

# Ensaio Trioplex RT-PCR em tempo real

Centros de Controle e Prevenção de Doenças

**Para uso somente com Autorização  
de Uso de Emergência**

Instruções de uso

# Índice

<i>Introdução</i> .....	3
<i>Amostras</i> .....	4
<i>Equipamento e consumíveis</i> .....	6
<i>Controle de qualidade</i> .....	8
<i>Extração de ácido nucleico</i> .....	10
<i>Algoritmo de teste</i> .....	16
<i>Ensaio RT-PCR em tempo real</i> .....	17
<i>Interpretação de resultados de testes</i> .....	24
<i>Limitações do ensaio</i> .....	29
<i>Características de desempenho</i> .....	30
<i>Observações sobre o procedimento</i> .....	48
<i>Referências</i> .....	48

### FINALIDADE

Este documento descreve a utilização de ensaios RT-PCR em tempo real (TaqMan®) para detecção e diferenciação de RNA dos vírus da dengue, chikungunya e zika em soro, sangue total (EDTA), líquido cefalorraquidiano (LCR) e para detecção de RNA do zika vírus na urina e no líquido amniótico. Este protocolo foi concebido a fim de facilitar o teste simultâneo para verificar a presença dos vírus da dengue, chikungunya e zika usando uma única amostra.

**OBSERVAÇÃO:** Neste ensaio (Trioplex RT-PCR em tempo real) os testes para os vírus da dengue, chikungunya e zika são executados no mesmo poço da placa rRT-PCR (multiplex).

### USO PRETENDIDO

O ensaio Trioplex RT-PCR em tempo real (Trioplex rRT-PCR) destina-se à detecção e diferenciação qualitativa de RNA do zika vírus, vírus da dengue e vírus chikungunya no soro, sangue total (EDTA) ou no líquido cefalorraquidiano de humanos (cada um deles coletado juntamente com uma amostra de soro do paciente), e para detecção qualitativa do RNA do zika vírus na urina e no líquido amniótico (cada um deles coletado juntamente com uma amostra de soro do paciente). O ensaio é destinado para uso com amostras coletadas de indivíduos que atendem a critérios clínicos do CDC para o vírus Zika (por exemplo, sinais clínicos e sintomas associados à infecção pelo vírus Zika) e/ou critérios epidemiológicos do CDC para o vírus Zika (por exemplo, histórico de residência ou viagem para uma região geográfica com transmissão ativa do Zika no momento da viagem ou outros critérios epidemiológicos para os quais o teste do vírus Zika possa ser indicado como parte de uma investigação de saúde pública). O teste é limitado a laboratórios qualificados designados pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC).

Os resultados do ensaio são destinados à identificação de RNA dos vírus Zika, dengue e chikungunya. O RNA do zika vírus é geralmente detectável no soro, sangue total e urina durante a fase aguda da infecção e até 14 dias após o início dos sintomas, se houver. Os resultados positivos são indicativos de infecção atual. Os laboratórios devem comunicar todos os resultados às autoridades de saúde pública competentes. Dentro dos Estados Unidos e de seus territórios, os resultados devem ser informados ao CDC.

Resultados negativos no ensaio Trioplex rRT-PCR não descartam infecções pelos vírus da dengue, chikungunya e/ou zika e não devem ser usados como embasamento único para decisões de gestão de pacientes. Os resultados negativos devem ser combinados com observações clínicas, histórico do paciente e informações epidemiológicas.

O Trioplex rRT-PCR é destinado ao uso por equipes de laboratório treinadas, proficientes na realização de ensaios RT-PCR em tempo real. O ensaio é para uso somente sob Autorização de Uso de Emergência da Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA).

## LIMITAÇÕES DE USO DO PROTOCOLO

O ensaio Triplex RT-PCR em tempo real descrito neste documento não foi exaustivamente testado com amostras clínicas. Não são permitidas modificações nesses ensaios (ou seja, o uso de instrumentos de PCR ou produtos químicos diferentes dos descritos). Esses ensaios não devem ser distribuídos sem o consentimento explícito do CDC.

## PRINCÍPIO DO ENSAIO

O Ensaio Triplex RT-PCR em tempo real inclui iniciadores e sondas de hidrólise duplamente marcadas (Taqman®) para uso na detecção qualitativa *in vitro* de RNA do zika vírus isolado de amostras clínicas, incluindo soro (de tubos de separação de soro), sangue total (EDTA), LCR, urina e líquido amniótico. Uma etapa de transcrição reversa produz DNAc a partir do RNA presente na amostra. A sonda liga-se ao DNA alvo entre os dois iniciadores de PCR não marcados. Para a sonda específica para o vírus da dengue, o sinal do corante fluorescente (FAM) na extremidade 5' é inibido pelo BHQ-1 na extremidade 3'. Para a sonda específica para o vírus chikungunya, o sinal do corante fluorescente (HEX) na extremidade 5' é inibido pelo BHQ-1 na extremidade 3'. Para a sonda específica para o vírus zika, o sinal do corante fluorescente (Vermelho do Texas [TxRd]) na extremidade 5' é inibido pelo BHQ-2 na extremidade 3'. Durante a PCR, a Taq polimerase estende os iniciadores não marcados utilizando a cadeia molde como guia e, quando atinge a sonda, cliva a sonda que separa o corante do inibidor, permitindo a fluorescência. O instrumento de PCR em tempo real detecta essa fluorescência do corante não inibido. A cada ciclo de PCR, mais sondas são clivadas, resultando num aumento da fluorescência proporcional à quantidade de ácido nucleico alvo presente.

## Amostras

### AMOSTRAS ACEITÁVEIS

Para testes de zika, chikungunya e dengue:

- Soro (coletado em um tubo separador de soro)  
O tubo deve ser centrifugado antes do envio para evitar a hemólise
- Sangue total (EDTA)
- Líquido cefalorraquidiano

Apenas para teste de zika:

- Urina
- Líquido amniótico

**OBSERVAÇÃO:** O soro é a amostra de diagnóstico preferencial. Sangue total (EDTA), LCR, urina e líquido amniótico só podem ser testados em conjunto com uma amostra de soro do paciente.

## MANUSEIO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

- Ao transportar amostras humanas, certifique-se de que todos os regulamentos aplicáveis para o transporte de amostras biológicas potencialmente infecciosas sejam cumpridos.
- Se possível, transporte/envie amostras de soro, urina, LCR e líquido amniótico de humanos em gelo seco. Porém, o uso de bolsas refrigeradas é aceitável.
- Armazene as amostras de soro, urina, LCR e líquido amniótico a  $\leq -20$  °C assim que as receber. Descongele a amostra e conserve-a em gelo durante o processamento da amostra. Armazene o restante da amostra a  $\leq -70$  °C para armazenamento de longo prazo.
- Transporte/envie amostras de sangue total (EDTA) de humanos com bolsas de gelo.
- Armazene amostras de sangue total (EDTA) de humanos entre 2 e 8 °C assim que as receber. Recomenda-se que o teste seja feito em até uma semana após a coleta.

## SEGURANÇA/PRECAUÇÕES

Orientações de biossegurança em laboratório para trabalho com amostras do zika vírus estão disponíveis em <http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-safety.html>. Recomendamos aos laboratórios realizar uma avaliação de riscos ao conduzir novos testes, e precauções de segurança devem ser baseadas na avaliação de riscos do laboratório. Os vírus da dengue e zika são considerados patógenos que podem ser trabalhados de forma segura em laboratório com nível de biossegurança 2 (BSL-2). No entanto, de acordo com as orientações de Biossegurança em Laboratórios de Microbiologia e Biomedicina (BMBL), as amostras com suspeita de vírus chikungunya devem ser manipuladas em condições de BSL-3:

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>.

Este procedimento deve ser realizado tendo em consideração a natureza potencialmente infecciosa das amostras envolvidas. O protocolo tem o objetivo de detectar genomas virais. Por conseguinte, presume-se que as amostras contenham vírus. Os laboratoristas devem reconhecer que o vírus chikungunya produz altos níveis de viremia, e amostras de casos com suspeita de vírus chikungunya devem ser tratadas como potencialmente infectantes. Consulte as orientações do CDC para laboratórios de saúde pública estaduais e locais: <http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-safety.html>. Consulte BMBL para obter mais informações de biossegurança sobre estes vírus e para conhecer práticas de biossegurança em laboratório.

Vestimenta descartável adequada, luvas, proteção para os olhos e uma cabine de segurança biológica são recomendadas para manipulação de amostras clínicas. O ensaio rRT-PCR deverá ser realizado em uma sala separada considerada livre do vírus da dengue (DENV), do vírus chikungunya (CHIKV), e do vírus Zika (ZIKV), ou de quaisquer moldes de RNA ou DNA de vírus. De igual modo, o procedimento de extração do RNA deve ser realizado em uma sala diferente daquela em que o RNA é amplificado por rRT-PCR. Durante as etapas de amplificação de ácidos nucleicos, seções dos genomas virais são amplificadas. Consequentemente, todas as amostras de soro originais e as amostras de ensaio devem ser mantidas separadamente da sala de PCR, a fim de evitar a contaminação de amostras.

**AVISO LEGAL:** Os nomes de fornecedores ou fabricantes são fornecidos como exemplos de fontes adequadas de produtos. O uso de nomes comerciais serve apenas para fins de identificação e não constitui endosso pelo CDC ou pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos.

### MATERIAIS FORNECIDOS PELO CDC

- Conjunto de iniciador e sonda para o Ensaio Triplex RT-PCR em tempo real do CDC (CDC; nº de catálogo KT0166). Consulte as instruções do produto para obter informações sobre armazenamento e validade. O conjunto inclui 4 frascos com iniciador e sondas para cada agente combinados em um frasco.
  - 1 frasco, DENV-F, DENV-R1, DENV-R2 e P
  - 1 frasco, CHIKV-F, R e P
  - 1 frasco, ZIKV-F, R e P
  - 1 frasco, RP-F, R e P (este é um conjunto de iniciador/sonda para RNase P humana, usado para verificar uma extração bem-sucedida)
- Conjunto de controle positivo para Ensaio Triplex rRT-PCR em tempo real (CDC; nº de catálogo KT0167).
  - Controle positivo (PC) para DENV: Vírus da dengue inativado
  - Controle positivo (PC) para CHIKV: Vírus chikungunya inativado
  - Controle positivo (PC) para ZIKV: Vírus zika inativado
  - Controle de Amostra Humana (HSC): controle de extração e controle positivo para RP

### MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Kits de extração de RNA (qualquer um dos seguintes pode ser usado - consulte a seção Extração de ácido nucleico para obter os detalhes sobre os kits apropriados que devem ser usados para cada tipo de instrumento e amostra):
  - MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (192 reações) (Roche, nº de catálogo 03038505001)
  - MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche, nº de catálogo 06543588001)
  - MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit (Roche, nº de catálogo 06374891001)
  - MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, nº de catálogo 03730964001)
  - MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume (Roche, nº de catálogo 03730972001)
  - Extração automática dos componentes bioMérieux NucliSENS easyMAG:  
**Observação:** O CDC foi informado sobre o recall de um produto relacionado a determinados lotes de reagentes de extração easyMAG. Embora o CDC não tenha observado mudanças de desempenho associadas ao uso desses reagentes, o CDC não avaliou amplamente o impacto dessas questões relacionadas ao produto sobre o desempenho do easyMAG para a extração de RNA de zika para testes posteriores de Triplex rRT-PCR. Os laboratórios devem consultar os Avisos de correção sobre a segurança de produtos da bioMérieux para obter a relação de lotes afetados e os avisos para os usuários finais. Cada lote de reagentes afetados deve ser avaliado pelo menos uma vez por semana antes de ser usado na extração de amostras de diagnóstico. Os laboratórios também devem monitorar de perto qualquer tendência nos valores de Ct dos Controles positivos externos e dos controles de HSC durante os testes.

- easyMAG Magnetic Silica (bioMérieux, nº de catálogo 280133)
  - easyMAG Disposables (bioMérieux, nº de catálogo 280135)
  - easyMAG Buffer 1 (bioMérieux, nº de catálogo 280130)
  - easyMAG Buffer 2 (bioMérieux, nº de catálogo 280131)
  - easyMAG Buffer 3 (bioMérieux, nº de catálogo 280132)
  - easyMAG Lysis Buffer (bioMérieux, nº de catálogo 280134)
- Qiagen QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, nº de catálogo 52904 ou 52906)
- Qiagen QIAamp® DSP Viral RNA Mini kit (Qiagen, nº de catálogo 61904)
- Kits de master mix para rRT-PCR (qualquer um pode ser usado):
  - SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (ThermoFisher Scientific, nº de catálogo 11732088 e/ou 11732020)
  - qScript™ One-Step qRT-PCR kit, Low Rox™ (Quanta, nº de catálogo 95059-050 e/ou 95059-200)
- Água de grau molecular, livre de nuclease

## EQUIPAMENTO

- Instrumento de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx (ThermoFisher Scientific; nº de catálogo 446985 ou 4406984);
- Misturador Vortex
- Microcentrífuga
- Bloco frio de 96 poços (ou gelo)
- Micropipetas (2 ou 10 µl, 20 µl, 200 µl e 1000 µl)
- Micropipetas multicanal (5 a 50 µl)
- Instrumentos automatizados de extração de RNA (opcional):
  - Instrumento MagNA Pure LC 2.0 (Roche; nº de catálogo 05197686001)
  - Instrumento MagNA Pure 96 (Roche; nº de catálogo 5195322001)
  - Instrumento MagNA Pure Compact (Roche; nº de catálogo 03731146001)
  - bioMérieux NucliSENS easyMAG (bioMérieux; nº de catálogo 280140)

## CONSUMÍVEIS

- Descontaminantes de superfície aceitáveis
  - DNA Away (Fisher Scientific, nº de catálogo 21-236-28)
  - RNase Away (Fisher Scientific; nº de catálogo 21-236-21). Este produto elimina RNase e DNA.
  - Água sanitária 10% (diluição de 1:10 de água sanitária comercial de hipoclorito de 5,25 a 6,0%)
  - DNAZap™ (ThermoFisher Scientific; nº de catálogo AM9890) ou equivalente.
- Luvas descartáveis sem talco e batas descartáveis
- Caneta marcadora de laboratório
- Ponteiras de pipeta estéreis com barreira de aerossol para P2/P10, P40, P200 e P1000
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 ml
- Racks para tubos para microcentrífuga de 1,5 ml
- Placas de reação de 0,1 ml para PCR (ThermoFisher Scientific; nº de catálogo 4346906 ou 4366932) e tampas ópticas (Applied Biosystems; nº de catálogo 4323032)
- Kit de filme adesivo óptico MicroAmp® (ThermoFisher Scientific; nº de catálogo 4311971 ou 4360954)

## Controle de qualidade

RT-PCR em tempo real é um método sensível e deve ser executado de acordo com rigorosos procedimentos de controle de qualidade e garantia de qualidade. Estas orientações ajudam a minimizar a possibilidade de resultados falso-positivos e falso-negativos.

### CONSIDERAÇÕES GERAIS

- A equipe deve estar familiarizada com o protocolo e com os instrumentos utilizados.
- Mantenha áreas separadas, equipamentos (por exemplo, pipetas, microcentrífugas) e materiais (por exemplo, tubos de microcentrífuga, ponteiras de pipeta, aventais e luvas) dedicados para
  - preparo do reagente de ensaio
  - manipulação dos ácidos nucleicos extraídos
  - amplificação por RT-PCR em tempo real.
- O fluxo de trabalho deve sempre prosseguir de modo unidirecional da área de extração de RNA/preparação do reagente (área limpa) para a sala da amplificação por PCR ("área suja"), a fim de evitar a contaminação de amostras clínicas com os ácidos nucleicos amplificados.
- Use aventais descartáveis limpos e nunca usados e luvas sem talco novas durante o preparo do reagente de ensaio e o manuseio dos ácidos nucleicos extraídos. Troque de luvas sempre que suspeitar de contaminação.
- Armazene iniciadores/sondas e o master mix de enzimas a temperaturas adequadas (ver instruções na embalagem). Não use reagentes após suas datas de validade.
- Mantenha os tubos de reagente e as reações com a tampa fechada, sempre que possível.
- Use DNAZap™ (ou equivalente) ou solução de água sanitária 10% recém-preparada para limpar as superfícies.
- Não traga ácido nucleico extraído ou material amplificado por PCR para a área de preparo do ensaio.
- Use somente ponteiras de pipeta com barreira de aerossol (filtro).

## **CONTROLES DE ENSAIO**

Os controles de ensaio devem ser executados simultaneamente com todas as amostras de teste.

### **Controle de extração**

Controle de amostra humana (HSC) --- material não infeccioso de células humanas em cultura utilizado como controle de extração e controle positivo para o conjunto de iniciador e sonda de RNase P (RP) que é **extraído simultaneamente** com as amostras de teste e incluído como amostra durante o preparo do rRT-PCR. O HSC deve gerar resultados negativos com conjuntos de iniciador e sonda para DENV, CHIKV e ZIKV, mas resultados positivos para RP. O HSC é um componente do conjunto de controle positivo para ensaio Trioplex rRT-PCR (CDC; nº de catálogo KT0167).

### **Controles positivos conjuntos de iniciador e sonda específicos de agente**

- DENV PC: Vírus da dengue inativado
- CHIKV PC: Vírus chikungunya inativado
- ZIKV PC: Vírus zika inativado

Esses componentes do conjunto de controle positivo para ensaio Trioplex rRT-PCR (CDC; nº de catálogo KT0167) devem ser extraídos usando um dos métodos de extração de RNA aceitáveis aqui descritos.

O ácido nucleico positivo extraído deve ser dividido em alíquotas e armazenado a  $\leq -20$  °C até a sua utilização. Evite ciclos de congelamento e descongelamento repetidos.

Observação: Durante a extração de material de controle positivo, devem ser tomadas precauções para evitar a contaminação cruzada. Tenha cuidado ao abrir frascos que contenham vírus inativado. Troque ou descontamine as luvas antes de abrir cada novo frasco. Precauções semelhantes devem ser observadas ao manusear material de controle positivo extraído.

### **Conjunto de iniciador e sonda para RNase P (RP)**

Todas as amostras clínicas e a HSC devem ser testadas para o gene de RNase P humano (utilizando o conjunto de iniciador e sonda RP incluído no kit Trioplex rRT-PCR) para controlar a qualidade das amostras e como indicador de que o ácido nucleico resultou do processo de extração. O conjunto de iniciador e sonda para RNase P é um componente do conjunto de iniciador e sonda para ensaio Trioplex RT-PCR em tempo real (CDC; nº de catálogo KT0166).

### **Controle sem molde (NTC)**

As reações NTC incluem água de grau PCR no lugar do RNA da amostra e devem ser incluídas em cada mistura de reação (uma para a reação de ZIKV, CHIKV e DENV e outra para a reação de RP) em cada série. O NTC é um controle de contaminação ou funcionamento impróprio dos reagentes do ensaio que resultam em falso-positivos.

**Tabela 1: Visão geral dos controles positivos e negativos**

Tipo de controle	Nome do controle	Usado para monitorar	DENV	CHIKV	ZIKV	RP	Valores de Ct esperados
Positivo	DENV PC	Falha substancial dos reagentes, incluindo integridade do iniciador e da sonda.	+	-	-	N/D	< 38 Ct
	CHIKV PC		-	+	-	N/A	
	ZIKV PC		-	-	+	N/A	
Negativo	NTC	1) Contaminação do reagente e/ou do ambiente durante o preparo do PCR; e 2) função do conjunto de iniciador e sonda.	-	-	-	-	Nenhum detectado
Extração	HSC	1) Contaminação do reagente e/ou do ambiente durante a extração; e 2) sucesso da extração.	-	-	-	+	Nenhum detectado para DENV, CHIKV e ZIKV.
							RP Ct < 38

## Extração de ácido nucleico

### Observações sobre a extração

- As extrações de amostras devem produzir RNA ou ácido nucleico total em volume suficiente para todos os ensaios RT-PCR em tempo real.
- Soro, urina, LCR e líquido amniótico - opções de extração em grande volume (volume de entrada 1 mL) são prioritárias para estas amostras, uma vez que produzem mais ácido nucleico do que os equivalentes em volume padrão. Extrações em volume pequeno devem ser usadas somente para estes tipos de amostra se houver um volume de amostra insuficiente para realizar uma extração em grande volume ou se não houver uma opção em grande volume disponível.
- **Observação:** Nenhuma opção de extração em grande volume foi incluída para extrações manuais ou instrumento MagNA Pure LC 2.0, uma vez que os dados demonstraram que uma sensibilidade superior com um volume grande ainda não está disponível. Somente amostras aceitáveis extraídas usando um dos métodos de extração recomendados podem ser testadas com este ensaio (consulte a tabela **Resumo de opções do kit de extração** abaixo).
- O HSC deve ser incluído em cada extração executada como um controle de extração de amostra. Para os métodos de extração em grande volume (volume de entrada 1 ml), 800 µL de água de grau PCR devem ser adicionados a 200 µL de HSC ressuspensão para criar a amostra de 1 ml de HSC para entrada de extração.
- Guarde os extratos de RNA das amostras em bloco frio ou gelo até o momento do teste. Se o teste for adiado por mais de 24 horas, congele o RNA a  $\leq -20$  °C imediatamente após a extração.

## Resumo de opções do kit de extração

Instrumento de extração	Kits autorizados para cada tipo de amostra			
	Grande volume de soro, urina, LCR e líquido amniótico (preferencial)	Pequeno volume de soro e urina	Pequeno volume de sangue total	Pequeno volume de LCR e líquido amniótico
Manual (sem instrumento)	Nenhum	QIAamp Viral RNA Mini Kit ou QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit	Nenhum	QIAamp Viral RNA Mini Kit ou QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit
MagNA Pure 96	MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Large Volume Kit	MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit	MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit	MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit
MagNA Pure LC 2.0	Nenhum	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit
MagNA Pure Compact	MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I
easyMAG*	Os reagentes easyMAG são fornecidos individualmente – consulte o manual de instrumentos e a seção Equipamentos e Consumíveis para obter a relação dos reagentes exigidos para a extração.	Os reagentes easyMAG são fornecidos individualmente – consulte o manual de instrumentos e a seção Equipamentos e Consumíveis para obter a relação dos reagentes exigidos para a extração.	Nenhum	Os reagentes easyMAG são fornecidos individualmente – consulte o manual de instrumentos e a seção Equipamentos e Consumíveis para obter a relação dos reagentes exigidos para a extração.

\*Devido ao recall de produto para determinados lotes de reagentes de extração bioMérieux easyMAG, cada lote de reagentes afetados deve ser avaliado pelo menos uma vez por semana antes de ser usado na extração de amostras de diagnóstico. Os laboratórios também devem monitorar de perto qualquer tendência nos valores de Ct dos Controles positivos externos e dos controles de HSC durante os testes. Consulte a seção Equipamentos e consumíveis para obter informações adicionais.

### Extração manual

As amostras de soro, urina, LCR e líquido amniótico podem ser extraídas utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit ou o QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit. Siga as instruções do fabricante, utilizando os seguintes volumes:

Volume de entrada de amostra: 140 µL

Volume de eluição: 60 µL

### Extração automática

- Instrumento MagNA Pure LC 2.0
  - Protocolo de pequeno volume (soro, urina, LCR, líquido amniótico) para MagNA Pure LC 2.0

O RNA de amostras clínicas de soro, urina, LCR e líquido amniótico pode ser extraído utilizando o MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit-Small Volume. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 200 µL  
Programa: Volume de eluição variável de NA total  
Volume de eluição: 60 µL

OU com a opção de lise externo:

Volume de entrada de amostra: misturar 200 µL da amostra com 300 µL de tampão de lise para um volume total de 500 µL antes de inserir no instrumento.  
Programa: Lise externo de NA total  
Volume de eluição: 60 µL

○ Protocolo de pequeno volume (sangue total) para MagNA Pure LC 2.0

O RNA de amostras clínicas de sangue total (EDTA) pode ser extraído utilizando o MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit.

1. Adicione 300 µL de tampão de lise externo LC 2.0 a 200 µL da amostra de sangue total (EDTA). Agite cada tubo no vórtex e incube à temperatura ambiente por 15 minutos.
2. Depois da incubação, agite no vórtex novamente e centrifugue para trazer o lisado para a parte inferior do tubo. Carregue as amostras em um cartucho de amostra LC 2.0.
3. Carregue a(s) placa(s) de amostra no instrumento de extração LC 2.0 e carregue reagentes no kit de “pequeno volume”.
4. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 500 µL Programa: NA total  
Protocolo: Total\_NA\_external\_lysis - Volume de eluição: 100 µL

• Instrumento MagNA Pure 96

○ Protocolo de volume grande (soro, urina, LCR e líquido amniótico) para MagNA Pure 96

O RNA de amostras clínicas de soro ou urina pode ser extraído usando o MagNA Pure 96 DNA ou Viral NA Large Volume Kit. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 1000 µL  
Programa: DNA/Viral\_NA\_LV\_2.0.  
Protocolo: Viral\_NA\_Universal\_LV\_1000\_3.0.1 ou 3.1  
Volume de eluição: 100 µL

○ Protocolo de pequeno volume (soro, urina, LCR ou líquido amniótico) para MagNA Pure 96

No caso de volume insuficiente de amostras de soro ou urina, o RNA de amostras clínicas de soro, urina, LCR e líquido amniótico pode ser extraído usando o MagNA Pure 96 DNA ou Viral NA Small Volume Kit. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 200 µL  
Programa: DNA/Viral\_NA\_SV\_2.0.  
Protocolo: Viral\_NA\_Universal\_SV\_3.0 ou 3.1  
Volume de eluição: 100 µL

OU com a opção de lise externo:

Volume de entrada de amostra: misturar 200 µL da amostra com 250 µL de tampão de lise MP96 para um volume total de 450 µL antes de inserir no instrumento.  
Programa: DNA/Viral\_NA\_SV\_2.0.  
\*Protocolo: Viral\_NA\_Plasma\_ext\_lys\_SV\_3.0 ou 3.1  
Volume de eluição: 100 µL

\* “Viral\_NA\_Plasma\_ext\_lys\_SV\_3.0” é o título do protocolo do instrumento que não pode ser alterado; o termo “Plasma” usado no título do programa não indica que o plasma pode ser utilizado neste ensaio.

○ Protocolo de pequeno volume (sangue total) para MagNA Pure 96

O RNA de amostras clínicas de sangue total (EDTA) pode ser extraído usando MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit.

1. Adicione 250 µL de tampão de lise externo MP96 a 200 µL da amostra de sangue total (EDTA). Agite cada tubo no vórtex e incube à temperatura ambiente por 15 minutos.
2. Depois da incubação, agite no vórtex novamente e centrifugue para trazer o lisado para a parte inferior do tubo. Carregue as amostras em um cartucho de amostra MP96.
3. Carregue a(s) placa(s) de amostra no instrumento de extração MP96 e carregue reagentes no kit de “pequeno volume”.
4. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 450 µL Programa: DNA/Viral\_NA\_SV\_2.0 kit  
\*Protocolo: Viral\_NA\_Plasma\_ext\_lys\_SV\_3.0 ou 3.1 - Volume de eluição: 100 µL

\* “Viral\_NA\_Plasma\_ext\_lys\_SV\_3.0” é o título do protocolo do instrumento que não pode ser alterado; o termo “Plasma” usado no título do programa não indica que o plasma pode ser utilizado neste ensaio.

• Instrumento MagNA Pure Compact

○ Protocolo de volume grande (soro, urina, LCR e líquido amniótico) para MagNA Pure Compact

O RNA de amostras clínicas de soro ou urina pode ser extraído usando o Large Volume MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume Kit. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 1000 µL  
\*Protocolo: Total\_NA\_Plasma\_1000\_V3\_2  
Material da amostra: Outros  
Volume para controle interno: Nenhum  
Volume de eluição: 100 µL

\* “Total\_NA\_Plasma\_1000\_V3\_2” é o título do protocolo do instrumento que não pode ser

alterado; o termo “Plasma” usado no título do programa não indica que o plasma pode ser utilizado neste ensaio.

○ Protocolo de pequeno volume (soro, urina, LCR e líquido amniótico) para MagNA Pure Compact

O RNA de amostras clínicas de LCR e líquido amniótico pode ser extraído usando o Small Volume MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation Kit I. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 200 µL

\*Protocolo: Total\_NA\_Plasma\_100\_400\_V3\_2 - Volume de eluição: 100 µL

\* “Total\_NA\_Plasma\_100\_400\_V3\_2” é o título do protocolo do instrumento que não pode ser alterado; o termo “Plasma” usado no título do programa não indica que o plasma pode ser utilizado neste ensaio.

○ Protocolo de pequeno volume (sangue total) para MagNA Pure Compact

O RNA de amostras clínicas de sangue total (EDTA) pode ser extraído utilizando o MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I.

1. Adicione 200 µL da amostra de sangue total (EDTA) a 300 µL de tampão de ligação/lise externo LC. Agite no vórtex, centrifugue para trazer o lisado para a parte inferior do tubo e incube à temperatura ambiente por 15 minutos.
2. Depois da incubação, agite no vórtex novamente e centrifugue para trazer o lisado para a parte inferior do tubo.
3. Insira os tubos de amostra no instrumento MPC no rack de amostra.
4. Siga as instruções do fabricante para configurar os reagentes/materiais descartáveis dos instrumentos.
5. Ao configurar o instrumento para uma série de extração, selecione o protocolo para o volume de entrada de amostra correspondente:

Volume de entrada de amostra: 500 µL

\*Protocolo: Total\_NA\_Plasma\_external\_lysis\_V3\_2

Material da amostra: Outros

Volume para controle interno: Nenhum

Volume de eluição: 100 µL

\* “Total\_NA\_Plasma\_external\_lysis\_V3\_2” é o título do protocolo do instrumento que não pode ser alterado; o termo “Plasma” usado no título do programa não indica que o plasma pode ser utilizado neste ensaio.

• Instrumento bioMérieux NucliSENS easyMAG

**Observação:** O CDC foi informado sobre o recall de um produto relacionado a determinados lotes de reagentes de extração easyMAG. Consulte a seção Equipamentos e consumíveis para obter informações adicionais.

○ Protocolo de volume grande (soro, urina, LCR e líquido amniótico) para bioMérieux NucliSENS easyMAG

O RNA de amostras clínicas pode ser extraído utilizando os reagentes bioMérieux NucliSENS easyMAG (tampões 1-3, tampão de lise, sílica magnética e materiais descartáveis). Siga estas configurações para o protocolo de lise externo:

Menu de solicitação de extração:

Matriz: Outro

Protocolo: Generic 2.0.1

Volume (ml): 1,0

Eluato ( $\mu$ L): 100

Tipo: Lisado

Prioridade: Antígeno

Siga as instruções do fabricante para concluir o processo restante de configuração e extração.

- Instrumento bioMérieux NucliSENS easyMAG
  - Protocolo de pequeno volume (soro, urina, LCR e líquido amniótico) para bioMérieux NucliSENS easyMAG

O RNA de amostras clínicas pode ser extraído utilizando os reagentes bioMérieux NucliSENS easyMAG (tampões 1-3, tampão de lise, sílica magnética e materiais descartáveis). Siga estas configurações para o protocolo de lise externo:

Menu de solicitação de extração:

Matriz: Outro

Protocolo: Generic 2.0.1

Volume (ml): 0,2

Eluato ( $\mu$ L): 100

Tipo: Lisado

Prioridade: Antígeno

Siga as instruções do fabricante para concluir o processo restante de configuração e extração.

### **Armazenagem de amostras de ácido nucleico**

Guarde os extratos de RNA das amostras em bloco frio ou gelo até o momento do teste.

Se o teste for adiado por mais de 24 horas, congele o RNA imediatamente a  $\leq -20$  °C. Apenas descongelar o número de extratos de RNA que serão testados em um único dia. Não congele ou descongele extratos de RNA mais de uma vez antes do teste. Para armazenamento em longo prazo,  $> 7$  dias, congele os extratos de RNA a  $\leq -20$  °C. Extratos de RNA armazenados a  $\leq -20$  °C deverão permanecer viáveis por 6 meses.

## Algoritmo de teste

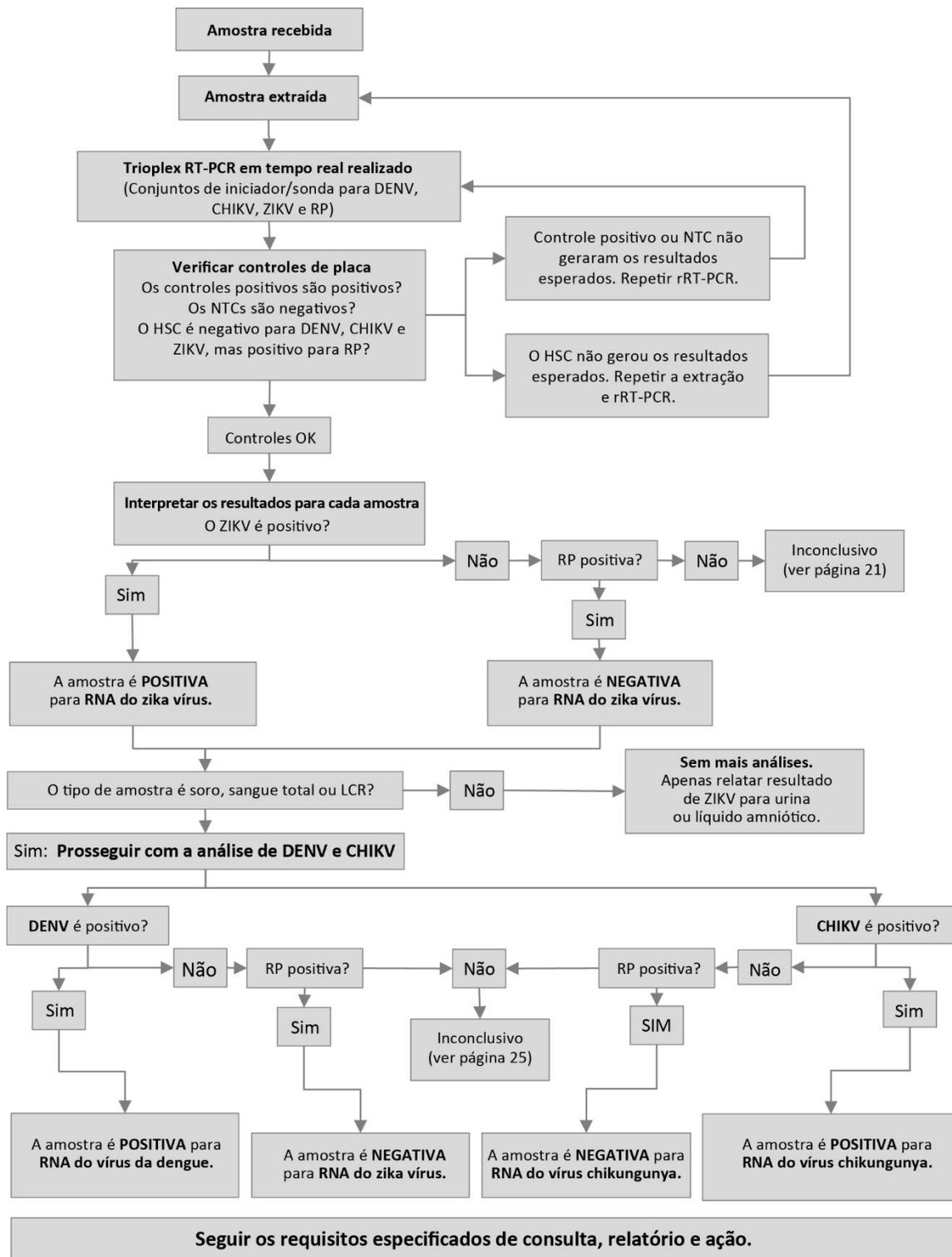


Figura 1: Resumo da interpretação dos resultados dos testes

### Preparação do reagente estoque

#### 1. Preparação de iniciadores/sondas em tempo real

- Antes de reidratação, armazene os kits entre 2 e 8 °C no escuro.
- Precauções: Estes reagentes só devem ser manipulados em uma área limpa e armazenados a temperaturas adequadas (ver abaixo) no escuro. Ciclos de congelamento-descongelamento devem ser evitados. Mantenha frio quando descongelado.
- Reidrate cuidadosamente os reagentes liofilizados em 250 µl de Tris 10 mM, pH 7,4 a 8,2 ou água de grau PCR (livre de nuclease) e deixe em reidratação durante 15 minutos a temperatura ambiente no escuro.
- Agite cada tubo no vórtex para obter uma mistura uniforme. Divida a mistura de iniciadores/sonda em alíquotas de volumes de 50 µL em 5 tubos pré-etiquetados.
- Armazene as alíquotas reidratadas de iniciadores e sondas a uma temperatura de -20 °C ou menos. Não armazene em freezers frost-free.
- Iniciadores e sondas reidratados podem ser mantidos congelados por até 24 meses.
- As alíquotas descongeladas de sondas e iniciadores podem ser armazenadas no escuro por até 4 meses entre 2 e 8 °C durante o uso frequente.
- Não volte a congelar alíquotas descongeladas.

**Tabela 2: Descrições de iniciadores e sondas**

Designador de sequência	Número da peça	Localização do gene
DENV-F	SO3684	5'-UTR
DENV-R1		
DENV-R2		
DENV-P		
CHIKV-F	SO3685	nSP1
CHIKV-R		
CHIKV-P		
ZIKV-F	SO3686	Gene do envelope
ZIKV-R		
ZIKV-P		
RP-F	SO3687	Ribonuclease P humana
RP-R		
RP-P		

## 2. Controles de ensaio

- Ácido nucleico extraído de vírus da dengue inativado
- Ácido nucleico extraído de vírus chikungunya inativado
- Ácido nucleico extraído de vírus zika inativado

## 3. Controle sem molde (NTC) (não fornecido)

- Água estéril, livre de nuclease
- Aliquota em pequenos volumes
- Usado para verificar se há contaminação durante a extração da amostra e/ou preparação da placa

## 4. Controle de extração HSC

- O controle de amostra humana deve ser extraído e processado com cada lote de amostras a ser testado, seguindo o mesmo procedimento utilizado com as amostras de pacientes.
- Não dilua o RNA extraído antes do teste

## 5. Master mix

**OBSERVAÇÃO:** É possível usar **SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System** ou **qScript™ One-Step qRT-PCR kit, Low Rox™**.

### a. SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR System

- Coloque o Master Mix 2X para PCR e a mistura de enzimas Superscript III RT/Platinum Taq em um rack refrigerado a uma temperatura entre 2 e 8 °C.
- Descongele completamente o frasco do Master Mix 2X para PCR.
- Misture o Master Mix 2X para PCR por inversão 10 vezes.

### b. qScript™ One-Step qRT-PCR kit, Low Rox™

- Descongele todos os componentes, exceto o qScript One-Step RT, à temperatura ambiente.
- Misture com vigor.
- Centrifugue para coletar o conteúdo para o fundo do tubo antes de usar.
- Coloque todos os componentes no gelo após o descongelamento.

## Preparação do equipamento

- Ligue o Instrumento de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx e deixe o bloco atingir a temperatura ideal.
- Prepare a placa e selecione o protocolo de ciclagem no instrumento (ver Tabela 5).

## Master Mix e preparação da placa

**OBSERVAÇÃO:** A configuração de preparação da placa pode variar de acordo com o número de amostras e com a organização do dia de trabalho. NTCs e controles de ensaio devem ser incluídos em cada série.

- Na capela de exaustão limpa da sala de preparação de reagentes, coloque o iniciador/sondas no gelo ou em bloco frio. Mantenha frio durante a preparação e o uso.
- Descongele a mistura de reação 2X (SuperScript III ou qScript) antes de usar.
- Misture o iniciador/sondas brevemente no agitador vórtex.
- Centrifugue brevemente os iniciadores/sondas e coloque novamente no gelo ou bloco frio.

- Determine o número de reações (N) a ser definido por ensaio. É necessário preparar um excedente da mistura de reação para as reações NTC e para casos de erro de pipetagem (ver Tabela 3).
- Use o seguinte guia para determinar N:
  - Se o número de amostras (n) incluindo os controles for igual a 1 a 14, então,  $N = n + 1$
  - Se o número de amostras (n) incluindo os controles for maior que 15, então,  $N = n + 2$

Prepare a mistura de reação de acordo com a seguinte tabela (**Tabela 3**). Mantenha a mistura de reação em gelo ou em bloco frio.

**Tabela 3: Mistura de reação para Trioplex rRT-PCR**

<b>Mistura de reação para TRIOPLEX</b>	
<b>Componente</b>	<b>Quantidade/Reação (µL)</b>
Água	N x 0,5 µL
Mistura de reação para	N x 12,5 µL
Mistura para DENV	N x 0,5 µL
Mistura para CHIKV	N x 0,5 µL
Mistura para ZIKV	N x 0,5 µL
Mistura de enzimas	N x 0,5 µL
<b>Subtotal</b>	<b>N x 15 µL</b>
Amostra de	10 µL
<b>TOTAL</b>	<b>25 µL</b>

**OBSERVAÇÃO:** Os mesmos volumes de mistura de reação podem ser usados para o kit SuperScript III ou para o qScript.

**Tabela 4: Mistura de reação para RP PCR**

<b>Mistura de reação para controle interno de RP</b>	
<b>Componente</b>	<b>Quantidade/Reação (µL)</b>
Água	1,5 µL
Mistura de reação para	12,5 µL
Mistura para RP	0,5 µL
Mistura de enzimas	0,5 µL
<b>Subtotal</b>	<b>15 µL</b>
Amostra de RNA	10 µL
<b>TOTAL</b>	<b>25 µL</b>

**OBSERVAÇÃO:** Os mesmos volumes de mistura de reação podem ser usados para o kit SuperScript ou qScript.

### **Preparação da placa de PCR**

- a. Na capela de exaustão limpa da sala de preparação de reagentes, mantendo a placa de PCR no gelo (ou bloco frio), adicione 15 µL de mistura de reação a todos os poços utilizados.
- b. Antes de mover a placa para a área de manipulação de ácido nucleico, adicione 10 µL de água livre de nuclease aos poços de NTC

- c. Coloque sem apertar tampas ópticas em tiras ou fita óptica sobre a parte superior dos poços de reação e mova a placa para a área de manipulação de ácido nucleico em bloco frio ou gelo.
- d. Retire as tampas ópticas em tiras ou a fita óptica e adicione 10 µL do RNA extraído da amostra para cada poço de amostra correspondente. **Troque as ponteiros depois da adição de cada amostra.**
- e. Adicione 10 µL de Controle positivo para DENV-1-4, controle positivo para CHIKV, controle positivo para ZIKV e HSC (controle positivo para RP) em poços separados, como indicado na Tabela 5.

Tabela 5: Exemplo de disposição de placa Trioplex rRT-PCR para 3 amostras

**Disposição do master mix**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Trioplex	Trioplex	Trioplex	Trioplex	Trioplex							
B	RP	RP	RP	RP	RP							
C												
D												
E												Trioplex
F												Trioplex
G												Trioplex
H												

**Disposição do molde**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	S3	HSC	H2O NTC							
B	S1	S2	S3	HSC	H2O NTC							
C												
D												
E												DENV PC
F												CHIKV PC
G												ZIKV PC
H												

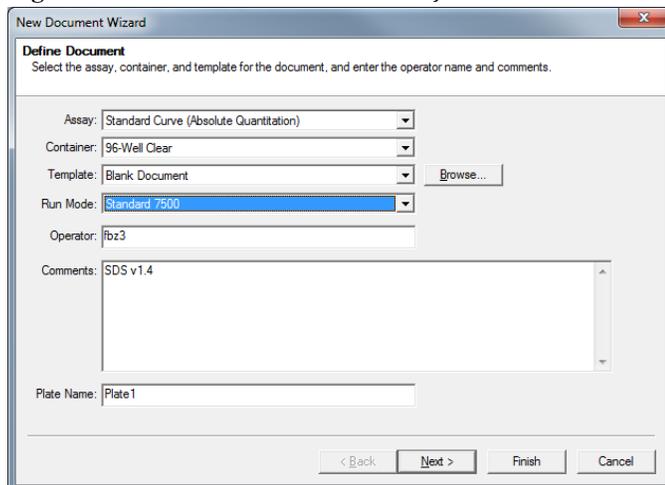
Controles positivos: E12-H12

- f. Vede a placa com fita óptica ou tampas ópticas e carregue a placa no Instrumento de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx.

## 2. Execução de PCR

- Inicie o software ABI 7500 e selecione **Create new document** (Criar novo documento).
- Selecione **Standard 7500** no menu Run Mode (Modo de execução) e clique em **Next** (Avançar) (**Figura 3**).

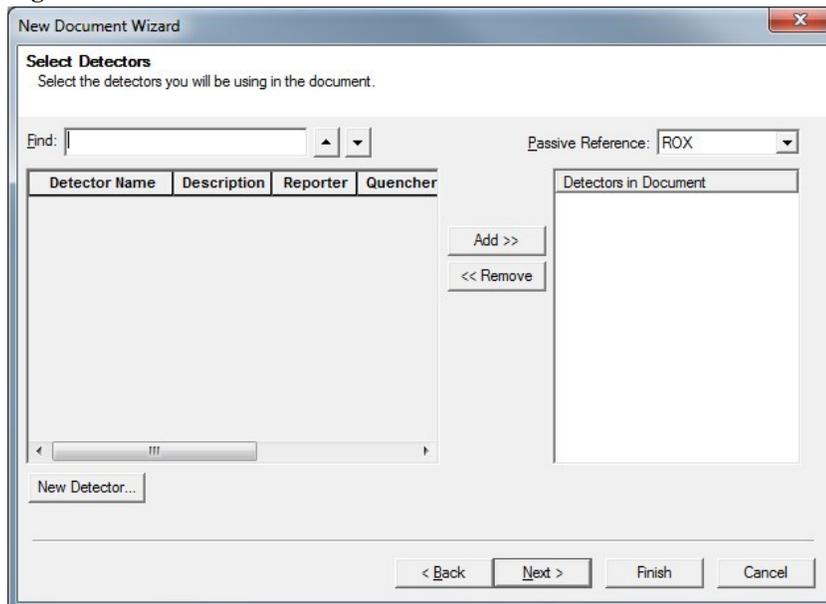
**Figura 3: Selecionar o modo de execução**



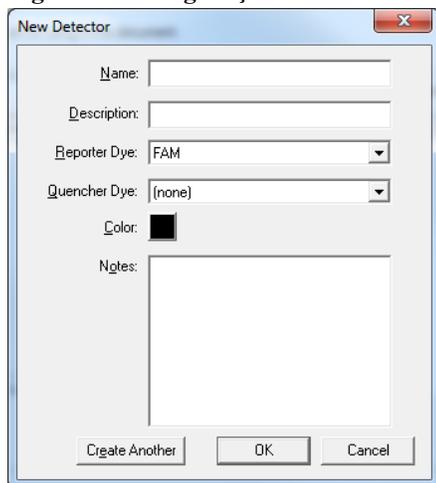
- Crie um novo detector para cada alvo, clicando em **New Detector** (Novo detector) (**Figura 4**), nomeie DENV, selecione corante indicador **FAM** e deixe Quencher Dye (Corante inibidor) como **none** (nenhum)

**Figura 5:**

**Figura 4: Selecionar detector**

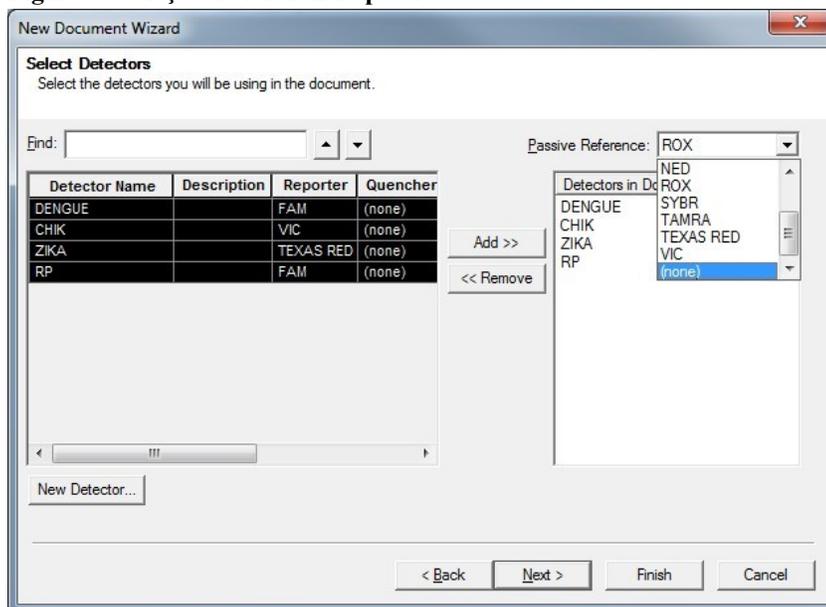


**Figura 5: Configurações de indicador e inibidor**



- d. Repita o procedimento para CHIKV, selecione o corante indicador **VIC** e deixe Quencher Dye como **none** (nenhum).
- e. Repita o procedimento para ZIKV, selecione o corante indicador **Texas Red** (Vermelho Texas) e deixe Quencher Dye como **none** (nenhum).
- f. Repita o procedimento para RP, selecione o corante indicador **FAM** e deixe Quencher Dye como **none** (nenhum).
- g. Na tela **Select Detectors** (Selecionar detectores), selecione **DENV** e clique em **Add** (Adicionar).
- h. Mude **Passive Reference** (Referência passiva) de **ROX** para **none** (nenhum) (Figura 6).

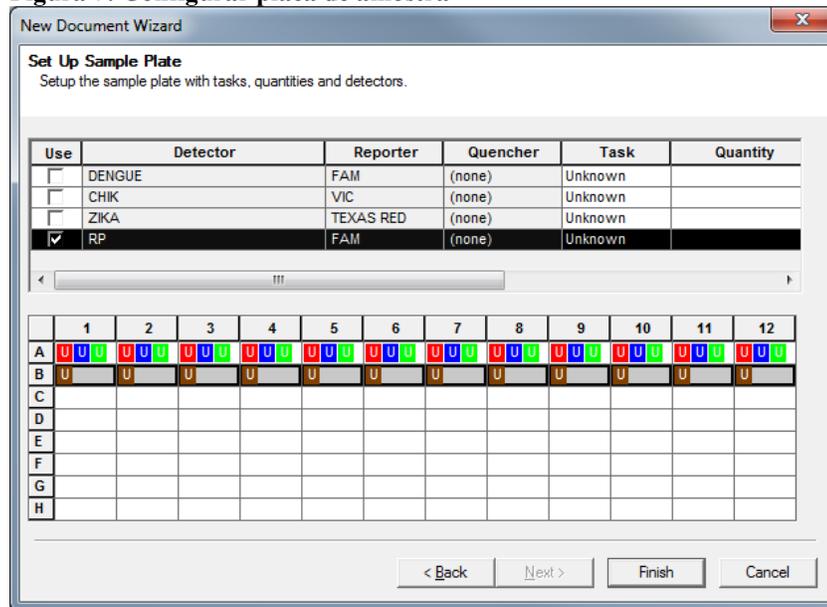
**Figura 6: Seleção de referência passiva**



- i. Na tela **Select Detectors** (Selecionar detectores), selecione **CHIKV** e clique em **Add** (Adicionar).
- j. Mude **Passive Reference** (Referência passiva) de **ROX** para **none**.
- k. Na tela **Select Detectors** (Selecionar detectores), selecione **ZIKV** e clique em **Add** (Adicionar).
- l. Mude **Passive Reference** (Referência passiva) de **ROX** para **none**.
- m. Na tela **Select Detectors** (Selecionar detectores), selecione **RP** e clique em **Add** (Adicionar).

- n. Mude **Passive Reference** (Referência passiva) de **ROX** para **none**.
- o. Na janela de configuração da placa de amostra, destaque os poços correspondentes e selecione os detectores de **DENV**, **CHIKV** e **ZIKV** (Figura 7).

**Figura 7: Configurar placa de amostra**

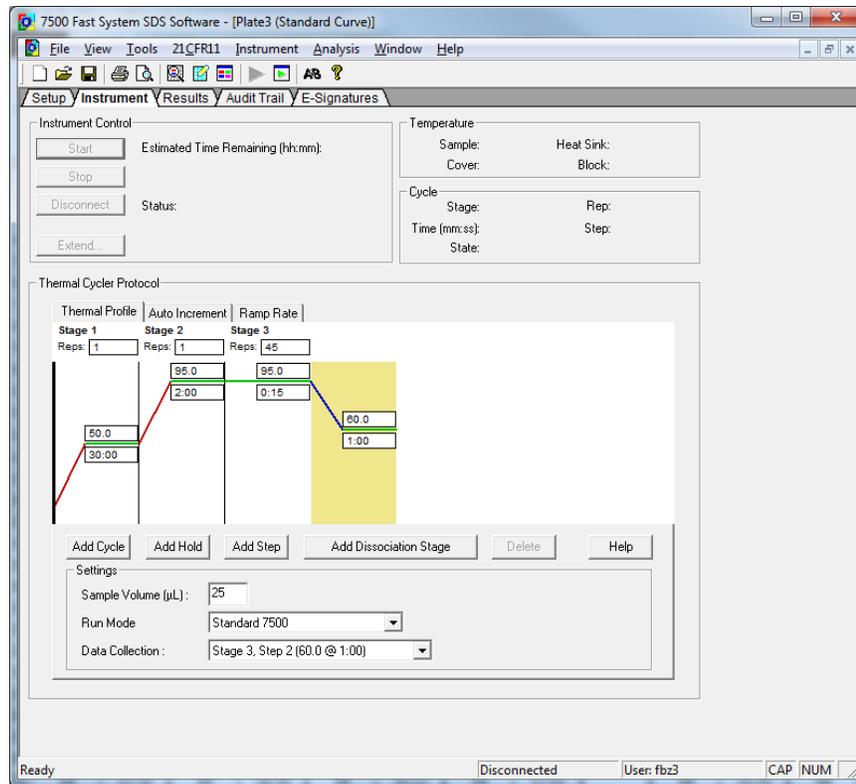


- p. Clique duas vezes em cada poço para inserir o nome da amostra.
- q. Selecione a guia Instrument (Instrumento) e defina as condições de termociclagem de acordo com o master mix usado:
  - (1) Estágio 1: **30 min.** a **50 °C**; **1 rep.**
  - (2) Estágio 2:
    - SuperScript III: **2 min.** a **95 °C**; **1 rep.**
    - qScript: **5 min.** a **95 °C**; **1 rep.**
  - (3) Estágio 3, etapa 1: **15 seg.** a **95 °C**
  - (4) Estágio 3, etapa 2: **1 min.** a **60 °C**
  - (5) Estágio 3: altere as repetições para **45 ciclos** (Figura 8)

SuperScript III			
Condições de termociclagem			
ESTÁGIO 1	ESTÁGIO 2	ESTÁGIO 3	ESTÁGIO 3
30 min	<b>2 min</b>	15 seg	1 min
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
1 rep.	1 rep.		
		45 ciclos	

qScript One-Step			
Condições de termociclagem			
ESTÁGIO 1	ESTÁGIO 2	ESTÁGIO 3	ESTÁGIO 3
30 min.	<b>5 min</b>	15 seg.	1 min.
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
1 rep.	1 rep.		
		45 ciclos	

**Figura 8: Definir as condições de termociclagem**



- (6) Em **Settings** (Configurações), altere o volume para **25 µL**
- (7) Em **Settings** (Configurações), **Run Mode** (Modo de execução), selecione **Standard 7500**
- (8) Estágio 3, etapa 2 deve estar destacado em amarelo, indicando a coleta de dados
  - r. Selecione **Save as** (Salvar como) e escolha um nome e uma pasta para o arquivo
  - s. Clique em **Start** (Iniciar). O instrumento inicializará e calculará o tempo de execução.

### **Análise de dados**

Após a conclusão da série, salve e analise os dados seguindo as instruções do fabricante do instrumento. As análises devem ser realizadas separadamente para cada alvo usando uma configuração de limiar manual. Limiares devem ser ajustados para ficar no início da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O procedimento escolhido para definir o limiar deve ser utilizado de forma consistente.

### **Interpretação de resultados de testes**

**Independentemente do tipo de amostra a ser testado, prepare a mistura de PCR como indicado em “PCR Plate Setup” (Preparação da placa de PCR).**

### **DETERMINAÇÃO DA VALIDADE DO TESTE**

Antes que os resultados possam ser determinados para cada amostra clínica, deve ser determinada a validade da placa testada. Para que um ensaio seja válido, os controles devem produzir os resultados esperados:

- Controles de ensaio (ácido nucleico extraído de DENV, CHIKV e ZIKV inativos) devem ser positivos e estar dentro do intervalo esperado de valores de Ct. Se os controles de ensaio forem negativos
  - Repita a placa.
  - Se a repetição do teste gerar um resultado negativo do controle positivo, entre em contato com o helpdesk da LRN para consulta.
- Os NTCs devem ser negativos. Se os NTCs forem positivos
  - Limpe possível contaminação de DNA das superfícies da bancada e das pipetas nas áreas de trabalho de preparação de reagentes e adição de molde.
  - Extraia e teste vários NTCs.
  - Descarte diluições de reagente de trabalho e prepare novamente a partir de estoques novos.
  - Repita as amostras apenas para alvos com amplificação inadequada.
- O HSC (controle de extração) deve ser
  - Positivo com conjunto de iniciador/sonda para RP devido ao DNA humano no HSC
  - Negativo com conjuntos de iniciador/sonda para vírus. Um resultado positivo com o HSC e iniciador/sondas para vírus indicam a ocorrência de contaminação cruzada. Se for obtido um resultado positivo, siga o procedimento de limpeza descrito acima.
- O ensaio de RP para cada amostra deve ser **positivo**.
  - Se o ensaio de RP para uma amostra for *negativo* e os ensaios Triplex rRT-PCR forem todos *negativos* para as amostras:
    - i. Registre o resultado como *Inconclusivo* por meio do LRN Results Messenger
    - ii. Siga as instruções abaixo:

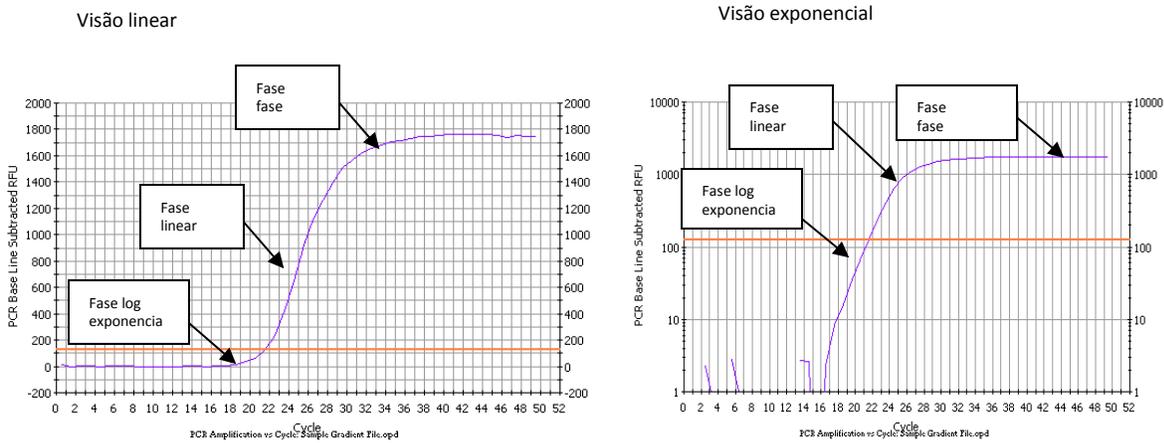
<b>Todos os tipos de amostras</b>
1. Repita o teste rRT-PCR da amostra usando ensaio de RP e Triplex.
2. Repita a extração da nova alíquota da amostra se o ensaio para RP for <i>negativo</i> para as amostras após a repetição do teste.
3. Depois de repetir a extração e repetir o teste rRT-PCR, se DENV, CHIKV e/ou ZIKV forem <i>positivos</i> , considere o resultado um verdadeiro <i>positivo</i> e continue seguindo o algoritmo de teste.
4. Se você não conseguir resolver os resultados de uma amostra de soro, teste outros tubos de amostra de soro do paciente, se disponíveis, ou solicite a coleta de mais soro.

- a. Se o ensaio para RP de uma amostra for *negativo*, mas DENV, CHIKV e/ou ZIKV forem *positivos* para as amostras:
  - Não repita o teste rRT-PCR e considere os resultados do Triplex rRT-PCR válidos.

Se todos os controles tiverem sido realizados de forma adequada, prossiga para a análise de cada alvo.

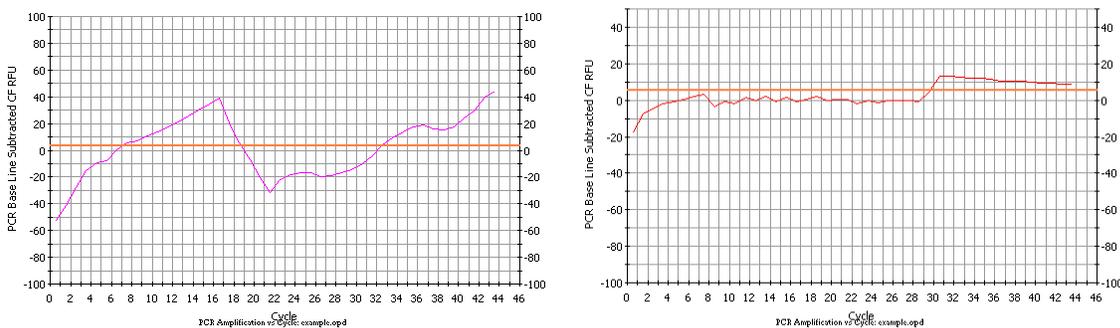
**OBSERVAÇÃO:** A próxima seção contém dados que são fornecidos como exemplos genéricos. Eles não são específicos para este ensaio.

- Verdadeiros positivos devem produzir curvas exponenciais com fases logarítmicas, lineares e estacionárias (**Figura 9**).  
(Observação: Positivos fracos produzirão valores elevados de  $C_T$  que às vezes não possuem uma fase estacionária. No entanto, o traçado exponencial será observado.)



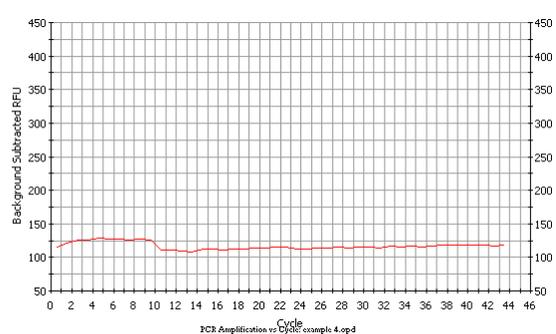
**Figura 9: Visões linear e log exponencial de curvas de PCR indicando cada estágio das linhas de amplificação.**

- Para uma amostra ser um verdadeiro positivo, a curva deve cruzar o limiar de modo semelhante ao que mostra a **Figura 9**. Ela NÃO deve ultrapassar o limiar e depois voltar a ficar abaixo do limiar.
- A **Figura 10** mostra exemplos de falso-positivos que não têm amplificação exponencial.

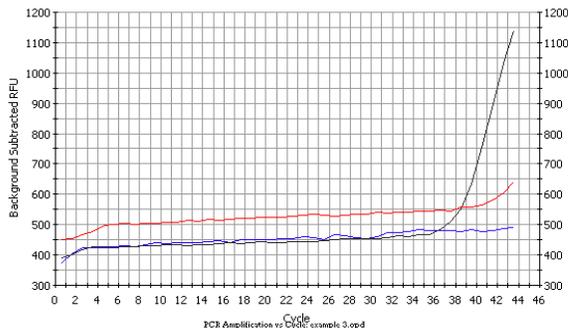
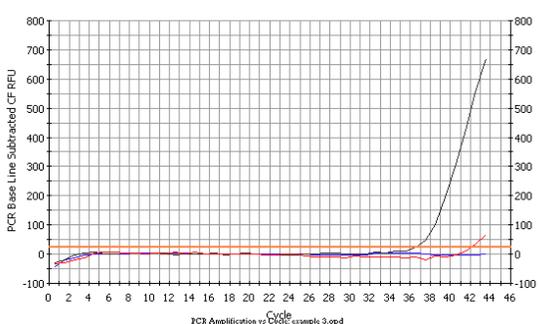


**Figura 10: Exemplos de curvas de falso-positivo.**

- Para melhor compreender e avaliar curvas desafiadoras de forma mais eficaz, use a visualização de fluorescência de fundo (Rn versus Ciclo com software AB) para determinar se a curva é realmente positiva. Nesta visualização, um forte aumento na fluorescência indica um verdadeiro positivo, enquanto uma linha reta (ou uma linha errante) indica que não há amplificação.
  - A **Figura 11** mostra uma curva com valor de  $C_T$  de 29,2 embora fique evidente que a amostra é negativa quando observamos a visualização de fluorescência de fundo.
  - A **Figura 12** mostra uma linha de amplificação com 3 curvas: um positivo moderadamente fraco com  $C_T$  de 36,6 (preta), um positivo muito fraco com  $C_T$  de 42,1 (vermelha) e um controle negativo (azul). O positivo fraco ( $C_T= 42,1$ ) é confirmado como positivo pelo forte aumento na fluorescência observado na visualização de fluorescência de fundo.



**Figura 11: Linha de amplificação de uma amostra com uma curva "errante" (à esquerda) e a visão de fluorescência de fundo correspondente (à direita).**



**Figura 12: Linha de amplificação de três amostras em uma visão linear (à esquerda) e a visão de fluorescência de fundo correspondente (à direita).**

- Uma observação sobre amostras com positivos fracos: Fracos positivos devem sempre ser interpretados com cautela. Observe atentamente as curvas de fluorescência associadas a esses resultados. Se as curvas forem verdadeiras curvas exponenciais, a reação deverá ser interpretada como positiva.
  - Se for necessário repetir o teste de uma amostra fraca, é importante repetir a amostra em réplicas, pois uma série única de repetição de teste tem alta probabilidade de gerar um resultado discrepante.
  - Em caso de repetição da extração e do teste da amostra, pode ser útil eluir em um volume inferior para concentrar a amostra.
  - O helpdesk da LRN está disponível para fornecer orientações a fim de determinar se a repetição do teste se justifica e para discutir estratégias de testes adicionais, conforme apropriado.

## INTERPRETAÇÃO DE AMOSTRAS E INSTRUÇÕES DE RELATÓRIO

Todos os controles de teste devem ser analisados antes da interpretação dos resultados do paciente. Se os controles não forem válidos, os resultados do paciente não poderão ser interpretados.

O resultado gerado por um conjunto de iniciador e sonda é interpretado como positivo se a reação gera uma curva de crescimento de fluorescência que cruza o limiar em (<) 38 ciclos.

O resultado gerado por um conjunto de iniciador e sonda é interpretado como negativo se:

- a reação gera uma curva de crescimento de fluorescência que cruza o limiar em pelo menos ( $\geq$ ) 38 ciclos, OU
- a reação não gera uma curva de crescimento de fluorescência que cruza o limiar.

**Tabela 6: Instruções de interpretação e relatório do Triplex rRT-PCR para amostras de sangue total (EDTA), soro e LCR**

ZIKV	DENV	CHIKV	RP	Interpretação	Relatório	Ações
-	-	-	+	Negativo	Sem RNA de zika, dengue, ou chikungunya detectado pelo rRT-PCR	Relatar os resultados ao CDC. Nenhum teste adicional necessário. Observação: Se a data em que começam a apresentar sintomas é incerta ou se o paciente não apresenta sintomas, o teste sorológico pode ser recomendável. Consultar o algoritmo do CDC.*
-	-	-	-	Inconclusivo	Amostra inconclusiva para a presença de RNA de zika, dengue e chikungunya pelo rRT-PCR. Pode ocorrer resultado inconclusivo no caso de uma amostra inadequada.	Repetir a extração e rRT-PCR. Se não for possível resolver o resultado inconclusivo de uma amostra de soro, solicite a coleta de soro adicional do paciente. Relatar os resultados inconclusivos para o CDC.
-	+	-	+/-	Positivo para DENV, mas negativo para ZIKV e CHIKV.	RNA da dengue detectado por rRT-PCR. Sem RNA de zika ou chikungunya detectado.	Relatar os resultados ao CDC. Encaminhar a amostra para o CDC. Consultar o algoritmo do CDC.*
-	-	+	+/-	Positivo para CHIKV, mas negativo para ZIKV e DENV.	RNA de chikungunya detectado pelo rRT-PCR. Sem RNA de dengue ou zika detectado.	
+	-	-	+/-	Positivo para ZIKV, mas negativo para DENV e CHIKV.	RNA de zika detectado por rRT-PCR. Sem RNA de dengue ou chikungunya detectado.	
-	+	+	+/-	Positivo para DENV e CHIKV, mas negativo para ZIKV.	RNA de dengue e chikungunya detectado pelo rRT-PCR. Sem RNA de zika detectado.	
+	+	-	+/-	Positivo para ZIKV e DENV, mas negativo para CHIKV.	RNA de zika e dengue detectado pelo rRT-PCR. Sem RNA de chikungunya detectado.	
+	-	+	+/-	Positivo para ZIKV e CHIKV, mas negativo para DENV.	RNA de zika e chikungunya detectado pelo rRT-PCR. Sem RNA de dengue detectado.	
+	+	+	+/-	Positivo para ZIKV, DENV e CHIKV.	RNA de Zika, dengue e chikungunya detectado pelo rRT-PCR.	

\* A orientação de laboratório para zika e o algoritmo de teste podem ser encontrados no site do CDC: <http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>

Se você tiver amostras positivas para encaminhar ao CDC, notifique a helpdesk da LRN ([LRN@cdc.gov](mailto:LRN@cdc.gov)) e peça instruções para o envio da amostra.

**Tabela 7: Instruções de interpretação e relatório do Trioplex rRT-PCR para amostras de urina e líquido amniótico**

ZIKV	RP	Interpretação	Relatório	Ações
-	+	Negativo	Sem RNA de zika detectado pelo rRT-PCR.	Relatar os resultados ao CDC. Consulte o algoritmo do CDC.*
-	-	Inconclusivo	Amostra inconclusiva para a presença de RNA de zika pelo rRT-PCR. Pode ocorrer resultado inconclusivo no caso de uma amostra inadequada.	Repetir a extração e rRT-PCR. Se a repetição do teste não resolver o resultado inconclusivo, não faça mais testes. Relatar os resultados ao CDC.
+	+/-	Positivo	RNA de zika detectado por rRT-PCR.	Relatar os resultados ao CDC. Encaminhar a amostra para o CDC. Consultar o algoritmo do CDC.*

\*A orientação de laboratório para zika e o algoritmo de teste podem ser encontrados no site do CDC:

<http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>

Se você tiver amostras positivas para encaminhar ao CDC, notifique a helpdesk da LRN ([LRN@cdc.gov](mailto:LRN@cdc.gov)) e peça instruções para o envio da amostra.

**OBSERVAÇÃO:** todos os resultados de testes gerados usando o Trioplex rRT-PCR por laboratórios da LRN devem ser enviados ao CDC por meio do LRN Results Messenger. Consulte a política de mensagens de dados da LRN (encontrada em Documentos/Informações específicas da LRN/Declarações de política da LRN, no site da LRN). Se tiver dúvidas sobre essa política, entre em contato com a helpdesk da LRN pelo e-mail [LRN@cdc.gov](mailto:LRN@cdc.gov).

Os casos positivos devem também ser reportados pelo ArboNet.

**OBSERVAÇÃO:** consulte a seção **Interpretação de Resultados de Testes** para obter orientação detalhada sobre a interpretação de positivos fracos ou curvas questionáveis.

### Limitações do ensaio

**O ensaio Trioplex RT-PCR em tempo real é realizado somente sob prescrição médica.**

A interpretação dos resultados do teste rRT-PCR deve considerar a possibilidade de resultados negativos falsos e positivos falsos. Os resultados falso-negativos podem resultar de:

- coleta insatisfatória da amostra
- degradação do RNA viral durante a remessa ou o armazenamento
- coleta da amostra feita antes do início dos sintomas
- coleta da amostra depois de o ácido nucleico não ser mais encontrado no paciente (aproximadamente 14 dias após o início dos sintomas para soro, sangue total e/ou urina)
- impossibilidade de comprovar os procedimentos autorizados do ensaio
- impossibilidade de usar o kit e a plataforma de extração autorizados

A aplicação de controles de ensaio apropriados que identifiquem amostras de baixa qualidade (como RNase P) e a adesão às orientações do CDC para testes de DENV, CHIKV e ZIKV podem ajudar a evitar a maioria dos resultados falso-negativos.

O caso mais comum de resultado falso-positivo é a contaminação por DNA amplificado anteriormente. O uso livre de amostras de controle negativas em cada ensaio pode ajudar a garantir que a contaminação no laboratório seja detectada e que os resultados falso-positivos do teste não sejam reportados.

Resultados negativos não descartam infecções pelo vírus zika e não devem ser usados como o único embasamento para decisões de tratamento/cuidados com o paciente. Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional treinado em conjunto com a análise do histórico e dos sinais e sintomas clínicos do paciente.

Informações limitadas estão disponíveis sobre os padrões de excreção de RNA do zika vírus em indivíduos infectados em diferentes amostras ao longo do tempo.

Esse ensaio se destina apenas ao diagnóstico *in vitro* sob a Autorização de Uso de Emergência da FDA e está limitado a laboratórios qualificados designados pelo CDC.

Todas as amostras devem ser manipuladas como se estivessem infectadas. As precauções adequadas de biossegurança, inclusive equipamento de proteção pessoal, devem ser aplicadas na manipulação dos materiais das amostras. Informações adicionais sobre a manipulação segura de amostras com vírus Zika podem ser encontradas no site:

<http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-safety.html>.

A coleta, o armazenamento e o transporte adequados das amostras são essenciais para obter resultados corretos.

A extração do ácido nucleico de amostras clínicas deve ser feita com os métodos de extração especificados relacionados neste procedimento. Outros métodos de extração não foram avaliados para o uso com este ensaio.

O desempenho só foi estabelecido com os tipos de amostras relacionados no uso pretendido. Outros tipos de amostras não foram avaliados.

## Características de desempenho

### Seção 1 - Limite de detecção

#### Visão geral

Os limites de detecção (LoD) do Triplex rRT-PCR foram estabelecidos por meio de diluições de vírus em estoque em 10 vezes (ZIKV, DENV ou CHIKV) na matriz. A maior diluição na qual o ensaio Triplex ainda poderia detectar  $\geq 95\%$  de réplicas planejadas foi considerado o LoD. A diluição de LoD foi comparada com uma curva de concentração padrão previamente estabelecida de RNA viral (ZIKV, DENV ou CHIKV) para determinar os equivalentes da cópia do genoma por mililitro (GCE/ml). Esses LoDs estão resumidos na Tabela 8 para os conjuntos de iniciador/sonda de ZIKV e na Tabela 9 para os conjuntos de iniciador/sonda de DENV e CHIKV.

- O LoD de **ZIKV** para extração automatizada de **pequeno volume (soro e urina)** foi determinado usando o instrumento **MagNA Pure LC 2.0** usando SuperScript III (SS III) [Seção 1.A.].
- O LoD de **DENV** para extração automatizada de **pequeno volume (soro e urina)** foi determinado usando o instrumento **MagNA Pure LC 2.0** usando SS III [Seção 1.B.].

- O LoD de **CHIKV** para extração automatizada de **pequeno volume (soro e urina)** foi determinado usando o instrumento **MagNA Pure LC 2.0** usando SS III [Seção 1.C.].
- O LoD de **ZIKV** para extração automatizada de **volume grande (soro e urina)** foi determinado usando o instrumento **MagNA Pure 96** [Seção 4.C.].
- O LoD de **ZIKV** para extração automatizada de **pequeno volume (sangue total EDTA)** foi determinado usando o instrumento **MagNA Pure 96** [Seção 4.D.].

Todos os estudos de ligação usaram o mesmo vírus em estoque que foi usado nos estudos de LoD. Os estudos de ligação de extração automatizada (Seção 4) usaram a diluição de LoD do ZIKV (determinada nos estudos de LoD) para determinar a não inferioridade com relação às plataformas de extração automatizada usadas nos estudos de LoD. Se o ensaio Trioplex conseguia detectar  $\geq 95\%$  das réplicas planejadas na diluição de LoD estabelecida, a plataforma de extração automatizada que estava sendo utilizada no estudo de ligação era considerada não inferior.

O estudo de ligação qScript master mix (Seção 4) usou a diluição de LoD do ZIKV, DENV e CHIKV (determinada nos estudos de LoD) para determinar a não inferioridade com relação ao SuperScript master mix usado nos estudos de LoD. Se o ensaio Trioplex conseguia detectar  $\geq 95\%$  das réplicas planejadas na diluição de LoD estabelecida, o qScript master mix era considerado não inferior.

**Tabela 8: Resumo dos dados gerais sobre limites de detecção para ZIKV**

	Extração	Master mix	LoD de ZIKV	Consulte a Seção
Soro	MP LC 2.0	SS III	1,93 x 10 <sup>4</sup> (GCE/mL) (diluição de 10 <sup>-6</sup> )	1A
	QIAamp	SS III	Não inferior ao instrumento MP LC 2.0 usando SS III	4E
	MP 96	SS III		1D
	MP LC 2.0	qScript		4A
Volume grande de soro	MP 96	SS III	2,45 x 10 <sup>3</sup> (GCE/mL) (diluição de 10 <sup>-6</sup> )	1D
	MP Compact	SS III	Não inferior ao instrumento MP 96	4C
	EasyMAG	SS III		4D
Urina	MP LC 2.0	SS III	5,38 x 10 <sup>4</sup> (GCE/mL) (diluição de 10 <sup>-6</sup> )	1A
	QIAamp	SS III	Não inferior ao instrumento MP LC 2.0 usando SS III	4E
	MP 96	SS III		1D
	MP LC 2.0	qScript		4A
Volume grande de urina	MP 96	SS III	4,64 x 10 <sup>3</sup> (GCE/mL) (diluição de 10 <sup>-6</sup> )	1D
	MP Compact	SS III	Não inferior ao instrumento MP 96	4C
	EasyMAG	SS III		4D
Sangue total	MP LC 2.0	SS III	2,43 x 10 <sup>3</sup> (GCE/mL) (diluição de 10 <sup>-5</sup> )	1E
	MP 96	SS III	2,43 x 10 <sup>3</sup> (GCE/mL) (diluição de 10 <sup>-5</sup> )	
	MP Compact	SS III	2,43 x 10 <sup>3</sup> (GCE/mL) (diluição de 10 <sup>-5</sup> )	

GCE = Cópia do genoma equivalente

MP LC 2.0 = Instrumento de extração MagNA Pure LC 2.0

MP 96 = Instrumento de extração MagNA Pure 96

MP Comp = Instrumento MagNA Pure Compact

EasyMAG = Instrumento bioMérieux NucliSENS easyMAG

QIAamp = QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit

**Tabela 9: Resumo dos dados gerais sobre limites de detecção para DENV e CHIKV**

	Extração	Master mix	LoD de DENV	LoD de CHIKV	Consulte a Seção
Soro	MP LC 2.0	SS III	DENV-1 $5,82 \times 10^4$ (GCE/mL) DENV-2 $8,25 \times 10^4$ (GCE/ml) DENV-3 $4,36 \times 10^4$ (GCE/ml) DENV-4 $2,68 \times 10^4$ (GCE/ml)	$1,28 \times 10^5$ (GCE/mL)	1B e 1C
	MP 96	SS III	Não inferior ao instrumento MP LC 2.0 usando SS III	Não inferior ao instrumento MP LC 2.0 usando SS III	4B
	MP LC 2.0	qScript			4A
Sangue total	MP 96	SS III	DENV-2 $4,28 \times 10^3$ (GCE/ml)	$4,80 \times 10^3$ (GCE/mL)	1E

**A. LoD de ZIKV (Extração de pequeno volume com MagNA Pure LC 2.0):**

O limite de detecção do conjunto de iniciador e sonda de ZIKV foi avaliado no soro humano normal e na urina usando a classe de zika vírus da Polinésia Francesa de 2013 (ativo). Foram preparadas cinco diluições de soro em 10 vezes para soro e urina. Cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure LC 2.0 (volume de extração 200 µL) e testada pelo Triplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados para soro e urina estão resumidos nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

**Tabela 10: LoD de ZIKV no soro (Extração de volume pequeno – MP LC 2.0)**

Diluição	GCE/mL	ZIKV positivo	CT méd.	DENV positivo	CHIKV positivo
10 <sup>-3</sup>	$1,93 \times 10^7$	20/20	28,10	0/20	0/20
10 <sup>-4</sup>	$1,93 \times 10^6$	20/20	31,58	0/20	0/20
10 <sup>-5</sup>	$1,93 \times 10^5$	20/20	34,84	0/20	0/20
10 <sup>-6</sup>	$1,93 \times 10^4$	20/20	37,17	0/20	0/20
10 <sup>-7</sup>	$1,93 \times 10^3$	0/20	ND	0/20	0/20

ND = Não detectado

**Tabela 11: LoD de ZIKV na urina (extração de volume pequeno – MP LC 2.0)**

Diluição	GCE/mL	ZIKV positivo	C <sub>T</sub> méd.	DENV positivo	CHIKV positivo
10 <sup>-3</sup>	$5,38 \times 10^7$	20/20	26,8	0/20	0/20
10 <sup>-4</sup>	$5,38 \times 10^6$	20/20	30,03	0/20	0/20
10 <sup>-5</sup>	$5,38 \times 10^5$	20/20	33,51	0/20	0/20
10 <sup>-6</sup>	$5,38 \times 10^4$	19/20	36,98	0/20	0/20
10 <sup>-7</sup>	$5,38 \times 10^3$	0/20	ND	0/20	0/20

ND = Não detectado

**B. LoD de DENV (Extração de volume pequeno - soro):**

O limite de detecção (LoD) do conjunto de iniciador e sonda de DENV foi avaliado no soro humano normal usando uma classe representativa de cada sorotipo do vírus da dengue (DENV-1

Porto Rico de 1998, DENV-2 Porto Rico de 1998, DENV-3 Porto Rico de 2004, DENV-4 Porto Rico de 1998). Foram preparadas cinco diluições de soro em 10 vezes para cada classe em cada matriz. Para cada matriz, cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure LC 2.0 (volume de extração 200 µL) e testada pelo Triplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados estão resumidos na Tabela 12.

**Tabela 12: LoD de DENV no soro (extração de volume pequeno – MP LC 2.0)**

Diluição	GCE/mL	Nº DENV Positivo	CT méd.	Nº ZIKV Positivo	Nº CHIKV Positivo
Sorotipo 1	1	5,82 x 10 <sup>5</sup>	20/20	32,55	0/20
	2	5,82 x 10 <sup>4</sup>	20/20	36,75	0/20
	3	5,82 x 10 <sup>3</sup>	1/20	39,08	0/20
	4	5,82 x 10 <sup>2</sup>	0/20	41,88	0/20
	5	5,82 x 10 <sup>1</sup>	0/20	ND	0/20
Sorotipo 2	1	8,25 x 10 <sup>6</sup>	20/20	29,18	0/20
	2	8,25 x 10 <sup>5</sup>	20/20	32,17	0/20
	3	8,25 x 10 <sup>4</sup>	19/20	37,03	0/20
	4	8,25 x 10 <sup>3</sup>	0/20	38,94	0/20
	5	8,25 x 10 <sup>2</sup>	0/20	ND	0/20
Sorotipo 3	1	4,36 x 10 <sup>6</sup>	20/20	29,99	0/20
	2	4,36 x 10 <sup>5</sup>	20/20	33,54	0/20
	3	4,36 x 10 <sup>4</sup>	20/20	37,07	0/20
	4	4,36 x 10 <sup>3</sup>	0/20	39,78	0/20
	5	4,36 x 10 <sup>2</sup>	0/20	ND	0/20
Sorotipo 4	1	2,68 x 10 <sup>6</sup>	20/20	30,61	0/20
	2	2,68 x 10 <sup>5</sup>	20/20	33,86	0/20
	3	2,68 x 10 <sup>4</sup>	19/20	37,33	0/20
	4	2,68 x 10 <sup>3</sup>	1/20	39,46	0/20
	5	2,68 x 10 <sup>2</sup>	0/20	ND	0/20

ND = Não detectado

C. LoD de CHIKV (Extração de volume pequeno - soro):

O limite de detecção (LoD) do conjunto de iniciador e sonda de CHIKV foi avaliado no soro humano normal usando a classe de vírus chikungunya de Porto Rico de 2014. Foram preparadas cinco diluições de soro em 10 vezes em cada matriz. Para cada matriz, cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure LC 2.0 (volume de extração 200 µL) e testada pelo Triplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados do soro estão resumidos na Tabela 13.

**Tabela 13: LoD de CHIKV no soro (Extração de volume pequeno – MP LC 2.0)**

Diluição	GCE/mL	Nº CHIKV Positivo	CT méd.	Nº ZIKV Positivo	Nº DENV Positivo
1	1,28 x 10 <sup>7</sup>	20/20	31,95	0/20	0/20
2	1,28 x 10 <sup>6</sup>	20/20	35,42	0/20	0/20
3	1,28 x 10 <sup>5</sup>	19/20	37,22	0/20	0/20
4	1,28 x 10 <sup>4</sup>	2/20	38,26	0/20	0/20
5	1,28 x 10 <sup>3</sup>	0/20	ND	0/20	0/20

ND = Não detectado

- D. Estudos de LoD do Zika - extração de pequeno volume de soro e urina (volume de entrada 0,2 ml) e de volume grande (volume de entrada 1 ml) no instrumento MagNA Pure 96:  
O limite de detecção do conjunto de iniciador e sonda de ZIKV foi avaliado no soro humano normal e na urina usando a classe de zika vírus ativo da Polinésia Francesa de 2013. O zika vírus foi usado nesta avaliação do volume de entrada da amostra para representar os três vírus detectados pelo ensaio. Foram preparadas quatro diluições de soro em 10 vezes para linhagens de zika vírus ativo em urina e soro. Para cada matriz, cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure 96 (volume de extração 0,2 ml e 1,0 ml) e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. O limite de detecção foi equivalente entre o uso de volumes de entrada grandes e pequenos (padrão), entretanto o volume grande de entrada mostrou, de forma geral, aproximadamente 2 Cts abaixo do volume padrão, sugerindo um pequeno aumento de sensibilidade. Sendo assim, o método de extração de volume grande para MagNA Pure 96 é o método recomendado para a extração MagNA Pure 96 de soro e urina para testes posteriores pelo ensaio Trioplex. Os resultados estão resumidos na Tabela 14 e na Tabela 15.

**Tabela 14: LoD de ZIKV no soro (Extração de volume pequeno e volume grande – MP 96)**

		Soro (volume grande)			Soro (volume pequeno)		
		GCE/mL	Nº ZIKV Positivo	Média C <sub>T</sub>	GCE/mL	Nº ZIKV Positivo	C <sub>T</sub> méd.
Diluição	10 <sup>-5</sup>	2,45 x 10 <sup>4</sup>	20/20	32,42	2,45 x 10 <sup>4</sup>	20/20	34,90
	10 <sup>-6</sup>	2,45 x 10 <sup>3</sup>	20/20	35,44	2,45 x 10 <sup>3</sup>	20/20	37,17
	10 <sup>-7</sup>	2,45 x 10 <sup>2</sup>	5/20	37,85	2,45 x 10 <sup>2</sup>	1/20	38,57
	10 <sup>-8</sup>	2,45 x 10 <sup>1</sup>	0/20	NA	2,45 x 10 <sup>1</sup>	1/20	39,18

**Tabela 15: LoD de ZIKV na urina (Extração de volume pequeno e volume grande – MP 96)**

		Urina (volume grande)			Urina (pequeno volume)		
		GCE/mL	Nº ZIKV Positivo	C <sub>T</sub> méd.	GCE/mL	Nº ZIKV Positivo	Média C <sub>T</sub>
Diluição	10 <sup>-5</sup>	4,64 x 10 <sup>4</sup>	20/20	31,63	4,64 x 10 <sup>4</sup>	20/20	34,02
	10 <sup>-6</sup>	4,64 x 10 <sup>3</sup>	20/20	35,11	4,64 x 10 <sup>3</sup>	19/20	37,37
	10 <sup>-7</sup>	4,64 x 10 <sup>2</sup>	1/20	38,72	4,64 x 10 <sup>2</sup>	3/20	39,10
	10 <sup>-8</sup>	4,64 x 10 <sup>1</sup>	0/20	38,88	4,64 x 10 <sup>1</sup>	1/20	39,94

- E. Estudo de LoD do Zika – extração de pequeno volume de sangue total EDTA (volume de entrada 0,2 ml) (com uma etapa de lise externo) nos instrumentos MagNA Pure 96, MagNA Pure Compact e MagNA Pure LC 2.0:  
O limite de detecção do conjunto de iniciador e sonda de ZIKV foi avaliado no sangue total (EDTA) humano normal usando a classe de zika vírus ativo da Polinésia Francesa de 2013. Foram preparadas três diluições de soro em 10 vezes para sangue total EDTA. Cada concentração foi extraída 20 vezes usando os instrumentos MagNA Pure 96 (volume de extração 200 µL), MagNA Pure Compact e MagNA Pure LC 2.0, com uma etapa de lise externo e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados para sangue total EDTA estão resumidos na Tabela 16, Tabela 17 e na Tabela 18.

**Tabela 16: LoD de ZIKV em sangue total EDTA (extração de pequeno volume – MP 96)**

Diluição	GCE/ml	Nº ZIKV Positivo	C <sub>T</sub> méd.
10 <sup>-4</sup>	2,43 x 10 <sup>4</sup>	20/20	35,01
10 <sup>-5</sup>	2,43 x 10 <sup>3</sup>	20/20	37,21
10 <sup>-6</sup>	2,43 x 10 <sup>2</sup>	0/20	39,83

**Tabela 17: LoD de ZIKV em sangue total EDTA (extração de pequeno volume – MP Comp)**

Diluição	GCE/ml	Nº ZIKV Positivo	C <sub>T</sub> méd.
10 <sup>-4</sup>	2,43 x 10 <sup>4</sup>	20/20	28,03
10 <sup>-5</sup>	2,43 x 10 <sup>3</sup>	20/20	31,57
10 <sup>-6</sup>	2,43 x 10 <sup>2</sup>	5/20	37,41

**Tabela 18: LoD de ZIKV em sangue total EDTA (extração de pequeno volume – MP LC 2.0)**

Diluição	GCE/ml	Nº ZIKV Positivo	C <sub>T</sub> méd.
10 <sup>-4</sup>	2,43 x 10 <sup>4</sup>	20/20	33,85
10 <sup>-5</sup>	2,43 x 10 <sup>3</sup>	19/20	37,18
10 <sup>-6</sup>	2,43 x 10 <sup>2</sup>	0/20	41,92

- F. Estudo de LoD do DENV – extração de pequeno volume de sangue total EDTA (volume de entrada 0,2 ml) (com uma etapa de lise externo) no instrumento MagNA Pure 96: O limite de detecção do conjunto de iniciador e sonda de DENV foi avaliado no sangue total (EDTA) humano normal usando a classe C DENV-2 de Nova Guiné. Foram preparadas três diluições de soro em 10 vezes. Cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure 96 (volume de extração 200 µL) e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados estão resumidos na Tabela 19.

**Tabela 19: LoD de DENV em sangue total EDTA (extração de pequeno volume – MP 96)**

Diluição	GCE/mL	Nº DENV Positivo	C <sub>T</sub> méd.	Nº ZIKV	Nº CHIKV Positivo
10 <sup>-4</sup>	4,28 x 10 <sup>4</sup>	20/20	34,13	0/20	0/20
10 <sup>-5</sup>	4,28 x 10 <sup>3</sup>	19/20	37,15	0/20	0/20
10 <sup>-6</sup>	4,28 x 10 <sup>2</sup>	3/20	39,05	0/20	0/20

- G. Estudo de LoD do CHIKV – extração de pequeno volume de sangue total EDTA (volume de entrada 0,2 ml) (com uma etapa de lise externo) no instrumento MagNA Pure 96: O limite de detecção do conjunto de iniciador e sonda de CHIKV foi avaliado no sangue total (EDTA) humano normal usando a classe clínica de CHIKV de Porto Rico de 2014. Foram preparadas três diluições de soro em 10 vezes. Cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure 96 (volume de extração 200 µL) e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados estão resumidos na Tabela 20.

**Tabela 20: LoD de CHIKV em sangue total EDTA (extração de pequeno volume – MP 96)**

Diluição	GCE/mL	Nº CHIKV Positivo	C <sub>T</sub> méd.	Nº ZIKV	Nº DENV Positivo
10 <sup>-4</sup>	4,80 x 10 <sup>4</sup>	20/20	33,89	0/20	0/20
10 <sup>-5</sup>	4,80 x 10 <sup>3</sup>	19/20	37,06	0/20	0/20
10 <sup>-6</sup>	4,80 x 10 <sup>2</sup>	0/20	39,58	0/20	0/20

**Seção 2 – Inclusão****A. Avaliação de inclusão de DENV:**

A inclusividade do conjunto de iniciador e sonda de DENV foi avaliada usando um grupo de RNA de 29 isolamentos internacionais de vírus da dengue, representando classes contemporâneas de todos os genótipos clinicamente relevantes. Os testes foram feitos usando o master mix SuperScript III. Um resumo dos resultados dos testes está na Tabela 21.

**Tabela 21: Inclusividade de DENV em vírus da dengue**

Sorotipo com vírus da dengue	Classes testadas	Resultados positivos para DENV
1	6	100%
2	11	100%
3	6	100%
4	6	100%

**B. Análise de sequências de ZIKV, DENV e CHIKV:**

A análise *in silico* de sequências de iniciadores e sondas do Triplex rRT-PCR foi feita para verificar a homologia da sequência de reagentes com cada vírus correspondente e região pretendida. Um total de 514 classes atuais e histórias de vírus da dengue, inclusive 104 DENV-1, 142 DENV-2, 154 DENV-3 e 114 DENV-4, 206 classes de vírus chikungunya e 33 classes de vírus zika foi selecionado para este estudo. Todas as sequências de iniciador e sonda mostraram 100% de identidade de sequência com o alvo esperado, prevendo que resultados falso-negativos provavelmente não ocorrerão.

A Tabela 22 abaixo contém um resumo desses resultados.

**Tabela 22: Análise de inclusividade *in silico***

Vírus	Classe	Nº conta GenBank	Identidade da sequência de iniciador/sonda									
			DENV-F	DENV-R1	DENV-R2	DENV-P	CHIKV-F	CHIKV-R	CHIKV-P	ZIKV-F	ZIKV-R	ZIKV-P
DENV-1	México 2012	KJ189368	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-1	Nicarágua 2011	KF973453	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-1	Brasil 2010	JX669466	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-1	Arábia Saudita 2011	KJ649286	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-1	Tailândia 2013	KF887994	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-2	Peru 2011	KC294210	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-2	Brasil 2010	JX669477	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-2	Indonésia 2010	KC762679	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-2	Arábia Saudita 2014	KJ830750	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-2	Singapura 2012	KM279577	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-3	Nicarágua 2009	JF937631	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-3	Indonésia 2010	KC762693	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-3	China 2013	KJ622195	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-3	Tailândia 2010	HG316483	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-3	Brasil 2009	JF808120	100%	100%	<85%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-4	Venezuela 2007	HQ332174	100%	<85%	100%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-4	Brasil 2010	JN983813	100%	<85%	100%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-4	Paquistão 2009	KF041260	100%	<85%	100%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-4	Singapura 2005	GQ398256	100%	<85%	100%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
DENV-4	Camboja 2008	JN638570	100%	<85%	100%	100%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	El Salvador 2014	KR559471	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Jamaica 2014	KR559489	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Trinidad e Tobago 2014	KR046231	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Polinésia Francesa 2015	KR559473	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Brasil 2014	KR264951	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Guiana 2014	KR559496	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%

Identidade da sequência de iniciador/sonda												
Vírus	Classe	Nº conta GenBa	DENV-F	DENV-R1	DENV-R2	DENV-P	CHIKV-F	CHIKV-R	CHIKV-P	ZIKV-F	ZIKV-R	ZIKV-P
CHIKV	Tailândia 2013	KJ579186	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Índia 2013	KT336782	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Indonésia 2013	KM673291	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	China 2012	KC488650	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Filipinas 2013	AB860301	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Rep. do Congo	KP003813	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Singapura 2008	FJ445463	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Sri Lanka 2008	FJ513654	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	China 2008	GU199351	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Malásia 2008	FJ807899	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Índia 2008	JN558835	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	México 2014	KP851709	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Porto Rico 2014	KR559474	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
CHIKV	Honduras 2014	KR559488	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%	<20%	<20%	<20%
ZIKV	China 2016	KU740184	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Brasil 2015	KU527068	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Guatemala 2015	KU501217	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Brasil 2015	KU365778	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Polinésia Francesa 2013	KJ776791	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Suriname 2015	KU312312	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Porto Rico de 2015	KU501215	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Tailândia 2014	KU681081	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Filipinas 2012	KU681082	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Martinica 2015	KU647676	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Micronésia 2007	EU545988	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Haiti 2014	KU509998	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	China 2016	KU744693	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%
ZIKV	Brasil 2015	KU321639	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	<20%	100%	100%	100%

### Seção 3 – Exclusividade

#### A. Avaliação de exclusividade de quase vizinhos:

A avaliação da reatividade cruzada de cada componentes do Trioplex rRT-PCR com os vírus visados pelos outros componentes foi feita extensivamente como parte de todas as avaliações de amostras planejadas, de ligação e de LoD. Nenhuma reatividade cruzada entre os iniciadores e sondas componentes e esses três vírus foi observada.

Três flavivírus adicionais (WNV, YFV e SLEV) foram selecionados para avaliar a especificidade dos conjuntos de iniciador e sonda de DENV, ZIKV e CHIKV. Precipitações de culturas de tecidos de WNV (classe NY99), YFV (classe 17D) e SLEV (classe MSI-7) foram extraídas com o instrumento MagNA Pure LC 2.0 da Roche e testadas usando o master mix SuperScript III. Todos os três vírus foram testados em duplicata em 3 diluições de 10 vezes. Nenhuma reatividade cruzada foi observada. Todos os controles tiveram o desempenho esperado.

**Tabela 23: Reatividade cruzada de quase vizinhos**

Vírus	Classe	Resultado de ZIKV	Resultado de DENV	Resultado de CHIKV
Vírus do Nilo Ocidental	NY99	Nenhuma reatividade	Nenhuma reatividade	Nenhuma reatividade
Vírus da febre amarela	17D	Nenhuma reatividade	Nenhuma reatividade	Nenhuma reatividade
Vírus da encefalite de São Luís	MSI-7	Nenhuma reatividade cruzada	Nenhuma reatividade cruzada	Nenhuma reatividade cruzada
Vírus zika*	Polinésia Francesa 2013	n/a	Nenhuma reatividade	Nenhuma reatividade
Vírus da dengue*	Representantes de todos os 4 sorotipos	Nenhuma reatividade cruzada	n/a	Nenhuma reatividade cruzada
Vírus chikungunya*	Porto Rico	Nenhuma reatividade	Nenhuma reatividade	n/a

\*Os resultados de reatividade cruzada desses três vírus foram extrapolados a partir dos dados apresentados em avaliações de amostras clínicas arquivadas, de ligação, de limite de detecção e amostras planejadas.

#### B. Avaliação de exclusividade sem arbovírus:

Um grupo de vírus e organismos conhecidos por causarem sinais e sintomas semelhantes aos dos vírus detectados pelo Trioplex rRT-PCR foi selecionado para a inclusão em uma avaliação de exclusividade. O ácido nucleico foi preparado a partir de linhagens quantificadas de classes qualificadas de cada um dos organismos listados. Todos os organismos foram testados em três análises a uma alta concentração: 100 pg de ácido nucleico/reação. Nenhuma reatividade cruzada foi observada. Todos os controles tiveram o desempenho esperado.

**Tabela 24: Reatividade cruzada sem arbovírus**

Organismo		Concentração	Número positivo		
			ZIKV	DENV	CHIKV
Bactéria	<i>Borrelia burgdorferi</i>	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
Fungo	<i>Histoplasma</i>	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
Protozoário	<i>Plasmodium falciparum</i>	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
Vírus	Citomegalovírus	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	HSV-1	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Influenza A	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Influenza B	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	VZV	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Vaccinia	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3
	Adenovírus	100 pg/rxn	0/3	0/3	0/3

C. Avaliação *in silico*:

Uma avaliação adicional da especificidade analítica do Trioplex rRT-PCR foi feita por meio da análise *in silico* de cada sequência de iniciador e sonda em relação a outras causas comuns de doença febril aguda em humanos. Consultas de análises BLAST de iniciadores e sondas do Trioplex rRT-PCR foram feitas em relação às sequências de nucleotídeo de domínio público do GenBank e não mostraram nenhuma homologia significativa (destino de iniciador e destino de sonda) com outras condições que poderiam prever resultados positivos falsos do rRT-PCR. As condições e os agentes de causa associados cobertos pela análise de especificidade *in silico* estão presentes na Tabela 25.

**Tabela 25: Organismos avaliados durante a análise de especificidade *in silico***

Organismo		Organismo (taxid)
Bactéria	<i>Borrelia burgdorferi</i>	64895
	<i>Streptococo do grupo A</i>	36470
	<i>Salmonella spp.</i>	590
	<i>Leptospira spp.</i>	171
	<i>Rickettsia spp.</i>	780
Trematodas	<i>Schistosoma spp.</i>	6181
Fungo	<i>Histoplasma spp.</i>	5036
Protozoário	<i>Plasmodium falciparum</i>	5833
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	5693
Flavivírus	Zika (DENV e CHIKV)	64320
	Dengue (ZIKV e CHIKV)	11052
	WNV	11082
	YFV	40005
	SLEV	11080
	Vírus Spondweni	64318
	JEEV	11071

Organismo		Organismo
Alfavírus	Chikungunya (ZIKV e DENV)	37124
	EEEV	11021
	WEEV	11039
	Vírus do rio de Ross	11029
	Vírus da floresta de Barmah	11020
	Vírus O'nyong-nyong	11027
	Vírus zika*	59301
Outros vírus	Parvovírus (B19)	10789
	Vírus do sarampo	11234
	Vírus da rubéola	11041
	Citomegalovírus	10358
	HSV-1	10298
	HSV-2	10310
	Influenza A	11320
	Influenza B	11520
	VZV	10335
	Vaccinia	10245
	Vírus Epstein Barr	10376
	HIV	11676
	Hepatite C	11102
	Enterovírus	12059
	Adenovírus	108098
	130310	
	129951	
	565302	
	10519	

#### Seção 4 - Estudos de ligação

##### A. Avaliações com o master mix qScript e SuperScript III:

Quatro grupos de materiais foram preparados para avaliação: três grupos de soro e um de urina. Um grupo de soro e um de urina foram contaminados com a classe de vírus zika da Polinésia Francesa de 2013 no fator de diluição da linhagem viral identificado como o limite de detecção (LoD) de ZIKV com o SuperScript III. Um grupo de soro foi contaminado com o vírus da dengue (Porto Rico de 1998, sorotipo 2) no fator de diluição da linhagem viral identificado como o limite de detecção (LoD) de DENV com o SuperScript III. E um grupo de soro foi contaminado com o vírus chikungunya (Porto Rico de 2014) no fator de diluição da linhagem viral identificado como o limite de detecção (LoD) de CHIKV com o SuperScript III.

Cada grupo foi extraído usando o instrumento MagNA Pure LC 2.0 20 vezes. Cada amostra de RNA resultante foi testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III e o master mix qScript. Os resultados mostram o desempenho comparável entre o master mix SuperScript III e o qScript.....

- B. O limite de detecção (LoD) do conjunto de iniciador e sonda de DENV foi avaliado no soro humano normal usando uma classe representativa de cada sorotipo do vírus da dengue (DENV-1 Porto Rico de 1998, DENV-2 Porto Rico de 1998, DENV-3 Porto Rico de 2004, DENV-4 Porto Rico de 1998). Foram preparadas cinco diluições de soro em 10 vezes para cada classe em cada matriz. Cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure 96 (volume de extração 200 µL) e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados mostram o desempenho comparável entre o uso do MagNA Pure 96 e o uso do MagNA LC 2.0.

O limite de detecção (LoD) do conjunto de iniciador e sonda de CHIKV foi avaliado no soro humano normal usando a classe de vírus chikungunya de Porto Rico de 2014. Foram preparadas cinco diluições de soro em 10 vezes em cada matriz. Cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure 96 (volume de extração 200 µL) e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados mostram o desempenho comparável entre o uso de

- C. Avaliação da extração de volume grande de urina e soro em instrumento MagNA Pure Compact: Foram preparadas três diluições de soro em 10 vezes para zika vírus ativo (Polinésia Francesa de 2013, concentração de estoque de  $2,45 \times 10^9$  GCE/ml), em urina e soro humano normal. A linhagem viral usada para preparar a série de diluição é idêntica à que foi utilizada para preparar as diluições para a avaliação de MagNA Pure 96 acima. As concentrações testadas aqui incluem o fator de diluição identificado como o limite de detecção para o instrumento MagNA Pure 96 em soro e urina ( $10^{-6}$ ). Para cada matriz, cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento MagNA Pure Compact (volume de extração 1 ml) e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Uma vez que o MagNA Pure Compact foi capaz de produzir ácido nucleico extraído de qualidade suficiente para possibilitar a detecção do RNA do zika vírus nas 20 reações no fator de diluição  $10^{-6}$  nas duas matrizes, o instrumento não é inferior ao MagNA Pure 96 e é aceito para uso neste ensaio.
- D. Avaliação da extração de volume grande de urina e soro em instrumento bioMérieux NucliSENS easyMAG:

O instrumento bioMérieux NucliSENS easyMAG foi avaliado para determinar sua capacidade não inferior na extração de volume grande de soro e urina em comparação ao MagNA Pure 96. Foram preparadas três diluições de soro em 10 vezes para zika vírus ativo, em urina e soro humano normal. A linhagem viral usada para preparar a série de diluição é idêntica à que foi utilizada para preparar as diluições para a avaliação de MagNA Pure 96 na Seção 1 acima. As concentrações testadas aqui incluem o fator de diluição identificado como o limite de detecção para o instrumento MagNA Pure 96 em soro e urina ( $10^{-6}$ ). Para cada matriz, cada concentração foi extraída 20 vezes usando o instrumento bioMérieux NucliSENS easyMAG (volume de extração 1 ml) e testada pelo Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Uma vez que o MagNA Pure Compact foi capaz de produzir ácido nucleico extraído de qualidade suficiente para possibilitar a detecção do RNA do zika vírus nas 20 reações no fator de diluição  $10^{-6}$  nas duas matrizes, o instrumento não é inferior ao MagNA Pure 96 e é aceito para uso neste ensaio.

- E. Avaliação de extração manual com QIAamp:  
Um grupo de urina e um de soro foram contaminados com a classe de zika vírus da Polinésia Francesa de 2013 no fator de diluição da linhagem viral identificado como o limite de detecção de ZIKV com o instrumento MagNA Pure LC 2.0. Cada grupo foi extraído 20 vezes usando o minikit de RNA viral Qiagen QIAamp DSP e testado com o Trioplex rRT-PCR usando o master mix SuperScript III. Os resultados comprovam que o minikit de RNA viral Qiagen QIAamp DSP tem desempenho semelhante ao do instrumento MagNA Pure LC 2.0 na

preparação de ácido nucleico para testes subsequentes pelo Trioplex rRT-PCR e é aceitável para o uso no ensaio.

## **Seção 5 - Avaliação clínica**

### **A. Desempenho clínico do Trioplex rRT-PCR:**

A partir da coleta de arquivo do CDC Dengue Branch em Porto Rico, 130 amostras de soro foram selecionadas para avaliar o desempenho do Trioplex rRT-PCR. Quarenta e oito (48) amostras de casos de dengue (12 de cada sorotipo), 12 de casos de chikungunya, 20 de casos de zika e 50 amostras negativas de indivíduos sintomáticos foram incluídas neste conjunto de amostras. Após a remoção do arquivo (-70 °C), as amostras foram testadas com os ensaios Trioplex rRT-PCR (usando o SuperScript III e o instrumento MagNA Pure LC 2.0), DENV 1-4 rRT-PCR aprovado pela FDA, Zika NS3 singleplex desenvolvido e validado internamente e chikungunya nSP1 rRT-PCR. Os resultados dos testes com os ensaios DEV 1-4 rRT-PCR, zika interno e chikungunya rRT-PCR corresponderam à determinação anterior associada a todas as amostras do repositório, exceto uma.

Uma amostra de zika arquivada gerou resultados negativos com o ensaio interno Zika NS3 (Ct 38,45, limite positivo do ensaio <38) e resultados positivos para zika com o Trioplex rRT-PCR. Devido ao resultado do ensaio interno Zika NS3, a amostra de zika arquivada foi reclassificada como negativa e o resultado do Trioplex analisado como falso-positivo. Os resultados dos testes com Trioplex rRT-PCR foram comparados com essa categoria de amostra arquivada na tabela abaixo.

**Tabela 26: Desempenho do Trioplex rRT-PCR com amostras clínicas de soro arquivadas**

Categoria da amostra	Testada	Resultado do componente Trioplex		
		ZIKV positivo	DENV positivo	CHIKV positivo
Zika	19*	19/19	0/19	0/19
Dengue	48	0/48	47/48**	0/48
Chikungunya	12	0/12	0/12	12/12
Negativo	51*	2/51	0/51	1/51
<b>Concordância percentual positiva</b>		<b>100%</b> (19/19) 95% CI: 83,2% a 100%	<b>97,9%</b> (47/48) 95% CI: 89,1% a 99,6%	<b>100%</b> (12/12) 95% CI: 75,8% a 100%
<b>Concordância percentual negativa</b>		<b>98,2%</b> (109/111) 95% CI: 93,7% a 99,5%	<b>100%</b> (82/82) 95% CI: 95,5% a 100%	<b>99,2%</b> (117/118) 95% CI: 95,4% a 99,9%

\* Uma amostra de zika arquivada, quando testada após a recuperação do arquivo, apresentou um valor de  $C_T$  logo acima do limite para o ensaio interno Zika NS3. Portanto, a amostra foi reclassificada como negativa. A amostra gerou um resultado positivo para Zika com o ensaio Trioplex, apresentado como um resultado positivo falso.

\*\*Uma amostra de dengue (sorotipo 4) gerou  $C_T$  de 39,87, o que é um resultado negativo. O resultado do teste do ensaio para DENV 1–4 da amostra foi positivo para o sorotipo 4.

**B. Detecção do RNA do zika vírus em amostras clínicas relacionadas ao caso:**

Soro, urina e sangue total (EDTA) foram coletados na primeira semana após o início dos sintomas de 175 pacientes diagnosticados com infecção pelo zika vírus em Porto Rico durante o surto de 2016. Como parte do estudo, as três amostras foram coletadas do paciente no mesmo dia e enviadas para análise. As amostras de soro foram testadas usando o MAC-ELISA para zika do CDC de acordo com o protocolo dos EUA. Soro, urina e sangue total foram testados com o Trioplex rRT-PCR do CDC usando o protocolo MagNA Pure 96 para extração de volume pequeno (volume de entrada 200  $\mu$ L) com uma etapa de lise externo, e o master mix Invitrogen SuperScript III. Além disso, 65% destes pacientes foram novamente abordados para fornecer uma segunda amostra de soro após 6 dias DPO. Esta segunda amostra de soro foi testada usando o MAC-ELISA IgM para zika do CDC de acordo com o protocolo dos EUA.

Para fins de apresentação de dados para este estudo, estes 175 casos foram constatados como casos verdadeiros de infecção por zika vírus quando pelo menos um dos testes de diagnóstico teve resultado positivo ou equívoco em uma ou mais das amostras. Um resumo dos resultados entre os tipos de amostra é apresentado na Tabela 27. Durante os primeiros 7 dias após o início dos sintomas, o RNA do zika vírus foi, de forma geral, detectável nas amostras de pacientes.

**Tabela 27: Percentual de resultados positivos nos dias após o início dos sintomas (DPO) entre os ensaios e tipos de amostras**

DPO	IgM de zika vírus do soro		Trioplex de soro (ZIKV)		Trioplex de urina (ZIKV)		Trioplex de sangue total (ZIKV)	
0	1/11	9,1%	8/11	72,7%	4/11	36,4%	10/11	90,9%
1	7/40	17,5%	27/40	67,5%	16/40	40%	38/40	95%
2	4/26	15,4%	20/26	76,9%	9/26	34,6%	25/26	96,2%
3	4/22	18,2%	19/22	86,4%	14/22	63,6%	21/22	95,5%
4	30/39	76,9%	24/39	61,5%	24/39	61,5%	36/39	92,3%
5	16/22	72,7%	11/22	50%	13/22	59,1%	20/22	90,9%
6	10/14	71,4%	7/14	50%	10/14	71,4%	13/14	92,9%
7	1/1	-	0/1	-	0/1	-	0/1	-
Todas	73/175	41,7%	116/175	66,3%	90/175	51,4%	163/175	93,1%

C. RNA de dengue e chikungunya detectado em amostras arquivadas de soro de paciente e sangue total

Um painel com as amostras de sangue total (EDTA) foi selecionado do arquivo de coleta do CDC para incluir o sangue total coletado de 60 indivíduos diagnosticados com infecção pelo vírus da dengue e 56 indivíduos diagnosticados com infecção pelo vírus chikungunya em Porto Rico. As amostras foram coletadas e arquivadas antes do atual surto do zika vírus em Porto Rico. Os diagnósticos da dengue foram feitos com base nos testes rRT-PCR das amostras de soro usando o Ensaio para DENV 1-4 RT-PCR em tempo real do CDC aprovado pela FDA. Os diagnósticos do vírus chikungunya foram feitos com base nos testes de soro, incluindo o ensaio interno para vírus chikungunya nSP1 rRT-PCR, Lanciotti et al. Todas as amostras de soro e sangue total foram armazenadas congeladas.

Todas as amostras de soro e sangue total foram extraídas usando o método MagNA Pure 96 correspondente descrito nas instruções de uso. Invitrogen SuperScript III foi usado para testes Trioplex rRT-PCR.

Todas as amostras de sangue total arquivadas e todas as amostras de soro arquivadas, com exceção de uma, geraram resultados do Trioplex rRT-PCR nas duas amostras correspondentes aos resultados de diagnóstico qualitativo gerados com DENV 1-4 rRT-PCR e rRT-PCR interno para CHIKV nas amostras de soro antes de serem arquivadas. Os valores do Trioplex rRT-PCR Ct para sangue total foram geralmente 2 a 3 Ct. mais baixos para DENV e CHIKV no sangue total em comparação às amostras de soro dos pacientes.

Nenhuma das amostras de sangue total ou soro dos 116 pacientes tiveram resultado de teste positivo para RNA do zika vírus utilizando o ensaio Trioplex, demonstrando ausência de reatividade cruzada e acordo percentual 100% negativo com os resultados negativos de RNA do zika vírus esperados (95% CI: 96,8% - 100%). Os dados estão resumidos na Tabela 28 abaixo.

**Tabela 28: Detecção de RNA de dengue e chikungunya em soro e sangue total arquivado**

Grupo de arquivos	Comparador de ensaios (testes de		Testes Trioplex de soro			Testes Trioplex de sangue total		
	DENV 1-4 pos	Resultado de	DENV pos	Resultado de	ZIKV pos	DENV pos	Resultado de	ZIKV pos
Casos de dengue	60/60	na	59/60*	0/60	0/60	60/60	0/60	0/60
Casos de chikungunya	na	56/56	0/56	56/56	0/56	0/56	56/56	0/56

<sup>1</sup> Todos os testes dos ensaios do comparador foram realizados antes das amostras serem congeladas.

<sup>2</sup> Uma amostra de soro gerou o valor de 40,05 para Trioplex DENV Ct. O valor de Ct. para o ensaio DENV 1-4 anterior ao arquivo era 36,11, na faixa de valores de Ct. geralmente observados no limite de detecção para o ensaio.

- D. Levando em consideração os resultados dos dois estudos clínicos descritos nas Seções 5B e 5C acima, o desempenho do ensaio Trioplex rRT-PCR que testou as amostras de sangue total EDTA para RNA do zika vírus foi avaliado em relação ao “Paciente com status de infectado por zika” como determinado pelos resultados do ensaio Trioplex rRT-PCR para zika vírus que testou amostras de sangue e urina do paciente ou resultados negativos esperados para RNA do zika vírus. “Paciente com status de infectado por zika” é considerado positivo quando as amostras de sangue e/ou urina do paciente apresentam resultado positivo para o teste de RNA de zika pelo ensaio Trioplex rRT-PCR. “Paciente com status de infectado por zika” é considerado “indeterminado” quando as amostras de soro e urina combinadas do paciente apresentam resultado negativo para o teste de RNA de zika pelo ensaio Trioplex rRT-PCR. Um total de 23 pacientes (23/175) classificados como “Paciente com status de infectado por zika” “indeterminado” foram excluídos desta análise de desempenho adicional.

**Tabela 29: Desempenho das amostras de sangue total nos testes de ensaio Trioplex rRT-PCR para RNA do zika vírus em relação a “Paciente com status de infectado por zika” ou “Resultados de RNA de zika esperados”**

Sangue total (ST) - Categoria da amostra	Trioplex rRT-PCR do CDC		
	Número de amostras testadas	RNA de zika positivo	RNA de zika negativo
Amostras naturais coletadas de pacientes com sintomas em Porto Rico onde o zika vírus está endêmico	175	163	12
Amostras naturais com resultado negativo esperado para RNA de zika que foram coletadas de pacientes que apresentavam sintomas em Porto Rico antes do surto do zika vírus. Esses pacientes foram diagnosticados com infecção pelo vírus da dengue utilizando o teste para dengue NAAT aprovado pela FDA.	60	0	60
Amostras naturais com resultado negativo esperado para RNA de zika que foram coletadas de pacientes que apresentavam sintomas em Porto Rico antes do surto do zika vírus. Esses pacientes foram diagnosticados com infecção CHIKV utilizando um teste CHIKV NAAT desenvolvido e validado pelo CDC.	56	0	56
Acordo percentual positivo (PPA)	<b>96,1% (146/152)*</b> <b>95% CI (91,7% - 98,2)</b>		
Acordo percentual negativo (NPA)	<b>100% (116/116)</b> <b>95% CI (96,8% - 100%)</b>		

\*2/6 dos casos “falso negativos” tiveram resultado positivo para RNA de zika pelo teste Trioplex do CDC somente em amostras de soro do paciente; 3/6 dos casos “falso negativos” tiveram resultado positivo para RNA de zika pelo teste Trioplex do CDC somente em amostras de urina do paciente; 1/6 dos casos “falso negativos” tiveram resultado positivo para RNA de zika pelo teste Trioplex do CDC em amostras de soro e urina do paciente

E. Dados de amostras secundárias:

Duas amostras de urina coletadas de pacientes mulheres sintomáticas com suspeita de infecção pelo vírus Zika durante a atual epidemia de Zika foram enviadas ao laboratório do CDC de Porto Rico para análise. Essas amostras foram testadas com o Trioplex rRT-PCR usando o instrumento MagNA Pure LC 2.0 e o master mix SuperScript III. As amostras também foram testadas com o conjunto de iniciador e sonda de ZIKV executado como singleplex e com um ensaio Zika NS3 rRT-PCR interno. Cada amostra foi testada juntamente com uma amostra de soro do paciente coletada no mesmo dia da coleta da urina. Os resultados são apresentados na Tabela 30.

**Tabela 30: Dados de amostra de urina**

Caso 1	DPO	Trioplex			ZIKV singleplex	Zika NS3 rRT-PCR
		DENV	CHKV	ZIKV		
Soro	3	Neg.	Neg.	32,51	33,21	34,6
Urina	3	Neg.	Neg.	29,34	28,56	31,56

Caso 2	DPO	Trioplex			ZIKV singleplex	Zika NS3 rRT-PCR
		DENV	CHKV	ZIKV		
Soro	2	Neg.	Neg.	29,23	28,56	31,05
Urina	2	Neg.	Neg.	27,45	27,12	29,6

DPO = Dias depois que começam a apresentar sintomas

Amostras de LCR e líquido amniótico:

Quatro amostras de líquido amniótico e duas de LCR, todas com resultado de vírus zika das amostras de soro associadas, foram avaliadas com a análise rRT-PCR. Os resultados da análise rRT-PCR das amostras de líquido amniótico e CSF corresponderam aos resultados de vírus Zika do soro em todos os casos.

F. Avaliação de amostras planejadas:

Os testes foram feitos em dois turnos. Para o primeiro turno, 50 amostras negativas de soro humano foram usadas para preparar amostras planejadas a fim de avaliar o desempenho do Trioplex rRT-PCR. Cada amostra foi dividida em 3 tubos. Uma alíquota de cada amostra não foi contaminada (50 do grupo de amostras 15). As alíquotas restantes (n=100) foram distribuídas em subgrupos e contaminadas com o vírus inteiro, conforme destacado nos grupos de amostras 1–13, na Tabela 31 abaixo. Para a segunda rodada de testes, 25 amostras adicionais de soro planejadas foram preparadas: 15 como definido para o grupo de amostras 14 e mais 10 negativas (grupo de amostras 15) para serem misturadas com elas.

O nível baixo de contaminação para zika (Polinésia Francesa 2013) foi de aproximadamente 1,5–3 LoD, o moderado foi de aproximadamente 100 x LoD e o alto, aproximadamente, 1.000 x LoD. Para dengue (sorotipo 2, Porto Rico de 1998) e chikungunya (Porto Rico de 2014), o nível de contaminação baixo foi de 5–10 x LoD e o alto, de 100–150 x LoD.

As alíquotas foram transmitidas sem identificação a um operador para os testes pelo Trioplex rRT-PCR. A extração foi feita usando o instrumento MagNA Pure LC 2.0, e o rRT-PCR foi feito com o master mix SuperScript III. Os resultados dos testes estão resumidos na Tabela 32. A concordância entre os resultados esperados e os resultados dos testes para todos os três conjuntos de iniciador e sonda foi de 100%.

**Tabela 31: Plano de contaminação para estudo de amostras planejadas**

Nº do grupo de amostras	N	Zika	Dengue	Chikungunya
1	5	Moderada	-	-
2	5	-	Baixa	-
3	5	-	-	Baixo
4	5	Alta	-	-
5	5	-	Alto	-
6	5	-	-	Alto
7	10	Moderado	Alto	-
8	10	Moderado	-	Alto
9	10	Alto	Baixo	-
10	10	-	Baixo	Alto
11	10	Alto	-	Baixo
12	10	-	Alto	Baixo
13	10	Alto	Alto	Alto
14	15	Baixo	Alto	Alto
15	60	-	-	-

**Tabela 32: Resumo de resultados das amostras planejadas**

	Alta positiva		Moderada positiva		Baixa positiva		Negativo	
	Testad	Positiva	Testad	Positiva	Testad	Positiva	Testad	Positivo
Zika	35	35	25	25	15	15	100	0
Dengue	50	50			25	25	100	0
Chikungunya	50	50			25	25	100	0

**Observações sobre o procedimento**

Envie comentários, sugestões e dúvidas sobre este procedimento para [LRN@cdc.gov](mailto:LRN@cdc.gov)

**Referências**

- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL. 2007. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* Maio; 13(5):764-7
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronésia, 2007. *Emerg Infect Dis.* Agosto; 14(8):1232-1239

- CDC DENV-1-4 Real Time RT-PCR Assay for detection and serotype identification of dengue virus. N° CAT de inserção de pacote KK0128. 2013. <http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/realTime.html>
- Lustig Y, Mendelson E, Paran N, Melamed S, Schwartz E. 2016. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, dezembro de 2015 a abril de 2016. Euro Surveill. 30 de junho de 2016; 21(26).
- Rios, M., Daniel, S., Chancey, C., Hewlett, I.K., Stramer, S.L. West Nile Virus Adheres to Human Red Blood Cells in Whole Blood. Clin. Infect. Dis. 2007; 45; 181-186.
- <http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>
- <http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-safety.html>