

Aptima™ Zika Virus Assay

Para fins de diagnóstico *in vitro*.
Exclusivamente para exportação dos EUA.

Informações gerais	2
Utilização prevista	2
Resumo e explicação do teste	2
Princípios do procedimento	2
Advertências e precauções	3
Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes	5
Colheita e conservação de espécimes	6
Panther™ System	9
Reagentes e materiais fornecidos	9
Materiais necessários mas disponíveis separadamente	10
Materiais opcionais	11
Procedimento de teste no Panther System	11
Notas sobre o procedimento	17
Controlo de qualidade	18
Critérios de aceitação do Aptima Zika Virus Assay	18
Critérios de aceitação da calibração e cálculo do cutoff	18
Interpretação dos resultados	21
Limitações	22
Desempenho	23
Sensibilidade analítica	23
Reprodutibilidade	24
Interferência	26
Reatividade cruzada	28
Avaliação clínica	29
Bibliografia	32

Informações gerais

Utilização prevista

O Aptima Zika Virus Assay (Ensaio do Aptima vírus Zika) é um teste de amplificação mediada por transcrição que se destina a ser utilizado na detecção qualitativa de RNA do vírus Zika em soro, plasma ou urina processada. Os espécimes são testados utilizando o Panther™ System para processamento, amplificação e detecção automatizados de espécimes. Os resultados destinam-se a identificar o RNA do vírus Zika.

Resumo e explicação do teste

O vírus Zika (ZIKV) é um vírus de RNA membro da família *Flaviviridae* e do género *Flavivirus*.¹ Transmite-se aos humanos por mosquitos pertencentes ao género *Aedes*.² O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947 num macaco Rhesus infetado, na floresta Zika do Uganda, e em 1952 foram relatados os primeiros casos observados em seres humanos no Uganda e na República Unida da Tanzânia.³ Desde aí, foram documentados surtos esporádicos de ZIKV em diversas regiões de África e do Sudeste Asiático. A primeira ocorrência de um surto de ZIKV fora da Ásia ou de África verificou-se em 2007, quando se produziu um enorme surto na ilha Yap do Pacífico, nos Estados Federados da Micronésia.⁴

Em 2013 e 2014, foi relatado um enorme surto da doença do vírus ZIKV, associado a complicações clínicas, na Polinésia Francesa.⁵ Em Maio de 2015, confirmaram-se no Brasil os primeiros casos autóctones de infeção pelo ZIKV no continente americano.^{6,7} Em Dezembro de 2016, a Organização Mundial da Saúde informou que 75 países e territórios haviam relatado evidências da transmissão do vírus Zika por mosquitos desde 2007, 69 dos quais começaram a efetuar essas notificações a partir de 2015.⁸ O ZIKV está normalmente associado a enfermidades humanas que vão desde infeções subclínicas a enfermidades ligeiras semelhantes à gripe, mas a infeção pelo ZIKV tem sido igualmente associada a casos graves e, por vezes, fatais do síndrome de Guillain-Barré.⁹ O vírus foi igualmente associado à microcefalia e a outras anomalias congénitas em crianças nascidas de mães infetadas.¹⁰ Apesar de a principal via de infeção parecer ser a mordida de um mosquito, também se relataram casos de contágio do ZIKV por transmissão sexual¹¹ e, possivelmente, por transfusões¹².

Princípios do procedimento

O Aptima Zika Virus Assay foca-se em duas regiões altamente conservadas nas regiões NS2 e NS4/NS5 para ter uma maior tolerância a eventuais mutações. O ensaio envolve três passos principais que se realizam num único tubo, no Panther System automático: preparação da amostra, amplificação do alvo de RNA do ZIKV através de amplificação mediada por transcrição (TMA),¹³ e detecção dos produtos amplificados (produto da amplificação) através de um ensaio de proteção da hibridação (HPA).¹⁴ O ensaio incorpora um controlo interno (IC) para monitorizar a captura, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, bem como erros do operador ou do instrumento.

Durante a preparação da amostra, o RNA é isolado dos espécimes através da captura do alvo. O espécime é tratado com um detergente para solubilizar o invólucro viral, desnaturar as proteínas e libertar o RNA genómico viral. Os oligonucleótidos ("oligonucleótidos de captura") homólogos a regiões altamente conservadas do ZIKV são hibridados com a captura do alvo do RNA, se presente, no espécime de teste. O alvo hibridado é depois capturado por micropartículas magnéticas que são separadas do espécime num campo magnético. Utilizam-se passos de lavagem para remover componentes estranhos do tubo de reação. A separação magnética e os passos de lavagem realizam-se com um sistema de captura do alvo.

A amplificação do alvo ocorre via TMA, que é um método de amplificação de ácidos nucleicos baseado na transcrição que utiliza duas enzimas: a transcriptase reversa MMLV e a T7 RNA polimerase. A transcriptase reversa é utilizada para criar uma cópia de DNA (com uma sequência promotora para a T7 RNA polimerase) da sequência-alvo do RNA. A T7 RNA polimerase produz várias cópias do produto da amplificação do RNA a partir do modelo da cópia do DNA. O Aptima Zika Virus Assay utiliza o método da TMA para amplificar regiões de RNA do ZIKV.

A detecção é alcançada mediante a utilização por parte do HPA de sondas de ácidos nucleicos de cadeia única com marcadores quimioluminescentes, que são complementares ao produto da amplificação. As sondas de ácido nucleico marcadas hibridam-se especificamente com o produto da amplificação. O reagente de seleção estabelece a diferença entre as sondas hibridadas e não hibridadas através da desativação dos marcadores das sondas não hibridadas. Durante a fase de detecção, o sinal quimioluminescente produzido pela sonda hibridada é medido num luminómetro, sendo registado como unidades de luz relativas (Relative Light Units, RLU).

O controlo interno é adicionado a cada espécime de teste e ao calibrador do ensaio através do reagente de captura do alvo de trabalho. O controlo interno do Aptima Zika Virus Assay controla as fases de processamento, amplificação e detecção dos espécimes. O sinal do controlo interno é discriminado do sinal do ZIKV pela cinética diferencial da emissão de luz das sondas com diferentes marcadores.¹⁴ O produto da amplificação específico do controlo interno é detetado por meio de uma sonda com uma emissão rápida de luz (sinal intermitente). O produto da amplificação específico do ZIKV é detetado por meio de sondas com uma cinética relativamente mais lenta de emissão de luz (sinal contínuo). O ensaio cinético Dual (DKA) é um método utilizado para estabelecer a diferença entre os sinais intermitentes e os sinais contínuos.¹⁵

Os calibradores do Aptima Zika Virus Assay são utilizados para determinar o cutoff do ensaio e para avaliar a validade da série analítica em cada execução. Consulte a secção *Controlo de qualidade* para obter mais detalhes.

Advertências e precauções

- A. Para fins de diagnóstico *in vitro*.
- B. Para reduzir o risco de resultados inválidos, leia atentamente todo o folheto informativo e o *Manual de instruções do Panther System* antes de executar este ensaio.

Relacionadas com o laboratório

- C. Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do Aptima Zika Virus Assay e no manuseamento de materiais infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfete imediatamente seguindo os procedimentos adequados do local.
- D. Utilize apenas os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- E. Tome todas as precauções laboratoriais de rotina. Não pipete com a boca. Não coma, não beba, nem fume nas áreas de trabalho designadas. Use luvas sem pó descartáveis, proteção ocular e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes de um kit. Lave bem as mãos depois de manusear os espécimes e os reagentes do kit.

- F. As superfícies de trabalho, as pipetas e outro equipamento devem ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M).
- G. Elimine todos os materiais que tenham estado em contacto com espécimes e reagentes de acordo com os regulamentos europeus, nacionais e locais.^{16,17,18,19} Limpe e desinfete minuciosamente todas as superfícies de trabalho.
- H. O reagente enzimático contém azida de sódio como conservante. Não utilize tubos de metal para a transferência de reagentes. Se as soluções com compostos de azida de sódio forem eliminadas num sistema de canalização, deverão antes ser diluídas e irrigadas com água corrente em abundância. Estas precauções são recomendadas para evitar a acumulação de depósitos em canos metálicos onde se poderiam desenvolver condições explosivas.





Relacionadas com os espécimes

- I. Os espécimes podem ser infecciosos. Utilize as Precauções universais^{16,17,18} quando executar este ensaio. Devem estabelecer-se métodos adequados de manuseamento e de eliminação, de acordo com os regulamentos locais.¹⁹ Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do Aptima Zika Virus Assay e com formação no manuseamento de materiais infecciosos.
- J. É obrigatório seguir os procedimentos de colheita, transporte, armazenamento e processamento de espécimes indicados neste folheto informativo para realizar o ensaio nas condições ideais. A colheita, transporte ou armazenamento indevido dos espécimes pode dar origem a resultados incorretos.
- K. Mantenha condições de conservação adequadas durante o transporte de espécimes para garantir a integridade do espécime. A estabilidade do espécime em condições de transporte além das recomendadas não foi avaliada.
- L. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento dos espécimes. Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis quando desaperatar ou destapar espécimes. Os espécimes podem conter níveis de organismos extremamente elevados. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não entram em contacto uns com os outros e deite fora os materiais usados sem passá-los por cima de recipientes abertos. Mude de luvas se estas entrarem em contacto com o espécime.

Relacionadas com o ensaio

- M. Não utilize o kit de reagentes ou os calibradores após o prazo de validade.
- N. Não troque, misture, nem combine reagentes do ensaio de kits com números de lote mestre diferentes. Os fluidos do ensaio podem pertencer a números de lote diferentes.
- O. Evite a contaminação microbiana ou com nucleases dos reagentes.
- P. Tape e conserve todos os reagentes do ensaio às temperaturas especificadas. O desempenho do ensaio pode ser afetado pela utilização de reagentes conservados de forma incorreta. Consulte as secções *Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes* e *Procedimento de teste no Panther System* para obter mais informações.

- Q. Não combine quaisquer reagentes ou fluidos do ensaio sem instruções específicas para tal. Não adicione reagentes ou fluidos. O Panther System verifica os níveis dos reagentes.
- R. Alguns reagentes deste kit estão marcados com símbolos de risco e de segurança e devem ser manuseados em conformidade com os mesmos.

	<p>Reagente de amplificação ADVERTÊNCIA H315 - Provoca irritação cutânea H319 - Provoca irritação ocular grave</p>
	<p>Reagente enzimático ADVERTÊNCIA H315 - Provoca irritação cutânea H319 - Provoca irritação ocular grave H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros</p>
 	<p>Reagente de seleção <i>Ácido bórico 1 - 5%</i> <i>Hidróxido de sódio <1%</i> ADVERTÊNCIA H315 - Provoca irritação cutânea H319 - Provoca irritação ocular grave H371 - Pode afetar os órgãos H373 - Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida P264 - Lavar o rosto, as mãos e qualquer porção de pele exposta cuidadosamente após o manuseamento P280 - Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial P305 + P351 + P338 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar P337 + P313 - Caso a irritação ocular persista: consulte um médico P302 + P352 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes P332 + P313 - Em caso de irritação cutânea: consulte um médico P362 - Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de voltar a usar</p>

Nota: para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em www.hologic.com/sds.

Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes

- A. A tabela seguinte mostra as condições de conservação e de estabilidade dos reagentes e dos calibradores.

Reagente	Conservação de produtos por abrir	Kit aberto (descongelado) ^a	
		Conservação	Estabilidade
Reagente de amplificação	-35 °C a -15 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^b
Reagente enzimático	-35 °C a -15 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^b
Reagente de sonda	-35 °C a -15 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^b
Controlo interno	-35 °C a -15 °C	15 °C a 30 °C	8 horas antes de combinar com o TCR
Reagente de captura do alvo (TCR)	2 °C a 8 °C	n/d	n/d
Reagente de captura do alvo de trabalho (wTCR)	n/d	2 °C a 8 °C	30 dias ^b
Reagente de seleção	15 °C a 30 °C	15 °C a 30 °C	30 dias ^b

NCAL (Calibrador negativo)	-35 °C a -15 °C	n/d	Frasco descartável Utilizar num período de 8 horas
PCAL (Calibrador positivo)	-35 °C a -15 °C	n/d	Frasco descartável Utilizar num período de 8 horas

^a As condições de armazenamento e estabilidade do kit aberto baseiam-se em ensaios similares validados.

^b Quando os reagentes são removidos do Panther System, devem ser imediatamente devolvidos às respetivas temperaturas de conservação adequadas.

- B. Elimine qualquer reagente previamente preparado que não tenha sido utilizado e o reagente de captura do alvo de trabalho decorrido um período de 30 dias.
- C. A estabilidade dos reagentes conservados dentro do Panther System é de 120 horas (acumuladas). O Panther System regista cada uma das vezes que os reagentes são carregados.
- D. Se ocorrer a formação de precipitado no reagente de captura do alvo (TCR) durante o armazenamento, consulte as instruções fornecidas na secção *Preparação de um novo kit*. NÃO COLOCAR NO VORTEX. NÃO CONGELAR O TCR.
- E. Após a descongelação inicial, não congele novamente os reagentes de controlo interno, de amplificação, enzimáticos e de sonda.
- F. Os calibradores são frascos de utilização única e devem ser eliminados após a respetiva utilização.
- G. Se ocorrer a formação de precipitado no reagente de seleção, no reagente de sonda, no calibrador negativo ou no calibrador positivo, consulte as instruções fornecidas na secção *Procedimento de teste no Panther System*.
- H. A ocorrência de alterações no aspeto físico do reagente fornecido pode indicar a instabilidade ou deterioração desses materiais. Se observar alterações no aspeto físico dos reagentes (por exemplo, alterações óbvias na cor do reagente ou turvação são indicadores de contaminação microbiana), não os utilize.
- I. Depois de descongelar os calibradores, a solução deve estar límpida, ou seja, sem turvação ou precipitados.
- ⚠ J. O reagente de sonda é fotossensível. Proteja o reagente da luz durante a conservação e a preparação para utilização.

Colheita e conservação de espécimes

O Aptima Zika Virus Assay pode ser usado com espécimes de soro, plasma e urina processada.

Um espécime de urina processada é constituído por urina pura adicionada a meio de transporte de urina num tubo de transporte de espécimes de urina Aptima.

Nota: manuseie todos os espécimes como se contivessem agentes potencialmente infecciosos. Use as Precauções universais.

Nota: tenha cuidado para evitar a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento das amostras. Por exemplo, elimine o material usado sem passar por cima de tubos abertos. Podem ocorrer resultados positivos falsos se a contaminação cruzada de espécimes não for controlada de forma adequada durante o manuseamento e o processamento dos espécimes.

Nota: o volume mínimo de soro ou plasma para tubos de colheita primários é de 1200 µl e para tubos de alíquotas de espécime (SATs) o volume mínimo é de 700 µl para se obter 500 µl de volume de reação.

A. Instruções de colheita

Consulte o folheto informativo do kit de colheita de espécimes adequado para obter instruções de colheita.

1. Espécimes de plasma e soro

Podem utilizar-se espécimes de sangue total colhidos nos seguintes tubos de vidro ou de plástico, de acordo com as instruções do fabricante:

- Tubos com anticoagulantes de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido de citrato e dextrose adenina (ACD-A) ou citrato de sódio (NAC)
- Tubos de preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPTs)
- Tubos de soro
- Tubos de separação de soro (Serum Separator Tubes, SSTs)

No caso de soro, aguarde até o coágulo se formar antes de continuar o processamento.

2. Espécimes de urina

Os espécimes de urina devem ser colhidos de acordo com as instruções do fabricante.

B. Transporte e armazenamento de espécimes antes do teste

1. Espécimes de plasma e soro

O plasma e o soro podem ser armazenados durante um total de 13 dias desde a data da colheita até à data do teste, nas seguintes condições:

- Os espécimes de sangue total devem ser centrifugados num período máximo de 72 horas após a colheita.
 - Os espécimes devem ser armazenados a uma temperatura situada entre os 2 °C e os 8 °C, a menos que sejam congelados. No entanto, os espécimes podem ficar armazenados durante 72 horas a temperaturas até 25 °C e durante 24 horas a temperaturas até 30 °C.
- a. Se necessitar de um período de armazenamento mais prolongado, congele o plasma e o soro em separado dos glóbulos e armazene-os a uma temperatura de -20 °C ou -70 °C. Não congele o sangue total.
 - b. Não se observou qualquer efeito adverso no desempenho do ensaio após a sujeição dos espécimes de plasma e de soro a três ciclos de congelação-descongelação.
 - c. Certifique-se de que os espécimes de plasma e de soro possuem um volume de amostra suficiente por cima do separador de gel ou da interface dos glóbulos vermelhos.
 - d. Os espécimes com precipitados visíveis ou material fibrinoso devem ser clareados com recurso a uma centrifugação de 10 minutos entre 1000 e 3000g antes do teste.

2. Espécimes de urina

- a. A urina deve ser transferida para um tubo de transporte de espécimes de urina, o qual contém meio de transporte de urina, e bem misturada num período de 72 horas. Consulte o folheto informativo do kit de colheita adequado.
- b. Guarde os espécimes de urina misturados e processados a uma temperatura situada entre 2 °C e 30 °C e teste-os num período de 30 dias após a colheita. Se necessitar de um período de armazenamento mais prolongado, congele o espécime de urina processado a uma temperatura de -20 °C ou -70 °C.
- c. Não se observou qualquer efeito adverso no desempenho do ensaio após a sujeição da urina processada a três ciclos de congelação-descongelação.
- d. Certifique-se de que os espécimes possuem um volume de amostra suficiente.
- e. Os espécimes com precipitados visíveis ou material fibrinoso devem ser clareados com recurso a uma centrifugação de 10 minutos entre 1000 e 3000g antes do teste.

C. Armazenamento de espécimes após o teste

1. Os espécimes testados devem ser armazenados em posição vertical num suporte.
2. Os tubos de espécimes devem ser cobertos com uma película de plástico nova e limpa ou com folha de alumínio.
3. Se as amostras testadas tiverem de ser congeladas ou expedidas, coloque novas tampas nos tubos de espécimes. Se os espécimes tiverem de ser expedidos para serem testados noutra local, mantenha as temperaturas recomendadas. Antes de retirar as tampas de amostras anteriormente testadas e tapadas, centrifugue os tubos de espécimes por breves instantes (5 minutos a 500g) para deslocar o líquido para o fundo do tubo. **Evite salpicos e contaminação cruzada.**

Nota: os espécimes devem ser transportados de acordo com os regulamentos de transporte nacionais, internacionais e regionais em vigor.

Panther™ System

Os reagentes do Aptima Zika Virus Assay para o Panther System são indicados abaixo. Os símbolos de identificação do reagente também estão indicados ao lado do nome do reagente.

Reagentes e materiais fornecidos

Nota: para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em www.hologic.com/sds.

Os kits do calibrador do Aptima Zika Virus devem ser adquiridos em separado. Consulte o número do kit de catálogo individual abaixo.

Kit do Aptima Zika Virus Assay, 1000 testes (4 x 250 testes) Código de produto PRD-04232 (3 caixas de ensaios)

Caixa do Aptima Zika Virus Assay

(conservar a uma temperatura entre -35 °C e -15 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
A	Reagente de amplificação <i>Ácidos nucleicos não infecciosos em solução tamponada.</i>	4 x 26 ml
E	Reagente enzimático <i>Transcriptase reversa e polimerase de RNA em solução tamponada com HEPES.</i>	4 x 13,4 ml
P	Reagente de sonda <i>Sondas quimioluminescentes em solução tamponada com succinato.</i>	4 x 34,7 ml
IC	Reagente do controlo interno <i>Uma solução tamponada com HEPES, com detergente e transcrito de RNA.</i>	4 x 2,8 ml
	Ficha de Códigos de Barras do Lote Mestre	1 folha

Caixa do Aptima Zika Virus Assay

(conservar a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
S	Reagente de seleção <i>Solução tamponada com borato a 600 mM e com surfactante.</i>	4 x 91 ml

Caixa do Aptima Zika Virus Assay

(conservar a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
TCR	Reagente de captura do alvo <i>Ácidos nucleicos em solução salina tamponada com fase sólida, ácidos nucleicos não infecciosos.</i>	4 x 161 ml

Materiais necessários mas disponíveis separadamente

Nota: os materiais disponíveis na Hologic têm a indicação dos códigos de produto, a menos que o contrário seja especificado.

Material	Código de produto
Panther System	—
Kit de fluidos do Aptima Assay (também conhecido como Kit de fluidos universais) <i>contém solução de lavagem Aptima, tampão para o fluido de desativação Aptima e reagente de óleo Aptima</i>	303014 (1000 testes)
Kit Auto Detect Aptima	303013 (1000 testes)
Unidades Multitubos (MTUs)	104772-02
Kit de sacos de resíduos Panther	902731
Tampa do recipiente de resíduos Panther	504405
ou, Kit de execução do Panther System <i>contém MTUs, sacos de resíduos, tampas de recipientes de resíduos, Auto Detect e fluidos de ensaio</i>	303096 (5000 testes)
Pontas, condutoras de 1000 µl, detecção de líquido	10612513 (Tecan)
Kit de calibradores do Aptima Zika Virus <i>NCAL. Calibrador negativo, solução tamponada com detergente, 15 x 2,2 ml</i> <i>PCAL. Calibrador positivo, transcrito de RNA em solução tamponada com detergente, 15 x 2,2 ml</i>	PRD-04233
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M)	—
Luvas sem pó descartáveis	—
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A
Tampas de substituição para reagentes, para frascos de 250 testes	
<i>Reagentes de amplificação e de sonda</i>	<i>CL0042 (100 tampas)</i>
<i>Reagente enzimático</i>	<i>501619 (100 tampas)</i>
<i>TCR e reagentes de seleção</i>	<i>CL0039 (100 tampas)</i>
Coberturas de bancada laboratorial com forro de plástico	—
Toalhetes que não larguem pêlos	—
Pipetador	—
Pontas	—
Podem utilizar-se tubos de colheita de sangue primários com as seguintes dimensões:	—
<i>13 mm x 100 mm</i>	
<i>13 mm x 75 mm</i>	
<i>16 mm x 100 mm</i>	
Centrífuga	—
Misturador vortex	—

Materiais opcionais

Material	Código de produto
Tubos de alíquotas de espécime Aptima (SAT) (100 por embalagem)	503762
Tampa de tubo de transporte (100 por embalagem) <i>tampa para SAT</i>	504415
Pipetas de transferência	—
Zaragatoas com ponta de algodão	—
Dispositivo de agitação de tubos por oscilação	—
Kit de colheita de espécimes de urina Aptima	301040
ou Tubos de transporte de espécimes de urina Aptima	105575
Sistema de equilíbrio de reagentes SB100™ (SB100-RES)	—
Banho de água	—

Procedimento de teste no Panther System

Nota: consulte o Manual de instruções do Panther System para obter mais informações sobre o procedimento.

Nota: consulte a Ficha de Aplicação do Sistema de equilíbrio de reagentes SB100 para obter informações opcionais sobre a preparação dos reagentes.

A. Preparação da área de trabalho

1. Limpe as superfícies de trabalho onde serão preparados os reagentes. Utilize 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxague com água desionizada (DI). Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada com coberturas de bancada laboratorial com forro de plástico, absorventes e limpas.
2. Limpe uma superfície de trabalho separada onde as amostras serão preparadas. Siga o procedimento supramencionado (passo A.1).
3. Limpe as pipetas. Siga o procedimento de limpeza supramencionado (passo A.1).

B. Preparação de um novo kit

Advertência: evite formar espuma excessiva nos reagentes. A espuma compromete o sensor de nível do Panther System.

Nota: o reagente de sonda é fotossensível. Proteja o reagente da luz durante a conservação e durante o manuseamento do mesmo.

Nota: os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda podem ser descongelados durante 24 horas a uma temperatura de 2 °C a 8 °C antes de preparar os reagentes.

Nota: o controlo interno pode ser descongelado durante 24 horas a uma temperatura de 2 °C a 8 °C ou durante 8 horas à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes de preparar o reagente de captura do alvo de trabalho (wTCR).

Preparação do reagente de captura do alvo (TCR) e dos reagentes de amplificação, enzimático e de sonda

1. Retire um conjunto novo de reagentes do armazenamento. Verifique os números de lote nos frascos de reagentes para se certificar de que correspondem aos números de lote da folha de códigos de barras do lote mestre.
2. Deixe os reagentes alcançarem a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) utilizando uma das três opções descritas abaixo:

Preparação com o instrumento SB100-RES (Opção 1)

1. **Imediatamente** depois de retirar o TCR do local de armazenamento (a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C), inverta o frasco do reagente vigorosamente para misturar o gel com a solução (realize um mínimo de 10 inversões até já não se observarem vestígios de gel na secção inferior). **NÃO COLOCAR NO VORTEX.**
2. Prepare o TCR e os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda com o instrumento SB100-RES.
3. Depois de descarregar os reagentes, registre a data de descongelação dos reagentes de amplificação, enzimático e de sonda no espaço fornecido na etiqueta.

Preparação com o banho de água (Opção 2)

Advertência: a temperatura do banho de água não deve exceder os 30 °C.

Nota: consulte as instruções de preparação à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) para preparar o TCR. Não utilize um banho de água para preparar o TCR.

1. Depois de retirar os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda do armazenamento (a temperaturas situadas entre -35 °C e -15 °C ou 2 °C e 8 °C), coloque-os em posição vertical num banho de água dedicado à temperatura ambiente (entre 15 °C e 30 °C). A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente os reagentes para os misturar bem e examine-os visualmente para confirmar a dissolução dos precipitados. Continue a inverter cuidadosamente e a examinar visualmente até deixar de observar a presença de precipitados.
2. Certifique-se de que os precipitados se dissolveram. Não utilize um reagente se apresentar a formação de gel, precipitado ou um tom turvo.
3. Registre a data de descongelação dos reagentes de amplificação, enzimático e de sonda no espaço fornecido na etiqueta.

Preparação à temperatura ambiente (Opção 3)

Nota: a descongelação completa do reagente de sonda armazenado a uma temperatura situada entre -35 °C e -15 °C pode demorar cerca de 4 horas à temperatura ambiente (entre 15 °C e 30 °C) com inversões suaves a, pelo menos, cada 10 minutos.

1. Para preparar o TCR, proceda da seguinte forma:
 - a. **Imediatamente** depois de retirar o TCR do local de armazenamento (a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C), inverta o frasco do reagente vigorosamente para misturar o gel com a solução (realize um mínimo de 10 inversões até já não se observarem vestígios de gel na secção inferior). **NÃO COLOCAR NO VORTEX.**
 - b. Deixe o frasco de TCR permanecer à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) durante, pelo menos, 45 minutos. A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente o frasco de TCR (mínimo de 10 inversões) para o misturar bem e examine-o visualmente para confirmar que não está presente qualquer gel.
 - c. Antes da utilização, assegure-se de que o gel está dissolvido e de que as partículas magnéticas estão em suspensão.

Nota: se estiverem presentes vestígios de gel, não o utilize. Coloque novamente o frasco de TCR no armazenamento (2 °C a 8 °C) para utilizá-lo posteriormente. Retire um novo frasco de TCR do armazenamento (2 °C a 8 °C) e repita os passos 1.a a 1.c.

2. Para preparar os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda, proceda da seguinte forma:
 - a. Depois de retirar os reagentes do armazenamento (a temperaturas situadas entre -35 °C e -15 °C ou 2 °C e 8 °C), coloque-os em posição vertical à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C). A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente os reagentes para os misturar bem e examine-os visualmente para confirmar a dissolução dos precipitados. Continue a descongelar até deixar de observar a presença de precipitados.
3. Certifique-se de que os precipitados se dissolveram. Não utilize um reagente se apresentar a formação de gel, precipitado ou um tom turvo.
4. Registe a data de descongelação dos reagentes de amplificação, enzimático e de sonda no espaço fornecido na etiqueta.

Preparação do controlo interno e do reagente de captura do alvo de trabalho (wTCR)

Nota: não utilize o instrumento SB100-RES para preparar o controlo interno.

1. Para preparar o controlo interno, proceda da seguinte forma:
 - a. Retire um tubo de controlo interno do armazenamento (-35 °C a -15 °C ou 2 °C a 8 °C).
 - b. Depois de retirar o controlo interno do armazenamento (a temperaturas situadas entre -35 °C e -15 °C ou 2 °C e 8 °C), coloque-o à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) durante um mínimo de 30 minutos.

Opção: o tubo do controlo interno pode ser colocado num banho de água à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C).

- c. A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente o tubo do controlo interno para o misturar bem e examine visualmente a presença de gel. Antes de utilizar, certifique-se de que o gel está dissolvido.

Opção: durante a preparação à temperatura ambiente, o tubo do controlo interno pode ser colocado num dispositivo de agitação de tubos por oscilação para ser bem misturado.

Nota: se ocorrer a formação de gel, será necessário dissolvê-lo antes de o utilizar, dentro do período de 8 horas de descongelação à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C). Se continuarem presentes vestígios de gel, não o utilize. Elimine o tubo, obtenha um novo tubo de controlo interno e repita os passos 1.a a 1.c.

2. Para preparar o wTCR, proceda da seguinte forma:
 - a. Assim que o TCR estiver pronto a utilizar, deite todo o conteúdo do tubo do controlo interno no frasco de TCR. Tape o frasco de TCR e inverta cuidadosamente para misturar bem.
 - b. No espaço indicado no frasco de TCR, registe a data de adição do controlo interno, o prazo de validade do wTCR (a data de adição do controlo interno mais 30 dias), o número de lote do controlo interno (IC LOT) e as iniciais do operador.
 - c. Guarde o tubo do controlo interno pois irá ser necessário para ler a etiqueta de código de barras no Panther System.

Preparação do reagente de seleção

Nota: não utilize o reagente se tiver precipitado ou apresentar um tom turvo.

1. Para preparar o reagente de seleção, proceda da seguinte forma:
 - a. Retire um frasco de reagente de seleção do armazenamento à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C). Verifique o número de lote no frasco de reagente para se certificar de que corresponde ao número de lote da folha do código de barras do lote mestre.
 - b. Inverta cuidadosamente o frasco para misturar bem e examine visualmente para garantir que não apresenta precipitado ou um tom turvo.
 - c. Registe a data da primeira abertura (Open Date) no espaço da etiqueta fornecido para o efeito.

Nota: recuperação de reagente de seleção: se o reagente de seleção tiver sido acidentalmente armazenado a uma temperatura situada entre 2 °C e 8 °C ou se a temperatura do laboratório se situar abaixo dos 15 °C, poderá ocorrer a formação de precipitado. Caso se forme precipitado no reagente de seleção durante o armazenamento, aqueça a uma temperatura de 60 °C ± 1 °C durante um máximo de 45 minutos e misture cuidadosamente o frasco de forma frequente (a cada 5 a 10 minutos). Assim que o precipitado se dissolver na solução, coloque o frasco num banho de água à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) e deixe-o estabilizar durante, pelo menos, 1 hora.

C. Preparação do calibrador

Nota: evite criar espuma excessiva quando inverter os calibradores. A espuma compromete o sensor de nível do Panther System.

Nota: não utilize o instrumento SB100-RES para descongelar os calibradores.

1. Depois de retirar os calibradores do armazenamento (a temperaturas situadas entre -35 °C e -15 °C), coloque-os à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) durante um mínimo de 30 minutos.

Opção: os calibradores podem ser colocados num banho de água à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) para descongelarem.

2. A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente cada tubo para misturar bem. Certifique-se de que o conteúdo do tubo está totalmente descongelado antes da utilização.

Opção: durante a preparação à temperatura ambiente, os calibradores podem ser colocados num dispositivo de agitação de tubos por oscilação para serem bem misturados.

3. Se observar a formação de gel, inverta o tubo cuidadosamente até se deixar de observar vestígios de gel.

Nota: se ocorrer a formação de gel, será necessário dissolvê-lo antes de o utilizar, dentro do período de 8 horas de descongelação à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C). Se continuarem presentes vestígios de gel, não o utilize. Elimine o(s) tubo(s), obtenha um(s) novo(s) tubo(s) de calibradores e repita os passos C.1 a C.3.

4. Quando o conteúdo dos tubos tiver descongelado na totalidade, seque a parte de fora de cada tubo com um toalhete descartável, limpo e seco.
5. Para prevenir a contaminação, não abra os tubos dos calibradores nesta fase.

D. Preparação de reagentes para reagentes previamente reconstituídos

Preparação do wTCR e dos reagentes de amplificação, enzimático e de sonda

1. Retire o wTCR e os reagentes previamente preparados do armazenamento.
2. Deixe os reagentes alcançarem a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) utilizando uma das três opções descritas abaixo:

Preparação com o instrumento SB100-RES (Opção 1)

1. **Imediatamente** depois de retirar o TCR do local de armazenamento (a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C), inverta o frasco do reagente vigorosamente para misturar o gel com a solução (realize um mínimo de 10 inversões até já não se observarem vestígios de gel na secção inferior). **NÃO COLOCAR NO VORTEX.**
2. Prepare o wTCR e os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda com o instrumento SB100-RES.

Preparação com o banho de água (Opção 2)

Advertência: a temperatura do banho de água não deve exceder os 30 °C.

Nota: consulte as instruções de preparação à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) para preparar o wTCR. Não utilize um banho de água para preparar o wTCR.

1. Depois de retirar os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda do armazenamento (a temperaturas situadas entre 2 °C e 8 °C), coloque-os em posição vertical num banho de água dedicado à temperatura ambiente (entre 15 °C e 30 °C). A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente os reagentes para os misturar bem e examine-os visualmente para confirmar a dissolução dos precipitados. Continue a descongelar até deixar de observar a presença de precipitados.
2. Certifique-se de que os precipitados se dissolveram. Não utilize um reagente se apresentar a formação de gel, precipitado ou um tom turvo.

Preparação à temperatura ambiente (Opção 3)

1. Para preparar o wTCR, proceda da seguinte forma:
 - a. **Imediatamente** depois de retirar o wTCR do local de armazenamento (a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C), inverta o frasco do wTCR vigorosamente para misturar o gel com a solução (realize um mínimo de 10 inversões até já não se observarem vestígios de gel na secção inferior). **NÃO COLOCAR NO VORTEX.**
 - b. Deixe o frasco de wTCR permanecer à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) durante, pelo menos, 45 minutos. A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente o frasco de wTCR (mínimo de 10 inversões) para o misturar bem e examine-o visualmente para confirmar que não está presente qualquer gel.
 - c. Antes da utilização, assegure-se de que o gel está dissolvido e de que as partículas magnéticas estão em suspensão.

Nota: se estiverem presentes vestígios de gel, não o utilize. Coloque novamente o frasco de wTCR e os respetivos reagentes no armazenamento (2 °C a 8 °C) para utilizá-lo posteriormente.

2. Para preparar os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda, proceda da seguinte forma:
 - a. Depois de retirar os reagentes do armazenamento (a temperaturas situadas entre 2 °C e 8 °C), coloque-os em posição vertical à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C). A cada 10 minutos, inverta cuidadosamente os reagentes para os misturar bem e examine-os visualmente para confirmar a dissolução do precipitado. Continue a descongelar até deixar de observar a presença de precipitados.

3. Certifique-se de que os precipitados se dissolveram. Não utilize um reagente se apresentar a formação de gel, precipitado ou um tom turvo.

Preparação do reagente de seleção

Nota: não utilize o reagente se tiver precipitado ou apresentar um tom turvo.

1. Retire o frasco correspondente de reagente de seleção do armazenamento à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C).
2. Inverta cuidadosamente o frasco para misturar bem e examine visualmente para garantir que não apresenta precipitado ou um tom turvo.

Nota: recuperação de reagente de seleção: se o reagente de seleção tiver sido acidentalmente armazenado a uma temperatura situada entre 2 °C e 8 °C ou se a temperatura do laboratório se situar abaixo dos 15 °C, poderá ocorrer a formação de precipitado. Caso se forme precipitado no reagente de seleção durante o armazenamento, aqueça a uma temperatura de 60 °C ± 1 °C durante um máximo de 45 minutos e misture cuidadosamente o frasco de forma frequente (a cada 5 a 10 minutos). Assim que o precipitado se dissolver na solução, coloque o frasco num banho de água à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) e deixe o frasco estabilizar durante, pelo menos, 1 hora.

E. Manuseamento de espécimes

1. Deixe os espécimes e os calibradores atingirem uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes do processamento.
2. Certifique-se de que cada tubo de espécime contém volume suficiente para cada tipo de amostra e cada tipo de tubo.
3. Misture bem os espécimes frescos ou descongelados.
4. Imediatamente antes de carregar as amostras num suporte de amostras, centrifugue cada espécime durante 10 minutos em acelerações de 1000 a 3000 g. Não remova as tampas. A existência de bolhas no tubo compromete a deteção de nível do Panther System. Os períodos e as velocidades de centrifugação para misturar o líquido e os precipitados devem ser validados pelo utilizador. Se o precipitado não regressar à solução, certifique-se visualmente de que o precipitado não está a impedir a transferência do espécime.

Consulte a secção *Preparação do sistema*, passo F.2 abaixo, para obter mais informações sobre o carregamento do suporte e a remoção das tampas.

F. Preparação do sistema

1. Configure o sistema de acordo com as instruções do *Manual de instruções do Panther System* e da secção *Notas sobre o procedimento*. Certifique-se de que são utilizados suportes de reagente e adaptadores de TCR de dimensão adequada.
2. Carregue as amostras no respetivo suporte. Execute os seguintes passos para cada tubo de amostra (espécime e, quando necessário, calibrador):
 - a. Desaperte a tampa de um tubo de amostra, mas não a remova já.

Nota: tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis. Desaperte as tampas das amostras com cuidado.
 - b. Carregue o tubo de amostra no respetivo suporte.
 - c. Repita os passos 2.a e 2.b para cada amostra restante.
 - d. Depois de as amostras terem sido carregadas no suporte de amostras, remova e elimine a tampa de cada tubo de amostra num suporte de amostras. Para evitar a contaminação, não passe uma tampa sobre quaisquer outros suportes de amostras ou tubos de amostras.

Nota: as tampas perfuráveis do tubo de transporte de espécimes de urina Aptima também devem ser retiradas e eliminadas.

- e. Se necessário, use uma pipeta de transferência descartável e nova para remover quaisquer bolhas ou espuma.
- f. Depois de removida a última tampa, carregue o Suporte de amostras numa Secção de amostras.

Nota: se realizar outros ensaios e tipos de amostras ao mesmo tempo, fixe o Retentor de amostras antes de carregar o Suporte de amostras numa Secção de amostras.

- g. Repita os passos 2.a a 2.f para o suporte de amostras seguinte.

Notas sobre o procedimento

A. Calibradores

1. Os tubos do calibrador podem ser carregados em qualquer posição no suporte de amostras e em qualquer fila da secção de amostras do Panther System. A pipetagem de espécimes começa quando se verificar uma das duas condições seguintes:
 - a. Os calibradores estão a ser processados pelo sistema.
 - b. São registados resultados válidos para os calibradores no sistema.
2. Assim que os tubos dos calibradores forem pipetados e estiverem a ser processados pelo kit de reagentes do Aptima Zika Virus Assay, os espécimes podem ser testados com o kit associado até um máximo de 24 horas, **a menos que:**
 - a. Os resultados do calibrador sejam inválidos.
 - b. O respetivo kit de reagente de ensaio seja removido do sistema.
 - c. O respetivo kit de reagente de ensaio tenha ultrapassado os limites de estabilidade.
3. Cada tubo do calibrador só pode ser utilizado uma única vez. As tentativas para usar o tubo mais do que uma vez podem dar origem a erros de processamento.

B. Pó das luvas

Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó em algumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. Recomenda-se a utilização de luvas sem pó.

Controlo de qualidade

Critérios de aceitação do Aptima Zika Virus Assay

A. Validade da execução

Uma execução (também designada por lista de trabalho) é válida se o número mínimo de calibradores cumprir os critérios de aceitação e se forem válidos (consulte a secção *Critérios de aceitação da calibração e cálculo do cutoff*).

1. Numa execução do Aptima Zika Virus Assay, pelo menos quatro das seis réplicas do calibrador devem ser válidas. Pelos menos duas das três réplicas do calibrador negativo e duas das três réplicas do calibrador positivo devem ser válidas.
2. Os critérios de aceitação do calibrador são automaticamente verificados pelo software do Panther System. Se for válida uma quantidade inferior ao número mínimo de réplicas do calibrador, o software do Panther System invalidará automaticamente a execução.
3. Numa execução válida, os valores de “cutoff” do controlo interno (sinal intermitente) e do analisado (sinal contínuo) são automaticamente calculados.
4. Se uma execução for inválida, os resultados da amostra serão apresentados como inválidos e será necessário testar novamente todos os espécimes.

B. Validade das amostras

1. Numa execução válida, o resultado de uma amostra será válido se o sinal do IC for igual ou superior ao “cutoff” do IC, com as seguintes exceções:
 - a. Os espécimes com um sinal do analisado (sinal contínuo) superior ao “cutoff” do analisado não são invalidados mesmo que o sinal do controlo interno (IC) seja inferior ao cutoff.
 - b. Os espécimes com um sinal do IC superior a 750.000 RLU são invalidados pelo software e não é possível avaliar o estado do reativo. O software também invalida de forma automática os calibradores positivos com um sinal do IC superior a 750.000 RLU.
2. Uma amostra também pode ser invalidada devido a erros do instrumento e de processamento dos resultados. Consulte o *Manual de instruções do Panther System* para obter mais detalhes.
3. É necessário testar novamente todos os resultados individuais de espécimes que tenham sido considerados inválidos numa execução válida.

Critérios de aceitação da calibração e cálculo do cutoff

A. Critérios de aceitação do calibrador negativo

No Aptima Zika Virus Assay, o calibrador negativo (NC) é processado em triplicado. Cada réplica individual do calibrador negativo deve ter um controlo interno (IC) com um valor superior ou igual a 50.000 RLU e inferior ou igual a 500.000 RLU. Cada réplica individual do calibrador negativo deve ter igualmente um valor do analisado inferior ou igual a 40.000 RLU e superior ou igual a 0 RLU. Se um dos valores da réplica do calibrador negativo for considerado inválido devido a um valor do IC ou a um valor do analisado fora destes limites, a média do calibrador negativo (NC_x) será novamente calculada com base nos dois valores aceitáveis. A execução será considerada inválida e deverá ser repetida se dois ou mais valores das três réplicas do calibrador negativo possuírem valores do IC ou valores do analisado fora destes limites.

Determinação da média dos valores do calibrador negativo (NC_x) para o controlo interno [NC_x (Controlo interno)]

Exemplo:

Calibrador negativo	Controlo interno Unidades de luz relativas
1	235.000
2	200.000
3	210.000
RLU total do controlo interno	= 645.000

$$NC_x (\text{controlo interno}) = \frac{\text{RLU total do controlo interno}}{3} = 215.000$$

Determinação da média dos valores do calibrador negativo (NC_x) para o analisado [NC_x (Analisado)]

Exemplo:

Calibrador negativo	Analisado Unidades de luz relativas
1	14.000
2	16.000
3	15.000
RLU total do analisado	= 45.000

$$NC_x (\text{analisado}) = \frac{\text{RLU total do analisado}}{3} = 15.000$$

B. Critérios de aceitação do calibrador positivo

No Aptima Zika Virus Assay, o calibrador positivo é processado em triplicado. Os valores individuais do analisado do calibrador positivo (PC) devem ser inferiores ou iguais a 4.000.000 RLU e superiores ou iguais a 400.000 RLU. Os valores do IC não podem exceder 750.000 RLU. Se um dos valores da réplica do calibrador positivo se situar fora destes limites, a média do calibrador positivo (PC_x) será novamente calculada com base nos dois valores aceitáveis das réplicas do calibrador positivo. A execução será considerada inválida e deverá ser repetida se dois ou mais dos três valores do analisado do calibrador positivo se situarem fora destes limites.

Determinação da média dos valores do calibrador positivo (PC_x) para o analisado [PC_x (Analisado)]

Exemplo:

Calibrador positivo	Analisado Unidades de luz relativas
1	1.250.000
2	1.500.000
3	1.150.000
RLU total do analisado	= 3.900.000

$$PC_x (\text{analisado}) = \frac{\text{RLU total do analisado}}{3} = 1.300.000$$

C. Cálculo do valor do “cutoff” do controlo interno

Valor do “cutoff” do controlo interno = $0,5 \times [NC_x \text{ (Controlo interno)}]$

Utilização dos valores fornecidos no exemplo anterior do calibrador negativo:

Valor do “cutoff” do controlo interno = $0,5 \times (215.000)$

Valor do “cutoff” do controlo interno = 107.500 RLU

D. Cálculo do valor do “cutoff” do analisado do vírus Zika

Valor do “cutoff” do analisado = $NC_x \text{ (Analisado)} + [0,03 \times PC_x \text{ (Analisado)}]$

Utilização dos valores fornecidos nos exemplos anteriores do calibrador negativo e do calibrador positivo:

Valor do “cutoff” do analisado = $15.000 + (0,03 \times 1.300.000)$

Valor do “cutoff” do analisado = 54.000 RLU

E. Resumo dos critérios de aceitação do Aptima Zika Virus Assay

Crítérios de aceitação	
Calibrador negativo	
Analisado	$\geq 0 \text{ e } \leq 40.000 \text{ RLU}$
Controlo interno	$\geq 50.000 \text{ e } \leq 500.000 \text{ RLU}$
Calibrador positivo	
Analisado	$\geq 400.000 \text{ e } \leq 4.000.000 \text{ RLU}$
Controlo interno	$\leq 750.000 \text{ RLU}$

F. Resumo dos cálculos do cutoff do Aptima Zika Virus Assay

“Cutoff” do analisado = $RLU \text{ média do analisado do NC} + [0,03 \times (RLU \text{ média do analisado do PC})]$

“Cutoff” do controlo interno = $0,5 \times (RLU \text{ média do IC do calibrador negativo})$

Interpretação dos resultados

O software do Panther System realiza todos os cálculos descritos anteriormente. São determinados dois cutoffs para cada ensaio: um para o sinal do analisado (sinal contínuo) que se designa por “Cutoff” do analisado e outro para o sinal do controlo interno (sinal intermitente) que se designa por “Cutoff” do controlo interno. O cálculo destes cutoffs é mostrado acima. Em cada amostra, determina-se um valor da RLU para o sinal do analisado e um valor da RLU para o sinal do controlo interno. No relatório, a RLU do sinal do analisado dividida pelo “cutoff” do analisado surge abreviada como sinal/“cutoff” do analisado (S/CO).

Um espécime é negativo se o sinal do analisado for inferior ao “cutoff” do analisado (i.e., S/CO do analisado < 1,00) e se o sinal do controlo interno (IC) for superior ou igual ao “cutoff” do controlo interno (Cutoff do IC) e inferior ou igual a 750.000 RLU. Um espécime é positivo se o sinal do analisado for superior ou igual ao “cutoff” do analisado (i.e., S/CO do analisado ≥ 1,00) e se o sinal do IC for inferior ou igual a 750.000 RLU. Os resultados são designados pelo software. Um espécime é inválido se o sinal do analisado for inferior ao “cutoff” do analisado (i.e., S/CO do analisado < 1,00) e se o sinal do controlo interno for inferior ao “cutoff” do controlo interno. Qualquer espécime com valores do controlo interno superiores a 750.000 RLU é considerado inválido.

Resumo da interpretação dos espécimes

Interpretação dos espécimes	Critérios
Negativo	S/CO do analisado < 1,00 e IC ≥ “Cutoff” do IC e IC ≤ 750.000 RLU
Positivo	S/CO do analisado ≥ 1,00 e IC ≤ 750.000 RLU*
Inválido	IC > 750.000 RLU ou S/CO do analisado < 1,00 e IC < “Cutoff”

*Nos espécimes com um sinal do IC superior a 750.000 RLU, o espécime será invalidado pelo software.

- A. Qualquer espécime considerado Inválido no Aptima Zika Virus Assay deve ser novamente testado individualmente.
- B. Os espécimes com um valor do controlo interno válido e com um S/CO do analisado inferior a 1,00 no Aptima Zika Virus Assay são considerados negativos para o RNA do ZIKV.
- C. Os espécimes com um S/CO do analisado superior ou igual a 1,00 e com um sinal do IC inferior ou igual a 750.000 RLU são considerados positivos para o RNA do ZIKV.

Limitações

- A. A utilização deste ensaio está limitada a pessoal que tenha recebido formação relativa ao procedimento. O não cumprimento das instruções fornecidas neste folheto informativo pode levar a resultados erróneos.
- B. A fiabilidade dos resultados depende da colheita, transporte, conservação e processamento de espécimes adequados.
- C. O efeito do armazenamento de longo prazo dos espécimes no desempenho do Aptima Zika Virus Assay não foi totalmente avaliado.
- D. Apesar de ser raro, poderão ocorrer mutações em regiões altamente conservadas do genoma viral abrangido pelos “primers” e/ou sondas do Aptima Zika Virus Assay, que poderão resultar na falha de deteção do vírus.
- E. Este ensaio foi desenvolvido para ser utilizado apenas com o Panther System.
- F. A contaminação cruzada de amostras pode dar origem a resultados positivos falsos.
- G. Os ensaios devem realizar-se e os resultados devem ser interpretados de acordo com os procedimentos indicados.
- H. O incumprimento destes procedimentos, as condições desfavoráveis de transporte e/ou de armazenamento ou o uso de reagentes fora do prazo pode dar origem a resultados pouco fiáveis.
- I. A impossibilidade de obter os resultados previstos indicia a realização de uma execução inválida. Entre as eventuais fontes do erro incluem-se a deterioração do kit de testes, erros do operador, o funcionamento defeituoso do equipamento, a deterioração do espécime ou a contaminação dos reagentes.
- J. Este ensaio foi testado utilizando apenas os tipos de espécime indicados. O desempenho com outros tipos de espécime não foi avaliado.
- K. Os resultados do Aptima Zika Virus Assay devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos de que o médico disponha.
- L. Um resultado negativo não impede uma possível infeção porque os resultados dependem da colheita adequada de espécimes. Os resultados do teste podem ser afetados por uma colheita inadequada de espécimes, um erro técnico, uma mistura de espécimes ou por níveis alvo inferiores ao limite de deteção do ensaio.
- M. O Aptima Zika Virus Assay fornece resultados qualitativos. Por isso, não se pode fazer uma correlação entre a magnitude de um sinal positivo de ensaio e a quantidade de organismos num espécime.
- N. Os clientes devem validar um processo de transferência LIS de forma independente.

Desempenho**Sensibilidade analítica****Limite de detecção (LoD) dos espécimes de plasma**

O limite de detecção (Limit of Detection, LoD) do ensaio define-se como a concentração de RNA do ZIKV que é detetada com uma probabilidade igual ou superior a 95% de acordo com a norma CLSI EP17-A2.²⁰ O LoD foi determinado através do teste de um espécime de plasma positivo para o ZIKV, diluído em série em plasma humano desfibrinado e sem lípidos. O espécime de plasma positivo foi colhido num dador de sangue em 2015, durante um surto do vírus Zika no Brasil. Utilizaram-se dois lotes de reagentes e três instrumentos Panther para testar 72 réplicas de cada nível de cópias por lote de reagente, num total de 144 réplicas por nível, à exceção do membro do painel com 90 cópias/ml, o qual foi testado em 20 réplicas por lote de reagente, num total de 40 réplicas. A Tabela 1 resume os resultados obtidos.

Tabela 1: Detecção do ZIKV no plasma

Concentração (cópias/ml)	% positividade (IC de 95%)		
	Lote 1 (n=72)	Lote 2 (n=72)	Combinado (n=144)
90	100 (84 - 100) ^a	100 (84 - 100) ^a	100 (91 - 100) ^b
30	100 (95 - 100)	100 (95 - 100)	100 (97 - 100)
10	100 (95 - 100)	100 (95 - 100)	100 (97 - 100)
3	86 (76 - 92)	92 (83 - 96)	89 (83 - 93)
1	38 (28 - 50)	60 (48 - 71)	49 (41 - 57)
0,3	19 (12 - 30)	14 (8 - 24)	17 (12 - 24)
0,1	1 (0 - 7)	6 (2 - 14)	3 (1 - 7)
0	0 (0 - 5)	0 (0 - 5)	0 (0 - 3)

IC = intervalo de confiança.

^an=20.

^bn=40.

As probabilidades de detecção do ZIKV no plasma de 50% e de 95% foram determinadas com recurso a uma análise Probit, utilizando os dados obtidos nos testes de sensibilidade analítica. O limite de detecção do ZIKV no Aptima Zika Virus Assay variou entre 0,91 cópias/ml e 1,22 cópias/ml na probabilidade de detecção de 50% e entre 3,30 cópias/ml e 4,41 cópias/ml na probabilidade de detecção de 95% (Tabela 2).

Tabela 2: Análise Probit de detecção do ZIKV no plasma

Lote de reagente	Limite de detecção de 50% (Limites fiduciais de 95%)	Limite de detecção de 95% (Limites fiduciais de 95%)
Lote 1	1,22 (1,01 - 1,47)	4,41 (3,46 - 6,14)
Lote 2	0,91 (0,74 - 1,09)	3,30 (2,63 - 4,44)
Combinado	1,06 (0,92 - 1,20)	3,87 (3,25 - 4,78)

Limite de detecção dos espécimes de urina

O LoD foi determinado através do teste de um espécime de plasma positivo para o ZIKV, diluído em série em urina negativa agrupada. Os membros do painel de sensibilidade da urina foram preparados adicionando um espécime de plasma positivo para o ZIKV, na concentração indicada, à urina antes de se efetuar a mistura com meio de transporte de urina (UTM) numa proporção de 1:1 (urina processada). Utilizaram-se dois lotes de reagentes e três instrumentos Panther para testar 30 réplicas de cada nível de cópias por lote de reagente, num total de 60 réplicas por nível. A Tabela 3 resume os resultados obtidos.

Tabela 3: Detecção do ZIKV na urina

Concentração ^a (cópias/ml)	% positividade (IC de 95%)		
	Lote 1 (n=30)	Lote 2 (n=30)	Combinado (n=60)
90	100 (89 - 100)	100 (89 - 100)	100 (94 - 100)
30	100 (89 - 100)	100 (89 - 100)	100 (94 - 100)
10	97 (84 - 100)	83 (66 - 92)	90 (80 - 95)
3	63 (45 - 78)	43 (27 - 60)	53 (41 - 65)
1	27 (14 - 45)	30 (17 - 48)	28 (18 - 40)
0,3	7 (2 - 22)	3 (0 - 16)	5 (2 - 14)
0,1	0 (0 - 11)	0 (0 - 11)	0 (0 - 6)
0	0 (0 - 11)	0 (0 - 11)	0 (0 - 6)

IC = intervalo de confiança.

^a Concentração na urina anterior ao processamento.

As probabilidades de detecção do ZIKV na urina de 50% e de 95% foram determinadas com recurso a uma análise Probit, utilizando os dados obtidos nos testes de sensibilidade analítica. O limite de detecção do ZIKV no Aptima Zika Virus Assay variou entre 2,26 cópias/ml e 3,42 cópias/ml na probabilidade de detecção de 50% e entre 8,25 cópias/ml e 15,63 cópias/ml na probabilidade de detecção de 95% (Tabela 4).

Tabela 4: Análise Probit de detecção do ZIKV em urina^a

Lote de reagente	Limite de detecção de 50% (Limites fiduciais de 95%)	Limite de detecção de 95% (Limites fiduciais de 95%)
Lote 1	2,26 (1,67 - 3,00)	8,25 (5,89 - 13,53)
Lote 2	3,42 (2,42 - 4,64)	15,63 (10,70 - 27,30)
Combinado	2,81 (2,23 - 3,47)	11,99 (9,17 - 17,04)

^a Concentração na urina anterior ao processamento.

Reprodutibilidade

Reprodutibilidade em espécimes de sangue

A reprodutibilidade do Aptima Zika Virus Assay no Panther System foi avaliada testando um painel de ZIKV constituído por membros do painel positivo, com uma concentração de 100 cópias/ml e de 30 cópias/ml, e por um membro do painel negativo obtido a partir de plasma negativo (Tabela 5). Os membros do painel positivo foram criados adicionando um espécime de plasma positivo para o ZIKV ao plasma negativo. O painel foi testado por três operadores, utilizando três lotes de reagentes diferentes em três instrumentos Panther durante vários dias. O Aptima Zika Virus Assay gerou um total de 27 execuções válidas. Cada membro do painel foi testado num total de 486 réplicas. A taxa geral de invalidez foi de 0% (0/1458).

As análises da reprodutibilidade incluíram a avaliação da percentagem de concordância e as relações médias de sinal para “cutoff” (S/CO) dos membros do painel, bem como a avaliação do desvio padrão (DP) e da percentagem do coeficiente de variação (%CV) das relações S/CO de cada um dos cinco fatores de variação (Tabela 5). Analisaram-se as relações S/CO médias do analisado para os membros do painel positivo e as relações S/CO médias do controlo interno para o membro do painel negativo. A percentagem de concordância entre os resultados do ensaio e o estado real de cada membro do painel foi calculada com recurso ao S/CO do analisado de todos os membros do painel.

A percentagem total de concordância dos resultados do teste foi de 100% para os membros do painel positivo e de 100% para o membro do painel negativo. Não existiu qualquer correlação entre a taxa reativa e os fatores de variação testados neste estudo. No que diz respeito à variabilidade do sinal, a variabilidade dentro da execução foi o principal contribuinte para a variação total (medida pelos valores de DP) observada no Aptima Zika Virus Assay.

Tabela 5: Reprodutibilidade do Aptima Zika Virus Assay em espécimes de sangue

Membro do painel	N	#P	% A	S/CO média ^a	Entre lotes		Entre instrumentos		Entre operadores		Entre dias		Intra-execução		Total	
					DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
Alto (100 cópias/ml)	486	486	100	33,22	0,02	0%	0,34	1%	0,17	1%	0,12	0%	1,33	4%	1,38	4%
Baixo (30 cópias/ml)	486	486	100	33,35	0,17	1%	0,27	1%	0,08	0%	0,08	0%	1,27	4%	1,31	4%
Negativo	486	0	100	1,94	0,02	1%	0,01	1%	0,01	0%	0,00	0%	0,05	2%	0,05	3%

N = número de membros do painel combinado para esta análise; #P = número de positivos; %A = percentagem de concordância; S/CO = Relação de sinal para “cutoff” apenas nas réplicas reativas; DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

^a S/CO média do analisado para os membros do painel positivo (Alto e Baixo); S/CO médio do controlo interno para o membro do painel negativo.

Reprodutibilidade em espécimes de urina

A reprodutibilidade do Aptima Zika Virus Assay no Panther System foi avaliada testando um painel de ZIKV constituído por membros do painel positivo, com uma concentração de 100 cópias/ml e de 30 cópias/ml, e por um membro do painel negativo obtido a partir de urina negativa agrupada (Tabela 6). Os membros do painel positivo foram preparados adicionando um espécime de plasma positivo para o ZIKV a urina negativa agrupada na concentração indicada. Todos os membros do painel foram misturados com UTM numa proporção de 1:1 para criar painéis de reprodutibilidade da urina processada. O painel foi testado por três operadores, utilizando três lotes de reagentes diferentes em três instrumentos Panther durante vários dias. O Aptima Zika Virus Assay gerou um total de 27 execuções válidas. Cada membro do painel foi testado num total de 486 réplicas. A taxa geral de invalidez foi de 0% (0/1458).

As análises da reprodutibilidade incluíram a avaliação da percentagem de concordância e as relações médias de sinal para “cutoff” (S/CO) dos membros do painel, bem como a avaliação do desvio padrão (DP) e da percentagem do coeficiente de variação (%CV) das relações S/CO de cada um dos cinco fatores de variação (Tabela 6). Analisaram-se as relações S/CO médias do analisado para os membros do painel positivo e as relações S/CO médias do controlo interno para o membro do painel negativo. A percentagem de concordância entre os resultados do ensaio e o estado real de cada membro do painel foi calculada com recurso ao S/CO do analisado de todos os membros do painel.

A percentagem total de concordância dos resultados do teste foi de 100% para o membro do painel positivo alto, de 96,5% para o membro do painel positivo baixo e de 100% para o membro do painel negativo. Não existiu qualquer correlação entre a taxa reativa e os fatores de variação testados neste estudo. No que diz respeito à variabilidade do sinal, a

variabilidade dentro da execução foi o principal contribuinte para a variação total (medida pelos valores de DP) observada no Aptima Zika Virus Assay.

Tabela 6: Reprodutibilidade do Aptima Zika Virus Assay em espécimes de urina

Membro do painel ^a	N	#P	%A	S/CO média ^b	Entre lotes		Entre instrumentos		Entre operadores		Entre dias		Intra-execução		Total	
					DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
Alto (100 cópias/ml)	486	486	100	34,36	0,09	0%	0,25	1%	0,08	0%	0,07	0%	1,31	4%	1,34	4%
Baixo (30 cópias/ml)	486	469	96,5	32,02	1,01	3%	0,30	1%	0,46	1%	1,46	5%	5,21	16%	5,53	17%
Negativo	486	0	100	1,99	0,02	1%	0,01	1%	0,02	1%	0,01	0%	0,04	2%	0,05	2%

N = número de membros do painel combinado para esta análise; #P = número de positivos; %A = percentagem de concordância; S/CO = Relação de sinal para "cutoff" apenas nas réplicas reativas; DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

^a Concentração na urina anterior ao processamento.

^b S/CO média do analisado para os membros do painel positivo (Alto e Baixo); S/CO médio do controlo interno para o membro do painel negativo.

Interferência

Substâncias interferentes em espécimes de sangue

O potencial de interferência de substâncias endógenas foi avaliado com a realização de testes a espécimes provenientes de pacientes com doenças autoimunes e outras doenças. Avaliaram-se dez espécimes de plasma de cada grupo de pacientes com as seguintes doenças autoimunes e outras condições: ictericos, lipémicos, hemolisados, anticorpos antinucleares, mieloma múltiplo, lúpus eritematoso sistémico e fator reumatóide. Cada espécime foi dividido em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi enriquecida com plasma positivo para o ZIKV numa concentração de 18 cópias/ml. As alíquotas enriquecidas e as alíquotas não enriquecidas foram testadas com o Aptima Zika Virus Assay. Todas as amostras não enriquecidas obtiveram resultados negativos. Todas as amostras enriquecidas obtiveram resultados positivos, exceto uma alíquota enriquecida proveniente de um paciente com lúpus eritematoso sistémico. Uma nova alíquota da amostra foi enriquecida e testada. Após o novo teste, o resultado foi positivo.

O potencial de interferência das substâncias endógenas foi ainda avaliado com a realização de testes às seguintes substâncias enriquecidas com plasma: albumina (60.000 mg/l), hemoglobina (2.000 mg/l), bilirrubina (200 mg/l) e lípidos (30.000 mg/l). Não foi observada qualquer interferência ao avaliar a especificidade e a sensibilidade.

Para avaliar a interferência dos anticoagulantes e do dispositivo de colheita, procedeu-se à comparação do soro e dos espécimes de plasma no Aptima Zika Virus Assay. Colheu-se o sangue de 10 dadores normais com recurso aos seguintes tipos de anticoagulante e de tubo: 1) Ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (K2 EDTA), 2) Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (K3 EDTA), 3) Ácido de citrato e dextrose adenina (ACD-A), 4) Citrato de sódio (NAC), 5) Tubos de preparação de plasma (PPT), 6) Tubo de preparação do soro (SST) e 7) Tubo de soro (Soro). Em cada um dos 10 dadores, colheu-se sangue com recurso a cada um dos sete tipos de tubo. A amostra de cada dador foi dividida em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi enriquecida com plasma positivo para o ZIKV até uma concentração de 18 cópias/ml. Tanto as alíquotas enriquecidas como as alíquotas não enriquecidas foram testadas com o Aptima Zika Virus Assay.

Nas alíquotas não enriquecidas, as 70 amostras resultaram negativas nos Aptima Zika Virus Assay. As relações S/CO médias do IC variaram entre 1,83 e 1,90 com as percentagens do coeficiente de variação (%CVs) a variarem entre 2% e 3% para cada tipo de tubo (Tabela 7). Nas alíquotas enriquecidas, as 70 amostras resultaram positivas no Aptima Zika Virus Assay. A relação S/CO média do analisado de cada um dos sete tipos de tubo variou entre

31,90 e 34,20 com as percentagens do coeficiente de variação (%CVs) a variarem entre 3% e 4% (Tabela 8). Não se observou qualquer interferência dos anticoagulantes e do dispositivo de colheita.

Tabela 7: Resultados do Aptima Zika Virus Assay em amostras não enriquecidas de plasma e soro colhidas em diversos tipos de tubo

Tubo de colheita	N	#P	%P	S/CO do IC			S/CO do analisado		
				Média	DP	CV	Média	DP	CV
K2EDTA	10	0	0%	1,89	0,06	3%	0,00	0,01	N/D
K3EDTA	10	0	0%	1,87	0,04	2%	0,00	0,00	N/D
ACD-A	10	0	0%	1,87	0,04	2%	0,00	0,00	N/D
PPT	10	0	0%	1,83	0,04	2%	0,00	0,00	N/D
NAC	10	0	0%	1,84	0,06	3%	0,00	0,00	N/D
Soro	10	0	0%	1,85	0,06	3%	0,00	0,00	N/D
SST	10	0	0%	1,90	0,05	3%	0,00	0,00	N/D

N = número de espécimes; #P = número de positivos; %P = percentagem de positivos; IC = Controlo Interno; S/CO = Relação de sinal para "cutoff"; DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação; N/D = não disponível.

Tabela 8: Resultados do Aptima Zika Virus Assay em amostras enriquecidas de plasma e soro colhidas em diversos tipos de tubo

Tubo de colheita	N	#P	%P	S/CO do IC			S/CO do analisado		
				Média	DP	CV	Média	DP	CV
K2EDTA	10	10	100%	2,05	0,45	22%	32,77	1,23	4%
K3EDTA	10	10	100%	1,99	0,39	20%	32,63	0,82	3%
ACD-A	10	10	100%	1,88	0,44	23%	32,02	1,32	4%
PPT	10	10	100%	1,92	0,25	13%	32,32	1,24	4%
NAC	10	10	100%	1,91	0,50	26%	31,90	1,31	4%
Soro	10	10	100%	1,78	0,31	18%	34,20	1,34	4%
SST	10	10	100%	1,77	0,51	29%	32,52	1,32	4%

N = número de espécimes; #P = número de positivos; %P = percentagem de positivos; IC = Controlo Interno; S/CO = Relação de sinal para "cutoff"; DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação; N/D = não disponível.

Substâncias interferentes em espécimes de urina

Para testar os efeitos dos metabolitos da urina, diluiu-se Controlo anormalmente alto com análise urinária do urobilinogénio KOVA-Trol I em meio de transporte de urina (UTM) em vez de urina. Este material de controlo para análise urinária à base de urina humana contém substâncias potencialmente interferentes, tais como proteínas (albumina), glucose, cetonas, bilirrubina, glóbulos vermelhos, nitritos, urobilinogénio e leucócitos. Além disso, testou-se urina com sangue total a uma concentração de 5% volume/volume. Não se observou qualquer interferência com qualquer uma das substâncias, quando enriquecidas com ZIKV até uma concentração final de 18 cópias/ml ou não enriquecidas com ZIKV, testadas no Aptima Zika Virus Assay.

Reatividade cruzada

Reatividade cruzada nos espécimes de sangue

Testaram-se outros patógenos sanguíneos de espécimes de sangue quanto à reatividade cruzada e interferência. A reatividade cruzada do Aptima Zika Virus Assay foi avaliada com a realização de testes a espécimes clínicos de 10 pacientes com as seguintes infecções víricas: Vírus do dengue, vírus da Hepatite A (HAV), vírus da Hepatite B (HBV), vírus da Hepatite C (HCV), vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2 (HIV-1/2), Parvovírus B19 e vírus do Nilo Ocidental (WNV). Foram igualmente testados espécimes de 10 indivíduos que haviam recebido a vacina do HBV. Os espécimes foram obtidos a partir de uma fonte comercial e caracterizados pelos vendedores através de métodos validados. Além disso, procedeu-se à avaliação de plasma negativo agrupado enriquecido com o vírus da Hepatite E (HEV) numa concentração de 1×10^5 cópias/ml e de plasma negativo agrupado enriquecido com o vírus Chikungunya numa concentração de 1×10^5 U/ml. Cada uma das amostras acima descritas foi dividida em duas alíquotas. Uma alíquota foi utilizada para fazer a avaliação da reatividade cruzada. A outra alíquota foi enriquecida com plasma positivo para o ZIKV e utilizada como espécime artificial na avaliação clínica. Para avaliar a reatividade cruzada, as alíquotas das amostras de doadores com infecções de origem natural ou que haviam recebido a vacina do HBV foram testadas uma vez. As amostras enriquecidas com HEV e Chikungunya foram testadas em réplicas de 10.

Os resultados do Aptima Zika Virus Assay foram negativos em todas as amostras. Não se observou qualquer reatividade cruzada nos espécimes provenientes de sujeitos infetados com outros patógenos sanguíneos, nos espécimes provenientes de indivíduos que haviam recebido as vacinas do HBV ou nos espécimes enriquecidos com vírus. O potencial de interferência foi testado com uma alíquota de cada espécime, enriquecida com ZIKV numa concentração de 18 cópias/ml, e todos os resultados foram positivos. Não se observou qualquer reatividade cruzada ou interferência nos espécimes com outros patógenos sanguíneos.

Testaram-se micro-organismos adicionais relativamente à reatividade cruzada e à interferência. Utilizou-se plasma negativo para preparar espécimes enriquecidos com 1×10^6 unidades formadoras de colónias (CFU/ml) ou unidades formadoras de inclusão por ml (IFU/ml) com cada um dos seguintes micro-organismos: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae* ou *Chlamydia trachomatis*. A reatividade cruzada foi testada com espécimes não enriquecidos com ZIKV e todos os resultados foram negativos. O potencial de interferência microbiana foi testado com uma alíquota de cada espécime, enriquecida com ZIKV numa concentração de 18 cópias/ml, e todos os resultados foram positivos. Não se observou qualquer reatividade cruzada ou interferência nos espécimes com bactérias ou fungos.

Reatividade cruzada nos espécimes de urina

A reatividade cruzada e a interferência de micro-organismos na urina foram testadas para o Aptima Zika Virus Assay. Utilizou-se urina negativa agrupada para preparar espécimes enriquecidos com 1×10^6 unidades formadoras de colónias (CFU/ml) ou unidades formadoras de inclusão por ml (IFU/ml) com cada um dos seguintes micro-organismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* (5×10^5 IFU/ml), *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* ou *Proteus mirabilis* (1×10^6 rRNA/ml). A reatividade cruzada foi

testada com espécimes não enriquecidos com ZIKV e todos os resultados foram negativos. O potencial de interferência microbiana foi testado com uma alíquota de cada espécime, enriquecida com ZIKV numa concentração de 18 cópias/ml, e todos os resultados foram positivos. Não se observou qualquer reatividade cruzada ou interferência nos espécimes com tais micro-organismos.

Avaliação clínica

Avaliação clínica dos espécimes de sangue

Obtiveram-se vinte e seis (26) espécimes de plasma de três fontes comerciais. Os 26 espécimes foram considerados pelos fornecedores como positivos para o vírus ZIKV, com base nos resultados do CDC TrioPlex Assay (dois fornecedores) ou num teste validado de RT-PCR em tempo real. Os espécimes foram novamente analisados com um teste validado de RT-PCR em tempo real diferente e 24 dos 26 espécimes confirmaram os resultados positivos. Os dois espécimes que obtiveram resultado negativo na repetição da análise são considerados negativos para o resultado de referência na análise mostrada abaixo. O Aptima Zika Virus Assay obteve resultados positivos nos 26 espécimes clínicos. A Tabela 9 mostra os resultados dos 24 espécimes positivos de referência.

Tabela 9: Resultados dos 24 espécimes clínicos positivos para o ZIKV no Aptima Zika Virus Assay

Identificação do espécime	País de origem	Ct/Cp de referência	Resultado do Aptima Assay	S/CO do Aptima Assay
08847156	Colômbia	34,14	Positivo	30,5
08847163	Colômbia	34,90	Positivo	31,3
08847229	Colômbia	31,43	Positivo	31,3
08847260	Colômbia	32,75	Positivo	32,5
08847264	Colômbia	36,32	Positivo	32,8
08847284	Colômbia	33,14	Positivo	32,5
08847325	Colômbia	36,22	Positivo	31,2
08847716	Colômbia	31,76	Positivo	29,8
1043-TDS-0112	República Dominicana	31,80	Positivo	30,9
1043-TDS-0114	República Dominicana	35,20	Positivo	31,8
1043-TDS-0115	República Dominicana	24,74	Positivo	32,3
1043-TDS-0119	República Dominicana	30,69	Positivo	32,1
1043-TDS-0122	República Dominicana	35,05	Positivo	30,6
1043-TDS-0129	República Dominicana	37,24	Positivo	31,8
1043-TDS-0130	República Dominicana	34,23	Positivo	33,4
1043-TDS-0131	República Dominicana	29,66	Positivo	30,3
1043-TDS-0134	República Dominicana	37,30	Positivo	31,0
1043-TDS-0135	República Dominicana	34,07	Positivo	32,1
1043-TDS-0137	República Dominicana	29,54	Positivo	31,7
1043-TDS-0141	República Dominicana	30,71	Positivo	32,0
1043-TDS-0143	República Dominicana	28,73	Positivo	29,6
1043-TDS-0144	República Dominicana	34,19	Positivo	29,8
1043023924	Colômbia	34,69	Positivo	30,3
8798593	Colômbia	22,75	Positivo	31,7

Preparou-se um total de 90 espécimes artificiais com a adição de plasma positivo para o ZIKV em espécimes individuais de plasma com uma concentração de 18 cópias/ml. Os 90 espécimes incluíam 10 espécimes individuais de plasma de pacientes positivos para o Parvovírus B19, Dengue, HAV, HBV, HCV, HIV ou WNV; 10 espécimes de plasma de um dador vacinado com HBV; e 10 espécimes de plasma de dadores normais.

Utilizou-se um total de 72 amostras individuais de plasma com espécimes negativos para o ZIKV. Setenta (70) espécimes incluíam 10 espécimes individuais de plasma com as seguintes características: resultados positivos para anticorpos antinucleares, hemolisados (hemoglobina elevada), ictericos (bilirrubina elevada), lipêmicos (lípidos elevados), mieloma múltiplo, artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico. Foram igualmente incluídos dois espécimes com resultados positivos no teste inicial de referência mas com resultados negativos na repetição do teste. Estes dois espécimes obtiveram resultados positivos com o Aptima Zika Virus Assay. A Tabela 10 resume os resultados da avaliação clínica.

Tabela 10: Resultados da avaliação clínica do Aptima Zika Virus Assay

Categoria do espécime	Aptima Zika Virus Assay		
	Quantidade testada	ZIKV positivo	ZIKV negativo
Espécimes naturais positivos para o Zika	24	24 / 24	0 / 24
Espécimes clínicos artificiais positivos para o Zika (3 x LoD)	90 ^a	90 / 90	0 / 90
Espécimes clínicos previstos negativos para o vírus Zika	72 ^b	2 / 72	70 / 72
Percentagem de concordância positiva		100% (114 / 114) IC de 95%: 96,7% a 100%	
Percentagem de concordância negativa		97,2% (70 / 72) ^b IC de 95%: 90,4 a 99,2%	

IC = intervalo de confiança.

^a Inclui as alíquotas enriquecidas com ZIKV dos 90 espécimes de plasma avaliados nos estudos da interferência.

^b Inclui duas amostras do paciente com resultado positivo no teste inicial de referência e resultado negativo na repetição do teste com um método PCR alternativo e que foram consideradas falsas positivas.

Avaliação clínica dos espécimes de urina

Obtiveram-se dez (10) espécimes combinados (espécimes combinados de plasma/soro/urina colhidos em 10 pacientes sintomáticos) de uma fonte comercial. Os 10 pacientes sintomáticos foram considerados pelo fornecedor como positivos para o vírus ZIKV, com base nos resultados dos espécimes séricos testados com um teste validado de RT-PCR em tempo real. Os espécimes de urina foram processados antes do teste. Os dez espécimes de urina processados foram testados em conjunto com amostras de plasma e soro de cada um dos 10 pacientes no Aptima Zika Virus Assay. Todos os espécimes obtiveram resultados positivos após os testes iniciais. A Tabela 11 mostra os resultados dos 10 espécimes combinados.

Tabela 11: Resultados dos 10 espécimes clínicos combinados positivos para o ZIKV no Aptima Zika Virus Assay

Identificação do espécime	País de origem	Cp de referência (Soro)	Plasma		Soro		Urina processada	
			Resultado	S/CO	Resultado	S/CO	Resultado	S/CO
1043-TDS-0159	República Dominicana	36,31	Positivo	33,1	Positivo	31,7	Positivo	32,9
1043-TDS-0163	República Dominicana	32,54	Positivo	33,4	Positivo	33,4	Positivo	17,0
1043-TDS-0165	República Dominicana	40,38	Positivo	32,8	Positivo	32,6	Positivo	33,7

Tabela 11: Resultados dos 10 espécimes clínicos combinados positivos para o ZIKV no Aptima Zika Virus Assay

Identificação do espécime	País de origem	Cp de referência (Soro)	Plasma		Soro		Urina processada	
			Resultado	S/CO	Resultado	S/CO	Resultado	S/CO
1043-TDS-0173	República Dominicana	33,15	Positivo	32,6	Positivo	32,8	Positivo	34,1
1043-TDS-0206	República Dominicana	36,62	Positivo	31,6	Positivo	30,8	Positivo	32,4
1043-TDS-0221	República Dominicana	38,11	Positivo	17,8	Positivo	33,5	Positivo	32,8
1043-TDS-0223	República Dominicana	32,50	Positivo	34,0	Positivo	33,4	Positivo	31,9
1043-TDS-0224	República Dominicana	31,81	Positivo	33,8	Positivo	31,6	Positivo	33,6
1043-TDS-0230	República Dominicana	30,51	Positivo	33,8	Positivo	33,7	Positivo	34,7
1043-TDS-0231	República Dominicana	35,63	Positivo	31,6	Positivo	33,8	Positivo	34,4

Preparou-se um total de 99 espécimes artificiais de urina enriquecidos com plasma positivo para o ZIKV em espécimes individuais de urina: 33 espécimes foram enriquecidos com uma concentração de 20 cópias/ml, 33 espécimes foram enriquecidos com uma concentração de 36 cópias/ml e 33 espécimes foram enriquecidos com uma concentração de 100 cópias/ml. Cada espécime de urina enriquecido foi processado com o Aptima Zika Virus Assay antes dos testes. Todos os espécimes artificiais de urina processados obtiveram um resultado positivo.

Utilizou-se um total de 123 espécimes individuais de urina com espécimes negativos para o RNA do ZIKV. Destes, 87 espécimes de urina foram colhidos junto de uma população normal: 36 espécimes individuais de urina feminina foram colhidos junto de uma população de pacientes (7 pacientes com cancro da mama, 6 pacientes com doença renal crónica, 6 pacientes com lúpus eritematoso sistémico, 4 pacientes com pneumonia, 8 pacientes com diabetes e 5 pacientes com infeção do trato urinário). Cada espécime de urina foi processado com o Aptima Zika Virus Assay antes dos testes. Todos os espécimes obtiveram um resultado negativo. A Tabela 12 resume os resultados da avaliação clínica.

Tabela 12: Resultados da avaliação clínica dos espécimes de urina processados

Categoria do espécime	Aptima Zika Virus Assay		
	Quantidade testada	ZIKV positivo	ZIKV negativo
Espécimes naturais positivos para o Zika	10	10/10	0/10
Espécimes clínicos artificiais positivos para o Zika	99	99/99	0/99
Espécimes clínicos previstos negativos para o vírus Zika	123	0/123	123/123
Percentagem de concordância positiva		100% (109/109) IC de 95%: 96,6% a 100%	
Percentagem de concordância negativa		100% (123/123) IC de 95%: 97,0% a 100%	

IC = intervalo de confiança.

Bibliografia

1. **International Committee on Taxonomy of Viruses.** <http://www.ictvonline.org/>
2. **Musso D, Gubler DJ.** 2016. Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* Jul;29(3):487-524.
3. **Kitchen SF, Haddow AJ.** 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 46:509–520.
4. **Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB.** 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536–2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715.
5. **Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D.** 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20:1085–1086.
6. **Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI.** 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1885–1886. doi: 10.3201/eid2110.150847.
7. **Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K.** 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:569-572.
8. **World Health Organization.** 2016. Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome. 8 December 2016.
9. **Cao-Lormeau V-M et al.** Guillain–Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case–control study. *Lancet* [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6).
10. **Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR.** 2016. Zika virus and birth defects — reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016 May 19;374(20):1981-1987. doi: 10.1056/NEJMs1604338. PubMed PMID: 27074377.
11. **Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM.** 2015. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21: 359-361.
12. **U.S. Centers for Disease Control and Prevention.** <http://www.cdc.gov/zika/transmission/blood-transfusion.html>
13. **Kacian DL, Fultz TJ** 1995. Nucleic acid sequence amplification methods. U.S. Patent 5,399,491.
14. **Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC.** 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 35:1588-1594.
15. **Nelson NC, Cheikh A, Matsuda E, Becker M.** 1996. Simultaneous detection of multiple nucleic acid targets in a homogeneous format. *Biochem.* 35:8429-8438.
16. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline.* CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
17. **29 CFR Part 1910.1030.** *Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens;* current version.
18. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL);* current version.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. *Clinical Laboratory Waste Management.* CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline.* 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA

Contactos nos EUA e a nível internacional:

Apoio ao cliente: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Suporte técnico: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Para mais informações de contacto, visite www.hologic.com.

HOLOGIC, Aptima, Panther, SB100 e logótipos associados são marcas comerciais ou marcas registadas da Hologic, Inc. e/ou respetivas subsidiárias nos EUA e/ou em outros países.

Quaisquer outras marcas comerciais que possam aparecer neste folheto informativo pertencem aos respetivos proprietários.

Este produto pode estar abrangido por uma ou mais das seguintes patentes nos EUA identificadas em www.hologic.com/patents.

© 2017 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-15988-601 Rev. 002
2017-02