

Instruções de uso

RealStar[®]

Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

01/2017 PT

RealStar[®]

Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Para utilização com

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



591013



96



01 2017



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Conteúdo

1. Utilização Prevista	6
2. Componentes do Kit	6
3. Armazenamento	6
4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5. Informação de Base	8
6. Descrição do Produto.....	9
6.1 Instrumento de PCR em tempo real.....	10
7. Avisos e Precauções	11
8. Procedimento	12
8.1 Preparação de Amostras.....	12
8.2 Preparação da Master Mix.....	13
8.3 Preparação da Reação	15
9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	16
9.1 Definições	16
9.2 Detetores de fluorescência (corantes)	16
9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	17
9.4 Observações especiais sobre a configuração dos instrumento de PCR em tempo real recomendados.....	18
10. Análise de Dados	20
10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	20
10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido.....	20
10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido	21
10.2 Interpretação dos Resultados	21
10.2.1 Análise Qualitativa	21

11. Avaliação do Desempenho.....	22
11.1 Avaliação do desempenho sem extração de ácido nucleico	22
11.1.1 Sensibilidade Analítica	22
11.1.2 Especificidade Analítica	23
11.1.3 Precisão	24
11.2 Avaliação do desempenho incluindo extração de ácido nucleico	25
11.2.1 Amostras de soro	25
11.2.2 Amostras de Urina	32
11.3 Avaliação do Desempenho Clínico	39
12. Limitações	55
13. Controlo de Qualidade.....	56
14. Apoio Técnico	56
15. Bibliografia	56
16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	57
17. Explicação de Símbolos	58

1. Utilização Prevista

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa do ARN específico do Vírus Zika (ZIKV) em soro humano ou urina.

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [μ l/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Controle Interno

Positive Control = Controle Positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e 15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvras sem pó (descartáveis)

NOTA



Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.



É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

O *vírus Zika* é um vírus ARN de cadeia simples (+) e com invólucro da família *Flaviviridae*. Tal como muitos outros membros da família é transmitido sobretudo por mosquitos do género *Aedes*. Em 1947, o vírus foi isolado de um macaco-rhesus no Uganda pela primeira vez. O primeiro caso humano de infeção pelo vírus Zika foi descoberto em 1968 na Nigéria. Inicialmente, as provas de infeções pelo vírus Zika foram descobertas apenas em doentes de África e do Sudeste Asiático. Em 2007, o vírus causou um grande surto na Micronésia e noutras ilhas do Oceano Pacífico. A Polinésia Francesa, a Ilha da Páscoa e as Ilhas Cook foram afetadas em 2013. Desde 2015, o vírus é também endémico na América do Sul, nomeadamente no Brasil, onde desde então foram registados números elevados de casos suspeitos. Febre, erupção cutânea e artralgia são sintomas e sinais comuns e de infeções pelo vírus Zika que, no entanto, habitualmente são moderados e autolimitadores.

Uma vez que os vírus Zika, Dengue e Chikungunya são endémicos nas mesmas regiões geográficas e causam sintomas semelhantes, a identificação definitiva dos agentes etiológicos apenas é possível através de testes laboratoriais. A deteção do vírus Zika através da RT-PCR em tempo real deve ser realizada logo após o início (até 10 dias) da doença. Os ensaios de anticorpos habitualmente com reatividade cruzada com flavivírus intimamente relacionados e a deteção de anticorpos neutralizantes através de ensaios de redução de placas são complexos e só podem ser realizados em laboratórios especializados.

NOTA



Devido à formação molecular relativamente rápida e aos vírus ARN, existe um risco inerente relativamente a qualquer sistema de teste baseado em RT-PCR de a acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos.

6. Descrição do Produto

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção qualitativa do ARN específico do Vírus Zika (ZIKV). O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da RT-PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas alvo específicas para a deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ARN do ZIKV estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ARN específico do ZIKV e do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

O teste consiste em três processos num único tubo de ensaio:

- Transcriptase reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo interno
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Controlo Positivo
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, transcriptase reversa, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcriptase reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ARN específico do ZIKV e do Controlo interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Avisos e Precauções

Leia as instruções de utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado aquando do momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata d laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.

- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área daboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

A qualidade do ARN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É necessário assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. O seguinte kit foi validado em combinação com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 para a extração de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
 - Cat. No. 52904 for 50 extractions
 - Cat. No. 52906 for 250 extractions

A extração de ARN recorrendo à utilização do QIAamp® Viral RNA Mini Kit foi realizada seguindo as instruções do fabricante, utilizando 140 µl do espécime como material inicial. Para a eluição do ARN extraído, deve ser utilizado um tampão AVE de 60 µl.

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados.

A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 deve ser validada pelo utilizador.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, antes da eluição do ácido nucleico.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de RT-PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controlo Interno (Internal Control)	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o Controlo Interno durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ O Controlo Interno **não deve** ser adicionado diretamente à amostra. O Controlo Interno deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de amostra/lise. O volume do Controlo Interno que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, quando utilizar o QIAamp® Viral RNA Mini Kit, o ARN com um volume de tampão AVE de 60 µl, deve ser adicionado 6 µl de Controlo Interno à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume da Master Mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO

Se o Controlo Interno foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno



Nunca adicione Controlo Interno diretamente ao espécime.

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo e um controlo negativo por processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do ZIKV	ZIKV	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	Controlo Interno	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

- Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Fase	Ciclo Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcriptase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	55	00:45
			-	72	00:15

9.4 Observações especiais sobre a configuração dos instrumentos de PCR em tempo real recomendados

Abaixo poderá encontrar observações especiais sobre a configuração do LightCycler® 480 Instrument II (Roche), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), ABI Prism® 7500 SDS e ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems), Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) e Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN), VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare) e Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene).

LightCycler® 480 Instrument II

1. Em "Definições do ensaio", selecione "Formato de detecção: Sonda de hidrólise de duas cores/sonda UPL".
2. Certifique-se de que o faz verificando no campo "Personalizar" que a definição apresentada para as "Combinações do filtro" são "FAM™ (465-510)" e "VIC™/HEX/Yellow555 (533-580)".

ABI Prism® 7500 SDS

Ir para "Configuração de placa", "Definir alvos e amostras", "Atribuir alvos e amostras":

1. Selecione toda a placa.
2. Clique sobre as caixas para atribuição para ambos os alvos. Os alvos devem aparecer nos poços no esquema da placa.

ABI Prism® 7500 SDS Fast

Aplicam-se as mesmas definições para "Configuração de placa" como para ABI Prism® 7500 SDS (ver acima). Para a versão "Fast", ir para "Propriedades do ensaio". A velocidade da rampa deve ser definida para "Padrão (~2 horas para concluir um processamento)". O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 não é compatível com as condições de realização de ciclo rápido e as taxas de rampa aumentadas.

CFX96™ Real-Time PCR Detection System e CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System

Abra a janela do "Editor de placa" e selecione todos os poços da placa de 96 poços. Clique em "Selecionar fluoróforos". Para o "Canal 1", verifique a caixa atrás de FAM™ e, para o "Canal 2", verifique a caixa atrás de VIC™. Atribua amostras a poços, selecionando o "Tipo de amostra" adequado e, em seguida, "Carregar" FAM™ e VIC™ nos poços. O nome do alvo de FAM™ deve ser definido para "Vírus Zika" e o nome do alvo de VIC™ para "Controlo interno (Internal control)".

Rotor-Gene® 6000 e Rotor-Gene® Q 5/6 plex/MDx Platform

Escolha o rotor de 72 poços e o volume de reação adequado. A Otimização da obtenção deve ser realizada antes da 1.ª aquisição.

VERSANT® kPCR Molecular System AD

Sob o menu pendente "Instrumento" selecione "Definições de obtenção do conjunto do filtro". Irá aparecer uma janela pop-up. Defina as seguintes configurações: Cy®5 x8, ROX™ x4, JOE™ x8 e FAM™ x8. Feche a janela pop-up, clicando no botão OK.

Mx 3005P™ QPCR System

Sob o menu pendente "Instrumento" selecione "Definições de obtenção do conjunto do filtro". Irá aparecer uma janela pop-up. Defina as seguintes configurações: Cy®5 x8, ROX™ x4, JOE™ x8 e FAM™ x8. Feche a janela pop-up, clicando no botão OK.

10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido

Para que um processamento de teste de diagnóstico seja **válido**, devem existir as seguintes condições de controlo:

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo	+	+/-*
Controlo Negativo	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido

Um processamento de teste de diagnóstico é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **válido** não estiver presente.

No caso de um processamento de teste de diagnóstico **inválido** repita o teste utilizando os restantes ácidos nucleicos purificados ou comece a partir das amostras originais novamente.

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
+	+*	Foi detetado o ARN específico do ZIKV.
-	+	Não foi detetado o ARN específico do ZIKV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do ZIKV.
-	-	RT-PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo Interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados Positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ARN do ZIKV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo Interno (Internal control).

11. Avaliação do Desempenho

11.1 Avaliação do desempenho sem extração de ácido nucleico

11.1.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (cópias/μl de eluato) de moléculas de ARN específico do ZIKV que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de ARN quantificado do ZIKV.

Tabela 1: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do vírus Zika específico ARN

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,500	24	23	96
0,316	24	20	83
0,100	24	10	42
0,050	24	8	33
0,032	24	6	25

A sensibilidade analítica do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção de ARN específico do vírus Zika, a sensibilidade analítica é de 0,61 cópias/μl eluato [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,39 - 1,27 cópias/μl]

11.1.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos relevantes do ZIKV serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN genómico extraído de vírus não Zika, alfavírus e outros agentes patogénicos.

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Virus del dengue serotipo 1
- Virus do dengue serotipo 2
- Virus do dengue serotipo 3
- Virus do dengue serotipo 4
- Virus do Nilo Occidental
- Virus da febre amarela
- Virus do Ébola cepa Zaire (ZEBOV)
- Parvovirus humano B19
- Virus chikunguía
- Virus da encefalitis do valle do Murray
- Virus da encefalitis japonesa
- Virus de Marburgo (MARV)
- Virus do Ébola cepa Sudán (SEBOV)
- Virus da encefalitis de San Luis
- *Plasmodium falciparum*

ATENÇÃO



Devido à homologia na sequência entre o ARN do vírus Usutu e da região alvo usada para deteção do ARN específico do vírus Zika, não é possível excluir a reatividade cruzada com o ARN do vírus Usutu. O vírus Usutu é um vírus aviário que raramente afeta os humanos. Não provoca doença grave ou fatal em doentes humanos e uma infeção normalmente permanece assintomática.

11.1.3 Precisão

A precisão do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 foi determinada com base na variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade interlote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base no ciclo limiar - valores (C_t). Pelo menos oito réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade intraensaio e variabilidade inter-ensaio e interlote.

Tabela 2: Dados de precisão para a detecção do ZIKV específico ARN

ZIKV	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	31,33	0,07	0,21
Variabilidade Inter-Ensaio	31,35	0,10	0,32
Variabilidade Interlote	31,42	0,11	0,35
Variabilidade Total	31,39	0,11	0,35

Tabela 3: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control)

Controlo Interno (Internal Control)	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	28,55	0,06	0,22
Variabilidade Inter-Ensaio	28,44	0,14	0,49
Variabilidade Interlote	28,44	0,17	0,60
Variabilidade Total	28,48	0,15	0,53

11.2 Avaliação do desempenho incluindo extração de ácido nucleico

11.2.1 Amostras de soro

Estimativa do Limite de Detecção (LDD):

Foram preparadas diluições em série da estirpe do vírus Zika H/PF/2013 (concentração de matéria TCID₅₀/ml: 10^{6,82}) obtida do Arquivo Europeu de Vírus (Marselha, França). Utilizando qRT-PCR e ARN transcrito *in vitro* quantificado o número de equivalentes ao genoma (geq) do vírus Zika por mililitro de matéria foi determinado como 1,26E+09.

Para a extração de ácido nucleico, 126 µl de agregado de soro foram combinados com 560 µl de tampão AVL, contendo 6 µl de Controlo Interno (proporcionado com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0) e potenciados com 14 µl de matéria de vírus Zika diluído. A mistura final foi sujeita ao procedimento de extração de acordo com as instruções do fabricante referentes ao QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). A eluição foi realizada em 60 µl de tampão AVE. Cada amostra foi extraída em triplicado e testada com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). A concentração mais baixa à qual as três réplicas testaram positivo foi tratada como LDD experimental. Os resultados encontram-se na Tabela 4:

Tabela 4: Determinação do LDD experimental para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Alvo	Concentração geq/ml	Determinação taxa	Réplica 1 C _t (FAM™)	Réplica 2 C _t (FAM™)	Réplica 3 C _t (FAM™)
Vírus Zika (estirpe H/PF/2013)	2515,71	3/3	33,52	33,76	33,87
	795,61	3/3	35,13	35,36	34,85
	251,62	3/3	36,98	35,92	35,86
	79,57	2/3	42,00	-	36,05
	25,17	1/3	36,74	-	-
	7,96	1/3	-	37,49	-
	2,52	0/3	-	-	-

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System detetou 3/3 réplicas com uma concentração de soro de 251,62 geq/ml.

Conformação do Limite de Detecção (LDD):

Com base no LDD experimental, a matéria de vírus Zika diluído foi potenciada em 20 amostras individuais de soro para uma concentração final de 251,62 geq/ml. Os ácidos nucleicos foram extraídos com o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) tal como descrito acima. Os eluatos obtidos foram testados com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 nos seguintes instrumentos:

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Os resultados encontram-se nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

Tabela 5: Confirmação LDD no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
1	+	36,84	31,55
2	+	38,29	32,16
3	+	36,07	31,71
4	+	35,18	31,32
5	+	36,95	31,60
6	+	36,22	31,71
7	+	35,48	32,06
8	+	35,12	32,04
9	+	36,05	31,49
10	+	36,07	31,89
11	+	35,77	31,69
12	-	-	32,68
13	+	36,51	32,17
14	+	36,21	32,32
15	+	34,96	31,66
16	+	36,08	32,18
17	+	35,97	32,05
18	+	35,47	31,41
19	+	36,07	31,86
20	+	36,15	31,87

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
Estatística	C _t mediano (n=19)	36,08	31,87
	SD	0,76	0,34
	CV %	2,09	1,06
	Resultado	19/20	

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System detetou 19/20 réplicas com uma concentração de 251,62 geq/ml. Por conseguinte o LDD confirmado é soro 251,62 geq/ml.

Tabela 6: Confirmação LDD no Rotor-Gene® Q (QIAGEN)

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	34,68	30,34
2	+	36,10	30,74
3	+	35,74	30,57
4	+	34,62	30,05
5	+	34,93	30,29
6	+	35,12	30,58
7	+	35,29	30,60
8	+	35,08	30,63
9	+	34,38	30,32
10	+	36,47	30,42
11	+	34,33	30,29
12	+	36,78	31,39

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
13	+	35,76	31,02
14	+	34,99	30,89
15	+	34,59	30,36
16	+	35,40	30,83
17	+	34,58	30,64
18	+	34,88	30,27
19	+	35,99	30,29
20	+	34,67	30,32
Estatística	C _t mediano (n=20)	35,22	30,54
	SD	0,71	0,32
	CV %	2,01	1,04
	Resultado	20/20	

À concentração de 251,62 geq/ml 20/20 réplicas foram detetadas como positivas e por conseguinte confirmam o LDD como soro 251,62 geq/ml para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o Rotor-Gene® Q (QIAGEN).

Tabela 7: Confirmação LDD no ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	36,18	30,20
2	+	35,11	30,67
3	+	35,02	30,38
4	+	35,49	29,88
5	+	34,86	30,35

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
6	+	35,37	30,09
7	+	35,61	30,33
8	+	34,67	30,28
9	+	34,85	30,12
10	+	35,61	29,91
11	+	34,82	30,05
12	+	35,78	31,07
13	+	34,78	30,95
14	+	36,43	30,75
15	+	34,25	30,19
16	+	35,33	30,57
17	+	34,86	30,31
18	+	36,58	30,00
19	+	35,10	30,13
20	+	34,74	30,32
Estatística	C _t mediano (n=20)	35,27	30,32
	SD	0,62	0,33
	CV %	1,74	1,08
	Resultado	20/20	

À concentração de 251,62 geq/ml 20/20 réplicas foram detetadas como positivas e por conseguinte confirmam o LDD como soro 251,62 geq/ml para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems).

Tabela 8: Confirmação LDD no LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	35,55	30,93
2	+	36,93	31,28
3	+	35,84	30,73
4	+	35,49	30,60
5	+	36,89	30,79
6	+	36,48	30,81
7	+	35,88	30,80
8	+	35,37	30,89
9	+	35,46	30,59
10	+	35,85	31,01
11	+	35,90	30,55
12	+	36,33	31,74
13	+	36,30	31,28
14	+	37,59	31,22
15	+	35,74	30,77
16	+	36,18	31,04
17	+	36,48	31,13
18	+	36,00	30,66
19	+	36,48	30,78
20	+	35,82	30,78

Concentração vírus Zika = 251,62 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
Estatística	C _t mediano (n=20)	36,13	30,92
	SD	0,57	0,29
	CV %	1,57	0,95
	Resultado	20/20	

À concentração de 251,62 geq/ml 20/20 réplicas foram detetadas como positivas e por conseguinte confirmam o LDD como soro 251,62 geq/ml para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

11.2.2 Amostras de Urina

Estimativa do Limite de Detecção (LDD):

Foram preparadas diluições em série da estirpe do vírus Zika H/PF/2013 (concentração de matéria TCID₅₀/ml: 10^{6,82}) obtida do Arquivo Europeu de Vírus (Marselha, França). Utilizando qRT-PCR e ARN transcrito in vitro quantificado o número de equivalentes ao genoma (geq) do vírus Zika por mililitro de matéria foi determinado como 1,26E+09.

Para a extração de ácido nucleico, 126 µl de agregado de urina foram combinados com 560 µl de tampão AVL, contendo 6 µl de Controlo Interno (proporcionado com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0) e potenciados com 14 µl de matéria de vírus Zika diluído. A mistura final foi sujeita ao procedimento de extração de acordo com as instruções do fabricante referentes ao QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). A eluição foi realizada em 60 µl de tampão AVE. Cada amostra foi extraída em triplicado e testada com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). A concentração mais baixa à qual as três réplicas testaram positivo foi tratada como LDD experimental. Os resultados encontram-se na Tabela 9:

Tabela 9: Determinação do LDD experimental para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Alvo	Concentração geq/ml	Determinação taxa	Réplica 1 C _t (FAM™)	Réplica 2 C _t (FAM™)	Réplica 3 C _t (FAM™)
Vírus Zika (estirpe H/PF/2013)	2515,71	3/3	33,15	33,34	33,11
	795,61	3/3	34,10	33,83	35,07
	251,62	3/3	35,54	35,64	35,27
	79,57	3/3	36,78	37,41	36,40
	25,17	2/3	38,38	37,72	-
	7,96	1/3	-	-	38,22
	2,52	0/3	-	-	-

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System detetou 3/3 réplicas com uma concentração de urina 79,57 geq/ml.

Conformação do Limite de Detecção (LDD):

Com base no LDD experimental, a matéria de vírus Zika diluído foi potenciada em 20 amostras individuais de urina para uma concentração final de 79,57 geq/ml. Os ácidos nucleicos foram extraídos com o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) tal como descrito acima. Os eluatos obtidos foram testados com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 nos seguintes instrumentos:

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Os resultados encontram-se nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

Tabela 10: Confirmação LDD no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
1	+	36,72	30,77
2	+	36,34	31,06
3	+	37,21	31,07
4	+	36,41	31,21
5	+	37,89	30,59
6	-	-	31,21
7	+	36,12	31,25
8	+	36,25	30,43
9	+	38,03	30,64
10	+	37,36	31,11
11	+	38,08	31,99
12	+	37,26	30,95
13	+	36,30	31,27
14	+	35,75	31,74
15	+	36,68	31,01
16	+	39,07	31,08
17	+	37,17	31,67
18	+	35,79	31,04
19	+	38,01	31,44
20	+	37,17	31,05

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
Estatística	C _t mediano (n=19)	37,03	31,08
	SD	0,90	0,27
	CV %	2,42	0,87
	Resultado	19/20	

O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System detetou 19/20 réplicas com uma concentração de 79,57 geq/ml. Por conseguinte, o LDD confirmado é 79,57 geq/ml de urina.

Tabela 11: Confirmação LDD no Rotor-Gene® Q (QIAGEN)

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	36,45	29,66
2	+	35,47	30,20
3	+	36,03	30,37
4	+	35,70	30,08
5	+	35,97	29,53
6	+	37,38	30,41
7	-	-	30,03
8	+	37,34	30,23
9	+	35,36	29,49
10	+	36,40	30,10
11	+	35,57	29,83
12	+	36,52	29,74

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
13	+	37,59	30,21
14	+	35,49	29,53
15	+	36,12	29,89
16	+	36,53	29,83
17	+	36,76	30,73
18	+	36,55	29,79
19	+	36,19	30,39
20	+	37,39	29,79
Estatística	C _t mediano (n=19)	36,36	29,99
	SD	0,70	0,34
	CV %	1,92	1,13
	Resultado	19/20	

À concentração de 79,57 geq/ml 19/20 réplicas foram detetadas como positivas e por conseguinte confirmam o LDD como urina 79,57 geq/ml para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o Rotor-Gene® Q (QIAGEN).

Tabela 12: Confirmação LDD no ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	36,11	29,48
2	+	36,63	29,97
3	+	35,76	29,94
4	+	37,29	29,85

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
5	+	36,54	29,56
6	+	37,37	29,86
7	+	36,36	30,03
8	+	37,27	30,11
9	+	36,05	29,45
10	+	36,65	30,06
11	+	37,33	29,86
12	+	35,88	29,53
13	+	36,09	30,02
14	+	37,58	29,51
15	+	37,36	29,86
16	+	36,07	29,80
17	+	36,50	30,23
18	+	37,36	29,81
19	+	35,86	30,20
20	+	35,74	29,74
Estatística	C _t mediano (n=20)	36,58	29,84
	SD	0,65	0,24
	CV %	1,79	0,80
	Resultado	20/20	

À concentração de 79,57 geq/ml 20/20 réplicas foram detetadas como positivas e por conseguinte confirmam o LDD como urina 79,57 geq/ml para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems).

Tabela 13: Confirmação LDD no LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	37,29	30,15
2	+	37,03	30,34
3	+	37,67	30,48
4	+	36,83	30,42
5	+	36,58	30,02
6	+	36,90	30,69
7	+	37,50	30,66
8	+	38,63	30,71
9	+	36,74	30,10
10	+	37,95	30,54
11	+	37,13	30,52
12	+	38,12	30,29
13	+	36,53	30,54
14	+	37,41	30,19
15	+	37,16	30,43
16	+	36,70	30,61
17	+	37,79	30,86
18	+	37,28	30,41
19	+	40,00	30,86
20	+	38,42	30,35

Concentração vírus Zika = 79,57 geq/ml			
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
Estatística	C _t mediano (n=20)	37,48	30,46
	SD	0,84	0,24
	CV %	2,25	0,78
	Resultado	20/20	

À concentração de 79,57 geq/ml 20/20 réplicas foram detetadas como positivas e por conseguinte confirmam o LDD como urina 79,57 geq/ml para o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

11.3 Avaliação do Desempenho Clínico

Para avaliar o desempenho clínico do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. 208 espécimes clínicos de 153 doentes com sinais e sintomas de infeção pelo vírus Zika (106 femininos (F) e 47 masculinos (M)) foram analisados retrospectivamente de forma anónima. Das 208 amostras testadas 103 eram soro e 105 eram espécimes de urina.

Para a extração de ARN foi utilizado o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). 140 µl de cada amostra de urina ou soro foram combinados com 560 µl de tampão AVL, contendo 6 µl do Controlo Interno fornecido com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0.. A mistura de amostra/tampão AVL foi sujeita ao procedimento de extração de acordo com as instruções do fabricante. A eluição foi realizada em 60 µl de tampão AVE.

Os eluatos foram testados com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. bem como com RT-PCR em tempo real tal como descrito por Lanciotti et. al (Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. (2008) Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007; Emerg Infect Dis. 2008 Aug; 14(8): 1232–1239).

Para a execução da RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. os seguintes oligonucleotídeos; Tabela 14 foram usados:

Tabela 14: Oligonucleotídeos usados para a RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al

Primer/Sonda	Sequência 5'→ 3'
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZIKV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA

Ambos os testes, o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. bem como a RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al., foram realizados em CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Os resultados gerados para as diferentes amostras testadas são mostrados na Tabela 15:

Tabela 15: Resultados de testes a amostras clínicas

ID de doente	Gênero	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
1	F	2	Soro	-	-	29,88	-	-
		2	Urina	-	-	31,57	-	-
2	F	5	Urina	-	-	29,50	-	-
3	F	1	Soro	-	-	30,37	-	-
		1	Urina	-	-	29,49	-	-
4	F	1	Soro	-	-	30,32	-	-
		1	Urina	-	-	30,16	-	-

ID de doente	Gênero	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
5	F	1	Soro	-	-	31,04	-	-
		1	Urina	-	-	30,10	-	-
6	F	3	Soro	-	-	30,77	-	-
		3	Urina	-	-	30,14	-	-
7	M	4	Soro	-	-	30,05	-	-
		4	Urina	-	-	31,21	-	-
8	M	0	Soro	-	-	29,61	-	-
		0	Urina	-	-	29,72	-	-
9	F	6	Urina	-	-	29,88	-	-
10	F	4	Soro	-	-	31,88	-	-
		4	Urina	-	-	29,83	-	-
11	F	0	Soro	-	-	31,33	-	-
		0	Urina	-	-	30,35	-	-
12	M	3	Soro	-	-	30,10	-	-
		3	Urina	-	-	30,34	-	-
13	F	4	Urina	33,03	+	29,92	33,85	+
14	F	2	Soro	33,53	+	29,84	32,73	+
15	M	5	Soro	-	-	30,53	-	-
		5	Urina	33,76	+	30,02	34,83	+
16	M	2	Soro	-	-	30,45	-	-
		2	Urina	-	-	29,87	-	-

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
17	F	3	Soro	30,12	+	31,45	29,68	+
18	F	3	Urina	-	-	29,81	-	-
19	F	2	Soro	-	-	29,60	-	-
		2	Urina	33,41	+	30,24	33,95	+
20	F	6	Urina	-	-	29,85	38,64	+
21	M	2	Soro	-	-	31,79	-	-
		2	Urina	-	-	29,96	-	-
22	M	1	Soro	-	-	32,04	-	-
		1	Urina	-	-	29,86	-	-
23	F	2	Soro	-	-	30,90	-	-
24	F	7	Urina	-	-	30,46	-	-
25	F	0	Soro	33,35	+	30,43	33,33	+
		3	Urina	31,93	+	31,23	32,81	+
26	F	3	Soro	-	-	30,81	-	-
		3	Urina	-	-	30,13	-	-
27	F	0	Urina	-	-	29,40	-	-
28	M	5	Soro	-	-	31,43	-	-
		5	Urina	-	-	30,49	-	-
29	F	7	Urina	-	-	30,09	-	-
30	M	1	Soro	-	-	32,57	-	-
		1	Urina	-	-	29,97	-	-

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
31	F	1	Soro	35,91	+	31,19	37,41	+
		1	Urina	30,14	+	30,06	30,05	+
32	M	2	Soro	-	-	30,49	-	-
		2	Urina	-	-	30,29	-	-
33	F	2	Soro	32,15	+	31,35	31,84	+
34	F	0	Urina	35,43	+	29,90	36,43	+
35	M	7	Urina	34,39	+	29,59	35,78	+
36	F	2	Soro	-	-	30,01	37,85	+
37	F	2	Urina	-	-	30,02	-	-
38	M	8	Urina	-	-	35,35	-	-
39	F	6	Soro	30,94	+	30,13	30,34	+
40	M	3	Soro	-	-	29,80	-	-
		3	Urina	-	-	30,76	-	-
41	M	3	Soro	-	-	30,36	-	-
		3	Urina	-	-	30,38	-	-
42	F	0	Soro	30,42	+	31,04	29,72	+
43	M	6	Urina	-	-	30,04	-	-
44	F	1	Soro	35,92	+	30,69	36,27	+
		1	Urina	35,16	+	29,77	38,48	+
45	M	6	Urina	-	-	30,06	-	-

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
46	M	4	Soro	-	-	30,98	-	-
		4	Urina	-	-	30,11	-	-
47	M	3	Urina	34,23	+	30,42	36,50	+
48	M	2	Urina	26,17	+	29,09	25,65	+
49	M	4	Soro	-	-	30,08	-	-
		4	Urina	-	-	30,23	-	-
50	F	6	Urina	-	-	29,91	-	-
51	F	2	Soro	35,04	+	32,35	34,74	+
52	F	3	Soro	33,48	+	31,29	33,18	+
53	M	5	Soro	-	-	29,69	-	-
		5	Urina	-	-	30,04	-	-
54	F	1	Soro	26,08	+	29,83	25,24	+
55	F	2	Urina	-	-	30,02	-	-
56	F	6	Soro	-	-	31,71	-	-
		6	Urina	-	-	31,11	-	-
57	F	7	Urina	-	-	30,10	-	-
58	F	4	Soro	-	-	32,75	-	-
		4	Urina	-	-	30,20	-	-
59	M	1	Soro	-	-	30,41	-	-
		1	Urina	-	-	29,87	-	-

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
60	M	0	Soro	-	-	29,62	-	-
		0	Urina	-	-	29,82	-	-
61	F	2	Soro	-	-	30,52	-	-
62	F	7	Urina	-	-	30,06	-	-
63	F	0	Soro	-	-	31,47	-	-
		0	Urina	-	-	29,74	-	-
64	F	7	Urina	28,03	+	30,03	28,68	+
65	F	2	Soro	37,79	+	29,33	38,15	+
		2	Urina	36,07	+	29,47	37,66	+
66	F	2	Soro	33,06	+	31,45	33,21	+
67	F	4	Soro	30,66	+	29,53	30,19	+
68	M	1	Soro	-	-	30,79	-	-
69	M	2	Soro	35,08	+	31,68	35,14	+
70	F	3	Urina	-	-	30,39	39,17	+
71	F	1	Soro	-	-	29,83	-	-
72	M	1	Soro	36,58	+	31,89	-	-
73	F	3	Urina	33,36	+	30,55	32,98	+
74	F	4	Soro	-	-	30,94	-	-
		4	Urina	-	-	30,92	-	-
75	F	3	Soro	35,03	+	29,82	35,30	+
76	M	3	Soro	34,06	+	29,57	34,01	+

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
77	F	3	Urina	35,02	+	31,02	34,66	+
78	F	6	Soro	32,00	+	30,08	32,03	+
		6	Urina	33,55	+	30,06	35,52	+
79	F	2	Soro	34,99	+	29,65	36,29	+
		2	Urina	26,59	+	29,72	26,94	+
80	M	3	Soro	31,93	+	29,78	31,17	+
		3	Urina	37,78	+	32,00	-	-
81	F	4	Soro	35,07	+	31,86	35,32	+
		4	Urina	34,51	+	30,83	36,42	+
82	F	1	Soro	33,51	+	29,88	33,09	+
83	F	0	Soro	26,83	+	33,66	26,55	+
		8	Urina	19,37	+	*	17,88	+
84	F	3	Urina	34,83	+	30,38	35,38	+
85	M	5	Urina	33,31	+	30,25	33,31	+
86	M	6	Urina	-	-	30,52	-	-
87	M	3	Soro	35,07	+	29,62	34,18	+
		3	Urina	31,01	+	30,34	30,48	+
88	F	6	Soro	-	-	29,54	-	-
		6	Urina	28,58	+	30,67	28,01	+
89	F	3	Soro	30,87	+	29,74	29,98	+
90	F	2	Soro	28,58	+	29,51	27,77	+

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
91	F	1	Soro	33,71	+	31,35	33,66	+
92	F	3	Urina	35,60	+	30,03	38,29	+
93	M	3	Soro	36,78	+	29,61	37,92	+
94	M	6	Urina	-	-	30,34	38,81	+
95	F	3	Soro	37,60	+	30,86	37,61	+
96	F	5	Urina	33,77	+	30,35	34,09	+
97	M	3	Soro	28,47	+	29,75	27,18	+
98	F	2	Soro	32,09	+	32,02	31,38	+
		2	Urina	37,64	+	31,16	38,33	+
99	F	1	Urina	33,47	+	30,57	35,44	+
100	F	4	Urina	-	-	30,31	-	-
101	M	7	Urina	-	-	30,30	-	-
102	F	0	Soro	-	-	32,62	-	-
103	F	3	Urina	33,63	+	30,30	33,45	+
104	F	2	Soro	36,05	+	32,30	36,08	+
		2	Urina	37,63	+	30,10	38,13	+
105	F	0	Soro	33,25	+	31,81	33,38	+
106	F	1	Urina	34,63	+	29,89	35,41	+
107	F	2	Soro	37,96	+	32,13	39,51	+
108	F	5	Soro	33,81	+	29,98	33,68	+
		5	Urina	35,89	+	30,31	36,57	+

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
109	F	1	Soro	-	-	30,38	-	-
110	M	7	Urina	-	-	30,61	-	-
111	F	1	Soro	37,07	+	31,19	38,54	+
112	F	2	Urina	35,76	+	29,94	-	-
113	F	2	Soro	31,13	+	31,50	30,62	+
114	M	1	Urina	-	-	29,83	-	-
115	F	5	Soro	-	-	30,30	36,89	+
		5	Urina	31,12	+	30,35	30,34	+
116	F	2	Soro	35,75	+	30,80	37,02	+
117	F	3	Urina	37,90	+	30,37	-	-
118	F	1	Soro	35,27	+	33,39	35,16	+
119	F	3	Soro	35,41	+	32,99	36,20	+
120	F	3	Urina	36,50	+	29,81	-	-
121	M	6	Urina	28,27	+	30,13	28,31	+
122	M	3	Soro	30,27	+	29,45	29,05	+
123	M	1	Soro	25,15	+	28,89	24,59	+
124	F	3	Urina	34,03	+	30,57	35,76	+
125	F	5	Urina	27,22	+	29,90	27,75	+
126	F	3	Urina	34,14	+	30,02	35,86	+
		1	Urina	37,81	+	30,20	-	-

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
127	F	2	Soro	27,47	+	29,41	27,38	+
		6	Soro	37,28	+	32,06	37,99	+
		6	Urina	26,93	+	29,28	25,90	+
128	M	2	Soro	29,58	+	29,62	28,76	+
129	F	3	Soro	34,26	+	30,16	33,89	+
		3	Urina	37,72	+	31,16	-	-
130	M	3	Urina	35,43	+	30,31	35,13	+
131	F	0	Soro	-	-	30,37	-	-
		0	Urina	36,28	+	29,79	36,82	+
132	F	3	Soro	30,58	+	29,49	30,10	+
133	F	4	Soro	35,20	+	32,73	35,45	+
134	F	0	Urina	-	-	29,62	-	-
135	M	4	Soro	32,37	+	31,16	32,22	+
		4	Soro	34,19	+	31,47	34,39	+
		4	Urina	33,21	+	30,41	34,16	+
136	F	0	Soro	36,58	+	32,12	37,04	+
137	F	3	Urina	32,11	+	29,89	31,41	+
138	F	2	Soro	34,84	+	30,31	34,56	+
139	M	3	Urina	33,61	+	29,59	33,88	+
140	M	2	Soro	31,01	+	30,44	30,39	+
		2	Urina	33,44	+	30,17	33,48	+

ID de doente	Género	Dias após o início dos sintomas	Tipo de espécime	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti et al	
				C _t (FAM™)	Determinação	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Determinação
141	F	4	Urina	31,12	+	29,59	30,32	+
142	F	3	Soro	33,65	+	29,54	33,50	+
143	F	0	Soro	29,11	+	30,82	28,39	+
		0	Urina	35,88	+	29,89	37,81	+
144	F	0	Soro	31,06	+	29,53	30,12	+
145	F	4	Soro	33,29	+	32,66	33,17	+
146	F	4	Urina	26,17	+	29,81	26,00	+
147	M	1	Urina	-	-	30,58	-	-
148	M	5	Urina	31,22	+	29,70	30,27	+
149	F	2	Soro	30,07	+	30,23	29,81	+
150	F	0	Soro	35,36	+	30,58	35,23	+
151	F	2	Soro	28,97	+	30,06	28,29	+
152	F	5	Soro	37,16	+	30,29	-	-
		5	Urina	-	-	30,05	-	-
153	F	2	Soro	-	-	30,16	-	-

* Não é necessária a deteção do Controlo Interno (Internal Control) no canal de deteção VIC™ para resultados Positivos no canal de deteção FAM™. A carga viral elevada de Zika nas amostras causa uma ausência de sinais de Controlo Interno (Internal Control).

Análise de resultados relativamente a amostras emparelhadas de soro/urina

Os espécimes emparelhados de urina e soro foram recolhidos de 52 doentes no estudo e foram analisados. Um doente foi considerado infetado com o vírus Zika (ex.: estado de infeção positivo) se a amostra de soro e/ou urina testar positivo para o ARN específico do Vírus Zika com o ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al.. O estado de infeção do doente foi considerado negativo se tanto a amostra de soro como a de urina testarem negativo com o ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al..

Das 52 amostras emparelhadas analisadas 23 apresentaram um resultado positivo para o espécime de soro e/ou urina (ex.: estado de infeção do doente = positivo) com o ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al., ao passo que 29 amostras emparelhadas testaram negativo tanto no espécime de soro como de urina (ex.: estado de infeção do doente = negativo). Os 23 doentes com estado de infeção positivo testaram positivo também com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. na amostra de soro e/ou urina. Das 29 amostras emparelhadas de doentes com estado de infeção negativo 28 testaram negativo quanto a ARN específico do Vírus Zika no soro bem como no espécime de urina com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. Um doente com estado de infeção negativo foi testado como positivo na amostra de soro e negativo na amostra de urina com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0.

Concluindo, a concordância percentual positiva dos resultados gerados com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. com os resultados do ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. é de 100,0%. A concordância percentual negativa entre os dois ensaios é de 96,6%. Os resultados são resumidos na Tabela 16:

Tabela 16: Resumo de resultados para estado de infecção do doente (deteção de ARN do vírus Zika em soro e/ou urina de doentes com espécimes emparelhados colhidos de soro/urina). Número total de amostras emparelhadas foi 52.

Resultados do ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al.	Resultados do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0		
	Positivo		Negativo
23 Positivos	23 [†]		0
29 Negativos	1*		28
Total (52 amostras emparelhadas)	24		28
			95% IC
Concordância Percentual Positiva	23/23	100,0%	85,7% - 100,0%
Concordância Percentual Negativa	28/29	96,6%	82,8% - 99,4%

* Este doente acusou Positivo apenas na amostra de soro e negativo na amostra de urina com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

† Quatro destes doentes acusaram Positivo apenas na amostra de urina e negativo na amostra de soro em ambos os ensaios. Dois doentes acusaram Positivo na amostra de soro e negativo na amostra de urina com o ensaio descrito por Lanciotti et al., mas Positivo no soro e na amostra urina com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. Um doente acusou Positivo no soro e na amostra de urina com o ensaio descrito por Lanciotti et al., mas Positivo apenas na amostra de urina e negativo na amostra de soro com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Análise de resultados relativamente ao tipo de espécime soro

Das 103 amostras de soro incluídas no estudo comparativo 62 testaram positivo para ARN do vírus Zika com o ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. ao passo que 41 testaram negativo. Das 62 amostras de soro positivas 60 testaram também positivo com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0, ao passo que duas testaram negativo. Das 41 amostras de soro que testaram negativo quanto a vírus Zika com o ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. 39 testaram negativo e duas positivo com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. Concluindo no que respeita a soro a concordância percentual positiva dos resultados gerados com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. com os resultados do ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. é de 96,8%. A concordância percentual negativa entre os dois ensaios é de 95,1%. Os resultados são resumidos na Tabela 17:

Tabela 17: Resumo de resultados para a deteção de ARN do vírus Zika em amostras de soro, o total de amostras de soro era 103.

Resultados do ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al.	Resultados do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0		
	Positivo		Negativo
62 Positivos	60		2
41 Negativos	2		39
Total (103 amostras)	62		41
			95% IC
Concordância Percentual Positiva	60/62	96,8%	89,0% - 99,1%
Concordância Percentual Negativa	39/41	95,1%	83,9% - 98,7%

Análise de resultados relativamente ao tipo de espécime urina

Das 105 amostras de urina incluídas no estudo comparativo 49 testaram positivo para ARN do vírus Zika com o ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. ao passo que 56 testaram negativo. Das 49 amostras de urina positivas 46 testaram também positivo com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0, ao passo que três testaram negativo. Das 56 amostras de urina que testaram negativo quanto a vírus Zika com o ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. 50 testaram negativo e seis positivo com RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. Concluindo no que respeita a urina a concordância percentual positiva dos resultados gerados com o RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. com os resultados do ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al. é de 93,9%. A concordância percentual negativa entre os dois ensaios é de 89,3%. Os resultados são resumidos na Tabela 18:

Tabela 18: Resumo de resultados para a deteção de ARN do vírus Zika em amostras de urina. Número total de amostras de soro foi 105.

Resultados do ensaio RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti et al.	Resultados do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0		
	Positivo		Negativo
49 Positivos	46		3
56 Negativos	6		50
Total (105 amostras)	52		53
			95% IC
Concordância Percentual Positiva	46/49	93,9%	83,5% - 98,0%
Concordância Percentual Negativa	50/56	89,3%	78,5% - 95,0%

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores RT-PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do ZIKV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.
- Devido à homologia na sequência entre o ARN do vírus Usutu e da região alvo usada para deteção do ARN específico do vírus Zika, não é possível excluir a reatividade cruzada com o ARN do vírus Usutu. O vírus Usutu é um vírus aviário que raramente afeta os humanos. Não provoca doença grave ou fatal em doentes humanos e uma infeção normalmente permanece assintomática.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com

Telefone: +49-(0)40-5480676-0

15. Bibliografia

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.


O RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC relativa ao diagnóstico *in vitro*.

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

