



MAC-ELISA para zika

Centros de Controle e Prevenção de Doenças

Este documento foi modificado pela Autorização de Uso de Emergência (laboratórios dos EUA) para incluir materiais usados por laboratórios fora dos EUA. Os laboratórios dos EUA devem consultar o protocolo da Autorização para Uso de Emergência (EUA) oficial, fornecido pela Rede de Laboratórios de Resposta

Instruções de uso

Índice

Introdução.....	3
Amostras.....	5
Equipamentos e consumíveis.....	6
Formulações.....	8
Controle de qualidade.....	9
Algoritmo de teste.....	11
Ensaio MAC-ELISA para zika.....	12
Interpretação de resultados de testes.....	16
Limitações do ensaio.....	18
Características de desempenho.....	20
Contato.....	24
Referências.....	24

Introdução

FINALIDADE

Este documento descreve o uso de um ensaio de imunoabsorção enzimática de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) para a detecção de anticorpos do zika vírus em pessoas que atendem aos critérios clínicos e/ou epidemiológicos dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) para teste do zika vírus.

Esse teste destina-se somente ao uso conforme descrito na orientação para teste de diagnóstico de zika do CDC e sob a Autorização de Uso de Emergência (EUA) da Food and Drug Administration (FDA). Consulte o site do CDC para obter orientação atualizada para laboratórios: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>. Laboratórios internacionais não são regidos por essas restrições.

USO PRETENDIDO

O teste MAC-ELISA para zika do CDC destina-se à detecção qualitativa de anticorpos IgM do zika vírus em soro humano ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) que é submetido junto com uma amostra de soro do paciente, coletada de indivíduos que atendem a critérios clínicos do CDC para o zika vírus (por exemplo, sinais clínicos e sintomas associados à infecção pelo zika vírus) e/ou critérios epidemiológicos do CDC para o zika vírus (por exemplo, histórico de residência ou viagem para regiões geográficas com transmissão ativa do zika vírus no momento da viagem ou outros critérios epidemiológicos para os quais o teste do zika vírus possa ser indicado como parte de uma resposta para a saúde pública). O ensaio destina-se a uso em laboratórios qualificados designados pelo CDC como parte de um algoritmo multitestado.

Os resultados do ensaio são para a suposta identificação de anticorpos de IgM para o zika vírus. Resultados positivos e resultados duvidosos não são definitivos para o diagnóstico de infecção por zika vírus. Resultados falso-positivos em pacientes com histórico de infecções de outros flavivírus são possíveis. A confirmação da presença de anticorpos IgM antizika em amostras supostamente positivas requer testes adicionais pelo CDC ou por laboratórios qualificados indicados pelo CDC e com a consultoria do CDC, usando o algoritmo emitido pelo CDC. Os laboratórios devem comunicar todos os resultados positivos às autoridades de saúde pública adequadas. Dentro dos Estados Unidos e de seus territórios, resultados equívocos e supostamente positivos devem ser informados ao CDC pelos laboratórios qualificados designados pelo CDC.

Os resultados desse teste não podem ser usados como base exclusiva de decisões de gestão de pacientes e devem ser combinados com observações clínicas, histórico de pacientes, informações epidemiológicas e outras evidências laboratoriais. Os níveis de IgM do zika durante a doença não são bem caracterizados. Os níveis de IgM são variáveis, mas geralmente são positivos a partir do dia quatro após o início dos sintomas e continuam por 12 ou mais semanas após a infecção inicial.

Resultados negativos não eliminam a possibilidade de infecção pelo zika vírus, passada ou presente. Resultados negativos podem ser vistos em amostras coletadas antes do dia quatro após o início dos sintomas ou depois que o período de IgM detectável termina.

O MAC-ELISA para o zika destina-se a uso por equipes de laboratório treinadas, proficientes na realização e interpretação de imunoenaios em laboratório qualificados designados pelo CDC. O MAC-ELISA para zika só deve ser usado sob a EUA da FDA para laboratórios dos EUA. Laboratórios fora dos Estados Unidos não são regidos pelas restrições da EUA, e esse protocolo pode ser usado como orientação.

LIMITAÇÕES DE USO DO PROTOCOLO

O ensaio MAC-ELISA descrito neste documento não foi exaustivamente testado com amostras clínicas. Não são permitidas modificações desses ensaios (ou seja, o uso de plataformas ou produtos químicos diferentes dos descritos). Esses ensaios não devem ser distribuídos sem o consentimento explícito do CDC.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Os ensaios que detectam imunoglobulina M (IgM) específica são vantajosos porque detectam anticorpos produzidos durante os primeiros dias após o início de sintomas clínicos em uma infecção primária, evidenciando a necessidade de amostras na fase de convalescência em muitos casos. A captura de IgM é a abordagem ideal para a detecção de IgM porque é simples, sensível e aplicável a amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e de soro de uma variedade de espécies animais (ex. humanos, equinos, aves).

O ensaio de imunoabsorção enzimática para captura de anticorpos de IgM (MAC-ELISA) fornece uma alternativa útil à imunofluorescência para documentação de uma resposta sorológica. O ELISA é menos subjetivo que a imunofluorescência, e grandes números de amostras podem ser processados. O anti-IgM (o anticorpo de captura) é revestido em placas de 96 poços. Isso é seguido sequencialmente adicionando o soro do paciente e, a seguir,

antígeno viral não infeccioso. A presença de antígeno é detectada usando anticorpo antiviral conjugado enzimático. Um resultado colorimétrico é gerado pela interação da enzima e um substrato cromogênico. Essa alteração colorimétrica é detectada por um espectrofotômetro (leitor de ELISA).

Amostras

AMOSTRAS ACEITÁVEIS

- Soro humano agudo e convalescente
OBSERVAÇÃO: O soro deve ser coletado em um tubo separador de soro. O tubo deve ser centrifugado e o soro decantado antes do envio para evitar a hemólise.
- Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR)
O LCR só pode ser testado quando enviado em conjunto com uma amostra de soro do paciente.

MANUSEIO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Armazene todas as amostras de diagnóstico a 2-8 °C antes do teste, e ≤ -20 °C depois que todos os testes previstos forem concluídos. Evite ciclos de congelamento e descongelamento repetidos.

As amostras de pacientes devem ser inativadas por calor por 30 minutos em banho-maria a 56 °C. Se houver alguma possibilidade de existência de vírus chikungunya na amostra, a inativação deverá ser estendida para 2 horas.

SEGURANÇA/PRECAUÇÕES

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. Se for possível a infecção pelo vírus chikungunya, os laboratoristas devem reconhecer que o vírus chikungunya produz altos níveis de viremia, e o soro de casos com suspeita de vírus chikungunya deve ser tratado como potencialmente infectante, mesmo para procedimentos sorológicos. Consulte as orientações do CDC para laboratórios de saúde pública estaduais e locais: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>. Consulte Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) para obter mais informações de biossegurança sobre esses vírus e para conhecer práticas de biossegurança em laboratório.

Esse procedimento deve ser realizado em condições de segurança laboratorial que levem em consideração a natureza potencialmente infecciosa das amostras de soro envolvidas. No mínimo, após a inativação por calor, recomenda-se que esses procedimentos sejam realizados usando instalações BSL-2 e práticas BSL-3. Para garantir a segurança da equipe do laboratório, efetue todas as manipulações de amostras dentro de um gabinete de segurança biológica (BSC) Classe II (ou mais alta).

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.

Equipamentos e consumíveis

MATERIAIS FORNECIDOS PELO CDC

OBSERVAÇÃO: Esses materiais serão fornecidos pelo CDC, Ft. Collins, CO. Para solicitar esses reagentes, envie um e-mail à Dra. Barbara Johnson em bmk8@cdc.gov. Laboratórios sob a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) devem consultar seus laboratórios de referência nacional ou a OPAS para obter assistência.

- **Antígeno normal:** antígeno Vero E6 normal liofilizado ou antígeno COS-1 normal.
- **Antígeno do zika:** Antígeno Vero E6 liofilizado do zika (inativado) preparado para uso no ELISA IgM para zika ou antígeno não infeccioso para zika produzido em COS-1.
- **Controle positivo de IgM de flavivírus:** Anticorpo monoclonal quimérico específico para flavivírus; liofilizado.
 - **Deteção de anticorpo conjugado:** Anticorpo monoclonal conjugado com rábano silvestre 6B6C-1. Disponível no CDC mediante acordo especial. As fontes comerciais são:
- Hennessy Research, catálogo nº DC153-100 (para uso especialmente com antígeno Vero E6) ou
- InBios International,
 - Item 500510: 6B6C-1/HRP conjugado (não diluído), 50 uL
 - Item 500510D: 6B6C-1/HRP conjugado (1/100 de diluição da solução-estoque), 1 mL

Controles de ensaio positivo e negativo devem ser executados simultaneamente com todas as amostras de teste.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

OBSERVAÇÃO: para materiais que requerem diluição/titulação, consulte as **Formulações** abaixo.

- IgM anti-humano (cabra) (Kirkegaard and Perry Laboratories cat. n° 01-10-03)
- Água desionizada
- Ácido clorídrico (para ajustar o pH do tampão de revestimento)
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3); (disponível em várias fontes comerciais, como Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3); (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
- Fosfato salino tamponado (PBS); (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
- Tween 20 (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
- Leite em pó desnatado (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4); (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher)
- Placas Immulon II HB de fundo chato de 96 poços, Dynatech Technologies catálogo n° 3455 (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
OBSERVAÇÃO: Essa é a única placa de 96 poços aprovada para este ensaio.
- Substrato Enhanced K-Blue TMB (3,3', 5, 5' base tetrametilbenzidina; Neogen Corp, catálogo n° 308175
- Soro humano normal – testou negativo para anticorpos do zika vírus
- Solução de parada TMB (KPL) OU 1N H_2SO_4

EQUIPAMENTOS E CONSUMÍVEIS

- Lavadora de microplacas
- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm
- Cabine de biossegurança (BSC)
- Incubadora regulada a 37 °C

- Pipetadores de canal único e multicanal (100 µL e/ou 200 µL de canal único, 100 µL e/ou 200 µL de 12 canais)
- Ponteiras de pipeta para os pipetadores listados
- Reservatórios de reagente
- Cronômetro
- Frascos de mistura de reagente; frascos de vidro esterilizados de 1 L; Gibco ou outro fornecedor
- Tubos de microcentrífuga para diluir o soro do paciente; comprar esterilizado ou autoclave e esfriar antes do uso; Corning ou outro fornecedor
- Recipientes de pesagem para medir componentes químicos secos, resistente a produtos químicos
- Marcador permanente.

Formulações

OBSERVAÇÃO: As diluições fornecidas são um ponto de partida para a titulação. Os laboratórios devem determinar a diluição ideal para seu laboratório individual. Consulte informações adicionais em Padronização de ensaios, na página 14.

- Tampão de revestimento: Tampão de carbonato/bicarbonato, pH 9,6
1,59 g de Na_2CO_3 + 2,93 g de NaHCO_3 diluídas em 1 L de água.
- Tampão de lavagem: Fosfato salino tamponado (PBS), 0,05% Tween 20, pH 7,2. O PBS está disponível em pó em várias fontes comerciais.
- Tampão de bloqueio: PBS/5% leite/ 0,5% Tween 20
- Solução de parada: 1 N H_2SO_4
- Detecção de anticorpo conjugado: O conjugado do CDC pode ser diluído a até 1:5000 em tampão de bloqueio
- Controle positivo de IgM de flavivírus: Controle positivo de IgM de flavivírus diluído até 1:3000 em tampão de lavagem
- Antígeno Vero E6 do zika: diluído a até 1:160 em tampão de lavagem; antígeno COS-1 para zika a até 1:800 em tampão de lavagem
- Antígeno Vero E6 normal: diluído a até 1:160 em tampão de lavagem; antígeno COS-1 normal a até 1:800 em tampão de lavagem
- IgM anti-humano de cabra: diluído a 1:2000 em tampão de revestimento (pode ser necessária titulação)
- Soro de paciente: diluído a 1:400 em tampão de lavagem (não é necessária titulação)

- Controle negativo: Soro humano diluído a 1:400 (não é necessária titulação)
 - Novos lotes de soro humano devem ser testados usando este protocolo como se fossem experimentais. Se a densidade óptica (DO) do antígeno viral NÃO for 2X maior que a DO do antígeno normal, pode-se presumir que é negativa.

Controle de qualidade

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- A equipe deve estar familiarizada com o protocolo e com os instrumentos utilizados.
- Use aventais descartáveis limpos e nunca usados e luvas sem talco novas durante o preparo e manuseio do reagente de ensaio. Troque as luvas sempre que suspeitar de contaminação.
- Armazene todos os reagentes a temperaturas adequadas (ver encartes dos produtos). Não use reagentes após suas datas de validade.
- Mantenha os tubos de reagente com a tampa fechada sempre que possível.
- Use somente ponteiros de pipeta com barreira de aerossol (filtro).
- Esvazie todo o lixo diariamente.

CONTROLES DE ENSAIO

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

Controles de anticorpos:

- Controle positivo: Controle positivo de IgM de flavivírus
- Controle negativo: soro humano normal.

Determinação de fundo:

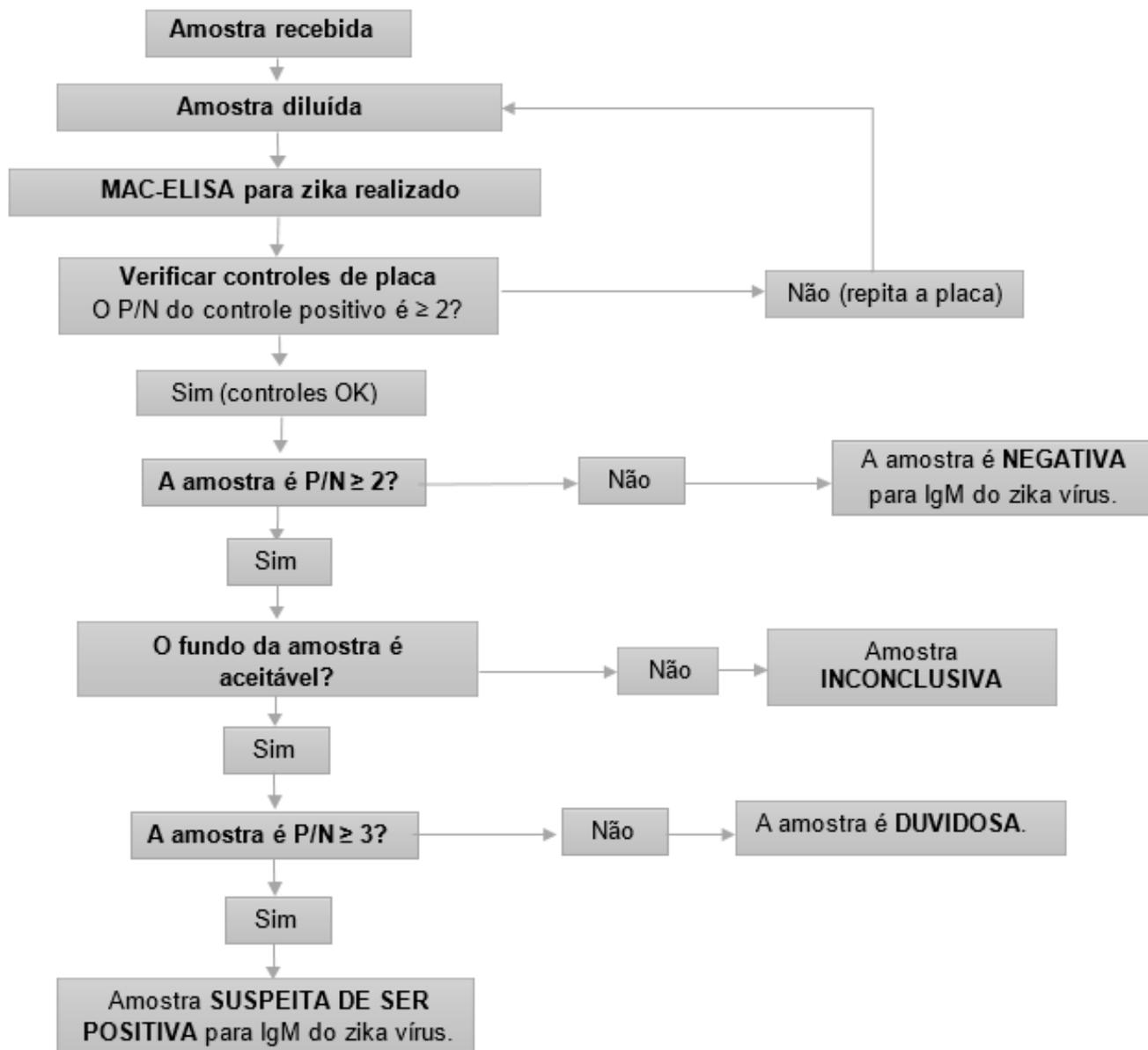
- A amostra reagiu com antígeno Vero E6 normal (para medir o sinal de fundo gerado pela amostra).

Tabela 1: Visão geral dos controles positivos e negativos

Cálculo	Razão	Resultado
Controle positivo P/N	DO média do soro de controle positivo que <u>reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (P)</u>	< 2 A placa NÃO É válida
	DO média do soro de controle negativo que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (N)	≥ 2 A placa É válida
P/N do grupo de amostras (para amostras com P/N de amostra ≥2 Consulte a Figura 1)	DO média da amostra que reagiu com o <u>antígeno Vero E6 do zika (P)</u>	< 2 A amostra é Inconclusiva
	DO média da amostra que reagiu com o antígeno Vero E6 normal	≥ 2 A amostra pode ser interpretada de acordo com o algoritmo de teste

Algoritmo de teste

Figura 1: Resumo da interpretação dos resultados dos testes



Siga os requisitos de relatório e ação especificados na Tabela 2.

Ensaio MAC-ELISA para zika

OBSERVAÇÕES SOBRE O PROCEDIMENTO ELISA:

- As placas podem ser revestidas e mantidas a 2-8 °C por até uma semana. (Consulte a etapa 2: revestimento das placas, abaixo).
- O soro de controle não diluído pode ser armazenado a 2-8 °C por até duas semanas.
- Antígenos Vero E6 virais e normais reconstituídos, não diluídos podem ser armazenados a ≤ -20 °C por um período de tempo indefinido.
- O soro de teste e controle pode ser diluído até as diluições de trabalho e refrigerado um dia antes do uso.
- Antígenos e conjugado devem ser diluídos até as diluições de trabalho imediatamente antes do uso.

OBSERVAÇÃO: O SEGUINTE PROCEDIMENTO INCLUI INFORMAÇÕES SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE E INTERPRETAÇÃO. CADA AMOSTRA DE SORO É TESTADA EM TRIPLICATA EM ANTÍGENOS VERO E6 VIRAL E NORMAL. OITO (8) AMOSTRAS DE TESTE PODEM SER ANALISADAS POR PLACA. DEVIDO AO VOLUME LIMITADO, AMOSTRAS DE LCR SÃO GERALMENTE TESTADAS SOMENTE INDIVIDUALMENTE.

1. PREPARAÇÃO DA PLACA:

Determine o número de placas ELISA necessárias. Usando um marcador permanente de ponta fina, numere e rotule as placas de 96 poços. Identifique a localização de cada amostra clínica (S1-S8) usando um modelo correspondente (Consulte a Fig. 2). *Para manter o timing de adição de reagente consistente, processe as placas na ordem de numeração durante todas as etapas do procedimento.* As placas devem ser mantidas em ambiente fechado e umidificado durante todo o tempo de incubação, com exceção da etapa de revestimento. Um saco tipo Ziploc grande contendo papel toalha úmido funciona bem para essa finalidade.

2. REVESTIMENTO DAS PLACAS:

- Dilua o IgM anti-humano (cabra) a 1:2000 em tampão de revestimento, pH 9,6.
- Revista os 60 poços internos da placa de 96 poços com 75 μ L por poço de IgM anti-humano (cabra) diluído. Deixe as colunas externas vazias (consulte a Fig. 2).
- Incube a **2-8 °C durante a noite**. As placas devem permanecer a 2-8 °C até serem necessárias para o teste, por até uma semana.

3. BLOQUEIO DAS PLACAS:

- Após a incubação à noite, descarte o anticorpo de revestimento.
- Seque as placas com papel toalha ou outro material absorvente.
- Bloqueie as placas com 200 µL de tampão de bloqueio por poço.
- Incube à temperatura ambiente por 30 minutos.

4. LAVAGEM DAS PLACAS:

- Lave os poços 5X com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
- Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo (i.e. 300 µL).

5. ADIÇÃO DE AMOSTRAS/CONTROLES:

- Dilua o soro do paciente a 1:400 em tampão de lavagem.
- Adicionam-se 50 µL por poço de soro do paciente diluído (S) a um bloco de 6 poços ou LCR não diluído a apenas dois poços. O LCR será testado individualmente para os antígenos Vero E6 viral e normal.

OBSERVAÇÃO: O LCR pode ser diluído até no máximo 1:5 em tampão de lavagem se necessário para obter volume suficiente para o teste.

- Adicione 50 µL de controle positivo de IgM de flavivírus (Ref) diluído em tampão de lavagem de acordo com uma titulação previamente determinada.
- Dilua o controle negativo de soro humano (N) 1:400 em tampão de lavagem.
- Adicione 50 µL de controle negativo de soro humano (N) diluído (1:400 em tampão de lavagem) para bloqueio de 6 poços.
- Incube as placas por **1 hora a 37 °C** em câmara umidificada.

6. LAVAGEM DAS PLACAS:

- Lave os poços 5X com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
- Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo.

7. ADIÇÃO DE ANTÍGENO:

- Dilua o antígeno do **zika** em tampão de lavagem de acordo com uma titulação previamente determinada.
- Dilua o antígeno **normal** em tampão de lavagem com a mesma concentração do antígeno **do zika**.
- Adicione 50 µL de antígeno Vero E6 do **zika** por poço aos três poços esquerdos de cada bloco de soro (consulte a Fig. 2).

- Adicione 50 μL de antígeno **normal** diluído por poço aos três poços diretos de cada bloco (consulte a Fig. 2).
 - Incube as placas **durante a noite a 2-8 °C** em uma câmara umidificada.
8. LAVAGEM DAS PLACAS:
- Lave os poços 5X com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
 - Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo.
9. ADIÇÃO DE CONJUGADO:
- Dilua o anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre em tampão de bloqueio de acordo com uma titulação previamente determinada.
 - Adicione 50 μL de anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre por poço.
 - Incube as placas por **1 hora a 37 °C** em câmara umidificada.
10. Ligue o leitor de placas para aquecimento.
11. Remova o TMB-ELISA da geladeira.
12. LAVAGEM DAS PLACAS:
- Lave os poços 5X **duas vezes** com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
 - Vire as placas a 180° na lavadora após a primeira série de 5 ciclos. Isso oferece resultados consistentes.
 - Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo.
13. ADIÇÃO DE SUBSTRATO:
- Com a placa à temperatura ambiente (20 a 25 °C), adicione 75 μL de substrato TMB por poço a todos os poços.
 - Cubra imediatamente as placas para bloquear a luz. Incube à temperatura ambiente por 10 minutos.
 - Uma cor azul se desenvolverá em poços positivos para anticorpos.
14. ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE PARADA:
- Adicione 75 μL de solução de parada KPL TMB por poço a todos os poços, incluindo as linhas externas de poços da placa OU adicione 50 μL de 1N H_2SO_4 a todos os poços.

OBSERVAÇÃO: o leitor de placas deve ser ajustado para zero no poços A1, B1, C1 e D1.

- Os poços que estavam azuis agora mudarão para amarelo.
- Deixe as placas em repouso à temperatura ambiente por 1 minuto.
- Leia as placas em leitor de microplacas usando um filtro de 450 nm.

Figura 2: Exemplo de disposição para 8 amostras e controles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO
B	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
C	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
			S1		S3		S5		S7		REF	
D	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
E	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
F	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
		S2		S4		S6		S8		N		
G	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
H	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO

O MAC-ELISA deve ser padronizado e validado antes do uso em laboratório, e a repadronização periódica é necessária. Isso deve ocorrer quando novos números de lotes de reagentes forem introduzidos e, no mínimo, uma vez por ano. Recomenda-se que a densidade óptica média do soro de controle positivo que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika seja definida para aprox. 1,0. O soro de controle normal que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika deve ser < 0,2 (isso varia). A padronização de reagentes é normalmente atingida por meio de titulação, sempre comparando as densidades ópticas dos reagentes ao reagir em antígeno Vero E6 viral e normal. A padronização e a repadronização podem ser confirmadas testando os painéis de verificação.

Interpretação de resultados de testes

DETERMINAÇÃO DA VALIDADE DO TESTE

Antes que os resultados possam ser determinados para cada amostra clínica, deve-se determinar que o teste é **válido**. Para que um teste seja válido, a seguinte relação deve ser maior ou igual a 2,0. **Esse é o P/N do controle positivo.**

DO média do controle positivo do IgM de flavivírus que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (P)

DO média do controle negativo que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (N)

A validade do teste deve ser determinada para cada placa. Os resultados para amostras clínicas só podem ser determinados se o teste for válido. Se o teste não for válido, essa placa deverá ser repetida. Se o P/N do controle positivo ainda falhar após uma repetição, um ou mais dos reagentes ou parâmetros de teste estava provavelmente errado, e o diagnóstico de falhas deve ser realizado.

DETERMINAÇÃO DE P/N DA AMOSTRA

Para determinar se as amostras clínicas (S1-S8) contêm IgM do zika vírus (o que indicaria recentes infecções por esse vírus), o seguinte deve ser calculado:

DO média da amostra de teste que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (P)

DO média do soro humano normal que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (N)

Esse é o P/N da amostra de teste.

Todas as amostras para as quais a relação P/N da amostra é < 2 , reportar como **negativa**. Não são necessárias análises adicionais. Consulte a Tabela 2 abaixo.

AVALIAÇÃO DO FUNDO DA AMOSTRA

Para cada amostra com P/N da amostra ≥ 2 , determine se fundo não específico está sendo gerado.

O valor de P (média da amostra de teste que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika) da amostra de teste deve ser maior ou igual a duas vezes (2X) a DO média da amostra de teste que reagiu com o antígeno Vero E6 normal. Se esse requisito não for atendido, o fundo não específico está sendo gerado, e o resultado **DEVE** ser

reportado como **inconclusivo**. Amostras inconclusivas devem ser testadas novamente. Se o teste repetido também produzir resultados inconclusivos, envie a amostra para análise adicional e/ou solicite a coleta de soro adicional para análise. Se o requisito for atendido, proceda à interpretação do resultado da amostra.

ANÁLISE DE RESULTADOS POSITIVOS E DUVIDOSOS

Todos os valores P/N de amostras maiores ou iguais a 3,0 devem ser reportados como suspeita de IgM positivo (consulte a tabela abaixo), contanto que atendam aos requisitos acima mencionados. Caso um LCR ou soro agudo inicial seja negativo de acordo com esse teste, uma amostra de soro convalescente deve ser solicitada e testada para que esse paciente seja reportado como negativo para evidência sorológica de infecção viral recente. Sem testar uma amostra convalescente, um resultado negativo poderá refletir teste de uma amostra da fase aguda obtida antes do anticorpo atingir níveis detectáveis.

Os valores P/N entre 2,0 e 3,0 devem ser considerados **duvidosos**. Testes adicionais devem ser realizados para determinar o status dessas amostras (consulte a Tabela 2 abaixo).

Deve-se enfatizar que o valor P/N de amostra na diluição de triagem de 1:400 não é uma indicação de concentração absoluta de anticorpos, i.e., o valor P/N não é quantitativo.

Tabela 2: Interpretação de resultados do MAC-ELISA para zika

P/N da amostra de teste	Interpretação	Relatório	Ação
< 2	Negativo	Nenhuma evidência de infecção por zika vírus detectada.	Reporte os resultados. Se a amostra for da fase aguda inicial, consulte as instruções de interpretação acima.
$2 \leq P/N < 3$	Duvidoso	Os resultados do MAC-ELISA para zika foram duvidosos quanto à presença de anticorpos antizika vírus.	Envie um relatório ao CDC junto com a amostra para teste confirmatório.
≥ 3	Suspeita de positivo	Evidência sorológica de possível infecção por zika vírus identificada. É necessário teste adicional.	Envie um relatório ao CDC junto com a amostra para teste confirmatório.

Todos os resultados positivos devem ser relatados ao CDC via ArboNET.

Para obter informações sobre o algoritmo de teste do zika, consulte a orientação do CDC para laboratórios de saúde pública estaduais e locais: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>

Para obter instruções de encaminhamento de amostras, consulte:

<http://www.cdc.gov/zika/hc-providers/diagnostic.html>

Limitações do ensaio

A interpretação dos resultados do MAC-ELISA para zika deve considerar a possibilidade de resultados falso-negativos e falso-positivos. Os resultados falso-negativos podem resultar de:

- Coleta de amostra realizada antes da IgM ter atingido níveis detectáveis (tipicamente aproximadamente 4 dias após o início dos sintomas).
- Coleta de amostra realizada depois que os níveis de IgM atingiram níveis detectáveis

(tipicamente aproximadamente 12 semanas após o início dos sintomas).

- Falha em seguir os procedimentos autorizados do ensaio.

O caso mais comum de resultado positivo falso é reatividade cruzada com IgM específico de outros flavivírus, como o vírus da dengue. Somente avaliação limitada de reatividade cruzada com flavivírus ou arbovírus foi realizada. Não foi feita nenhuma avaliação de reatividade cruzada com fator reumatoide. Dados clínicos indicam que reatividade cruzada com anticorpos de vírus contra a dengue é possível. São necessários testes de acompanhamento para eliminar resultados falso-positivos. A confirmação da presença de anticorpos IgM antizika requer testes adicionais pelo CDC ou por laboratórios designados pelo CDC. O método padrão ouro para confirmação da presença de anticorpos antizika é o teste de neutralização por redução de placas (PRNT).

Todos os testes de zika devem ser realizados seguindo as orientações e os algoritmos de teste do laboratório de zika emitidos pelo CDC: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>.

Os resultados negativos não descartam infecções pelo zika vírus 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.

Este 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. Laboratórios internacionais não são regidos pelas restrições da EUA da FDA.

Todas as amostras devem ser manipuladas como se estivessem infectadas. Precauções adequadas de biossegurança, inclusive equipamento de proteção individual, devem ser aplicadas na manipulação dos materiais das amostras.

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

O desempenho só foi estabelecido com os tipos de amostras listados no tópico Uso Pretendido. Outros tipos de amostras não são aceitáveis para uso com este ensaio.

Vale ressaltar que, a partir de abril de 2016, qualquer paciente cuja amostra produza resultados de PRNT positivos (ou seja, ≥ 10) para zika vírus e vírus da dengue será agora classificado como infectado por “flavivírus”. O vírus da infecção só será especificado se um resultado for positivo e o outro, negativo. A diferença anterior de 4 vezes para identificar a infecção demonstrou ser incorreta em vários casos e foi agora abandonada somente para diagnóstico de zika.

Características de desempenho

Reatividade cruzada

Reatividade cruzada com flavivírus

Soros conhecidos em banco do repositório do CDC foram selecionados para avaliar a reatividade cruzada do MAC-ELISA para zika. Não foi observada nenhuma reatividade cruzada entre o MAC-ELISA para zika e flavivírus que não a dengue.

Tabela 3: Resumo de reatividade cruzada com flavivírus

Flavivírus	Descrição da amostra	Amostras testadas	Negativo por MAC-ELISA para zika
WNV	Soros de casos confirmados de vírus do Nilo ocidental.	4	4 (100%)
SLE	Soros de casos confirmados de encefalite de São Luís	1	1 (100%)
YFV	Soros de indivíduos vacinados contra o vírus da febre amarela	4	4 (100%)
JEV	Soros de indivíduos vacinados contra o vírus da encefalite japonesa	2*	2 (100%)

*Dois soros dentro do grupo de recipientes cujos pacientes foram vacinados contra a febre amarela vieram de indivíduos que também foram vacinados contra a encefalite japonesa, portanto são um subconjunto das amostras da linha acima.

O vírus da dengue não foi incluído na avaliação de reatividade cruzada. Dados de testes clínicos apresentados abaixo demonstram reatividade cruzada significativa do MAC-ELISA para zika a anticorpos IgM do vírus contra a dengue.

Reatividade cruzada de não flavivírus

Não foi realizado nenhum estudo experimental com o MAC-ELISA para zika para determinar reatividade cruzada com IgM contra não flavivírus. Entretanto, a literatura (Martin, et al., 2000) indica que somente reatividade cruzada mínima é esperada com IgM contra alfavírus e buniavírus.

Os arbovírus foram originalmente divididos em três grupos com base em diferenças sorológicas significativas, conforme caracterizado por técnicas sorológicas iniciais rudimentares. Essas divisões permanecem: Vírus do grupo A são agora alfavírus; os do grupo B são agora flavivírus; os do grupo C são agora bunivírus. À medida que os métodos sorológicos evoluíram, as distinções sorológicas que originalmente definiam os grupos significam que reatividade cruzada entre os grupos em imunoenaios não é esperada.

Desempenho clínico

Desempenho com amostras dos EUA enviadas ao CDC, Ft. Collins, de 2015 até o presente

No período entre janeiro de 2015 e 13 de fevereiro de 2016, 167 amostras de soro e 2 de LCR foram testadas pelo MAC-ELISA para zika do CDC e pelo ensaio PRNT para Zika do CDC.

Resumo de desempenho clínico com soro

Dos 167 registros de teste de soro, um subconjunto continha amostras emparelhadas de sangrias seriais. Das sangrias seriais, somente a primeira sangria positiva para IgM ou duvidosa foi incluída. Se ambas as sangrias seriais foram negativas, somente a primeira foi incluída. O conjunto de dados resultante usado nessa análise é 161 soros. Um resumo dos resultados desses soros é apresentado na Tabela 4. Quarenta e quatro desses registros de teste indicaram que eram de gestantes. Um resumo dos dados desse subconjunto de soros de gestantes é apresentado na Tabela 5.

Tabela 4: Dados de soros enviados ao CDC Ft. Collins para testes de 2015 até o presente

		Resultados de PRNT			
		zika	flavivírus	dengue	negativo
MAC-ELISA para zika	positivo	45	16	23	9
	duvidoso	1	0	9	13
	negativo	0	0	6	39

Acordo percentual positivo (somente positivos para zika definitivos em PRNT): $45/46 = 97,8\%$ (95% CI: 88,7% a 99,6%)

Acordo percentual negativo: $45/99 = 45,5\%$ (95% CI: 36,0% a 55,3%)

Tabela 5: Dados de soros de gestantes enviados ao CDC Ft. Collins para teste de 2015 até o presente

		Resultados de PRNT			
		zika	flavivírus	dengue	negativo
MAC-ELISA para zika	positivo	3	2	1	3
	duvidoso	0	0	2	8
	negativo	0	0	1	24

Acordo percentual positivo (somente positivos para zika definitivos em PRNT): $3/3 = 100\%$ (95% CI: 43,9% a 100%)

Acordo percentual negativo: $25/39 = 64,1\%$ (95% CI: 48,4% a 77,3%)

Resumo dos dados de LCR

Ambas as amostras de LCR testadas pelo CDC produziram resultados positivos de infecção pelo zika vírus tanto pelo MAC-ELISA para zika quanto pelo PRNT. Os resultados de LCR foram de acordo com o teste de soro emparelhado.

Avaliação de desempenho com infecções primária e secundária pelo zika, estado de Yap, Micronésia, 2007

O MAC-ELISA para zika do CDC foi incluído em uma bateria de métodos imunológicos de flavivírus do MAC-ELISA do CDC e PRNT para avaliação de amostras de soro emparelhadas de 11 casos de zika vírus identificados em um surto de zika no estado de Yap, Micronésia, em 2007 (Lanciotti, et al., 2008). No momento desse surto, o MAC-ELISA para zika empregava sacarose-acetona extraída sugando o antígeno do cérebro de camundongos. Quatro dos 11 casos são infecções primárias por flavivírus, e sete são prováveis infecções secundárias por flavivírus.

Dos soros emparelhados coletados e avaliados na publicação, somente um paciente tinha pelo menos uma amostra de soro dentro do nosso período alegado de ≥ 4 dias após o início dos sintomas e < 12 semanas após o início dos sintomas. Para cada um dos dez casos restantes, a primeira amostra de soro coletada dentro do nosso período alegado está incluída em nossa análise.

Os resultados do MAC-ELISA para zika para essas amostras são comparados aos seus resultados do teste de neutralização por redução de placas (PRNT), o padrão ouro para teste imunológico de flavivírus.

Tabela 6: Resumo de resultados do MAC-ELISA para zika e PRNT para flavivírus para as primeiras amostras dentro do período para infecções por zika primárias e secundárias no estado de Yap, Micronésia, 2007

	Caso	Amostra	Dias após o início dos sintomas	MAC-ELISA para zika	PRNT (7 flavivírus)
Infecções primárias	822	822a	5	23,2	zika
	830	830b	21	16,3	zika
	849	849b	18	18,2	zika
	862	862a	6	25,4	zika
Infecções secundárias prováveis	817	817b	19	8,1	flavivírus
	833	833b	19	3,1	zika
	844	844b	16	12,7	dengue
	955	955b	14	10,9	flavivírus
	968	Nenhuma amostra dentro do período alegado			
	839	839b	20	17,2	zika
	847	847a	5	0,94	febre amarela

		Resultados de PRNT (7 flavivírus)			
		zika	flavivírus	dengue	febre amarela
MAC-ELISA para zika	Positivo	6	2	1	0
	Negativo	0	0	0	1

Infecções primárias:

Os quatro casos identificados como infecções primárias produziram resultados positivos do MAC-ELISA para zika para sua amostra de soro inicial dentro do período. Essas quatro amostras também produziram resultados positivos pelo PRNT para infecção pelo zika vírus.

Infecções secundárias (prováveis):

Dos seis casos com amostras de soro dentro do período, cinco produziram resultados positivos para as amostras de soro iniciais dentro do período pelo MAC-ELISA para zika. Duas delas (833b e 839b) produziram resultados claramente positivos para infecção pelo zika vírus pelo PRNT. Duas outras amostras (817b e 955b) produziram resultados maiores pelo

PRNT para zika vírus do que qualquer outro flavivírus testado. Entretanto, esses resultados não foram 4 vezes maiores que todos os outros resultados, portanto foram interpretados como positivos para flavivírus pelo PRNT. A amostra restante produziu resultados positivos no MAC-ELISA para zika e resultados 4 vezes mais altos no PRNT para dengue do que para zika, a única amostra para a qual o PRNT não concordou com o MAC-ELISA para zika.

A amostra 847a, uma amostra do dia 5, foi negativa no MAC-ELISA para zika e foi positiva para o vírus da febre amarela no PRNT. Não foi observado nenhum efeito de neutralização para zika pelo PRNT. Portanto, os resultados do MAC-ELISA e do PRNT para essa amostra estão de acordo.

Contato

Perguntas ou comentários sobre este procedimento podem ser direcionados a ajj1@cdc.gov

Referências

Johnson, AJ, Martin, DA, Karabatsos, N and Roehrig, JT. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clinical Microbiology*, 38:1827-1831, 2000.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, and Winn Jr. WC , (Eds). *Diagnosis of Infections caused by Viruses, Chlamydia, Rickettsia*, Diagnostic Microbiology, 4ª edição, JB Lippicott Co: 956-1074, 1992.

Lanciotti, RS, O.L. Kosoy, J.J. Laven, J.O. Velez, A.J. Lambert, A.J. Johnson, S.M. Stanfield, and M.R. Duffy. *Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronésia, 2007*. *Emerg Infect Dis*. 2008 (Ago); 14(8): 1232-1239.

Monath, TP, Nystrom, RR, Bailey, RE, Calisher, CH, and Muth, DJ:

Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis. *Journal of Clinical Microbiology* 20:784-790, 1984.

Martin, DA., Muth, DA., Brown, T., Karabatsos, N., and Roehrig, JT.

Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays (MAC-ELISA) for routine diagnosis of arboviral infections. *Journal of Clinical Microbiology* 38:1823–1826, 2000.

Tsai, TH: *Arboviruses*, In Rose NR, Marcario EC, Fahey JL, Friedman H, and Penn GM, (Eds): *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 4ª edição, American Society for Microbiology: 606- 618, 1976.

Idioma inglês, versão acessível: <http://www.cdc.gov/zika/pdfs/non-eua-zika-mac-elisa-protocol.pdf>