

**RIDASCREEN® Zika Virus IgG capture,
RIDASCREEN® Zika Virus IgM μ -capture**

REF K8421
K8431



1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Os testes RIDASCREEN® Zika Virus são ensaios imunoenzimáticos para a detecção qualitativa de anticorpos IgG ou IgM para o vírus Zika em soro e plasma humanos.

Os testes devem ser usados em casos de suspeita de infecção com o vírus Zika.

2. Sumário e explicação do teste

O vírus Zika é um vírus RNA de fita simples da família Flaviviridae, do gênero Flavivirus.

Os vírus Zika são transmitidos principalmente por mosquitos pertencentes às espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*. No entanto, existem relatórios de tipos de transmissão menos comuns, entre outros, transfusões de sangue, transmissão perinatal e contato sexual.

O período de incubação exato da febre Zika não é conhecido, porém será provavelmente de poucos dias.

É estimado que apenas uma de cada cinco pessoas infectadas com o vírus Zika desenvolvem sintomas. As manifestações clínicas são similares às da infecção com vírus da dengue ou vírus Chikungunya, tendo normalmente uma evolução mais leve. Os sintomas mais comuns são erupção cutânea maculopapular, febre leve, artralgia, mialgia, cefaleia e conjuntivite. Os sintomas menos comuns são edemas, dor de pescoço, tosse, vômitos e hematospermia. Em seres humanos, as infecções geralmente são leves e autolimitantes, e os sintomas desaparecem de forma espontânea, em geral, entre três e sete dias. A artralgia pode durar até um mês. Em casos raros, a síndrome de Guillain-Barré (GBS), uma doença do sistema nervoso periférico, também pode se desenvolver após uma infecção pelo vírus Zika. Atualmente, é considerada provável uma correlação entre a infecção do vírus Zika na gravidez e defeitos cerebrais no feto.

Como resultado da resposta do sistema imunológico, o corpo produz anticorpos específicos para o patógeno após ter sido infectado com o vírus Zika. Esses anticorpos podem ser detectados no soro com a ajuda de métodos imunológicos. A seleção do antígeno específico do patógeno usado e o método de teste aplicado são importantes para a validade de um teste.

3. Princípio do teste

Os anticorpos IgG anti-humano e IgM anti-humano são ligados a uma placa de microtitulação. Os anticorpos IgG ou IgM presentes nos espécimes do paciente se ligam aos anticorpos IgG ou IgM anti-humanos. O material de espécime não ligado é removido por lavagem. Em seguida, são adicionados os antígenos do vírus Zika marcados por enzimas. Este conjugado de antígenos é ligado aos anticorpos IgG ou IgM ligados específicos. Em uma segunda etapa de lavagem, o conjugado não

ligado **Conjugate** é removido. A enzima transforma um substrato incolor (H_2O_2/TMB) em um produto final azul.

A reação enzimática é interrompida pela adição de ácido sulfúrico. Esta adição faz com que a cor mude de azul para amarelo. A medida final é tomada em um fotômetro a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm).

4. Conteúdo da embalagem

Tab. 1: Reagentes fornecidos (os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 96 exames.)

			K8421 IgG	K8431 IgM
Plate	96 exames	Placa de microtitulação: 12 tiras de microtitulação (separáveis) em uma estrutura; revestidas com anticorpos IgG anti-humanos	X	
Plate	96 exames	Placa de microtitulação: 12 tiras de microtitulação (separáveis) em uma estrutura; revestidas com anticorpos IgM anti-humanos		X
Diluent	100 ml	Diluição de amostra, pronta para usar; tampão de fosfato, coloração amarela	X	X
Wash	50 ml	Tampão de lavagem, 20X concentrado; tampão de fosfato	X	X
Control IgG + Tampa vermelha	2 ml	IgG de controle positivo, pronto para usar; soro humano ou plasma diluído, coloração amarela	X	
Control IgG - Tampa azul	2 ml	IgG de controle negativo, pronto para usar; soro humano ou plasma diluído, coloração amarela	X	
Cut-off IgG Tampa verde	3 ml	Controle de IgG limite, pronto para usar; soro humano ou plasma diluído, coloração amarela	X	
Control IgM + Tampa vermelha	2 ml	Controle de IgM positivo, pronto para usar; soro humano ou plasma diluído, coloração amarela		X
Control IgM - Tampa azul	2 ml	IgM de controle negativo, pronto para usar; soro humano ou plasma diluído, coloração amarela		X
Cut-off IgM Tampa verde	3 ml	IgM de controle limite, pronto para usar; soro humano ou plasma diluído, coloração amarela		X
Conjugate IgG Tampa preta	15 ml	Conjugado de vírus Zika; pronto para usar; conjugado de poliperoxidase do antígeno de vírus Zika, coloração azul	X	
Conjugate IgM Tampa preta	15 ml	Conjugado de vírus Zika; pronto para usar; conjugado de poliperoxidase do antígeno de vírus Zika, coloração vermelha		X
Substrate Tampa amarela	15 ml	Substrato, pronto para usar; H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina	X	X
Stop Tampa vermelha	15 ml	Solução bloqueadora, pronta para usar; ácido sulfúrico 0,2 mol/l	X	X

As informações sobre as substâncias perigosas cumprem com os requisitos de marcação. Consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com, para obter mais detalhes.

5. Instruções de armazenamento

O kit de testes pode ser usado até a data de validade impressa no rótulo quando armazenado a 2 - 8 °C. O tampão de lavagem diluído tem uma duração de quatro semanas quando armazenado a 2 - 8 °C e de cinco dias quando armazenado a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.

Abra a bolsa de alumínio que contém a placa de microtitulação sem separar a vedação de encaixe. Guarde as tiras de microtitulação não utilizadas na embalagem de alumínio.

Evite a contaminação dos reagentes e luz direta sobre o substrato incolor.

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

6.1. Reagentes

–Água destilada ou deionizada

6.2. Acessórios

–Ampolas de espécime

–Incubadora a 37 °C

–Misturador vórtice

–Micropipetas para volumes de 10 - 100 µl e 100 - 1000 µl

–Cilindro graduado (1000 ml)

–Lavador para placas de microtitulação ou pipetas multicanal

–Fotômetro para placas de microtitulação (450 nm e filtro de referência de ≥ 620 nm)

–Filtro de papel (toalhinhas de laboratório)

–Recipiente de descarte com solução de hipoclorito a 0,5%

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para uso em diagnóstico *in-vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. Observe as diretrizes para trabalho em laboratórios médicos. As instruções de uso para realizar este teste devem ser seguidas à risca. Não despeje espécimes ou reagentes pela boca e evite o contato com membranas mucosas ou pele lesionada. Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os espécimes e lave as mãos após concluir o teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo processadas.

Consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com, para obter mais detalhes.

O soro de controle que se encontra no kit (controle positivo, controle de limite e controle negativo) foi testado para HIV Ab, HCV Ab e HBsAg dando resultado

negativo. Eles devem ser tratados como potencialmente infecciosos, do mesmo modo que os espécimes do paciente e todos os materiais que tocar, devendo ser manuseados de acordo com as regulamentações de segurança nacionais.

Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Obedeça às regulamentações de descarte nacionais.

8. Coleta e armazenamento de amostra

Este teste foi desenvolvido para o exame de espécimes de soro e plasma humanos. Depois de coletar o sangue, para evitar hemólise, o soro deve ser separado do sangue coagulado com a maior rapidez possível. Os espécimes devem ser mantidos frios ou congelados até o teste. É necessário evitar o congelamento e descongelamento repetidos de espécimes devido a contaminação bacteriana. A utilização de espécimes inativados pelo calor, lipêmicos, hemolíticos, icteríticos ou opacos podem levar a resultados falsos.

Tab. 2: Armazenagem de espécimes

Soro ou plasma não diluído		Soro ou plasma diluído
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Realização do teste

9.1. Geral

Antes de usar, coloque todos os reagentes e tiras de microtitulação em temperatura ambiente (20 - 25 °C). Quando tiver chegado à temperatura ambiente, retire as tiras de microtitulação da embalagem de alumínio. Misture bem os reagentes imediatamente antes do uso. Após o uso, armazene o kit rapidamente a 2 - 8 °C. Para realizar o teste, utilize apenas os reagentes que necessitar. Não devolva o reagente ao recipiente para não causar contaminações.

As tiras de microtitulação não podem ser utilizadas mais de uma vez. Não utilize reagentes e tiras de microtitulação se a embalagem estiver danificada ou se os frascos não estiverem bem selados.

9.2. Produção do tampão de lavagem

Misture 1 parte de concentrado de tampão de lavagem **Wash** com 19 partes de água destilada. Para isso, adicione 50 ml de concentrado em um cilindro de 1000 ml e complete com água destilada até 1000 ml. Todos os cristais presentes no concentrado devem ser dissolvidos com antecedência, com calor (banho de água a 37 °C). O tampão de lavagem diluído tem uma duração de cinco dias quando armazenado a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

Os espécimes de soro ou plasma a serem testados serão diluídos com o diluente de amostra **Diluent** 1 + 100 antes de começar o teste.

Por exemplo, 10 µl de soro + 1 ml de diluente **Diluent**

Atenção!

O controle de limite, controle negativo e controle positivo estão prontos para usar e não devem ser diluídos.

9.4. Primeira incubação

Depois de introduzir um número suficiente de poços no quadro, pipete 100 µl de cada soro diluído, controles prontos para usar **Control -**, **Control +**, e de limite **Cut-off** nos poços respectivos; a posição A1 (valor em branco do substrato) permanece vazia. É recomendado realizar o controle de limite **Cut-off** duas vezes. A placa será incubada por 60 minutos na incubadora a 37 °C.

A base dos poços não deve entrar em contato com materiais que conduzam calor facilmente. A placa de microtitulação deve ser revestida com a lâmina de proteção fornecida durante a incubação.

A1	Valor em branco do substrato
B1	Controle negativo
C1	Controle de limite
D1	Controle de limite
E1	Controle positivo
F1, G1	Soro do paciente 1, 2, etc.

Atenção!

Não coloque a placa de microtitulação em um recipiente de incubação frio que não será aquecido a 37 ° até o momento da incubação. O recipiente deverá ser adaptado previamente a 37 °C.

9.5. Lavagem

Esvazie os poços em um recipiente de descarte com solução de hipoclorito para desinfecção. Em seguida, bata a placa sobre papel absorvente para remover a umidade restante. Lave então a placa três vezes, usando 300 µl de tampão de lavagem cada vez. Após cada lavagem, bata a placa sobre uma área do papel não usada para garantir que fique completamente vazia.

Quando for usada uma lavadora, certifique-se de que a máquina é ajustada corretamente ao tipo de placa. Após a lavagem, bata a placa sobre papel absorvente limpo para remover a umidade residual.

9.6. Segunda incubação

Adicione 100 µl de conjugado **Conjugate** aos respectivos poços exceto o A1 (valor em branco do substrato). Em seguida, incube a placa em um incubador por 30 minutos a 37 °C (ver 9.4.).

9.7. Lavagem

Lave três vezes do modo descrito em 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adicione 100 µl de substrato **Substrate** a todos os poços, incluindo a A1 (valor em branco do substrato). Em seguida, incube a placa por exatamente 15 minutos no escuro, em temperatura ambiente (20 - 25 °C). Adicione 100 µl de solução bloqueadora **Stop** a todos os poços para bloquear a reação, o que fará com que a cor mude de azul para amarelo. Depois de misturar a placa com cuidado (batendo delicadamente na borda da placa), a extinção será medida em um fotômetro da placa a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm). A comparação do valor zero é realizada com o valor em branco do substrato (posição A1).

10. Controle de qualidade - indicações da expiração do reagente

Para o controle de qualidade, os controles positivo, negativo e de limite devem ser realizados sempre que o teste for realizado. O controle de limite é realizado em dobro e o valor médio determinado por duas medições individuais. O teste foi realizado corretamente se a taxa de extinção (OD) dos controles atender os seguintes critérios:

Tab. 3: Critérios de controle de qualidade

	OD
Valor em branco do substrato	< 0,100
Controle negativo	< limite
Controle de limite	0,150 - 1,300
Controle positivo	> limite

Um desvio dos valores esperados, bem como nebulosidade ou coloração azul do substrato incolor antes de ser adicionado aos poços, podem ser indicação de reagente vencido.

Se os valores especificados não forem obtidos, verifique o seguinte antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- O desempenho funcional do equipamento utilizado (por ex., a calibração)
- Execução correta do teste
- Inspeção visual dos componentes do kit, à procura de contaminação ou vazamentos; se a solução de substrato ficou azul, ela não deve ser mais usada.

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do índice de espécimes

1. O valor de extinção médio do controle de limite será calculado.
2. A extinção do espécime do paciente é dividida pelo valor de extinção médio do controle calculado do controle de limite.

Por exemplo:

Controle de limite 1	OD = 0.440
Controle de limite 2	OD = 0.420
Valor médio:	= 0.430
Espécime	OD = 1.591

$$\text{Índice de amostras} = \frac{1,591}{0,430} \times 10 = 37$$

Tab. 4: Análise de índice de espécimes

	Negativo	Limítrofe	Positivo
Índice de espécimes	< 9	09 - 11	> 11

12. Limitações do método

RIDASCREEN® Zika Virus IgG capture e IgM μ -capture ELISA detectam anticorpos IgG ou IgM dos vírus Zika. Uma conexão entre o valor de extinção medido e a presença ou severidade de sintomas clínicos não pode ser obtida. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em conexão com os sinais clínicos e com os sintomas.

Um resultado negativo não descarta uma infecção existente. Em uma etapa anterior à infecção, a produção de anticorpos pode continuar sendo tão baixa que o teste de anticorpos será negativo. Se houver suspeita clínica presente, uma amostra de soro de acompanhamento deveria ser testada.

Geralmente, nos testes serológicos, para aprimorar a validade do diagnóstico, devem ser testados dois soros consecutivos do paciente. O curso da titulação é importante para a interpretação de um achado.

Um resultado positivo não descarta a presença de outros patógenos infecciosos como a causa de uma doença.

O teste de um painel de espécimes usando atividades de anticorpos contra parâmetros potencialmente de reação cruzada não pode detectar indicações significantes de resultados falso-positivos devido a reatividades cruzadas. No entanto, em áreas endêmicas, devem ser levadas em consideração infecções duplas e infecções passadas com outros flavivírus.

13. Características de desempenho

Tab. 5: Variância interensaio (n = 12)

Variância interensaio	IgG		IgM	
	U/ml	CV	U/ml	CV
Soro 1	32,6	6,2%	25,2	10,7%
Soro 2	22,6	5,7%	11,4	5,3%
Soro 3	23,8	5,9%	6,8	8,8%

Tab. 6: Variância intraensaio (n = 24)

Variância intraensaio	IgG		IgM	
	OD	CV	OD	CV
Soro 1	0,422	6,7%	1,012	4,0%
Soro 2	1,062	2,1%	0,488	3,0%
Soro 3	0,988	2,6%	0,431	1,8%

Tab. 7: Sensibilidade e especificidade










	IgG	IgM
Sensibilidade	96,0%	100%
Especificidade	99,6%	98,6%

14. Versão histórica

Número da versão	Capítulo e designação
2017-12-13	Versão de lançamento

15. Explicação dos símbolos no rótulo

Símbolos gerais

	Diagnóstico in vitro
	Consulte o manual de operação
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Plate	Placa de microtitulação
Diluent	Diluição de amostra
Wash	Tampão de lavagem
Control IgG +	IgG de controle positivo
Control IgG -	IgG de controle negativo
Cut-off IgG	Controle de IgG limite
Control IgM +	Controle de IgM positivo
Control IgM -	IgM de controle negativo
Cut-off IgM	IgM de controle limite
Conjugate IgG	Conjugado IgG de vírus Zika
Conjugate IgM	Conjugado IgM de vírus Zika
Substrate	Substrato
Stop	Solução bloqueadora

16. Referências

1. Lanciotti, R.S.; Kosoy, O.L.; Laven, J.J.; Velez, J.O.; Lambert, A.J.; Johnson, A.J.; Stanfield, S.M.; Duffy, M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1232-1239.
2. Lazear, H.M.; Diamond, M.S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and its Emergence in the Western Hemisphere. *J Virol.* 2016 Mar 9. pii: JVI.00252-16.
3. Musso, D.; Gubler, D.J. Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016. 29:487–524.
4. Petersen, L.R.; Jamieson, D.J.; Powers, A.M.; Honein, M.A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* March 30, 2016
DOI: 10.1056/NEJMra1602113.
5. Rasmussen, S.A.; Jamieson, D.J.; Honein, M.A.; Petersen, L.R. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N. Engl. J. Med.* April 13, 2016. DOI: 10.1056/NEJMr1604338
6. Waggoner, J.J.; Pinsky, B.A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *J Clin Microbiol.* 2016 Apr;54(4):860-867.
7. Weaver, S.C.; Reisen, W.K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010 Feb;85(2):328-345.
8. Zammarchi, L.; Stella, G.; Mantella, A.; Bartolozzi, D.; Tappe, D.; Günther, S.; Oestereich, L.; Cadar, D.; Muñoz-Fontela, C.; Bartoloni, A.; Schmidt-Chanasit, J. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol.* 2015 Feb;63:32-35.