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	31,87	0,95
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,46	0,72
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	29	96,7%	33,78	0,77
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	200	cópias/mL	30/30	30	100%	34,18	0,83

Tabela 6. Taxas de detecção positiva para a confirmação da taxa de identificação do LdD do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay – N96, (a) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado); (b) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

(a) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

Alvo/cepa	Nível	Unidade	Nº de resultados válidos (n/N)	Nº pos.	% de detecção	Méd. de Ct	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,05	0,81
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,53	0,75
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,33	1,11
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,98	0,96
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,75	0,69
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,0033	TCID ₅₀ /mL	10/10	4	40%	34,75	0,58
	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,91	0,75
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,25	0,97
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	1	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,21	0,96
RSV A2	0,5	TCID ₅₀ /mL	29/30	28	96,6%	32,39	1,10
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,06	0,76
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	29	96,7%	33,79	0,67
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	150	cópias/mL	30/30	29	96,7%	33,59	1,05

(b) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

Alvo/cepa	Nível	Unidade	Nº de resultados válidos (n/N)	Nº pos.	% de detecção	Méd. de Ct	DP de Ct
Flu A, Idaho/07/2018 (H1N1) pdm09	0,06	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,42	0,54
Flu A, Wisconsin/505/2018 (H1N1) pdm09	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,35	1,10
Flu A, Singapore/INIFMIH-16-0019/2016 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,17	1,24
Flu A, Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	0,5	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,22	0,50
Flu B, Hong Kong/286/2017 (Victoria)	0,03	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,78	0,56
Flu B, Colorado/6/2017 (Victoria)	0,01	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	34,21	0,50
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	0,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	33,41	0,65
Flu B, Phuket/3073/2013 (Yamagata)	0,75	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	33,36	1,04
RSV A2	1,25	TCID ₅₀ /mL	30/30	29	96,7%	32,29	0,99
RSV B (WV/14617/85)	0,05	TCID ₅₀ /mL	30/30	30	100%	32,17	0,75
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	150	UI/mL	30/30	29	96,7%	33,50	0,78
SARS-CoV-2, Isolate USA-WA1/2020	200	cópias/mL	29/30	29	100%	34,45	0,39

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

Tabela 7. Resumo do estudo de limite de detecção

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

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

A interferência competitiva do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada usando painéis de alvos virais misturados em espécimes de swab nasofaríngeo clínicos negativos coletados em UVT. Dez painéis continham um ou dois alvos próximos do seu Limite de detecção (3–10X LdD) e um único alvo a $\geq 1E5$ cópias/mL, representando o alvo coinfetado. Um décimo primeiro painel continha um de cada um dos quatro alvos a 2X LdD. A *Tabela 8* mostra a presença de dois a três vírus a diferentes concentrações em um único espécime e os seus efeitos na sensibilidade analítica.

Os resultados negativos para influenza A e RSV A devem ser considerados presumíveis em amostras com resultado positivo para SARS-CoV-2, e os resultados negativos para RSV devem ser considerados presumíveis em amostras com resultado positivo para influenza A. Estudos de Interferência competitiva mostraram que o vírus SARS-CoV-2, quando presente a concentrações iguais ou superiores a 1E5 cópias/mL, pode inibir a detecção e amplificação do RNA da influenza A e do RSV A, se presente a concentrações iguais ou inferiores a 1,5 TCID₅₀/mL ou 6,25 TCID₅₀/mL, respectivamente, e pode levar a resultados falso-negativos. Além disso, o vírus influenza A, quando presente a concentrações iguais ou superiores a 1E5 cp/mL, pode inibir a detecção e amplificação do RNA do RSV A, se presente a concentrações iguais ou inferiores a 3,75 TCID₅₀/mL e pode levar a resultados falso-negativos para o RSV. Se houver suspeita de coinfeção com vírus influenza A ou RSV em amostras com resultado positivo para SARS-CoV-2, ou suspeita de coinfeção com RSV em amostras com resultado positivo para influenza A, a amostra deve ser testada novamente com outro teste de influenza ou RSV liberado, aprovado ou autorizado pela FDA, caso a detecção do vírus influenza ou RSV interfira na gestão clínica.

Tabela 8. Resumo do estudo de interferência competitiva

Painel	Alvo	Nível do painel	Conc. de alvo	Resultados válidos	Nº pos.	% de detecção
1	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /mL	24	23	96%
	Flu B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
2 (Run 1) (Execução 1)	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /mL	24	19	79%
	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /mL	24	8	33%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
2 (Run 2) (Execução 2)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /mL	24	16	67%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
2 (Run 3) (Execução 3)	Flu A	5X	2,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV A	10X	12,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
3	Flu A	3X	1,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	3X	450 UI/mL	24	24	100%
	RSV B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
4	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
5	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
6	Flu B	3X	0,75 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
7	SARS-CoV-2	3X	450 UI/mL	24	24	100%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
8	SARS-CoV-2	3X	450 UI/mL	24	24	100%
	Flu B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
9 (Run 1) (Execução 1)	RSV A	3X	3,75 TCID ₅₀ /mL	24	20	83%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
9 (Run 2) (Execução 2)	RSV A	5X	6,25 TCID ₅₀ /mL	24	23	96%
	Flu A	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
10	RSV B	3X	0,15 TCID ₅₀ /mL	24	23	96%
	Flu B	Alto	1E5 cp/mL	24	24	100%
11	Flu A	2X	1 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	Flu B	2X	0,5 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	RSV B	2X	0,1 TCID ₅₀ /mL	24	24	100%
	SARS-CoV-2	2X	300 UI/mL	24	24	100%

Reatividade e inclusividade analítica

A reatividade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada quanto a diferentes cepas/isolados de influenza A, influenza B, RSV e SARS-CoV-2. A reatividade de cada cepa/isolado foi caracterizada em duas partes. A avaliação inicial dos níveis de reatividade para cada alvo foi realizada com cada cepa-alvo individual testada a 3 concentrações em matriz de swab nasofaríngeo simulada (preparada com 3000 células epiteliais humanas por mL de UVT), *Tabela 9*. Na segunda parte, o nível mais baixo que obteve uma taxa positiva de 100% na fase 1 foi confirmado como nível de reatividade testando um mínimo de 20 réplicas, *Tabela 10*. Foi testado um total de 14 cepas de Flu A, 6 cepas de Flu B, 1 isolado de RSV A, 1 isolado de RSV B e 6 isolados de SARS-CoV-2.

Tabela 9. Cepas de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 – Análise preliminar do nível de reatividade

Análise preliminar					
Alvo	Cepa		Níveis testados	Nº de resultados válidos	% pos.
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	0,5 TCID ₅₀ /mL	8	75,0%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			4,5 TCID ₅₀ /mL	7	100%
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,33 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			3 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,17 TCID ₅₀ /mL	6	50%
			0,5 TCID ₅₀ /mL	6	100%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	6	100%
		A/Iowa/53/2015 (H1N1) pdm09	0,33 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			3 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1) pdm09	3,3 CEID ₅₀ /mL	8	62,5%
			10 CEID ₅₀ /mL	8	87,5%
			30 CEID ₅₀ /mL	8	100%
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	0,17 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			0,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,15 TCID ₅₀ /mL	7	28,6%
			0,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			1,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Kansas/14/2017 (H3N2)	2,67 TCID ₅₀ /mL	8	50%
			8 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
			24 TCID ₅₀ /mL	7	100%
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	3,3 CEID ₅₀ /mL	6	83,3%
			10 CEID ₅₀ /mL	6	100%
			30 CEID ₅₀ /mL	6	100%
		A/California/02/2014 (H3N2)	0,01 TCID ₅₀ /mL	8	85,7%
			0,03 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			0,1 TCID ₅₀ /mL	7	100%
	0,33 TCID ₅₀ /mL		8	100%	
	1 TCID ₅₀ /mL		8	100%	
	3 TCID ₅₀ /mL		7	100%	
	H2N2	A2/Japan/305/57(H2N2)	10,87 pg/mL ¹	8	100%
			32,6 pg/mL ¹	8	87,5%
			97,8 pg/mL ¹	7	100%
	H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	8 pg/mL ¹	8	100%
			25 pg/mL ¹	8	100%
			75 pg/mL ¹	7	100%
	H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1:3E5 ¹	8	50%
		1:1E5 ¹	7	87,5%	
		1:3,3E4 ¹	8	100%	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	22,67 pg/mL ¹	8	100%	
		68 pg/mL ¹	8	100%	
		204 pg/mL ¹	8	100%	
Flu B	Victoria Lineage	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			3 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			9 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		Washington/02/2019 (Victoria)	2,5 CEID ₅₀ /mL	8	25,0%
			5 CEID ₅₀ /mL	8	87,5%
			15 CEID ₅₀ /mL	8	100%
		B/Maryland/15/2016 (Victoria)	0,01 TCID ₅₀ /mL	12	91,7%
			0,03 TCID ₅₀ /mL	8	100%
			0,1 TCID ₅₀ /mL	8	100%
		0,33 TCID ₅₀ /mL	16	100%	

Análise preliminar						
Alvo	Cepa		Níveis testados	Nº de resultados válidos	% pos.	
Flu B (continuação)	Yamagata Lineage		1 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
			3 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
		Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	0,17 CEID ₅₀ /mL	8	75,0%	
			0,5 CEID ₅₀ /mL	8	100%	
			1,5 CEID ₅₀ /mL	8	100%	
			0,06 CEID ₅₀ /mL	8	25,0%	
		B/Utah/09/2014 (Yamagata Lineage)	0,19 CEID ₅₀ /mL	8	87,5%	
			0,56 CEID ₅₀ /mL	7	85,7%	
			1,7 CEID ₅₀ /mL	6	100%	
			5 CEID ₅₀ /mL	6	100%	
			15 CEID ₅₀ /mL	6	100%	
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	0,33 TCID ₅₀ /mL	8	25,0%	
			1 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%	
3 TCID ₅₀ /mL	8		100%			
RSV	RSVA	A (long)	0,67 pfu/mL	8	37,5%	
			2 pfu/mL	8	100%	
			6 pfu/mL	7	100%	
	RSVB	B (9320)	0,03 pfu/mL	8	12,5%	
			0,1 pfu/mL	8	87,5%	
			0,3 pfu/mL	8	100%	
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B1.617.1)		0,06 TCID ₅₀ /mL	8	0%	
			0,17 TCID ₅₀ /mL	8	12,5%	
			0,5 TCID ₅₀ /mL	8	37,5%	
			1,5 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%	
			4,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
			13,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%	
			USA/CA_CDC_5574/2020 (Alpha, B.1.1.7)	0,006 TCID ₅₀ /mL	8	62,5%
				0,02 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%
				0,06 TCID ₅₀ /mL	8	100%
				0,17 TCID ₅₀ /mL	7	100%
				0,5 TCID ₅₀ /mL	7	100%
			Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	1,5 TCID ₅₀ /mL	7	100%
				0,002 TCID ₅₀ /mL	8	62,5%
				0,006 TCID ₅₀ /mL	8	100%
				0,02 TCID ₅₀ /mL	8	100%
	0,06 TCID ₅₀ /mL	8		100%		
		0,17 TCID ₅₀ /mL	8	100%		
		0,5 TCID ₅₀ /mL	8	100%		
		0,001 TCID ₅₀ /mL	8	37,5%		
		0,004 TCID ₅₀ /mL	8	87,5%		
		0,013 TCID ₅₀ /mL	8	100%		
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)	0,04 TCID ₅₀ /mL	8	100%		
		0,11 TCID ₅₀ /mL	8	100%		
		0,33 TCID ₅₀ /mL	4	100%		
		Italy-INMI1	7,44 cp/mL ¹	8	37,5%	
			22,33 cp/mL ¹	8	87,5%	
	67 cp/mL ¹		8	100%		
	200 cp/mL ¹		8	100%		
		600 cp/mL ¹	8	100%		
		7,44 cp/mL ¹	8	25,0%		
22,33 cp/mL ¹		8	87,5%			
Isolate Hong Kong/VM20001061/2020		67 cp/mL ¹	7	100%		
	200 cp/mL ¹	7	100%			
	600 cp/mL ¹	7	100%			
	600 cp/mL ¹	7	100%			

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

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

Confirmação						
Alvo	Cepa		Nível	Nº de resultados válidos	% pos.	
Flu A	H1N1	Brisbane/02/2018	1,0 TCID ₅₀ /mL	23	91,3%	
			1,5 TCID ₅₀ /mL	23	100%	
		Guangdong-Moanan/SWL 1536/2019	0,5 TCID ₅₀ /mL	23	82,6%	
			1,0 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
		Michigan/272/2017 (H1N1)pdm09	0,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
		A/Iowa/53/2015 (H1N1) pdm09	0,33 TCID ₅₀ /mL	24	85,7%	
	A/Bangladesh/3002/2015 (H1N1) pdm09	0,67 TCID ₅₀ /mL	24	95,2%		
	H3N2	Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	10 CEID ₅₀ /mL	24	100%	
			0,25 TCID ₅₀ /mL	24	87,0%	
		Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	0,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
			1,0 TCID ₅₀ /mL	23	91,3%	
		Kansas/14/2017 (H3N2)	12 TCID ₅₀ /mL	23	95,7%	
		A/Wisconsin/04/2018 (H3N2)	5 CEID ₅₀ /mL	23	100%	
		A/California/02/2014 (H3N2)	10 CEID ₅₀ /mL	23	91,3%	
			0,01 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
		H2N2	A/Japan/305/57(H2N2)	0,03 TCID ₅₀ /mL	24	91,7%
				10,87 pg/mL ¹	24	100%
	H5N2	A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	2 pg/mL ¹	24	83,3%	
4 pg/mL ¹			23	100%		
H7N9	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	8 pg/mL ¹	23	100%		
		1:3,3E4 ¹	24	95,7%		
H10N7	A/Chick/Germany/N/49 (H10N7)	7,6 pg/mL ¹	23	73,9%		
		22,67 pg/mL ¹	23	100%		
Flu B	Victoria Lineage	Malaysia/2506/2004 (Victoria)	1 TCID ₅₀ /mL	23	95,7%	
		Washington/02/2019 (Victoria)	5 CEID ₅₀ /mL	24	95,8%	
			10 CEID ₅₀ /mL	24	100%	
	B/Maryland/15/2016 (Victoria)	0,01 TCID ₅₀ /mL	23	83,3%		
		0,03 TCID ₅₀ /mL	24	100%		
			Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	0,05 CEID ₅₀ /mL	24	100%
	Yamagata Lineage	B/Utah/09/2014 (Yamagata Lineage)	0,56 TCID ₅₀ /mL	24	87,0%	
			1,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
		B/Oklahoma/10/2018 (NA D197N) (Yamagata)	0,75 TCID ₅₀ /mL	24	87,5%	
1,5 TCID ₅₀ /mL			20	95,0%		
RSV	RSVA	A (long)	3,0 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
			2 pfu/mL	24	91,7%	
	RSVB	B (9320)	4 pfu/mL	24	95,8%	
0,15 pfu/mL			24	100%		
SARS-CoV-2	USA/CA-Stanford-15_S02/2021 (Kappa, B.1.617.1)	USA/CA-CDC_5574/2020 (Alpha, B.1.1.7)	0,3 pfu/mL	21	100%	
			1,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
			3 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
		Japan/TY7-503/2021 (Gamma, Brazil P.1)	4,5 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
			0,02 TCID ₅₀ /mL	24	95,8%	
			0,06 TCID ₅₀ /mL	24	100%	
	USA/PHC658/2021 (Delta, B.1.617.2)	0,006 TCID ₅₀ /mL	24	95,8%		
		0,006 TCID ₅₀ /mL	24	87,5%		
		0,013 TCID ₅₀ /mL	24	100%		
	Italy-INMI1	22 cp/mL ¹	22 cp/mL ¹	24	95,8%	
			67 cp/mL ¹	24	100%	
		Isolate Hong Kong/VM20001061/2020	22 cp/mL ¹	24	57,1%	
SARS-CoV-2 (continuação)	Isolate Hong Kong/VM20001061/2020	67 cp/mL ¹	24	100%		
		67 cp/mL ¹	24	100%		

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

A reatividade do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay na detecção de diferentes isolados clínicos de SARS-CoV-2 foi demonstrada realizando uma análise *in silico* com os primers e sondas do ensaio em relação a todas as sequências disponíveis no GenBank (em novembro de 2021) usando a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do NCBI baseada na Web. Os resultados mostram que os primers e a sonda para SARS-CoV-2 possuem 100% de homologia com mais de 98% das sequências. No global, os primers e a sonda têm uma homologia > 95% com todas as sequências analisadas.

Reprodutibilidade intralaboratorial

A reprodutibilidade intralaboratorial do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi caracterizada testando dez painéis de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B ou SARS-CoV-2 misturados individualmente a 2 níveis (moderate positive [moderado positivo] [5x LdD] e low positive [baixo positivo] [2x LdD]) e um painel negativo (negativo). Os painéis foram testados em três lotes de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips fabricadas sob BPF, em dois NeuMoDx Systems e em seis dias não consecutivos. Os membros dos painéis foram preparados em espécimes de swab nasofaríngeo simulados preparados com 3000 células epiteliais humanas por mL de Universal Viral Transport Medium (UVT) e misturados a uma cepa representativa de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2. As NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strips e o NeuMoDx Vantage Viral Lysis Buffer (VVLB) foram identificados como os principais reagentes específicos do teste capazes de influenciar no desempenho do ensaio e, portanto, foi usado o fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado) a fim de incorporar o VVLB no estudo. O desvio padrão para os valores de Ct dentro e entre três lotes de NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay Test Strips, dois NeuMoDx Molecular Systems foi $\leq 1,2$ com coeficientes de variação (CV) $\leq 4,0\%$ para todos os alvos, o que demonstra uma excelente reprodutibilidade; *Tabelas 11, 12 e 13.*

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

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

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

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

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

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

Desempenho clínico

As características de desempenho do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foram determinadas por meio de um estudo interno retrospectivo de comparação de métodos usando espécimes residuais de swab nasofaríngeo (NF) provenientes de 4 laboratórios clínicos de regiões diferentes. As diluições de amostras clínicas positivas para SARS-CoV-2 também foram incluídas neste estudo para demonstrar a sensibilidade clínica próxima do LdD.

Os espécimes residuais de swab NF de pacientes sintomáticos foram desidentificados e receberam um número de ID exclusivo atribuído pelos laboratórios fornecedores, estabelecendo uma lista confidencial que vincula o ID do paciente aos espécimes desidentificados testados para fins de estudo. No total, 747 espécimes de swab NF individuais foram processados neste estudo. Todos os espécimes foram processados pelos fluxos de trabalho direto e pré-tratado, produzindo, ao final, 739 resultados válidos e 8 resultados inválidos no fluxo de trabalho Direct (Direto) e 736 resultados válidos e 11 resultados inválidos no fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado). Dessas amostras válidas, 121 foram dedicadas exclusivamente à avaliação dos alvos da Flu A, da Flu B e do RSV. As amostras positivas para Flu A representam 54 desses espécimes, enquanto as positivas para Flu B totalizam 34 e as positivas para RSV, 33. Dentro desta coorte de 121 amostras, os resultados para os 3 alvos de interesse foram disponibilizados pelos laboratórios clínicos fornecedores. Por isso, esta coorte de amostras positivas também forneceu 67 resultados negativos para Flu A, 87 resultados negativos para Flu B e 88 resultados negativos para RSV. Os resultados negativos supramencionados foram ainda complementados por 59 espécimes clínicos que tinham resultados negativos confirmados pelo ensaio comparativo para os 4 alvos. No geral, 106 amostras foram identificadas como positivas para SARS-CoV-2 em ambos os fluxos de trabalho. Os resultados clínicos negativos para SARS-CoV-2 foram confirmados com um resultado válido do NeuMoDx em 512 amostras de fluxo de trabalho Direct (Direto) e 509 amostras de fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado).

O estado de teste dessas amostras foi omitido do operador para implementar um "estudo simples cego". Os resultados relatados pelos dispositivos moleculares específicos legalmente comercializados, liberados pela FDA e CE e usados pelos laboratórios para testagem de padrão de prudência, foram usados para realizar a análise comparativa dos métodos.

Os resultados do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay apresentaram uma sensibilidade clínica de 98,1% em ambos os fluxos de trabalho para o alvo da Flu A e uma especificidade clínica de 100% e 99,2% para os fluxos de trabalho Direct (Direto) e Pretreated (Pré-tratado), respectivamente (Tabela 14A). Os resultados para o alvo da Flu B apresentaram uma sensibilidade clínica e uma especificidade clínica de 97,1% e 100%, respectivamente, em ambos os fluxos de trabalho (Tabela 14B). Os resultados para o alvo do RSV (indiferenciado) apresentaram uma sensibilidade clínica de 97% em ambos os fluxos de trabalho e uma especificidade clínica de 99,3% e 98,6% nos fluxos de trabalho Direct (Direto) e Pretreated (Pré-tratado), respectivamente (Tabela 14C). Os resultados para o alvo do SARS-CoV-2 apresentaram uma sensibilidade clínica de 97,2% em ambos os fluxos de trabalho e uma especificidade clínica de 98,4% no fluxo de trabalho Direct (Direto) e 98,2% no fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado) (Tabela 14D). Os limites superior e inferior dos intervalos de confiança (IC) de 95% são apresentados nas Tabelas 14A, 14B, 14C e 14D abaixo e foram calculados usando o procedimento de Wilson com correção de continuidade.

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

(a) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

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

(b) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

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

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

(a) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

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

(b) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

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

Tabela 14C. Resumo do desempenho clínico – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detecção de **RSV** por (a) Fluxo de trabalho Direct (Direto) e (b) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

(a) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

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

(b) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

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

Tabela 14D. Resumo do desempenho clínico – NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Test Strip: Detecção de SARS-CoV-2 por (a) Fluxo de trabalho Direct (Direto) e (b) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

(a) Fluxo de trabalho Direct (Direto)

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

(b) Fluxo de trabalho Pretreated (Pré-tratado)

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

Especificidade analítica e reatividade cruzada

A especificidade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada testando um painel de 47 organismos, composto por 22 cepas virais, 24 bacterianas e 1 cepa de levedura representando patógenos respiratórios comuns ou flora comumente presentes no trato respiratório. As bactérias e a levedura foram testadas a concentrações de ~6E6 CFU/mL ou IFU/mL, exceto quando indicado. Os vírus foram testados a concentrações de 1E5 a 1E6 TCID₅₀/mL ou cópias/mL, exceto quando indicado. Para confirmar a possível reatividade cruzada entre o SARS-CoV-2 e a família dos coronavírus (229E, OC43, NL63, MERS e SARS-1) juntamente com a *Legionella pneumophila*, foram incluídas réplicas adicionais (>20) para cumprir o requisito do MDCG para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro destinados ao SARS-CoV-2. A especificidade analítica do NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi de 100% para a Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2.

O HKU1 era outro membro da família dos coronavírus a ser testado. Contudo, devido à indisponibilidade do vírus e do RNA genômico, foram testadas 4 réplicas de material sintético. Foi também realizada uma análise *in silico* entre os primers e sondas do NeuMoDx SARS-CoV-2 e os genomas do coronavírus HKU1 publicados no GenBank para investigar a possível reatividade cruzada. Foi obtido um total de 57 sequências de genomas de HKU1 da base de dados do NCBI Virus dos Institutos Nacionais da Saúde (National Institutes of Health, NIH). Todas as sequências de HKU1 tinham três ou mais incompatibilidades com cada um dos primers e sondas do NeuMoDx SARS-CoV-2. Nenhuma homologia próxima foi detectada. Portanto, não é esperada nenhuma reatividade cruzada entre o Coronavírus HKU1 e o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

Tabela 15. Resultados de especificidade analítica

Organismo	Concentração	Flu A	Flu B	RSV	SARS-CoV-2
Adenovírus Tipo 1	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Adenovírus Tipo 7	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> I176	10 ng/mL	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	10 ng/mL	-	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
EBV	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Hemophilus influenzae</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
HHV 6A	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HHV 7	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HHV 8	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HSV 1	1E6 cp/mL	-	-	-	-
HSV 2	1E6 cp/mL	-	-	-	-
Coronavírus humano 229E	1E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Coronavírus humano HKU1	1E6 cp/mL	-	-	-	-
Coronavírus humano NL63	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Coronavírus humano OC43	1E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Enterovírus humano 68	1E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Metapneumovírus humano	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Parainfluenza humana Tipo 1	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Parainfluenza humana Tipo 2	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Parainfluenza humana Tipo 3	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
Rinovírus humano Tipo 1A	5E3 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus jensoni</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
Vírus do sarampo	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
MERS-coronavírus EMC/2012	1E4 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
Vírus da papeira	5E5 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero A	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero B	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero C	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Sero D	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
SARS-coronavírus	1E6 TCID ₅₀ /mL	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	6E6 CFU/mL	-	-	-	-
Flu A, Singapura/INIFMIH-16-0019/2016	3x LdD	+	-	-	-
Flu B, Florida/78/2015 (Victoria)	3x LdD	-	+	-	-
RSV A2	3x LdD	-	-	+	-
RSV B (WV/14617/85)	3x LdD	-	-	+	-
SARS-CoV-2, 1º padrão internacional da OMS	3x LdD	-	-	-	+
Controle negativo (Sem patógenos)	N/A	-	-	-	-

Tabela 16. Especificidade analítica – Família dos coronavírus juntamente com a *Legionella pneumophila* (>20 réplicas testadas)

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

Substâncias interferentes – Organismos comensais

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi testado quanto à interferência na presença de organismos não alvo (potencialmente presentes no trato respiratório superior) avaliando o desempenho do ensaio em níveis baixos (~3X LdD) de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B e SARS-CoV-2 na presença de altas concentrações dos organismos listados na *Tabela 15* acima. Além disso, para confirmar a possível interferência entre o SARS-CoV-2 e a família dos coronavírus (229E, OC43, NL63, MERS e SARS-1) juntamente com a *Legionella pneumophila* (*Tabela 16*), foram incluídas réplicas adicionais (>20) para cumprir o requisito do MDCG para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro destinados ao SARS-CoV-2. As amostras foram misturadas com SARS-CoV-2 somente a ~3X LdD para a porção de interferência do estudo. Foi observada uma taxa de detecção de 100% para todos os alvos. Portanto, não foi observada nenhuma interferência na detecção de nenhum alvo com nenhum dos organismos comensais.

Substâncias interferentes – Endógenas/Exógenas

O NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliado quanto à suscetibilidade à interferência causada por substâncias potencialmente associadas à coleta de espécimes de swab nasofaríngeo. Espécimes residuais de swab nasofaríngeo clínicos negativos foram misturados individualmente com Flu A, Flu B, RSV A, RSV B ou SARS-CoV-2 a 3X LdD e processados na presença e ausência dos agentes mostrados abaixo na *Tabela 17*. Nenhuma das substâncias incluídas nos testes teve um efeito adverso no desempenho do ensaio para qualquer alvo.

Tabela 17. Substâncias testadas quanto a interferência

	Substância	Descrição/Ingrediente ativo	Concentração*
Exógenas	Neo-Sinefrina	Fenilefrina	15% v/v
	Gel nasal – Ayr Saline Nasal Gel	Cloreto de sódio com conservantes	15% v/v
	Colírio homeopático para alergias – Similasan	Cardiospermum, Sabadilla, Luffa operculata, Galphimia glauca	15% v/v
	Zinco da Nature’s Bounty	Gluconato de zinco	0,1 mg/mL
	Anestésico/analgésico oral – Oragel	Benzocaína, cloreto de benzalcônio	1% v/v
	Spray nasal – Afrin	Oximetazolina	15% p/v
	Spray nasal – Zicam	<i>Luffa operculata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum, enxofre</i>	15% v/v
	Corticosteroide nasal – Flonase	Fluticasona	5% v/v
	Corticosteroide nasal – Rhinocort	Budesonida	5% v/v
	Corticosteroide nasal – Nasacort	Triancinolona	5% v/v
	Corticosteroide nasal – Dexametasona	Dexametasona	10 mg/mL
	Corticosteroide nasal – Mometasona	Mometasona	10 mg/mL
	Corticosteroide nasal – Beclometasona	Beclometasona	10 mg/mL
	Pastilha para a garganta Chloraseptic	Benzocaína, mentol	2 mg/mL
	Antibiótico, pomada nasal	Mupirocina	10 mg/mL
	Medicamento antiviral Relenza	Zanamivir	7,5 mg/mL
Medicamento antiviral Tamiflu	Oseltamivir	25 mg/mL	
Antibiótico sistêmico	Tobramicina	15 mg/mL	
Endógenas	Mucina	Proteína de mucina purificada	2,5% p/v
	Sangue humano	Sangue	2% v/v

*Nota: As concentrações mostradas são as usadas para saturar os swabs antes de dosar amostras clínicas positivas artificiais com a substância interferente. Portanto, elas são representativas do nível que pode ser tolerado no local de coleta do swab.

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay nos sistemas NeuMoDx Molecular 288 e 96 foi determinada processando amostras altamente positivas e negativas em um padrão de "tabuleiro de xadrez" alternado. Todas as amostras consistiam em material de swab NF simulado, com amostras positivas misturadas a $\geq 10^5$ TCID₅₀/mL (ou $\geq 10,000X$ LdD). Foram realizados cinco conjuntos de testes em tabuleiro de xadrez, produzindo um total de 60 réplicas negativas e 60 réplicas positivas no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System. Entre os dois tipos de sistema, todas as 120 réplicas de amostras negativas foram reportadas com exatidão como negativas, o que demonstra que não houve contaminação cruzada durante o processamento de amostras nos NeuMoDx Systems.

Tempo de execução

O Tempo de execução para processar oito amostras usando o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay é determinado em ~85 minutos no sistema N288 e ~78 minutos no sistema NeuMoDx 96 para processar quatro amostras.

Taxa de falha de todo o sistema

A Taxa de falha de todo o sistema para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay foi avaliada testando 1 nível de alvo de SARS-CoV-2 a uma concentração de ~3X LdD, preparada por meio da mistura de espécimes de swab nasofaríngeo clínicos negativos com o 1º padrão internacional da OMS para SARS-CoV-2. Foi processado um total de 200 réplicas usando o fluxo de trabalho Direct (Direto) no NeuMoDx 96 Molecular System e no NeuMoDx 288 Molecular System (100 réplicas por sistema). A taxa de falha foi calculada pela porcentagem de resultados falso-negativos do número total de resultados válidos obtidos. Foi encontrada uma taxa de detecção de 100% para o alvo de SARS-CoV-2 no NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay tanto no NeuMoDx 96 Molecular System quanto no NeuMoDx 288 Molecular System, o que demonstra uma taxa de falha de 0% em ambos os sistemas.

Robustez do sistema – Inibição

A taxa de inibição foi determinada calculando a taxa de Unresolved (Não resolvido) (controle de processo de amostras não amplificado na ausência de erro do sistema) em todas as amostras negativas executadas durante os estudos de verificação e validação. Foi obtido um total de 11 resultados Unresolved (Não resolvido) de um total de 1221 amostras negativas processadas, o que demonstra uma taxa de inibição de 0,9% para o NeuMoDx FluA/FluB/RSV/SARS-CoV-2 Assay.

REFERÊNCIAS

1. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
2. 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

BD™ é uma marca da Becton, Dickinson and Company

Hamilton® é uma marca registrada da Hamilton Company

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

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


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

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

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

LEGENDA DE SÍMBOLOS

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

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

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

Patente: www.neumodx.com/patents

EC REP

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

CE