

REF 300500 NeuMoDx™ HIV-1 Quant Test Strip

R only

CUIDADO: Apenas para exportação dos EUA

IVD Para utilização em diagnóstico *in vitro* no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System

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

UTILIZAÇÃO PREVISTA

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

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay destina-se a ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica e outros marcadores de laboratório do prognóstico da doença como um auxiliar na gestão de pacientes com infecção por VIH-1 e na monitorização dos efeitos do tratamento antirretroviral, conforme medido por alterações no nível de ARN de VIH-1 no plasma. O ensaio pode quantificar o ARN de VIH-1 ao longo do intervalo de 34,2 a 5,0 x 10⁷ UI/mL (1,5–7,7 log₁₀ UI/mL). O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay está validado para a quantificação de ARN de VIH-1 Grupos M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, K, CRF01_AE, CRF02_AG) N, O e P.

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay destina-se a ser utilizado como um auxiliar no diagnóstico de infecção por VIH-1, incluindo infecção aguda ou primária. A presença de ARN de VIH-1 no plasma de pacientes sem anticorpos do VIH-1 é indicativa de infecção por VIH-1 aguda ou primária. O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser utilizado como teste suplementar para espécimes que apresentem resultados reativos repetidos com imunoenaios de VIH aprovados e como confirmação da infecção por VIH-1.

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay não se destina a ser utilizado como teste de rastreamento de VIH-1 em doadores para a presença do VIH-1 no sangue ou em produtos sanguíneos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Sangue total humano colhido em tubos de colheita de sangue estéreis contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido-citrato-dextrose (ACD) como agentes anticoagulantes ou em tubos para preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT) pode ser utilizado na preparação do plasma. Para preparar o teste, plasma num tubo de espécime secundário ou sangue fracionado num tubo de espécime primário compatível com o NeuMoDx System é carregado no NeuMoDx System utilizando um transportador de tubos de espécime designado para iniciar o processamento. Por cada espécime, uma alíquota de 600 µL da amostra de plasma é misturada com o NeuMoDx Lysis Buffer 3 e o NeuMoDx System desempenha automaticamente todos os passos necessários para extrair o ácido nucleico alvo, preparar o isolado de ARN para a transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) em tempo real e, se presente, amplificar e detetar os produtos de amplificação (secções do genoma do VIH-1 em regiões conservadas). O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay inclui um controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) de ARN para ajudar a monitorizar a presença de possíveis substâncias inibidoras e falhas do reagente ou do NeuMoDx System que podem acontecer durante o processo de extração e amplificação.

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é o agente etiológico da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e está dividido em dois tipos principais, sendo o mais comum e patogénico o VIH do tipo 1 (VIH-1). O VIH-1 pode ser transmitido através de contacto sexual, exposição a sangue ou produtos sanguíneos infetados ou de uma mãe infetada para o feto.¹⁻⁴ A infecção por VIH-1 aguda, caracterizada por sintomas semelhantes aos da gripe, desenvolve-se 3 a 5 semanas após a infecção inicial e está associada a níveis elevados de viremia. A resposta imunitária específica ao VIH-1 é detetável no período de 4 a 6 semanas após o surgimento dos sintomas.⁵⁻⁹

Após a seroconversão, a maioria dos pacientes entra numa fase assintomática que pode durar anos. A medição quantitativa dos níveis de ARN de VIH-1 no sangue periférico contribuiu de forma considerável para a compreensão da patogénese da infecção por VIH-1 e tem demonstrado ser um parâmetro essencial no prognóstico e na gestão de indivíduos infetados com VIH-1.¹⁰⁻¹¹ As decisões relativas ao início ou à alteração da terapia antirretroviral são baseadas na monitorização dos níveis de ARN de VIH-1 no plasma (carga viral), na contagem das células T CD4+ e no estado clínico do paciente.¹²⁻¹⁷ O objetivo da terapia antirretroviral é a supressão da replicação do VIH-1 para níveis inferiores aos detetáveis em testes de carga viral atualmente disponíveis. Os níveis de vírus no sangue periférico podem ser quantificados através da medição do antígeno p24 de VIH no soro, da cultura quantitativa de VIH do plasma ou através da medição direta do ARN viral no plasma utilizando tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos ou de amplificação do sinal.⁹⁻¹¹ Técnicas moleculares tais como reação em cadeia da polimerase mediada por transcrição reversa têm sido amplamente utilizadas na amplificação de ácidos nucleicos.¹¹ O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay utiliza tecnologia RT-PCR com deteção de fluorescência homogénea em tempo real. O ensaio inclui amplificação e deteção de duplo alvo, tendo como alvo duas regiões independentes do genoma do VIH-1. Além disso, a estrutura degenerada do ensaio permite a deteção de diversos subtipos do grupo M (A, B, C, D, F, G, H, K), incluindo formas recombinantes circulantes, e isolados dos grupos N, O e P. Os resultados do ensaio são comunicados em Unidades Internacionais por mL (UI/mL).

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay combina extração automatizada de ARN e amplificação/deteção RT-PCR em tempo real. Espécimes de sangue total são colhidos em tubos EDTA, ACD ou PPT para a preparação do plasma. O espécime de sangue primário (fracionado) ou uma alíquota de plasma num tubo de espécime secundário compatível é etiquetado com um código de barras e carregado no NeuMoDx System. O NeuMoDx System aspira automaticamente uma alíquota do plasma para misturar com NeuMoDx Lysis Buffer 3 e com os reagentes contidos na NeuMoDx Extraction Plate para iniciar o processamento. O NeuMoDx System automatiza e integra a extração e a concentração de reagentes e a amplificação/deteção de ácidos nucleicos das sequências-alvo, utilizando RT-PCR em tempo real. O controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) incluído ajuda a monitorizar a presença de substâncias inibidoras e falhas de sistema, processo ou reagentes. Não é necessária qualquer intervenção do operador depois de o espécime ser carregado no NeuMoDx System.

O NeuMoDx System utiliza uma combinação de calor, enzimas líticas e reagentes de extração para desempenhar automaticamente a lise, a extração de ARN e a remoção de inibidores. Os ácidos nucleicos libertados são capturados por partículas paramagnéticas. As partículas, com os ácidos nucleicos ligados, são carregadas no NeuMoDx Cartridge, onde os elementos não ligados são retirados por lavagem, utilizando o NeuMoDx Wash Reagent. O ARN ligado é então eluído utilizando o NeuMoDx Release Reagent. O NeuMoDx System utiliza o ARN eluído para reidratar reagentes de amplificação NeuDry™ patenteados que contêm todos os elementos necessários para a amplificação dos alvos de VIH-1 e SPC2. Isto permite a amplificação e deteção simultâneas das sequências de ARN de controlo e alvo. Depois da reconstituição dos reagentes de RT-PCR secos, o NeuMoDx System dispensa a mistura preparada e pronta para RT-PCR numa câmara de PCR (por espécime) do NeuMoDx Cartridge. A transcrição reversa, a amplificação e a deteção das sequências de controlo e alvo (se presentes) ocorrem na câmara de PCR. O NeuMoDx Cartridge foi concebido para conter o amplificação decorrente de RT-PCR, eliminando essencialmente o risco de contaminação após a amplificação.

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

As sondas TaqMan foram concebidas de forma a hibridizar dentro de uma região de ADN amplificada por um conjunto específico de iniciadores. À medida que a Polimerase Taq de ADN expande o iniciador e sintetiza a nova cadeia, a atividade exonuclease de 5' a 3' da Polimerase Taq de ADN degrada a sonda que foi hibridizada com o modelo. A degradação da sonda liberta o fluoróforo e quebra a sua proximidade com o supressor, ultrapassando assim o efeito de supressão devido ao FRET e permitindo a deteção do fluoróforo. O sinal de fluorescência resultante, detetado no termociclador de RT-PCR quantitativa do NeuMoDx System é diretamente proporcional ao fluoróforo libertado e pode ser correlacionado com a quantidade de alvo presente.

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

REAGENTES/CONSUMÍVEIS

Material fornecido

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

Materiais adicionais necessários (disponíveis em separado)

REF	Conteúdo
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Partículas paramagnéticas, enzimas líticas e controlos de processo de amostra secos</i>
800304	NeuMoDx HIV-1 Calibrators <i>Conjuntos de utilização única de calibradores altos e baixos de VIH-1 para estabelecer a validade da curva-padrão</i>
900301	NeuMoDx HIV-1 External Controls <i>Conjuntos de utilização única de controlos positivos e negativos de VIH-1</i>
400600	NeuMoDx Lysis Buffer 3
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Pontas Hamilton CO-RE/CO-RE II (300 µL) com filtros
235905	Pontas Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µL) com filtros

Instrumentos necessários

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



AVISOS E PRECAUÇÕES

- A NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip destina-se apenas para utilização em diagnóstico *in vitro* com NeuMoDx Molecular Systems.
- Não utilizar os reagentes ou consumíveis depois da data de validade indicada.
- Não utilizar quaisquer reagentes que tenham o selo de segurança aberto ou cuja embalagem tenha sido danificada ao chegar ao destino.
- Não utilizar consumíveis ou reagentes cuja bolsa protetora tenha sido aberta ou danificada ao chegar ao destino.
- Deve estar disponível uma calibração de teste válida (gerada através do processamento de calibradores altos e baixos dos NeuMoDx HIV-1 Calibrators [REF 800304]) antes de os resultados de teste poderem ser gerados para as amostras clínicas.
- Devem ser processados controlos externos (dos NeuMoDx HIV-1 External Controls [REF 900301]) a cada 24 horas ao longo do teste com o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.
- O volume mínimo de espécime de alíquotas secundárias depende do tamanho do tubo/transportador de tubos de espécime, tal como definido abaixo. Volumes inferiores ao mínimo especificado poderão resultar num erro "Quantity Not Sufficient" (Quantidade insuficiente).
- A utilização de espécimes armazenados a temperaturas inadequadas ou para além dos períodos de armazenamento especificados poderá produzir resultados inválidos ou erróneos.
- Evitar a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase) de todos os reagentes e consumíveis. É recomendada a utilização de pipetas de transferência descartáveis, estéreis e isentas de RNase ao utilizar tubos secundários. Utilizar uma nova pipeta para cada espécime.
- Para evitar a contaminação, não manusear nem destruir um NeuMoDx Cartridge após a amplificação. Não recuperar NeuMoDx Cartridges do conteúdo de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 288 Molecular System) ou do recipiente de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 96 Molecular System) em quaisquer circunstâncias. O NeuMoDx Cartridge foi concebido para prevenir a contaminação.
- Nos casos em que são também realizados em laboratório testes de PCR em tubo aberto, é necessário ter especial cuidado para assegurar que a NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip, os consumíveis e reagentes adicionais necessários para teste, o equipamento de proteção individual como luvas e batas de laboratório e o NeuMoDx System não sejam contaminados.
- Devem ser utilizadas luvas de nitrilo, sem pó e limpas durante o manuseio de reagentes e consumíveis NeuMoDx. É necessário ter especial cuidado para não tocar na parte superior da superfície do NeuMoDx Cartridge, na superfície da película de alumínio da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip e da NeuMoDx Extraction Plate ou na parte superior da superfície do NeuMoDx Lysis Buffer 3; o manuseamento dos consumíveis e reagentes deve ser feito tocando apenas nas superfícies laterais.
- São fornecidas fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS) para cada reagente (conforme aplicável) em www.qiagen.com/neumodx-ifu
- Lavar muito bem as mãos depois de realizar o teste.
- Não pipetar com a boca. Não fumar, beber ou comer em áreas onde estiverem a ser manuseados espécimes ou reagentes.
- Manusear sempre os espécimes como se fossem infecciosos e de acordo com os procedimentos laboratoriais de segurança, tal como os descritos na publicação *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁸ e no documento M29-A4 do CLSI.¹⁹
- Eliminar os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, regionais e locais.



ARMAZENAMENTO, TRATAMENTO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

- As NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strips permanecem estáveis dentro da embalagem primária até à data de validade indicada na etiqueta do produto, quando armazenadas a temperaturas entre 15 a 23 °C.
- As NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strips são enviadas num recipiente isolado contendo pacotes de gel de refrigeração.
- Não utilizar consumíveis ou reagentes após a data de validade indicada.
- Não utilizar qualquer produto de teste se a embalagem primária ou secundária tiver danos visíveis.
- Não carregue novamente qualquer produto de teste que tenha sido previamente carregado noutra NeuMoDx System.
- Uma vez carregada, a NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip pode permanecer a bordo do NeuMoDx System durante sete (7) dias. O prazo de validade restante de tiras de teste carregadas é controlado pelo software e comunicado ao utilizador em tempo real. O sistema irá solicitar a remoção das tiras de teste que tenham sido utilizadas para além do período permitido.
- Apesar de não infecciosos, descarte os calibradores e controlos externos NeuMoDx após a utilização no recipiente de resíduos de risco biológico do laboratório para reduzir o risco de contaminação pelo ácido nucleico alvo incluído.

COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES



1. Manuseie todos os espécimes, calibradores e controlos como se fossem passíveis de transmitir agentes infecciosos.
2. Não congele espécimes de sangue total ou quaisquer outros armazenados em tubos primários.
3. Para preparar espécimes de plasma, o sangue total deve ser colhido em tubos estéreis, utilizando EDTA ou ACD como anticoagulante. Siga as instruções do fabricante do tubo para colheita de espécimes relativamente à preparação e ao armazenamento.
4. Os espécimes podem ser testados em tubos de colheita primários ou em tubos de espécime secundários. Recomendado para testes de tubos primários: BD Vacutainer® Plus Plastic K₂EDTA Tube (BD #368589) ou BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube (BD #362799).
5. Os espécimes de plasma preparados podem ser armazenados no NeuMoDx System até 8 horas antes do processamento. Se for necessário tempo adicional de armazenamento, é recomendado que os espécimes sejam refrigerados ou congelados como alíquotas de plasma secundárias.
6. Os espécimes de plasma preparados devem ser armazenados a temperaturas entre 2 e 8 °C até 7 dias antes do teste e durante um máximo de 8 horas à temperatura ambiente.
7. Espécimes preparados podem ser armazenados a ≤ -20 °C durante até 8 semanas, para plasma, antes do processamento.
 - a. Se as amostras estiverem congeladas, permitir que descongelem à temperatura ambiente (15-30 °C); agitar para gerar uma amostra uniformemente distribuída.
 - b. Assim que as amostras congeladas estiverem descongeladas, o teste deverá ocorrer num espaço de 8 horas.
 - c. As amostras de plasma não devem ser sujeitas a mais do que 4 ciclos de congelação/descongelação antes de serem utilizadas.
8. Se os espécimes forem expedidos, estes devem ser embalados e etiquetados em conformidade com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis.
9. Etiquetar claramente os espécimes e indicar que são para testes de VIH-1.
10. Avançar para a secção *Preparação para teste*.

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

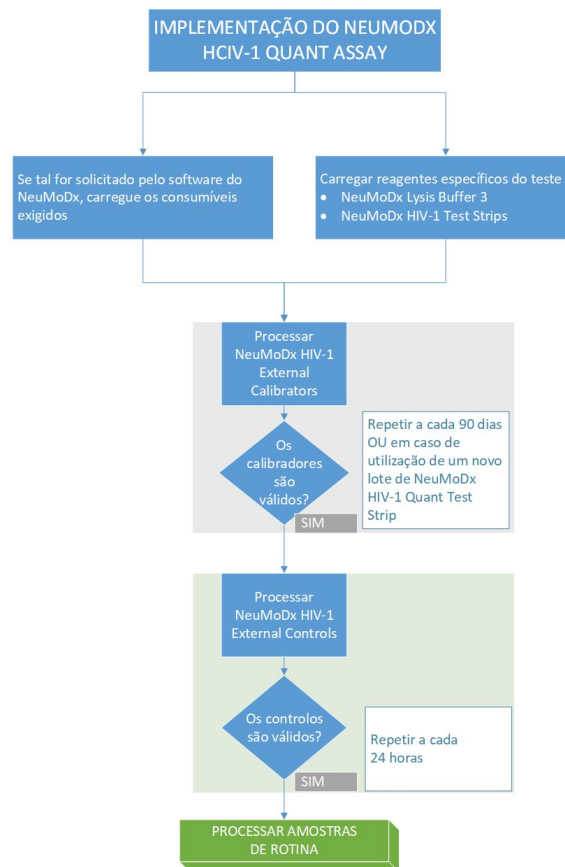


Figura 1: Fluxo de trabalho da implementação do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Preparação para teste

1. Aplicar a etiqueta de código de barras de espécime a um tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System. O tubo de colheita de sangue primário pode ser etiquetado e colocado diretamente num transportador de tubos de espécime de 24 ou 32 tubos, após a centrifugação e conforme indicado pelo fabricante. Em alternativa, uma alíquota do plasma pode ser transferida para um tubo secundário para processamento no NeuMoDx System.
2. Se estiver a testar o espécime no tubo de colheita primário, colocar o tubo etiquetado com código de barras num transportador de tubos de espécime e garantir que a tampa é removida antes de o carregar no NeuMoDx System.
3. Caso esteja a utilizar um tubo secundário, transferir uma alíquota do plasma para um tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System conforme 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 enchimento $\geq 750 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime (24 tubos): 14,5–18 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura, volume mínimo de enchimento $\geq 1200 \mu\text{L}$
 - Transportador de tubos de espécime de baixo volume (32 tubos): Tubo de microcentrifuga com base cónica de 1,5 mL, volume mínimo de enchimento $\geq 700 \mu\text{L}$

Operação do NeuMoDx System

Para obter instruções detalhadas, consultar os Manuais do Operador do NeuMoDx 288 Molecular System e do NeuMoDx 96 Molecular System (p/n 40600108 e 40600317)

1. Preencher um ou mais transportadores de tiras de teste NeuMoDx System com a(s) NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip(s) e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) de tiras de teste no NeuMoDx System.
2. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, adicionar os consumíveis necessários aos transportadores de consumíveis do NeuMoDx System e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System.
3. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, substituir o NeuMoDx Wash Reagent, o NeuMoDx Release Reagent, esvaziar os resíduos de iniciação, o contentor de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 288 Molecular System), o recipiente de resíduos de pontas (apenas NeuMoDx 96 Molecular System) ou o recipiente de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 96 Molecular System), conforme apropriado.
4. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, processar NeuMoDx HIV-1 Calibrators [REF 800304] e/ou NeuMoDx HIV-1 External Controls [REF 900301]. Podem ser encontradas mais informações acerca dos calibradores e controlos na secção *Processamento de resultados*.
5. Carregar o(s) tubo(s) de espécime/calibrador/controlo num transportador de tubos de espécime e garantir que as tampas foram removidas de todos os tubos.
6. Colocar o(s) transportador(es) de tubos de espécime na prateleira do carregador automático e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System. Tal irá iniciar o processamento dos espécimes carregados para os testes identificados, desde que esteja presente no sistema um pedido de teste válido.

LIMITAÇÕES

1. A NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip pode ser utilizada apenas em NeuMoDx Molecular Systems.
2. O desempenho da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip foi estabelecido para espécimes de plasma preparados a partir de sangue total colhido com EDTA/ACD como anticoagulante. A utilização da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip com outras fontes não foi avaliada e as características de desempenho são desconhecidas com outros tipos de espécimes.
3. O desempenho da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip foi estabelecido para testes de tubos primários utilizando BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA Tubes e BD Vacutainer PPT™ Plasma Preparation Tube.
4. O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay não deve ser utilizado com amostras de humanos heparinizados.
5. Uma vez que a deteção de VIH-1 está dependente do número de partículas virais presentes na amostra, a obtenção de resultados fiáveis depende da colheita, do tratamento e do armazenamento adequados do espécime.
6. Os NeuMoDx HIV-1 Calibrators e os NeuMoDx HIV-1 External Controls devem ser processados conforme recomendado nos folhetos informativos quando solicitado pelo software do NeuMoDx System, antes do processamento de amostras clínicas de rotina.
7. Podem ocorrer resultados erróneos devido à colheita, ao manuseamento ou ao armazenamento inadequados de espécimes, a erros técnicos ou à mistura de tubos de espécime. Além disso, podem ocorrer resultados falso-negativos devido ao facto de o número de partículas virais presente na amostra estar abaixo do limite de deteção do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.

8. A operação do NeuMoDx System apenas pode ser realizada por pessoal com formação para utilizar o NeuMoDx System.
9. Se ambos os alvos VIH-1 e SPC2 não forem amplificados, é comunicado um resultado inválido (Indeterminate [Indeterminado] ou Unresolved [Não resolvido]) e o teste deverá ser repetido.
10. Se o resultado do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay for Positive (Positivo), mas o valor de quantificação estiver além dos limites de quantificação, o NeuMoDx System irá comunicar se o VIH-1 detetado estava abaixo do limite inferior de quantificação (LIdQ) ou acima do limite superior de quantificação (LSdQ).
11. Se o VIH-1 detetado estiver abaixo do LIdQ, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser repetido (se pretendido) com outra alíquota do espécime.
12. Se o VIH-1 detetado estiver acima do LSdQ, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser repetido com uma alíquota diluída do espécime original. É recomendada uma diluição a 1:100 ou 1:1000 em plasma negativo para VIH-1 ou Basematrix 53 Diluent (Basematrix) (SeraCare, Milford, MA). A concentração do espécime original pode ser calculada da seguinte forma:

$$\text{concentração do espécime original} = \log_{10}(\text{fator de diluição}) + \text{concentração comunicada da amostra diluída}$$

13. A presença ocasional dos inibidores de PCR em plasma pode resultar num erro de quantificação do sistema. Se isto ocorrer, é recomendável que repita o teste com o mesmo espécime diluído em Basematrix a 1:10 ou 1:100.
14. Um resultado positivo não indica necessariamente a presença de VIH-1 viável. No entanto, um resultado positivo pressupõe a presença de ARN de VIH-1.
15. Eliminações ou mutações nas regiões conservadas visadas pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay podem afetar a deteção e originar um resultado incorreto.
16. Os resultados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay devem ser utilizados como complemento a observações clínicas e outras informações à disposição do médico.
17. São recomendadas boas práticas de laboratório, incluindo a troca de luvas entre o manuseamento de espécimes de pacientes, de forma a evitar a contaminação.

PROCESSAMENTO DE RESULTADOS

Os resultados disponíveis podem ser visualizados ou impressos a partir do separador "Results" (Resultados) na janela Results (Resultados) do ecrã tátil do NeuMoDx System.

Os resultados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay são gerados automaticamente pelo software do NeuMoDx System, utilizando o algoritmo de decisão e os parâmetros de processamento de resultados especificados no ficheiro de definição de ensaio NeuMoDx HIV-1 (HIV-1 Assay Definition File, HIV-1 ADF). Um resultado do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay pode ser reportado como Negative (Negativo), Positive with a reported HIV-1 concentration (Positivo com uma concentração de VIH-1 comunicada), Positive above ULoQ (Positivo acima do LSdQ), Positive below LLoQ (Positivo abaixo do LIdQ), Indeterminate (Indeterminado) ou Unresolved (Não resolvido), de acordo com o estado de amplificação do alvo e do controlo de processo de amostra. Os resultados são comunicados com base no algoritmo de decisão do ADF, resumido na *Tabela 1* abaixo.

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

RESULTADO*	Alvo(s) VIH-1	Controlo de processo de amostra (Sample Process Control 2, SPC2)
Positive with Reported Concentration (Positivo com concentração comunicada)	Amplified (Amplificado), $1,5 \leq [\text{VIH-1}] \leq 7,7 \log_{10} \text{ UI/mL}$	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)
Positive, above ULoQ (Positivo, acima do LSdQ)	Amplified (Amplificado), $[\text{VIH-1}] > 7,7 \log_{10} \text{ UI/mL}$	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)
Positive, below LLoQ (Positivo, abaixo do LIdQ)	Amplified (Amplificado), $[\text{VIH-1}] < 1,5 \log_{10} \text{ UI/mL}$	Amplified (Amplificado) ou Not Amplified (Não amplificado)
Negative (Negativo)	Not Amplified (Não amplificado)	Amplified (Amplificado)
Indeterminate (Indeterminado)	Not Amplified (Não amplificado), System Error Detected (Erro do sistema detetado)	
Unresolved (Não resolvido)	Not Amplified (Não amplificado), No System Error Detected (Nenhum erro do sistema detetado)	

*O intervalo de quantificação do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay é de $1,5$ a $7,7 \log_{10} \text{ UI/mL}$. Um resultado POSITIVE (Positivo) indica a deteção de ARN de VIH-1 e ajuda no diagnóstico de infeção por VIH-1. Um resultado NEGATIVE (Negativo) indica a ausência de ARN de VIH-1 ou que a carga viral se encontra abaixo do limite de deteção. Resultados falso-negativos ou com uma carga viral baixa falsa podem ser causados pela colheita e pelo armazenamento incorretos de espécime. Os resultados devem ser interpretados no contexto de todos os resultados clínicos e laboratoriais relevantes.

Cálculo do teste

1. Para amostras dentro do intervalo de quantificação do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay, a concentração de ARN de VIH-1 nas amostras é calculada utilizando a curva-padrão armazenada em conjunto com o coeficiente de calibração.
 - a. O coeficiente de calibração é calculado com base nos resultados dos NeuMoDx HIV-1 Calibrators processados para estabelecer a validade da curva-padrão para um lote específico da NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip num NeuMoDx System em particular.
 - b. O coeficiente de calibração está integrado na determinação final da concentração de ARN de VIH-1.
2. Os resultados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay são comunicados em \log_{10} UI/mL. O fator de conversão para o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay é de 0,75 cópia/UI.
3. A quantificação resultante de amostras desconhecidas é rastreável de acordo com um material de referência calibrado obtido através do National Institute for Biological Standards and Control.

Calibração de teste

É necessária uma calibração válida com base na curva-padrão para quantificar o ARN de VIH-1 presente nos espécimes. Para gerar resultados válidos, deve ser concluída uma calibração de teste utilizando os calibradores fornecidos pela NeuMoDx Molecular, Inc.

Calibradores

1. Os NeuMoDx HIV-1 Calibrators [REF 800304] contêm alvo VIH-1 encapsulado e não infeccioso preparado em Basematrix.
2. É necessário processar um conjunto dos calibradores de VIH-1 com cada novo lote de NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strips se for carregado um novo ficheiro de definição de ensaio VIH-1 no NeuMoDx System, se o conjunto atual de calibradores estiver fora do prazo de validade (definido atualmente para 90 dias) ou se o software do NeuMoDx System for modificado.
3. O software do NeuMoDx System irá notificar o utilizador quando for necessário processar calibradores. Não é possível utilizar um novo lote de tiras de teste para análise até que os calibradores tenham sido processados com êxito.
4. A validade da calibração é estabelecida da seguinte forma:
 - a) É necessário processar um conjunto de dois calibradores – um (1) alto e um (1) baixo – de forma a estabelecer a validade.
 - b) Pelo menos duas (2) das três (3) réplicas devem originar resultados dentro dos parâmetros predefinidos. O alvo nominal do calibrador baixo é de $3 \log_{10}$ UI/mL e o alvo nominal do calibrador alto é de $5 \log_{10}$ UI/mL.
 - c) É calculado um coeficiente de calibração para ter em conta a variação prevista entre lotes de tiras de teste. Este coeficiente de calibração é utilizado na determinação da concentração final de VIH-1.
5. Se um ou ambos os calibradores falharem na verificação de validade, repetir o processamento do calibrador ou dos calibradores que falharam utilizando um novo frasco. No caso de um calibrador falhar a validade, é possível repetir apenas o calibrador que falhou porque o sistema não necessita que o utilizador processe novamente ambos os calibradores.
6. Se os calibradores falharem a verificação de validade consecutivamente, contactar a NeuMoDx Molecular, Inc.

Controlo de qualidade

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

Controlos externos

1. Os NeuMoDx HIV-1 External Controls [REF 900301] contêm controlos positivos de alvo VIH-1 encapsulado e não infeccioso preparado em Basematrix e controlos negativos apenas de Basematrix.
2. Os controlos externos positivos e negativos devem ser processados a cada 24 horas ao longo do teste com o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay. Se não existir um conjunto válido de resultados de controlos externos, o software do NeuMoDx System irá solicitar ao utilizador que estes controlos sejam processados antes de os resultados da amostra poderem ser comunicados.
3. A validade dos controlos externos irá ser avaliada pelo NeuMoDx System de acordo com o resultado previsto. O controlo positivo deve fornecer um resultado Positive (Positivo) para VIH-1 e o controlo negativo um resultado Negative (Negativo) para VIH-1.
4. O tratamento de resultados discrepantes de controlos externos deve ser realizado da seguinte forma:
 - a) Um resultado de teste Positive (Positivo) para uma amostra de controlo negativo indica um problema de contaminação de espécimes.
 - b) Um resultado de teste Negative (Negativo) para uma amostra de controlo positivo pode indicar um problema relacionado com o reagente ou com o instrumento.
 - c) Em ambos os casos acima, ou em caso de um resultado indeterminado (IND), repetir os NeuMoDx HIV-1 External Controls com novos frascos do controlo ou controlos que falharam no teste de validade.
 - d) Se o NeuMoDx HIV-1 External Control positivo continuar a comunicar um resultado Negative (Negativo), contactar a assistência técnica da NeuMoDx.
 - e) Se um NeuMoDx HIV-1 External Control negativo continuar a comunicar um resultado Positive (Positivo), tentar eliminar todas as potenciais fontes de contaminação, incluindo substituir todos os reagentes antes de contactar o apoio ao cliente da NeuMoDx.

Controlos (internos) do processo de amostra

Um controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) exógeno está integrado na NeuMoDx Extraction Plate e passa por todo o processo de extração do ácido nucleico e de amplificação RT-PCR em tempo real com cada amostra. Estão também incluídos os iniciadores e a sonda específicos para o SPC2 em cada uma das NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip, permitindo a deteção do SPC2 em conjunto com o alvo ARN de VIH-1 (se presente) via RT-PCR em multiplex. A deteção da amplificação do SPC2 permite que o software do NeuMoDx System monitorize a eficácia dos processos de extração de ARN e de amplificação RT-PCR.

Resultados inválidos

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

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

Será comunicado um resultado UNR (Não resolvido) se não for detetada uma amplificação válida de ARN de VIH-1 ou de SPC2, o que indica uma possível falha de reagentes ou a presença de inibidores. Caso seja comunicado um resultado UNR (Não resolvido), recomenda-se, como primeiro passo, realizar um novo teste. Se o novo teste falhar, pode ser utilizada uma diluição de espécime para mitigar os efeitos de qualquer inibição da amostra.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica — Limite de deteção

A sensibilidade analítica do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi caracterizada testando uma série de diluições rastreável de acordo com o 3º padrão internacional da OMS para VIH-1 em plasma EDTA negativo quanto a ARN de VIH-1 analisado para determinar o limite de deteção (Limit of Detection, LdD) no NeuMoDx System. O LdD foi definido como o nível de alvo mais baixo detetado a uma taxa de $\geq 95\%$ tal como determinado pela análise de Probit. O estudo foi realizado ao longo de três (3) dias utilizando vários sistemas, operadores, processamentos e lotes de reagentes do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay. Cada sistema processou 12 réplicas em cada nível de diluição por dia. As taxas de deteção estão descritas na *Tabela 2*.

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

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

Através da análise de Probit, o LdD do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em plasma em todos os genótipos foi determinado como sendo de **34,2 UI/mL** (**1,5 \log_{10} UI/mL**) com um intervalo de confiança de 95% (IC) de 27,8 a 47,7 UI/mL (1,4–1,7 \log_{10} UI/mL) tal como testado no NeuMoDx 288 Molecular System [Figura 2].

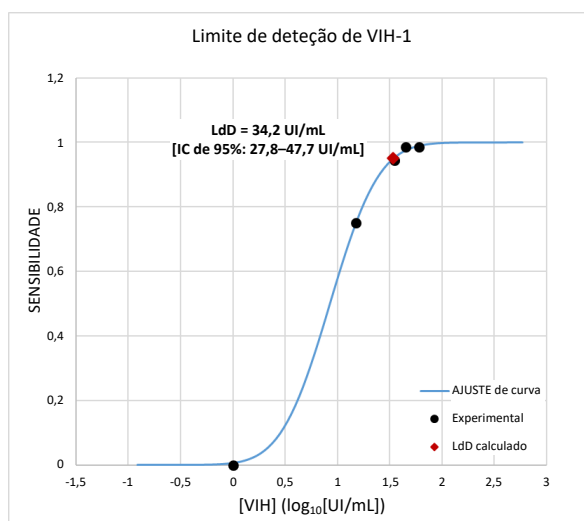


Figura 2: Análise de Probit do limite de deteção do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Sensibilidade analítica — Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LlDQ) é definido como sendo o nível de alvo mais baixo a que uma detecção de > 95% é alcançada e o erro analítico total é ≤ 1 . De forma a determinar o LlDQ, o erro analítico total (Total Analytical Error, TAE) foi calculado para cada um dos níveis do alvo VIH-1 como parte do cálculo do LlD. O TAE é definido da seguinte forma:

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

em que

tendência é o valor absoluto da diferença entre a média da concentração calculada e a concentração esperada

DP é desvio-padrão do valor quantificado da amostra

Os resultados compilados para os quatro (4) níveis de espécimes de plasma de VIH-1 utilizados no estudo de LlDQ que utilizou o subtipo B são apresentados na *Tabela 3*. Uma vez que o TAE calculado era ≤ 1 a níveis de VIH-1 abaixo do LlD, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay demonstrou um limite inferior de quantificação equivalente ao limite de detecção: **34,2 UI/mL** (IC de 95% 27,8–47,7 UI/mL) ou **1,5 log₁₀ UI/mL** (IC de 95% 1,4–1,7 log₁₀ UI/mL).

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

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

Sensibilidade analítica — Linearidade e determinação do limite superior de quantificação

A linearidade e o limite superior de quantificação (LsDQ) do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foram estabelecidos através da preparação de uma série de diluições de VIH-1 obtido junto do The External Quality Assurance Program Oversight Laboratory (Duke University, NC, EUA), AccuPlex™ Recombinant HIV/HCV Control (Seracare, MA, EUA) e HIV-1 RNA Working Reagent 2 para ensaios NAT (NIBSC). Um painel de nove membros foi preparado em plasma EDTA negativo quanto a ARN de VIH-1 em pools para abranger um intervalo de concentração de 7,70–1,70 log₁₀ UI/mL. O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay demonstrou capacidade para quantificar VIH-1 num intervalo linear de 6 log₁₀ com uma precisão de $\pm 0,33$ log₁₀ UI/mL baseado no erro padrão conforme calculado pelo intervalo de confiança de 95%. Não foi obtido qualquer benefício significativo utilizando ajustes de regressão de 2.ª ou 3.ª ordem. Utilizando os dados deste estudo, o LsDQ foi determinado como sendo de **7,7 log₁₀ UI/mL**. As concentrações do ensaio VIH-1 comunicadas pelo NeuMoDx System em comparação com os valores esperados são apresentadas na *Figura 3*.

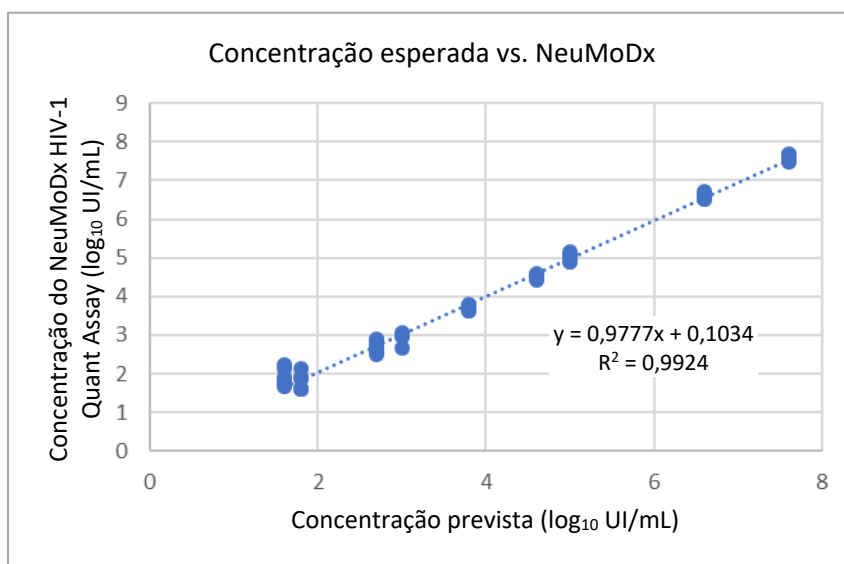


Figura 3: Intervalo linear do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay

Sensibilidade analítica — Linearidade entre genótipos

A linearidade do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay entre os grupos VIH-1 M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, K, CRF01_AE, CRF02_AG), N, O e P foi caracterizada testando pelo menos cinco (5) concentrações diferentes de cada grupo/subtipo de VIH-1 preparado em plasma EDTA negativo quanto a ARN de VIH-1 em pools. Os níveis testados dos alvos VIH-1 utilizados neste estudo estavam dependentes da concentração do espécime original e, assim, variavam entre grupos/subtipos. O estudo foi realizado com cada grupo/subtipo a utilizar seis (6) réplicas em cada nível. A linearidade foi demonstrada ao longo dos intervalos testados e é apresentada na *Tabela 4* e na *Figura 4*.

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

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

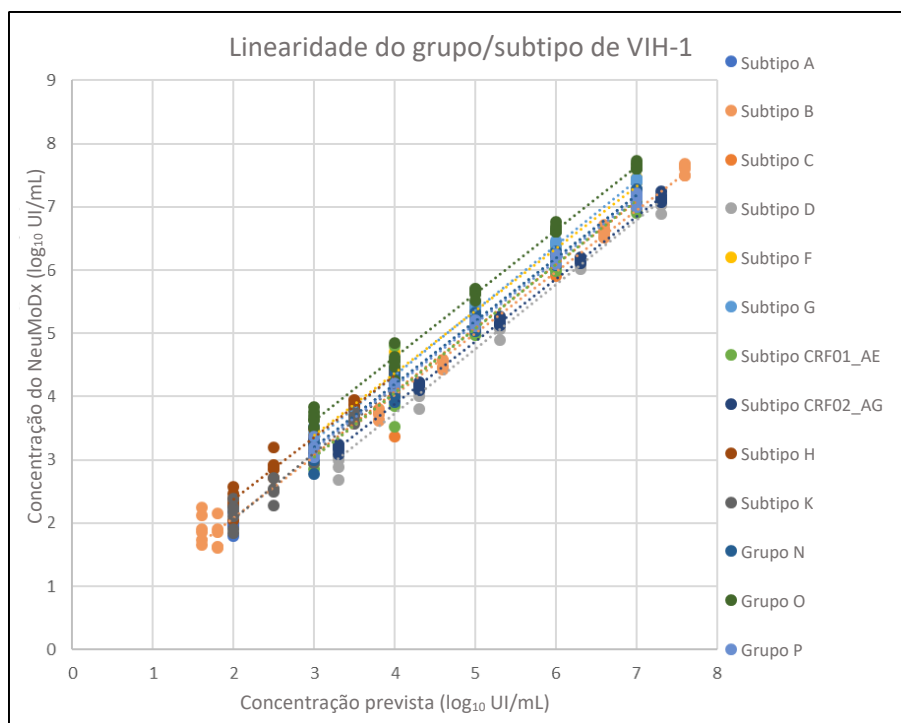


Figura 4: Linearidade do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay entre subtipos

Especificidade analítica — Contaminantes microbianos potencialmente interferentes

A especificidade analítica do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi avaliada testando um painel de microrganismos (*Tabela 5*) preparado em plasma EDTA negativo quanto a ARN de VIH-1 a concentrações elevadas para reatividade cruzada. A interferência potencial foi avaliada utilizando o mesmo painel de microrganismos preparado em plasma EDTA e enriquecido com VIH-1 a 2,02 log₁₀ UI/mL. Não foi observada qualquer reatividade cruzada, com todas as amostras microbianas negativas para VIH-1 a produzirem resultados negativos. Todas as amostras microbianas positivas para VIH-1 apresentaram resultados positivos e não foi observada qualquer interferência significativa nestas amostras, como demonstrado pelo desvio mínimo na quantificação de VIH-1 comunicada de espécimes de controlo sem quaisquer microrganismos potencialmente interferentes. Uma possível reatividade cruzada posterior foi avaliada através da análise comparativa da sequência de nucleótidos das sequências alvo do NeuMoDx HIV Quant Assay com os genomas completos de 26 patógenos adicionais (*Tabela 6*) utilizando a Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) disponibilizada pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI). A análise comparativa de sequências não demonstrou qualquer analogia entre as sequências alvo e os genomas examinados.

Tabela 5: Patogénicos testados quanto a especificidade analítica

Microrganismos potencialmente interferentes
Vírus da hepatite A
Vírus da hepatite B
Vírus da hepatite C
Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)
Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2)
Vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (VIH-2)
Vírus da imunodeficiência símia (VIS)
Vírus Epstein-Barr

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

Microrganismo	Número(s) de registo	Microrganismo	Número(s) de registo
Adenovírus tipo 12	X73487.1	Vírus herpes humano 5	GQ221974.1 KR534211.1 GQ221975.1 NC_006273.2
Poliovírus BK	AB369101.1 NC_001538.1 AB369092.1	Vírus herpes humano 7	AF037218.1 NC_001716.2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CP018052.1 CP017731.1	Vírus herpes humano 8	NC_009333.1
<i>Cutibacterium acnes</i>	NZ_CP006032.1	Vírus do papiloma humano tipo 18	NC_001357.1 MF288723.1
Vírus da dengue	KR919821.1 KR052012.1	Vírus do papiloma humano tipo 16	KY549222.1 KY549321.1
Herpesvírus simplex tipo 2	Z86099.2	Parvovírus humano B19	KX752821.1 MH201456.1
Adenovírus humano 2	J01917.1 AC_000007.1	Influenza A (todos os segmentos)	MN253846.1 MH797924.1 MH842686.1 MN037420.1
Adenovírus humano 5	KX868466.2 AC_000008.1 AY601635.1	Vírus JC	J02226.1 AB081030.1
Adenovírus humano C	AY339865.1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CP034022.1 CP041586.1

Herpesvírus beta humano 6A	NC_001664.4 X83413.2	<i>Propionibacterium acnes</i> C1	CP003877.1
Vírus herpes humano 1	X14112.1 JQ780693.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	AP017922.1
Vírus herpes humano 2	LT797626.1 JN561323.2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	AP008934.1
Vírus herpes humano 3	DQ479962.1 KC847290.1	Vírus do Nilo Ocidental	M12294.2 MF797870.1

Especificidade analítica — Substâncias endógenas e exógenas potencialmente interferentes

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi avaliado quanto à suscetibilidade a interferência por medicamentos normalmente receitados a indivíduos infectados com VIH-1, níveis elevados de substâncias endógenas e pela presença de doenças autoimunes. Plasma EDTA negativo quanto a ARN de VIH-1 analisado foi enriquecido com 3 log₁₀ UI/mL de VIH-1 e com albumina (120 mg/mL), bilirrubina (0,03 mg/mL), hemoglobina (3,5 mg/mL), triglicéridos (5,3 mg/mL) e compostos de medicamentos (Tabela 7) a três vezes a C_{max}. Foram analisados também plasma em estado de doença para lúpus eritematoso sistêmico (LES), anticorpo antinuclear (ANA) e artrite reumatoide (AR) negativos e enriquecidos com 3 log₁₀ UI/mL de VIH-1 para testes. Não foi observada qualquer interferência significativa. Os resultados do estudo são resumidos na Tabela 8.

Tabela 7: Compostos de medicamentos testados quanto a interferência

Classificação de medicamento	Nome do medicamento
Modulador imune	Interferão alfa-2a, Interferão alfa-2b, Ribavirina
Antagonista do CCR5	Maraviroc
Intensificador farmacocinético	Cobicistat
Inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI)	Doravirina, Efavirenz, Nevirapina, Rilpivirina
Inibidor da protease (IP)	Darunavir, Amprenavir, Ritonavir, Saquinavir, Simeprevir
Inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI) ou Inibidor da ADN polimerase	Cidofovir, Lamivudina, Ganciclovir, Tenofovir disoproxil, Zidovudina, Valganciclovir, Sulfato de abacavir, Emtricitabina, Entecavir, Foscarnet, Sofosbuvir
Inibidor da integrase	Raltegravir, Dolutegravir
Inibidor de fusão	Enfuvirtida
Tratamento de infecção oportunista	Azitromicina, Claritromicina, Fluconazol, Sulfametoxazol, Trimetoprim

Tabela 8: Resumo do teste de interferência — Agentes endógenos e exógenos

Endógenas	Média [VIH-1] (log ₁₀ UI/mL)	Tendência (log ₁₀ UI/mL)
Albumina	3,03	-0,11
Bilirrubina	3,04	-0,09
Hemoglobina	3,04	-0,09
Triglicéridos	3,14	0,01
Exógenos (medicamentos)	Média [VIH-1] (log ₁₀ UI/mL)	Tendência (log ₁₀ UI/mL)
Pool 1: Interferão alfa-2a, Interferão alfa-2b, Ribavirina, Maraviroc, Cobicistat	3,06	-0,07
Pool 2: Raltegravir, Dolutegravir, Efavirenz, Nevirapina, Rilpivirina	3,04	-0,09
Pool 3: Doravirina, Darunavir, Amprenavir, Ritonavir, Saquinavir	3,11	-0,02
Pool 4: Simeprevir, Enfuvirtida, Sulfato de abacavir, Emtricitabina, Entecavir, Foscarnet	3,12	-0,01
Pool 5: Cidofovir, Lamivudina, Ganciclovir, Tenofovir disoproxil, Zidovudina, Valganciclovir	3,14	0,01
Pool 6: Sofosbuvir, Azitromicina, Claritromicina, Fluconazol, Sulfametoxazol, Trimetoprim	3,13	0

Estado de doença	Média [VIH-1] (log ₁₀ UI/mL)	Tendência (log ₁₀ UI/mL)
Lúpus eritematoso sistêmico (LES)	3,00	-0,13
Anticorpo antinuclear (ANA)	3,10	-0,03
Artrite reumatoide (AR)	3,25	0,12

Precisão

A precisão do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi determinada testando um painel de quatro membros de amostras de VIH-1 preparado em plasma negativo quanto a VIH-1 (incorporando o subtipo B e o grupo O de VIH-1 do EQAPOL, Duke University) em três (3) NeuMoDx Systems ao longo de seis (6) dias. Foi realizado um total de 12 processamentos em cada sistema para cada nível de amostra, resultando em 216 réplicas por nível ao longo dos testes. Foram caracterizadas as precisões intraensaio, intradiária e intrassistema, e o desvio-padrão geral foi determinado como sendo $\leq 0,15$ log₁₀ UI/mL. Nenhuma diferença significativa foi observada no desempenho entre sistemas, dias ou processamentos, tal como apresentado na *Tabela 9*. A precisão entre operadores não foi determinada, uma vez que o operador não desempenha um papel significativo no processamento de amostras utilizando o NeuMoDx System.

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

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

Variação lote a lote

A reprodutibilidade lote a lote do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi verificada por análise retrospectiva de dados de testes de qualidade de três (3) lotes diferentes de reagentes críticos. Estes dados foram gerados através de testes funcionais dos reagentes num painel de três membros do alvo VIH (AccuPlex Recombinant HIV/HCV Control) em plasma negativo quanto a ARN de VIH-1, juntamente com amostra de plasma negativo. Foram processadas no total 18 réplicas positivas e 14 réplicas negativas por lote de NeuMoDx HIV-1 Quant Test Strip. Foi analisada a variação intralote e interlotes e os resultados são apresentados na *Tabela 10*. A tendência geral absoluta não excedeu 0,14 log₁₀ UI/mL e o desvio-padrão geral situou-se abaixo de 0,25 log₁₀ UI/mL. Nenhuma diferença significativa foi observada no desempenho entre lotes, uma vez que a quantificação de todos os membros do painel se encontrava dentro da especificação de tolerância.

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

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

Eficácia do controlo

O NeuMoDx HIV-1 Quant Assay inclui um controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC2) para comunicar falhas de processo e/ou amplificação. A eficácia deste controlo interno foi testada no NeuMoDx HCV Quant Assay análogo sob condições representativas de falhas críticas nos passos do processo que podem ocorrer durante o processamento de amostras e que poderão não ser detetadas pelos sensores de monitorização do desempenho do NeuMoDx System. Foram testadas amostras moderado-positivas e negativas para confrontar o controlo interno com a presença de inibidores da reação, sem fornecimento de NeuMoDx Wash Reagent e sem expulsão de solução de lavagem. Condições que tiveram um efeito adverso na deteção do alvo foram também refletidas na deteção do SPC2, resumida abaixo na *Tabela 11*. Todos os casos testados demonstraram a capacidade do controlo de processo de amostra em monitorizar as falhas de forma adequada ou que as falhas não detetadas não tiveram um efeito significativo na deteção e quantificação do alvo.

Tabela 11: Resumo do estudo da eficácia do controle de processo de amostra

Condição de falha simulada	Estado de amplificação do SPC2	Estado de amplificação do alvo	Resultado do ensaio
Presence of Inhibitor (Presença do inibidor)	Not Amplified (Não amplificado)	Not Amplified (Não amplificado)	Unresolved (Não resolvido)
No Wash Reagent Delivered (Sem fornecimento de reagente de lavagem)	Not Amplified (Não amplificado)	Not Amplified (Não amplificado)	Unresolved (Não resolvido)
No Wash Blowout (Sem expulsão da solução de lavagem)	Amplified (Amplificado)	Amplified (Amplificado)	Positive, $\pm 0,3 \log_{10}$ IU/mL of Control (Positivo, $\pm 0,3 \log_{10}$ UI/mL de controle)

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada para o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi determinada testando seis (6) processamentos de amostras alternadas de VIH-1 altamente positivas e negativas. Foram processadas no total 36 réplicas negativas e 36 réplicas de elevada titulação de VIH-1 a $6,0 \log_{10}$ UI/mL numa configuração de tabuleiro de damas. Todas as réplicas das amostras negativas foram comunicadas como negativas, o que demonstra que não houve contaminação cruzada durante o processamento de amostras no NeuMoDx System.

Equivalência da matriz de espécimes

Foram realizados testes para demonstrar a equivalência da matriz de espécimes entre sangue total colhido em tubos de colheita EDTA e ACD para a preparação de plasma. Foram realizados testes adicionais para determinar a equivalência entre espécimes de plasma recém-colhidos e congelados (colhidos nos dois tipos de tubo). Espécimes recém-colhidos foram mantidos a 2–4 °C antes de serem enriquecidos com quatro níveis de VIH-1 (incluindo um nível negativo) abrangendo o intervalo quantitativo do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay e testados quanto a equivalência. Em seguida, as amostras foram congeladas durante um mínimo de 24 horas a ≤ -20 °C. Após este período de armazenamento congelado, os espécimes foram descongelados e novamente testados. Os resultados dos espécimes de plasma EDTA vs. ACD e recém-colhidos vs. congelados foram comparados quanto a equivalência através de análise de regressão. Os resultados da análise de dados de regressão linear não indicaram qualquer diferença significativa nos valores comunicados entre plasma EDTA e ACD ou entre as condições de armazenamento de plasma recém-colhido ou congelado testado utilizando o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay.

Foram realizados testes adicionais para demonstrar a equivalência do desempenho do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em espécimes primários vs. espécimes secundários. Primeiro, foram processados painéis de espécimes de dadores negativos quanto a VIH-1 enriquecidos com alvo VIH-1 (AccuPlex Recombinant HIV/HCV Control) e painéis de espécimes de dadores positivos quanto a VIH-1 a partir dos tubos de espécime primários. Após o processamento dos tubos primários, o plasma restante de cada espécime foi separado em alíquotas para um tubo de espécime secundário e novamente processado. Não foi observada qualquer diferença significativa nos resultados comunicados entre o processamento dos tubos primários e secundários de plasma.

Comparação do método clínico

O desempenho qualitativo e quantitativo do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay foi comparado com o de um ensaio comparativo aprovado pela CE/FDA para IVD. Foram realizados testes internos através de um estudo cego único de espécimes de plasma restantes não identificados, obtidos a partir de um fornecedor reconhecido pela FDA. Foram processados no total 723 espécimes de plasma utilizando o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay em vários NeuMoDx Systems. Todas as amostras que inicialmente produziram um resultado inválido foram novamente processadas com êxito, produzindo resultados válidos para todos os espécimes submetidos a este estudo.

Erros de sistema e de processamento encontrados durante os testes foram mínimos e encontravam-se dentro dos critérios de aceitação estabelecidos. Um total de doze (12) resultados indeterminados (IND) e sete (7) resultados não resolvidos (UNR) produz uma taxa de resultados indeterminados de 1,48% (IC de 95%: 0,85–2,57%) e uma taxa de resultados não resolvidos de 0,86% (IC de 95%: 0,42–1,77%). A taxa geral de resultados válidos foi de 97,7% (IC de 95%: 96,4–98,5%).

Dos 723 resultados válidos obtidos, 165 foram comunicados como positivos pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay com valores de concentração correspondentes atribuídos pelos testes de referência. Foram produzidas análises de regressão de Deming e de regressão de Passing-Bablok para fazer a correlação entre os valores de concentração comunicados do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay e os valores comunicados pelos testes de referência.

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

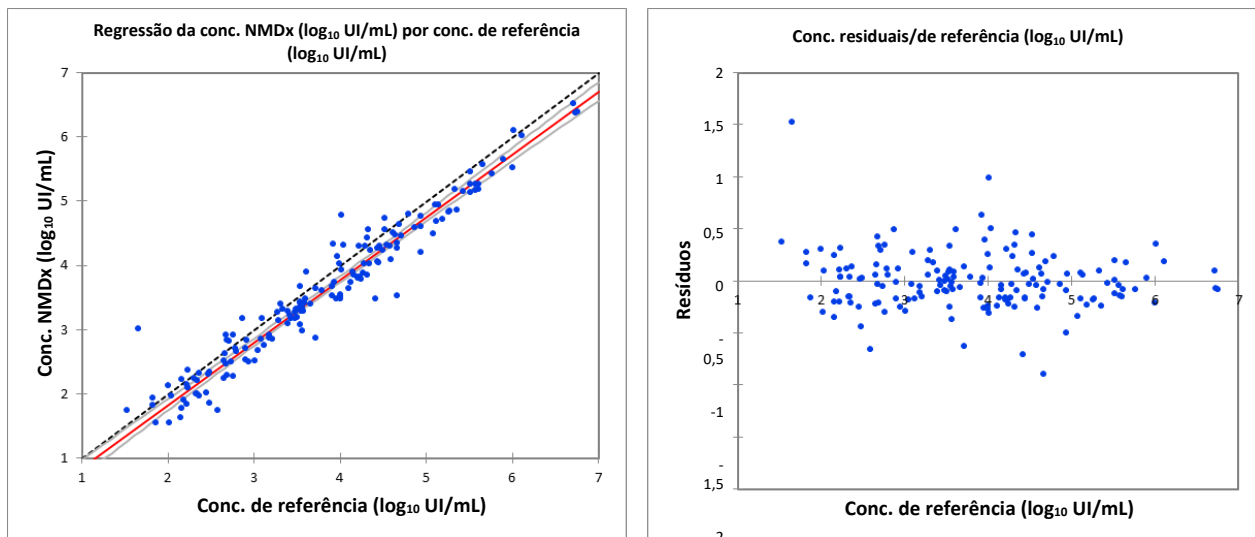


Figura 5: Gráficos de equivalência (à esquerda) e residuais (à direita) — Análise cumulativa do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. Testes de referência — Análise de Deming

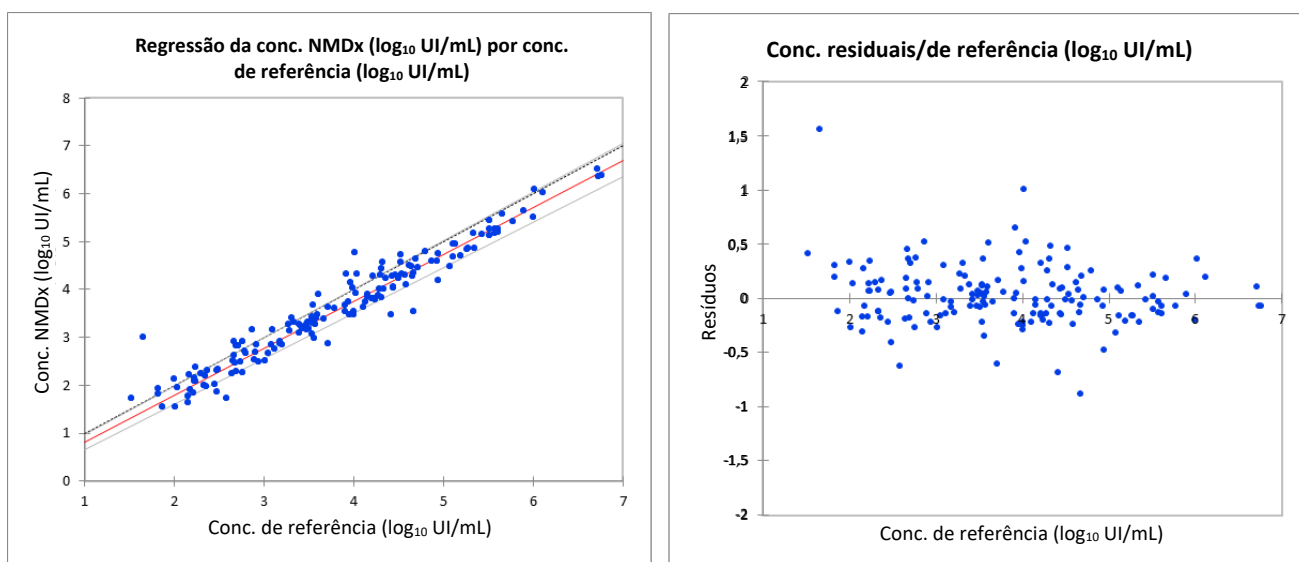


Figura 6: Gráficos de equivalência (à esquerda) e residuais (à direita) — Análise cumulativa do NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. Testes de referência — Análise de Passing-Bablok

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

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

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

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

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

Além disso, foi processado um total de 12 painéis de seroconversão comercialmente disponíveis, incluindo 75 amostra de plasma individuais, com o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay para demonstrar a detecção de ARN de VIH-1 antes da detecção de anticorpos/antigénios utilizando testes disponíveis comercialmente. Foram incluídos na análise membros de painel pré-seroconversão, de seroconversão precoce e de seroconversão. Foi realizada uma análise para comparar a primeira amostra sanguínea na qual é detetado ARN de VIH-1 pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay com a primeira amostra sanguínea positiva quanto a anticorpos/antigénios (Ab/Ag) de VIH-1, conforme comunicado por testes sanguíneos aprovados pela CE/FDA para IVD disponíveis comercialmente. Para todos os painéis testados, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay detetou ARN de VIH-1 em pelo menos uma amostra sanguínea antes do que os testes sanguíneos para a detecção de anticorpos/antigénios. Os resultados são resumidos na *Tabela 14*.

Tabela 14: Comparação do painel de seroconversão — NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. Teste sanguíneo de Ab/Ag de HIV-1

ID do painel	Dia de colheita da amostra sanguínea com o primeiro resultado positivo	
	NeuMoDx HIV-1 Quant Assay	Teste sanguíneo de Ab/Ag de VIH-1
PRB969	4	7
PRB968	5	7
0600-0230	2	4
0600-0270	2	3
0600-0258	2	3
0600-0244 (PRB962)	3	5
0600-0272	3	4
PRB967	2	4
PRB964	3	6
PRB963	4	6
0600-0263	5	7
PRB956	2	4

Foram realizadas análises adicionais para comparar a primeira amostra sanguínea na qual é detetado ARN de VIH-1 pelo NeuMoDx HIV-1 Quant Assay com a primeira amostra sanguínea positiva quanto a ARN de VIH-1, conforme comunicado por testes NAT aprovados pela CE/FDA para IVD disponíveis comercialmente. Para todos os painéis testados, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay detetou ARN de VIH-1 na mesma amostra sanguínea que os outros testes NAT para a detecção de ARN de HIV-1. Em dois painéis, o NeuMoDx HIV-1 Quant Assay demonstrou detetar ARN de VIH-1 uma amostra sanguínea antes do que os outros testes NAT. Os resultados são resumidos na *Tabela 15*.

Tabela 15: Comparação do painel de seroconversão — NeuMoDx HIV-1 Quant Assay vs. Teste NAT de ARN de HIV-1

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

REFERÊNCIAS

- Barré-sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(12):877-83.
- Piot P, Plummer FA, Mhalu FS, Lamboray JL, Chin J, Mann JM. AIDS: an international perspective. *Science.* 1988;239(4840):573-9.
- Acheson ED. AIDS: a challenge for the public health. *Lancet.* 1986;1(8482):662-6.
- De cock KM, Jaffe HW, Curran JW. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS.* 2012;26(10):1205-13.
- Gaines H, Von sydom MA, Von stedingk LV, et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS.* 1990;4(10):995-9.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1993;328(5):327-35.
- Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324(14):961-4.
- Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324(14):954-60.
- Coombs RW, Collier AC, Allain JP, et al. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1989;321(24):1626-31.
- Horsburgh CR, Ou CY, Jason J, et al. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet.* 1989;2(8664):637-40.
- Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 1993;259(5102):1749-54.
- Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA.* 2007;297(21):2349-50.
- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Department of Health and Human Services. Available at <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Updated December 18, 2019.
- Cohen MS, Chen YQ, Mccauley M, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493-505.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):123-6.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):117-22.
- Dimitrov DS, Martin MA. HIV results in the frame. CD4+ cell turnover. *Nature.* 1995;375(6528):194-5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARCAS COMERCIAIS

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

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


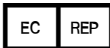








BD Vacutainer® é uma marca comercial registrada da Becton, Dickinson and Company

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

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

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

SÍMBOLOS

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

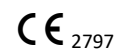


NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, EUA

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



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



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

Patente: www.neumodx.com/patents