

cobas[®] CHIKV/DENV

Teste de ácidos nucleicos para utilização com os cobas[®] 6800/8800 Systems

Para diagnóstico in vitro

cobas[®] CHIKV/DENV – 480	P/N: 08042276190
cobas[®] CHIKV/DENV Control Kit	P/N: 08042136190
cobas[®] NHP Negative Control Kit	P/N: 07002220190
cobas omni MGP Reagent	P/N: 06997546190
cobas omni Specimen Diluent	P/N: 06997511190
cobas omni Lysis Reagent	P/N: 06997538190
cobas omni Wash Reagent	P/N: 06997503190

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Reagentes e materiais	8
Reagentes e controlos do cobas® CHIKV/DENV	8
Reagentes cobas omni para preparação da amostra.....	10
Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes	11
Materiais adicionais necessários.....	12
Equipamentos e software necessários.....	12
Precauções e requisitos de manuseamento.....	13
Advertências e precauções	13
Manuseamento dos reagentes.....	14
Boas práticas de laboratório	14
Colheita, transporte, armazenamento e pooling de amostras.....	15
Amostras de dadores vivos.....	15
Instruções de utilização	17
Pooling e pipetagem de amostras automáticos (opcional)	17
Notas de procedimento	17
Execução do cobas® CHIKV/DENV	17
Resultados	18
Controlo de qualidade e validade dos resultados.....	18
Interpretação dos resultados.....	19
Repetição de testes de amostras individuais	19
Limitações do procedimento	19
Avaliação não clínica do desempenho	20
Características principais de desempenho - Amostras de dador vivo.....	20
Limite de deteção (LoD)	20
Reprodutibilidade	23
Verificação de genótipos.....	25
Especificidade analítica	25

Correlação.....	28
Falha global do sistema	28
Informações adicionais	29
Características principais do teste	29
Símbolos	30
Fabricante e distribuidores.....	31
Marcas comerciais e patentes.....	31
Copyright.....	31
Bibliografia	32
Revisão do documento	34

Utilização prevista

O cobas® CHIKV/DENV para utilização com os cobas® 6800/8800 Systems é um teste qualitativo *in vitro* para a detecção direta do ARN do vírus chikungunya (CHIKV) e ARN dos serotipos 1-4 do vírus da dengue (DENV) em plasma humano.

O teste destina-se a ser utilizado como um teste de rastreio de amostras de dadores para a detecção individual de ARN de CHIKV ou ARN de DENV ou rastrear tanto ARN de CHIKV como de DENV em plasma de dadores individuais humanos, incluindo dadores de sangue total, de componentes sanguíneos e outros dadores vivos. Este teste destina-se também a ser utilizado para rastreio de dadores de órgãos e tecidos, quando as amostras de dador são obtidas enquanto o coração do dador ainda bate. O plasma de todos os dadores pode ser rastreado como amostras individuais. Para dádivas de sangue total e componentes sanguíneos, as amostras de plasma podem ser testadas individualmente ou o plasma pode ser testado em pools constituídas por alíquotas de amostras individuais.

Este teste não se destina a ser utilizado em amostras de sangue do cordão umbilical.

Este teste não se destina a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico de CHIKV ou DENV.

Resumo e explicação do teste

Fundamentos

O DENV é um vírus ARN transmitido por artrópodes (arbovírus) que pertence à família *Flaviviridae*, que inclui o vírus do Nilo ocidental (WNV), vírus da febre amarela e cerca de outros 70 vírus.¹ Tal como outros arbovírus, o DENV é mantido num ciclo enzoótico entre mosquitos hematófagos (essencialmente *Aedes aegypti*) e hospedeiros vertebrados suscetíveis (humanos).^{2,3} A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o DENV é endémico em mais de 100 países, o que inclui mais de 2,5 mil milhões de pessoas em risco nas regiões tropicais e subtropicais do planeta.² A América Latina e as Caraíbas, incluindo Porto Rico, sofreram aumentos significativos na incidência do DENV nos últimos anos, suscitando apreensão quanto à disseminação do *Ae. aegypti* (mosquito transmissor do DENV) e, com ele, a disseminação do DENV para os Estados Unidos.⁴ A carga global do DENV durante a pandemia de 2010 está estimada em 390 milhões de infeções, incluindo 96 milhões de infeções sintomáticas do DENV e 500 000 casos de dengue grave.⁵

Grande parte das infeções de DENV são “febre de dengue”, que a OMS define como febre e, pelo menos, dois outros sintomas, que incluem arrepios, dores nos ossos (muitas vezes graves, de onde vem a alcunha “febre quebra ossos”), mialgia, artralgia, dor ocular, erupção cutânea e maior propensão a contusões.² O “dengue grave” inclui febre e choque hemorrágico.² O DENV é classificado em quatro serotipos relacionados mas distintos em termos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A infeção com um tipo de DENV cria uma imunidade vitalícia em relação a esse serotipo do DENV e uma proteção cruzada a curto prazo (≤ 2 meses) contra a infeção com os outros três tipos de DENV.⁶

O DENV é transmissível através de transfusão.^{2,6,7} A primeira transmissão de DENV através de transfusão documentada teve lugar em 2002, durante um surto local em Hong Kong; os testes RT-PCR demonstraram que tanto as amostras do dador como do recetor eram positivas para o ARN do DENV-1.^{8,9} Houve registo de grupos de transmissões associadas a transfusões de DENV em Singapura, em 2007,¹⁰ e em Porto Rico, em 2007, que incluíram um caso de febre hemorrágica transmitida através de transfusão.^{1,6} Durante uma epidemia no Brasil, em 2012, foram efetuadas transfusões de 42 dádivas positivas com ARN do DENV-4 para 35 recetores, resultando em seis infeções de DENV transmitidas através de transfusão.^{11,12}

Grande parte (53% a 87%) das infecções de DENV são assintomáticas, pelo que os indivíduos infetados podem doar sangue.² Um rastreio de pesquisa a dádivas de sangue em Porto Rico revelou uma taxa de 0,03% a 0,31% durante os últimos anos do surto (2005, 2007, 2010, 2011 e 2012).² Um estudo efetuado em 39 134 dádivas de sangue colhidas durante a epidemia do DENV de 2012 no Brasil apresentou viremia do DENV-4 em 0,51% das dádivas no Rio de Janeiro e em 0,80% das dádivas no Recife.^{11,12} O modelo dos centros de controlo e prevenção de doença (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) estimam uma tendência semelhante.⁴ Apesar de as vacinas estarem a ser desenvolvidas, ainda não está disponível qualquer vacina contra a infeção do DENV; o cuidado é paliativo.⁵

O CHIKV faz parte da família *Togaviridae* e é um vírus ARN transmitido por artrópodes (arbovírus). O CHIKV é mantido num ciclo enzoótico entre mosquitos hematófagos (*Ae. aegypti* e desde, pelo menos, 2005 *Ae. albopictus*) e humanos.² O CHIKV (“chikungunya” significa “o que curva para cima”, na língua maconde da Tanzânia e Moçambique) apresenta sintomas semelhantes e durante os mesmos períodos endémicos que o DENV, sendo que o CHIKV é caracterizado por graves dores nas articulações e artrite paralisante, que podem fazer com que os doentes não consigam manter-se em pé devido a estas dores intensas.^{2,13} Ainda que raras, foram registadas mortes por CHIKV, que resultaram, normalmente, de encefalites ou outras encefalopatias, miocardites, hepatites ou falências de múltiplos órgãos.¹⁴

O CHIKV foi descoberto na Tanzânia em 1952 e, durante várias décadas, causou surtos esporádicos em África e na Ásia.¹⁴ Foram identificadas três linhagens distintas do CHIKV: a linhagem da África Ocidental, a linhagem Este, Centro e Sul da África (ECSA) e a linhagem asiática, com origem no vírus ECSA.¹⁴ Desde 2000, o CHIKV reemergiu e causou surtos de formas mais graves da doença do que as previamente relatadas.¹⁴ Após uma ausência de 32 anos na Índia, em 2006 e 2007 o CHIKV originou um grande surto, afetando 13 estados.^{14,15} Em 2006 e 2007, ocorreu um grande surto de CHIKV na Índia. Vários outros países no sudeste asiático vivenciaram surtos de CHIKV. Desde 2005, a Índia, a Indonésia, as Maldivas, Myanmar e a Tailândia relataram mais de 1,9 milhões de casos de CHIKV.¹⁵ Desde julho de 2017 que o Paquistão e o Quênia estão a sofrer epidemias constantes que começaram em 2016.¹⁵

Um surto explosivo de CHIKV ocorreu na Ilha Reunião e nas ilhas do sudoeste do oceano Índico, este de África, do final de 2005 até 2007, que incluiu 300 000 casos clínicos na Ilha Reunião (40% da população da ilha), 75% dos quais sintomáticos.^{2,16} Neste surto da Ilha Reunião foi descoberta uma mutação que afeta a cápsula viral e que permitiu a reprodução viral no *Ae. albopictus* (uma alternativa ao *Ae. aegypti*, o transmissor previamente conhecido do CHIKV); essa mutação resultou num aumento das cargas virais e da virulência no surto da Ilha Reunião.¹⁷ O *Ae. albopictus* foi subsequentemente implicado como o mosquito transmissor dos surtos na Índia, norte de Itália e também nas Caraíbas.^{2,18,19} Apesar de não ter sido documentada nenhuma infeção de CHIKV transmitido através de transfusão no surto de 2005 a 2007 na Ilha Reunião, foram implementadas intervenções agressivas para mitigar o risco de uma infeção transmitida através de transfusão, estimado em 1500 infeções por cada 100 000 dádivas (1,5%).^{2,16}

Foram relatados casos esporádicos de CHIKV na Europa. O primeiro surto local na Europa (197 casos) teve lugar no norte de Itália em 2007, confirmando a possibilidade de surtos associados ao *Ae. albopictus* na Europa.¹⁵ Em 2014, foram relatados pelo menos 11 casos autóctones de CHIKV em Montpellier, em França, causados pelo mosquito tigre invasivo (*Ae. albopictus*), na vizinhança de um caso importado.²⁰

Até 2013, foram relatados surtos de CHIKV em África, na Ásia, na Europa e nas ilhas dos oceanos Índico e Pacífico, mas a transmissão do CHIKV ainda não tinha sido documentada no continente americano.^{2,21} Todavia, o potencial para surtos de CHIKV já tinha sido reconhecido há muito tempo, pela prevalência dos transmissores e pela sua eficiência na transmissão de vírus da dengue.²¹ Os primeiros relatos de infeção CHIKV adquirida localmente no continente americano tiveram lugar em São Martinho, em dezembro de 2013.²¹

O CHIKV continua a ser uma preocupação no continente americano, particularmente nas Caraíbas. No dia 14 de julho de 2017, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) relatou 58 806 casos suspeitos de transmissão autóctone (28 654 confirmados) de CHIKV na América do Sul, nas Caraíbas e na América do Norte, incluindo 13 mortes no Brasil.²² A maioria destes casos (52 724) ocorreu no Brasil; os casos restantes ocorreram na Bolívia, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guiana Francesa, Guadalupe, Guatemala, Martinica, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Porto Rico, São Bartolomeu, São Martinho e Venezuela.²²

A preocupação relativa à disseminação do CHIKV para os EUA está a aumentar. Até 2006, a doença CHIKV raramente foi identificada em viajantes dos EUA e não tinham sido documentados quaisquer casos adquiridos nos EUA.²³ De 2006 a 2013, uma média de 28 pessoas por ano (dos 5 aos 65) obtiveram um resultado positivo nos testes quanto a uma infeção recente do CHIKV; eram todos viajantes em visita ou de regresso aos EUA de áreas afetadas na Ásia, África ou oceano Pacífico.²³ No que respeita a 2014, foram relatados 2811 casos de doença CHIKV no ArboNET em 47 estados dos EUA (excluindo o Alasca, Nebraska e Wyoming), incluindo 12 casos de transmissão local na Florida.²³ Todos os outros casos envolviam viajantes que regressavam de áreas afetadas.²³ Em 2014, foram relatados no ArboNET um total de 4710 casos de CHIKV a partir de territórios dos EUA, incluindo Porto Rico, as Ilhas Virgens Britânicas e a Samoa Americana.²³

O CHIKV tornou-se uma condição declarável a nível nacional nos EUA em 2015. Em 2015, foram relatados 679 casos de CHIKV no ArboNET em 44 estados dos EUA (todos os estados, exceto Delaware, Louisiana, Novo México, Dakota do Sul, Virgínia Ocidental e Wyoming), todos em viajantes que regressavam de áreas afetadas.²⁴ Os territórios dos EUA (Porto Rico e Ilhas Virgens Britânicas) relataram 202 casos no ArboNET em 2015, sendo que todos os casos foram infeções transmitidas localmente.²⁴ Em 2016, foram relatados 175 casos de doença chikungunya no ArboNET em 37 estados dos EUA (todos os estados, exceto Alasca, Colorado, Idaho, Maine, Mississippi, Nevada, Dakota do Norte, Oklahoma, Oregon, Dakota do Sul, Vermont, Virgínia Ocidental e Wyoming).²⁵ Os 175 casos ocorreram em viajantes que regressavam de áreas afetadas; nenhum era infeção transmitida localmente.²⁵ Foi relatado um total de 171 casos de doença chikungunya em territórios dos EUA (todos de Porto Rico), sendo 170 de aquisição local e um associado a viagens.²⁵ A preocupação com a disseminação do CHIKV além da Florida aumentou com a descoberta de mosquitos *Ae. aegypti* no condado de Los Angeles (Commerce e Pico Rivera).²⁶

Fundamentos dos testes NAT

O DENV pode ser transmitido através de transfusão.^{2,6,7} Apesar de não ter sido relatada transmissão do CHIKV através de transfusão, o potencial para a infeção CHIKV transmitida através de transfusão tem como base a transmissibilidade através de transfusão de outros arbovírus, como o DENV.² Grande parte (53% a 87%) das infeções DENV e muitas (aproximadamente 25%) das infeções CHIKV são assintomáticas, por isso os indivíduos infetados podem doar sangue.^{2,6,7} Uma vez que os dadores infetados podem não desenvolver uma doença relevante em termos clínicos ou permanecer assintomáticos, questionar os dadores de sangue sobre sintomas recentes que sugeriram uma infeção CHIKV ou DENV não é eficaz na identificação de dadores infetados.

Explicação do teste

O cobas® CHIKV/DENV é um teste qualitativo de PCR para a deteção e discriminação de ARN do CHIKV e DENV, que é executado no cobas® 6800 System e no cobas® 8800 System. O teste cobas® CHIKV/DENV permite o rastreio direcionado simultâneo ou individual do ARN do CHIKV e DENV num teste único de uma dádiva individual ou um pool de plasma de dádivas individuais.

Princípios do procedimento

O **cobas**® CHIKV/DENV baseia-se na preparação totalmente automática de amostras (extração e purificação dos ácidos nucleicos) seguida de amplificação e detecção por PCR. Os **cobas**® 6800/8800 Systems são constituídos pelo módulo de abastecimento de amostras, o módulo de transferência, o módulo de processamento e o módulo analítico. A gestão automática de dados é executada pelo software **cobas**® 6800/8800, que atribui resultados a todos os testes, na forma de não-reativos, reativos ou inválidos. Os resultados podem ser examinados diretamente no ecrã do sistema e impressos como um relatório.

As amostras podem ser testadas individualmente ou testadas em pools constituídas por várias amostras. Caso se execute pooling, o equipamento **cobas p** 680, ou o software **cobas**® **Synergy** com o Hamilton MICROLAB® STAR IVD (**cobas**® **Synergy** Core), poderá opcionalmente ser utilizado num passo pré-analítico.

Os ácidos nucleicos da amostra e as moléculas do Controlo Interno (IC) Armored RNA adicionado (que serve como controlo do processo de preparação da amostra e de amplificação/detecção) são extraídos simultaneamente. Adicionalmente, o teste utiliza dois controlos externos: um controlo positivo e um controlo negativo. Os ácidos nucleicos virais são libertados ao adicionar proteinase e reagente de lise à amostra. Os ácidos nucleicos libertados ligam-se à superfície de sílica das partículas magnéticas de vidro adicionadas. As substâncias não ligadas e impurezas, tais como proteínas desnaturadas, detritos celulares e potenciais inibidores da PCR (como a hemoglobina), são removidas com os posteriores passos com reagente de lavagem, e os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro com tampão de eluição a alta temperatura.

A amplificação seletiva do ácido nucleico alvo da amostra de dador é conseguida através da utilização de primers diretos e reversos específicos do vírus que são selecionados de regiões altamente conservadas do ácido nucleico viral. É utilizada uma enzima polimerase do ADN termoestável para a transcrição reversa e para a amplificação. A mistura principal inclui trifosfato de desoxiuridina (dUTP), em vez de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), que é incorporado no ADN acabado de sintetizar (amplicon).²⁷⁻²⁹ Quaisquer amplicons contaminantes de corridas de PCR anteriores são eliminados pela enzima AmpErase [uracil-N-glicosilase], que é incluída na mistura principal da PCR, quando aquecida no primeiro passo do ciclo térmico. No entanto, os amplicons acabados de formar não são destruídos, uma vez que a enzima AmpErase fica inativada quando exposta a temperaturas acima dos 55 °C.

A mistura principal do **cobas**® CHIKV/DENV contém sondas de detecção específicas para o ácido nucleico do CHIKV, do DENV e do IC. As sondas de detecção específicas do CHIKV, do DENV e do IC estão marcadas com um de três corantes fluorescentes únicos, que atua como um sinalizador. Cada sonda tem também um quarto corante, que atua como um supressor. Os três corantes sinalizadores são medidos a comprimentos de onda definidos, permitindo assim a detecção e discriminação simultânea dos alvos amplificados do CHIKV e do DENV e do IC.^{30,31} Quando não ligado à sequência-alvo, o sinal fluorescente das sondas intactas é suprimido pelo corante supressor. Durante o passo de amplificação por PCR, a hibridização das sondas com o ADN alvo específico, em cadeia simples, resulta na sua clivagem pela atividade nuclease 5' a 3' da polimerase do ADN, originando a separação dos corantes de sinalização e de supressão e a geração de um sinal fluorescente. Com cada ciclo da PCR, são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas, aumentando concomitantemente o sinal cumulativo do corante sinalizador. Uma vez que os três corantes sinalizadores específicos são medidos a comprimentos de onda definidos, é possível a detecção e discriminação simultânea do alvo amplificado do CHIKV, do DENV e do IC.

Reagentes e materiais

Reagentes e controlos do cobas® CHIKV/DENV

Todos os reagentes e controlos não abertos devem ser armazenados conforme recomendado na Tabela 1 até à Tabela 4.

Tabela 1 cobas® CHIKV/DENV

cobas® CHIKV/DENV Conservar entre 2 e 8 °C Cassete de 480 testes (P/N 08042276190)		
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit 480 testes
Solução de proteinase (PASE)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% (p/v) de proteinase EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido. EUH208: Contém Subtilisina. Pode desencadear uma reação alérgica.	38 ml
Controlo Interno (IC)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de estrutura de Armored RNA de Controlo Interno (ARN não infeccioso encapsulado em bacteriófagos MS2), < 0,002% de ARN de Poli rA (sintético), < 0,1% de azida sódica	38 ml
Tampão de Eluição (EB)	Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	38 ml
Reagente 1 da Mistura Principal (MMX-R1)	Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida sódica	14,5 ml
Reagente 2 da Mistura Principal de CHIKV/DENV (CHIKV/DENV MMX-R2)	Tampão de tricina, acetato de potássio, glicerol, 18% de sulfóxido de dimetilo, < 0,1% de Tween 20, EDTA, < 0,14% de dATP, dGTP, dCTP, dUTP, < 0,01% de primers ascendente e descendente do CHIKV e DENV, < 0,01% de primers senso e antissenso de controlo interno, < 0,01% de sondas com marcação fluorescente de controlo interno, < 0,01% de aptâmero oligonucleotídico, < 0,01% de polimerase do ADN Z05D, < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,1% de azida sódica	17,5 ml

Tabela 2 cobas® CHIKV/DENV Control Kit

cobas® CHIKV/DENV Control Kit

Conservar entre 2 e 8 °C
(P/N 08042136190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
Controlo Positivo de CHIKV/DENV (CHIKV/DENV (+) C)	< 0,001% de (Armored) ARN sintético do CHIKV e DENV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, anticorpos do HBc; ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV, ADN do HBV, ARN do HEV, ARN do WNV e ADN do CMV, ARN do Zika, ARN do CHIKV e ARN do DENV não detetáveis por métodos de PCR. 0,1% de conservante ProClin® 300 55965-84-9 mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1)	16 ml (16 x 1 ml)	 Advertência H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280: Usar luvas de proteção. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consulte um médico. P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente num local aprovado para eliminação de resíduos.

* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

Tabela 3 cobas® NHP Negative Control Kit

cobas® NHP Negative Control Kit

Conservar entre 2 e 8 °C
(P/N 07002220190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
Controlo negativo de plasma humano normal (NHP-NC)	Plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg; anticorpos do HBc, ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV, ADN do HBV, ARN do HEV, ARN do WNV e ADN do CMV, ARN do Zika, ARN do CHIKV e ARN do DENV não detetáveis por métodos de PCR. < 0,1% de conservante ProClin® 300	16 ml (16 x 1 ml)	 Advertência H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280: Usar luvas de proteção. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consulte um médico. P362 + P364: Retirar a roupa contaminada. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente num local aprovado para eliminação de resíduos.

* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

Reagentes cobas omni para preparação da amostra

Tabela 4 Reagentes **cobas omni** para preparação da amostra*

Reagentes	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997546190)	Partículas de vidro magnéticas, Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	480 testes	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997511190)	Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	4 x 875 ml	Não aplicável
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997538190)	42,56% (p/p) de tiocianato de guanidina, 5% (p/v) de polidocanol, 2% (p/v) de ditiotreitol, citrato de sódio dihidratado	4 x 875 ml	 Perigo H302 + H332: Nocivo por ingestão e por inalação. H318: Provoca lesões oculares graves. H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar proteção ocular/proteção facial. P304 + P340 + P312: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/ médico. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente num local aprovado para eliminação de resíduos.
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservar entre 15 e 30 °C (P/N 06997503190)	Citrato de sódio dihidratado, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo	4,2 l	Não aplicável

* Estes reagentes não estão incluídos no kit do teste **cobas**® CHIKV/DENV. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (Tabela 7).

** A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes

Os reagentes deverão ser armazenados e manuseados conforme especificado na Tabela 5 e Tabela 6.

Quando os reagentes não estiverem carregados nos cobas® 6800/8800 Systems, armazene-os à temperatura correspondente especificada na Tabela 5.

Tabela 5 Armazenamento de reagentes (quando o reagente não se encontra no sistema)

Reagente	Temperatura de armazenamento
cobas® CHIKV/DENV – 480	2 a 8 °C
cobas® CHIKV/DENV Control Kit	2 a 8 °C
cobas® NHP Negative Control Kit	2 a 8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2 a 8 °C
cobas omni MGP Reagent	2 a 8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2 a 8 °C
cobas omni Wash Reagent	15 a 30 °C

Os reagentes carregados nos cobas® 6800/8800 Systems são armazenados a temperaturas apropriadas e as datas de validade são controladas pelo sistema. O sistema apenas permite que os reagentes sejam usados, se as condições indicadas na Tabela 6 forem satisfeitas. O sistema impede automaticamente a utilização de reagentes expirados. A Tabela 6 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems.

Tabela 6 Condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems

Reagente	Prazo de validade do kit	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade a bordo do equipamento (tempo acumulado a bordo do equipamento fora do frigorífico)
cobas® CHIKV/DENV – 480	Data não ultrapassada	60 dias desde a primeira utilização	Máx. 20 corridas	Máx. 20 horas
cobas® CHIKV/DENV Control Kit	Data não ultrapassada	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas® NHP Negative Control Kit	Data não ultrapassada	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni MGP Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Wash Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável

* O tempo é medido a partir da primeira vez que o reagente é carregado nos cobas® 6800/8800 Systems.

Materiais adicionais necessários

Tabela 7 Material e consumíveis para utilizar nos **cobas® 6800/8800 Systems**

Material	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Saco de resíduos sólidos	07435967001
Reservatório de resíduos sólidos	07094361001

Equipamentos e software necessários

O software **cobas® 6800/8800** e o pacote de análise **cobas® CHIKV/DENV** deverão estar instalados no(s) equipamento(s). O servidor IG (Instrument Gateway) será fornecido com o sistema.

Tabela 8 Equipamentos

cobas® 6800/8800 Systems	P/N
cobas® 6800 System (Opção Móvel)	05524245001 e 06379672001
cobas® 6800 System (Fixo)	05524245001 e 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Módulo de abastecimento de amostras	06301037001
Opções para pipetagem e pooling	P/N
cobas p 680 instrument	06570577001
Dongle do software cobas® Synergy	07788339001
Hamilton MICROLAB® STAR IVD	04640535001

Para mais informações sobre os tubos primários e secundários aceites nos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas® 6800/8800 Systems** e o Manual do Operador do **cobas p 680 instrument**, ou a assistência ao utilizador do software **cobas® Synergy**.

Nota: contacte o representante local da Roche para uma lista de pedidos detalhada de racks de amostras, racks de pontas obstruídas e suportes de racks aceites nos equipamentos.

Precauções e requisitos de manuseamento

Advertências e precauções

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para um desempenho adequado deste teste. Em virtude da elevada sensibilidade deste teste, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes e as misturas de amplificação livres de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Todas as amostras devem ser manuseadas como se estivessem infetadas, utilizando boas práticas laboratoriais, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e no Documento M29-A4 do CLSI.^{32,33} Este procedimento só deve ser efetuado por pessoal com experiência no manuseamento de materiais infetados e na utilização do **cobas®** CHIKV/DENV, dos **cobas®** 6800/8800 Systems e (opcionalmente) do **cobas p 680** instrument ou do Hamilton MICROLAB® STAR IVD com **cobas®** Synergy Core.
- Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados com as precauções universais. Se ocorrer derrame, desinfete imediatamente com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água destilada ou desionizada (lixívia doméstica diluída a 1:10) ou siga os procedimentos apropriados do laboratório.
- O **cobas®** CHIKV/DENV Control Kit e o **cobas®** NHP Negative Control Kit contêm plasma derivado do sangue humano. O material de origem foi submetido a testes aprovados de anticorpos e considerado como não-reativo para a presença de anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, e anticorpos do HBc. Os testes de plasma humano normal por métodos de PCR não apresentaram quaisquer ARN do HIV-1 (grupos M e O), ARN do HIV-2, ARN do HCV, ADN do HBV, ARN do HEV, ARN do WNV, ADN do CMV, ARN do CHIKV, ARN do DENV ou ARN do Zika detetáveis. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
- Não congele sangue total.
- Recomenda-se a utilização de pipetas esterilizadas descartáveis e de pontas de pipetagem isentas de nucleases. Para garantir o desempenho ideal do teste, utilize apenas os materiais consumíveis necessários fornecidos ou especificados.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- Para garantir que o teste é executado corretamente, siga rigorosamente os procedimentos e diretrizes fornecidos. Qualquer desvio dos procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Poderão ocorrer resultados falsos positivos se durante a manipulação e processamento das amostras, o carryover das amostras não for controlado adequadamente.

Manuseamento dos reagentes

- Para evitar carryover de amostras ou controlos, manipule todos os reagentes, controlos e amostras de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Inspeccione visualmente todas as cassetes de reagente, diluentes, reagente de lise e reagente de lavagem, antes dos mesmos serem utilizados, para se certificar de que não existem quaisquer sinais de fugas. Se existir algum indício de fuga, não utilize esse material para testes.
- O **cobas omni** Lysis Reagent contém tiocianato de guanidina, um produto químico potencialmente perigoso. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras.
- Os kits **cobas**® CHIKV/DENV, o **cobas omni** MGP Reagent e o **cobas omni** Specimen Diluent contém azida sódica como conservante. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras. No caso de derrame destes reagentes, dilua com água antes de passar com um pano para secar.
- Não permita que **cobas omni** Lysis Reagent, que contém tiocianato de guanidina, entre em contacto com solução de hipoclorito de sódio (lixívia). Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Elimine todos os materiais que tenham entrado em contacto com amostras e reagentes, de acordo com regulamentações nacionais, estaduais e locais.

Boas práticas de laboratório

- Não efetue pipetagem com a boca.
- Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho.
- Use luvas de laboratório, bata de laboratório e proteção ocular quando manusear amostras e reagentes. Para evitar contaminação, as luvas devem ser trocadas entre o manuseamento de amostras e o manuseamento de kits de teste **cobas**® CHIKV/DENV e reagentes **cobas omni**. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controlos.
- Lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes do kit, e depois de retirar as luvas.
- Limpe e desinfete cuidadosamente todas as superfícies de trabalho do laboratório com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). A seguir, limpe a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Se ocorrer um derrame nos **cobas**® 6800/8800 Systems, siga as instruções do Manual do Operador dos **cobas**® 6800/8800 Systems para limpar e descontaminar corretamente as superfícies do(s) equipamentos).

Colheita, transporte, armazenamento e pooling de amostras

Nota: Manuseie todas as amostras e controles tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.

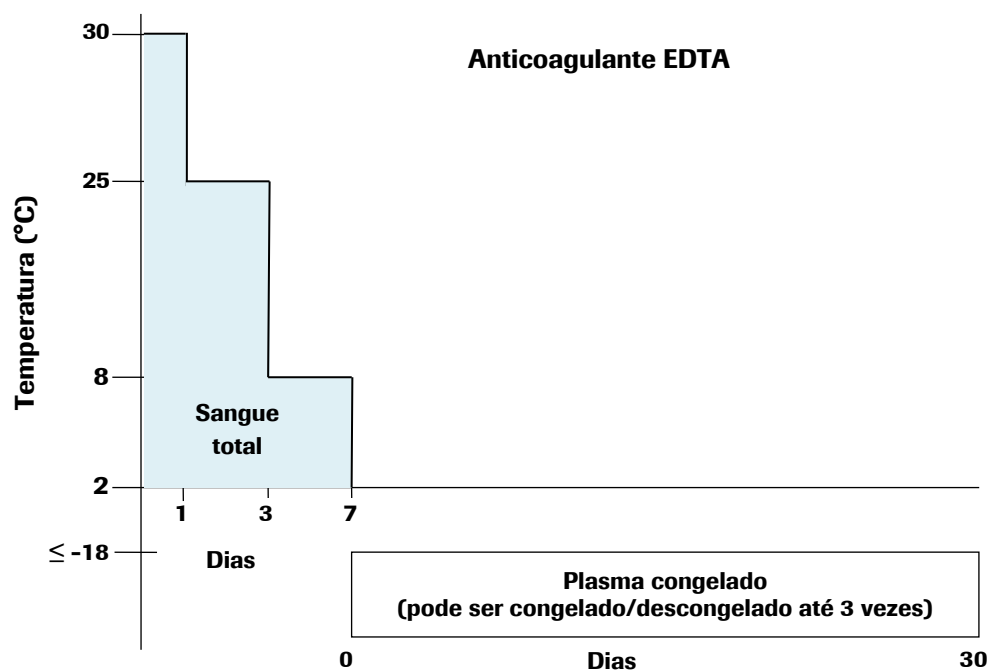
Armazene todas as amostras de doadores às temperaturas especificadas.

A estabilidade das amostras é afetada por altas temperaturas.

Amostras de doadores vivos

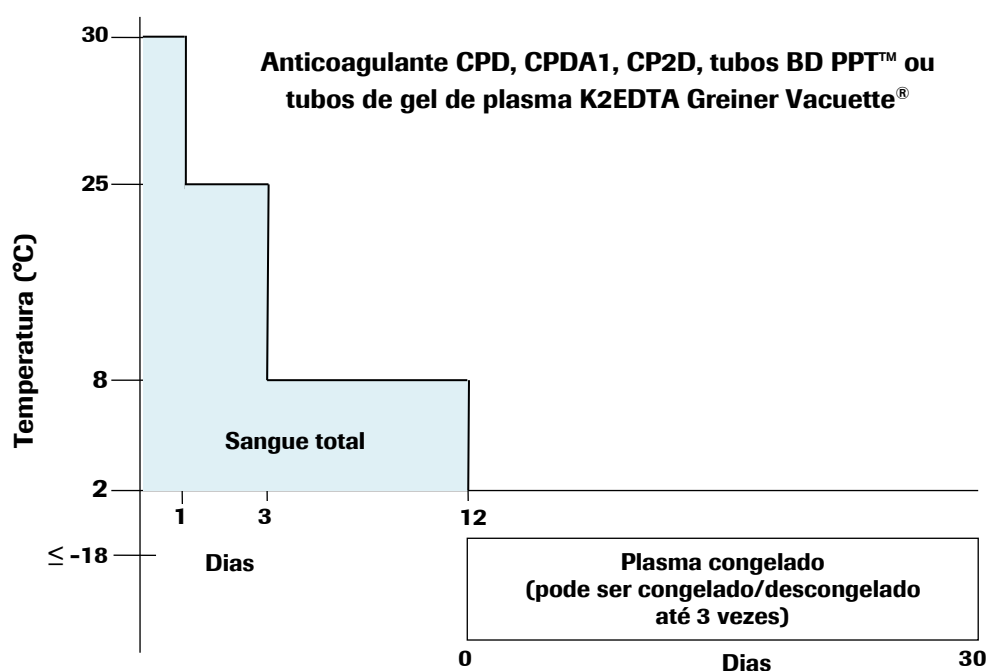
- O plasma colhido em EDTA, CPD, CPDA1, CP2D pode ser utilizado com o cobas® CHIKV/DENV. Para o manuseamento e a centrifugação, siga as instruções do fabricante dos tubos de amostra/sacos de colheita de amostras.
- O sangue colhido em EDTA pode ser armazenado durante um máximo de 7 dias nas seguintes condições:
 - As amostras devem ser centrifugadas no prazo de 72 horas após a colheita.
 - Para armazenamento acima dos 8 °C, as amostras podem ser armazenadas a temperaturas até 25 °C durante 72 horas e até 30 °C durante 24 das 72 horas.
- Além do indicado acima, as amostras são armazenadas a temperaturas entre 2 e 8 °C. Além disso, o plasma separado dos glóbulos sanguíneos pode ser armazenado até 30 dias a temperaturas ≤ -18 °C com três ciclos de congelação/descongelação. Consulte a Figura 1.

Figura 1 Condições de armazenamento das amostras de doadores vivos colhidas em EDTA



- Os tubos de sangue colhido em CPD, CPDA1 ou CP2D, tubos de preparação de plasma EDTA Becton-Dickinson (BD PPT™) ou os tubos de gel de plasma K2EDTA Greiner Vacuette® podem ser armazenados até 12 dias nas seguintes condições:
 - As amostras devem ser centrifugadas no prazo de 72 horas após a colheita.
 - Para armazenamento acima dos 8 °C, as amostras podem ser armazenadas a temperaturas até 25 °C durante 72 horas e até 30 °C durante 24 das 72 horas.
- Além do indicado acima, as amostras são armazenadas a temperaturas entre 2 e 8 °C. Além disso, o plasma separado dos glóbulos sanguíneos pode ser armazenado até 30 dias a temperaturas ≤ -18 °C com três ciclos de congelação/descongelação. Consulte a Figura 2.

Figura 2 Condições de armazenamento das amostras de doadores vivos colhidas em CPD, CPDA1, CP2D, tubos BD PPT™ e tubos de gel de plasma K2EDTA Greiner Vacuette®



- Caso seja necessário expedir amostras, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras e agentes etiológicos.

Instruções de utilização

Pooling e pipetagem de amostras automáticos (opcional)

O **cobas p 680** instrument ou o **cobas® Synergy Core** é um componente opcional dos **cobas® 6800/8800 Systems** utilizado para pipetagem e pooling automáticos de alíquotas de várias amostras primárias para uma amostra em pool. Para mais instruções, consulte o Manual do Operador do **cobas p 680** instrument ou a assistência ao utilizador do software **cobas® Synergy**.

Notas de procedimento

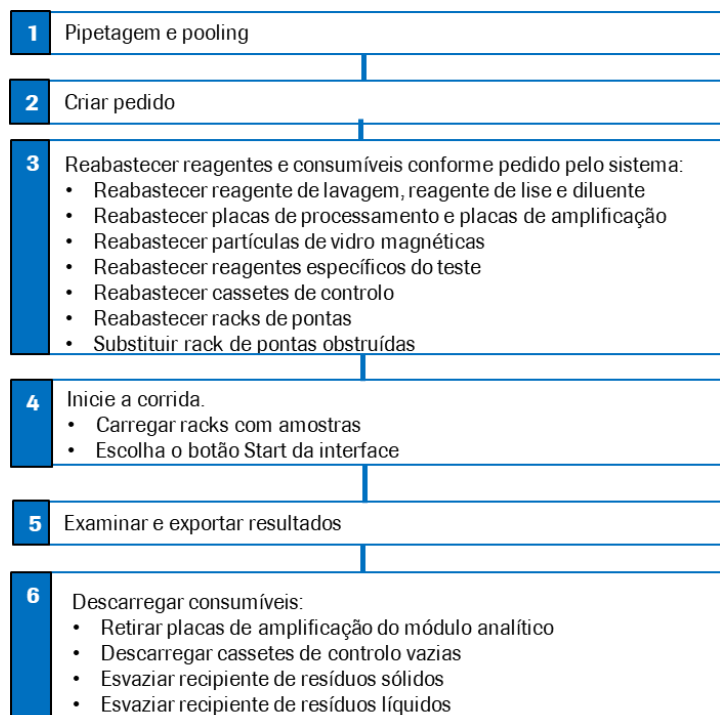
- Não utilize reagentes do teste **cobas® CHIKV/DENV**, **cobas® CHIKV/DENV Control Kit**, **cobas® NHP Negative Control Kit** ou reagentes **cobas omni** depois de expirados os respetivos prazos de validade.
- Não reutilize consumíveis. Os consumíveis são para uma única utilização.
- Para a manutenção adequada dos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas® 6800/8800 Systems**.

Execução do cobas® CHIKV/DENV

O procedimento de teste é descrito detalhadamente no Manual do Operador dos **cobas® 6800/8800 Systems**; para mais informações relativas aos procedimentos opcionais de pooling, consulte o Manual do Operador do **cobas p 680** instrument ou a assistência ao utilizador do software **cobas® Synergy**, conforme aplicável.

A Figura 3 a seguir resume o procedimento.

Figura 3 Procedimento **cobas® CHIKV/DENV**



Resultados

Os cobas® 6800/8800 Systems detetam e discriminam automaticamente o ARN do CHIKV e o ARN do DENV das amostras e dos controlos.

Controlo de qualidade e validade dos resultados

- Um controlo negativo [(-) C] e um controlo positivo [CHIKV-DENV (+) C] são processados com cada batch.
- No software cobas® 6800/8800 e/ou nos relatórios, verifique os alarmes e os resultados associados, para se certificar da validade do batch.
- O batch é válido se não aparecer nenhum alarme para ambos os controlos.

A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo software cobas® 6800/8800, com base na falha de algum controlo positivo ou negativo.

Alarmes de controlos

Tabela 9 Alarmes de controlos negativos e positivos

Controlo negativo	Alarme	Resultado	Interpretação
(-) C	Q02	Invalid	Se o resultado do (-) C for inválido, todo o batch é considerado inválido.
Controlo positivo	Alarme	Resultado	Interpretação
CHIKV-DENV (+) C	Q02	Invalid	Se o resultado do CHIKV-DENV (+) C for inválido, todo o batch é considerado inválido.

Se o batch for inválido, repita os testes de todo o batch, incluindo todas as amostras e controlos.

Interpretação dos resultados

Para um batch válido, verifique todas as amostras individuais relativamente a alarmes no software **cobas**® 6800/8800 e/ou nos relatórios. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- Um batch válido poderá incluir resultados de amostras de dador válidos e inválidos consoante os alarmes obtidos das amostras individuais.
- Os resultados de amostras são válidos apenas se o respetivo controlo positivo e controlo negativo do batch correspondente forem válidos.

São medidos simultaneamente três parâmetros para cada amostra: CHIKV, DENV e o controlo interno. Os resultados de amostra finais do **cobas**® CHIKV/DENV são indicados pelo software. Para além dos resultados gerais, será apresentado no software **cobas**® 6800/8800 o resultado alvo individual, que deverá ser interpretado da seguinte maneira:

Tabela 10 Interpretação dos resultados de amostras

Resultados alvo	Interpretação
CHIKV Non-Reactive	Nenhum sinal do alvo detetado para o CHIKV e sinal do IC detetado.
CHIKV Reactive	Sinal do alvo detetado para o CHIKV e sinal do IC poderá ter sido ou não detetado.
DENV Non-Reactive	Nenhum sinal do alvo detetado para o DENV e sinal do IC detetado.
DENV Reactive	Sinal do alvo detetado para o DENV e sinal do IC poderá ter sido ou não detetado.
Invalid	Sinal do alvo e sinal do Controlo Interno (IC) não detetados.

Repetição de testes de amostras individuais

Os tubos de amostra com um resultado final inválido para um alvo necessitam de repetição do teste, independentemente dos resultados válidos dos outros alvos.

Limitações do procedimento

- O **cobas**® CHIKV/DENV foi avaliado apenas para utilização em combinação com o **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit, o **cobas**® NHP Negative Control Kit, o **cobas omni** MGP Reagent, o **cobas omni** Lysis Reagent, o **cobas omni** Specimen Diluent e o **cobas omni** Wash Reagent para utilização nos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- A obtenção de resultados fiáveis está dependente de procedimentos corretos de colheita, armazenamento e manuseamento da amostra.
- Não utilize plasma heparinizado com este teste, porque foi verificado que a heparina inibe a PCR.
- A deteção do ARN do CHIKV e do ARN do DENV depende do número de partículas virais presentes na amostra e pode ser afetada pelos métodos de colheita, armazenamento e manuseamento de amostra, por fatores inerentes ao próprio doente (por ex., a idade, a presença de sintomas) e/ou o estágio da infeção e o tamanho do pool.
- Embora raras, as mutações dentro de regiões altamente conservadas do genoma viral abrangidas pelo **cobas**® CHIKV/DENV, podem afetar a ligação de primers e/ou sonda e resultar na não deteção da presença do vírus.
- Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudar de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para qualificar as diferenças tecnológicas. Os utilizadores deverão seguir os seus próprios procedimentos específicos e políticas específicas.

Avaliação não clínica do desempenho

Características principais de desempenho - Amostras de dador vivo

Limite de detecção (LoD)

Padrão Secundário da Roche

O limite de detecção (LoD) do cobas® CHIKV/DENV foi determinado utilizando os seguintes padrões:

- Padrão Secundário da Roche para serotipo 1 do DENV (DENV-1)
- Padrão Secundário da Roche para serotipo 2 do DENV (DENV-2)
- Padrão Secundário da Roche para serotipo 3 do DENV (DENV-3)
- Padrão Secundário da Roche para serotipo 4 do DENV (DENV-4)
- Padrão Secundário da Roche para genótipo asiático do CHIKV (CHIKV-Asian)
- Padrão Secundário da Roche para genótipo Este, Centro e Sul da África do CHIKV (CHIKV-ECSA)
- Armored RNA para o genótipo da África Ocidental do CHIKV (CHIKV-WA)

Os Padrões Secundários da Roche para DENV são sobrenadantes de culturas de vírus inativados por calor e os títulos são rastreáveis com conformidade com o 1º Pannel de referência internacional para tipos de vírus da dengue de 1 a 4 (DENV-1 BB, DENV-2 AA, DENV-3 CC e DENV-4 BB) para técnicas de amplificação de ácidos nucleicos.

Atualmente, não estão disponíveis padrões internacionais para o CHIKV. Os Padrões da Roche do CHIKV (CHIKV-Asian, CHIKV-ECSA), os sobrenadantes de culturas de vírus inativados por calor e o Armored RNA (CHIKV-WA) são rastreáveis com o reagente de referência ARN do CBER do CHIKV (CHIKV-RR).³⁴

Para os Padrões Secundários da Roche para DENV-1 e CHIKV-Asian, foram preparadas três séries de diluições independentes coformuladas dos dois padrões virais com plasma EDTA humano normal, negativo quanto a vírus (CHIKV e DENV). Cada série de diluições foi testada utilizando três lotes diferentes de kits de teste cobas® CHIKV/DENV, com aproximadamente 63 réplicas por lote, num total de cerca de 189 réplicas por concentração.

Para os Padrões Secundários da Roche para DENV-2, DENV-3, DENV-4, CHIKV-ECSA e Armored RNA para CHIKV-WA, foram preparadas 3 séries independentes de cada padrão viral coformulado para membros DENV-2 e CHIKV-ECSA e formulados individualmente para DENV-3, DENV-4 e CHIKV-WA com plasma EDTA humano normal, negativo quanto a vírus (CHIKV e DENV). Cada série de diluição foi testada utilizando 3 lotes diferentes de kits de teste cobas® CHIKV/DENV, com aproximadamente 42 réplicas por lote, num total de cerca de 126 réplicas por concentração.

Para cada vírus, foi utilizada a análise PROBIT nos dados combinados de todas as séries de diluições e todos os lotes de reagente para calcular o LoD, juntamente com os limites inferior e superior do intervalo de confiança de 95% (Tabela 11). As taxas de reatividade observadas nos estudos do LoD para cada vírus estão resumidas na Tabela 12 até à Tabela 18.

Tabela 11 Resultados da análise PROBIT em dados de LoD obtidos com padrões virais em plasma EDTA

Analito	Unidade de medida	LoD	Limite inferior do intervalo de confiança de 95%	Limite superior do intervalo de confiança de 95%
DENV-1	UI/ml	0,6	0,5	0,8
DENV-2	UI/ml	1,0	0,8	1,3
DENV-3	UI/ml	1,0	0,9	1,3
DENV-4	UI/ml	0,4	0,3	0,5
CHIKV Asian	UD*/ml	6,8	5,9	8,1
CHIKV ECSA	UD*/ml	9,3	7,9	11,5
CHIKV WA	UD*/ml	7,1	6,1	8,7

*Unidades Detetáveis

Tabela 12 Resumo das taxas de reatividade para o DENV-1 em plasma EDTA

Concentração de ARN do DENV (UI/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
1,69	189	189	100,0%	98,4%
0,85	187	189	98,9%	96,7%
0,42	163	189	86,2%	81,4%
0,21	119	189	63,0%	56,7%
0,11	81	189	42,9%	36,7%

Tabela 13 Resumo das taxas de reatividade para o DENV-2 em plasma EDTA

Concentração de ARN do DENV (UI/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
3,49	126	126	100,0%	97,7%
1,75	125	126	99,2%	96,3%
0,87	116	126	92,8%	87,8%
0,44	92	126	73,0%	65,7%
0,22	60	126	47,6%	40,0%

Tabela 14 Resumo das taxas de reatividade para o DENV-3 em plasma EDTA

Concentração de ARN do DENV (UI/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
1,40	126	126	100,00%	97,7%
0,70	106	126	84,1%	77,8%
0,35	85	124	68,5%	61,0%
0,17	48	125	38,4%	31,1%
0,09	21	125	16,8%	11,5%

Tabela 15 Resumo das taxas de reatividade para o DENV-4 em plasma EDTA

Concentração de ARN do DENV (UI/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
2,40	126	126	100,0%	97,7%
1,20	126	126	100,0%	97,7%
0,60	124	126	98,4%	95,1%
0,30	116	126	92,1%	86,9%
0,15	90	126	71,4%	64,1%

Tabela 16 Resumo das taxas de reatividade para o CHIKV-Asian em plasma EDTA

Concentração de ARN do CHIKV (UD/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
16,0	189	189	100,0%	98,4%
8,0	188	189	99,5%	97,5%
4,0	150	189	79,4%	73,9%
2,0	94	189	49,7%	43,5%
1,0	50	189	26,5%	21,2%

Tabela 17 Resumo das taxas de reatividade para o CHIKV-ECSA em plasma EDTA

Concentração de ARN do CHIKV (UD/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
16,0	126	126	100,0%	97,7%
8,0	119	126	94,4%	89,8%
4,0	80	125	64,0%	56,3%
2,0	45	126	35,7%	28,6%
1,0	16	126	12,7%	8,1%

Tabela 18 Resumo das taxas de reatividade para o CHIKV-WA em plasma EDTA

Concentração de ARN do CHIKV (UD/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
16,0	126	126	100,0%	97,7%
8,0	122	126	96,8%	92,9%
4,0	100	126	79,4%	72,5%
2,0	54	126	42,9%	35,4%
1,0	19	126	15,1%	10,1%

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do cobas® CHIKV/DENV nos cobas® 6800/8800 Systems foi determinada utilizando os seguintes padrões:

- Padrão Secundário da Roche para serotipo 1 do DENV (DENV-1)
- Padrão Secundário da Roche para genótipo asiático do CHIKV (CHIKV-Asian)

Este estudo consistiu em 3 painéis de membros CHIKV e DENV coformulados em concentrações de aproximadamente 0,5 x, 1 x e 2 x o LoD do cobas® CHIKV/DENV para cada vírus. Os testes foram efetuados para os seguintes componentes de variabilidade:

- variabilidade dia-a-dia durante 3 dias
- variabilidade lote-a-lote utilizando 3 lotes de reagente diferentes do cobas® CHIKV/DENV
- variabilidade equipamento-a-equipamento utilizando 3 cobas® 8800 Systems diferentes

Foram testadas aproximadamente 21 réplicas com cada um dos 3 painéis, para um total de 63 réplicas com cada lote de reagente. Foram avaliados todos os dados de reprodutibilidade válidos, calculando a percentagem de resultados de teste reativos para cada nível de concentração, através de todos os componentes de variabilidade.

Foram calculados os limites dos intervalos de confiança bilaterais de 95% de cada taxa de reativos para cada um dos três níveis de CHIKV e DENV, testados em 3 dias, 3 lotes de reagente e 3 cobas® 8800 Systems. O cobas® CHIKV/DENV é reprodutível em vários dias, vários lotes de reagente e vários equipamentos. Os resultados da variabilidade lote-a-lote de reagente estão resumidos na Tabela 19.

Tabela 19 Resumo da reprodutibilidade lote-a-lote de reagente do teste cobas® CHIKV/DENV

Analito	Concentração	Lote de reagente	% de reativos (reativos/réplicas válidas)	Limite inferior do intervalo de confiança (IC) de 95%	Limite superior do intervalo de confiança (IC) de 95%
DENV-1	2 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	96,8% (61/63)	89,0%	99,6%
	0,5 x LoD	1	92,1% (58/63)	82,4%	97,4%
		2	84,1% (53/63)	72,7%	92,1%
		3	82,5% (52/63)	70,9%	90,9%
CHIKV-Asian	2 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	98,4% (62/63)	91,5%	100,0%
	0,5 x LoD	1	77,8% (49/63)	65,5%	87,3%
		2	87,3% (55/63)	76,5%	94,4%
		3	73,0% (46/63)	60,3%	83,4%

Verificação de genótipos

O desempenho do **cobas**® CHIKV/DENV na detecção dos 4 serotipos do DENV e dos 3 genótipos do CHIKV foi determinado pelo teste de um total de 43 amostras clínicas únicas, 2 isolados de cultura e 1 Armored RNA (aRNA) com serotipos/genótipos conhecidos. As 43 amostras clínicas foram testadas puras e após diluição com plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus (CHIKV e DENV) para 4 x LoD do **cobas**® CHIKV/DENV.

As amostras clínicas e os isolados de cultura foram todos detetados puros e a 4 x LoD (Tabela 20).

Tabela 20 Amostras clínicas do CHIKV/DENV, isolados de cultura e Armored RNA

Alvo	Genótipo/Serotipo	Amostras	% de reativas (reativas/amostras testadas) puras	% de reativas (reativas/amostras testadas) diluídas a 4x LoD
CHIKV	Asian	10 amostras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)
	ECSA	1 isolado de cultura	100% (1/1)	100% (1/1)
	West African	1 aRNA	100% (1/1)	100% (1/1)
DENV	1	10 amostras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)
	2	10 amostras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)
	3	3 amostras clínicas, 1 isolado de cultura	100% (4/4)	100% (4/4)
	4	10 amostras clínicas	100% (10/10)	100% (10/10)

Especificidade analítica

A especificidade analítica do **cobas**® CHIKV/DENV foi avaliada relativamente a reatividade cruzada com 31 microrganismos a 10^5 - 10^6 partículas, cópias, equivalentes de genoma, UI ou CFU/ml, que incluía 24 isolados virais, seis estirpes bacterianas e um isolado de levedura (Tabela 21). Os microrganismos foram adicionados a plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus (CHIKV and DENV) e testados com e sem CHIKV e DENV (coformulados) adicionado a uma concentração de aproximadamente 3 x LoD do **cobas**® CHIKV/DENV. Os microrganismos testados não apresentaram reação cruzada nem interferiram com o **cobas**® CHIKV/DENV.

Tabela 21 Microrganismos testados relativamente a especificidade analítica

Vírus	Flavivírus	Bactérias	Leveduras
Adenovírus tipo 5	Vírus da encefalite japonesa	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Citomegalovírus	Vírus da encefalite de Murray Valley	<i>Propionibacterium acnes</i>	
Vírus de Epstein Barr	Vírus da encefalite de São Luís	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Vírus da hepatite A	Vírus Usutu	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Vírus da hepatite B	Vírus do Nilo Ocidental	<i>Streptococcus viridans</i>	
Vírus da hepatite C	Vírus da febre-amarela	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
Vírus da hepatite E	Vírus Zika		
Vírus da hepatite G			
Vírus do herpes simples do tipo 1			
Vírus do herpes simples do tipo 2			
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 Grupo M)			
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-2)			
Vírus linfotrópico da célula T humana tipo I			
Vírus linfotrópico da célula T humana tipo II			
Vírus do herpes humano tipo 6A			
Vírus da gripe A			
Vírus da varicela-zoster			

Amostras de plasma de cada um dos estados de doença (Tabela 22) foram testadas com e sem CHIKV e DENV (coformulados) adicionados a uma concentração de aproximadamente 3 x LoD do **cobas®** CHIKV/DENV para cada vírus. Estes estados de doença não apresentaram reação cruzada nem interferiram com o **cobas®** CHIKV/DENV.

Tabela 22 Amostras de estados de doença testadas relativamente a especificidade analítica

Agentes causadores de doença		
Adenovírus tipo 5	Vírus da hepatite C	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo I
Citomegalovírus	Vírus da hepatite E	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo II
Vírus de Epstein Barr	Vírus do herpes simples do tipo 1	Parvovírus B19
Vírus da hepatite A	Vírus do herpes simples do tipo 2	Vírus do Nilo Ocidental
Vírus da hepatite B	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1) Grupo M	

Especificidade analítica – substâncias interferentes

Substâncias com interferência endógena

Amostras de plasma com níveis anormalmente elevados de triglicéridos (até 33,0 g/l), hemoglobina (até 2,0 g/l), bilirrubina não conjugada (até 0,20 g/l), albumina (até 60,0 g/l) ou ADN humano (até 0,002 g/l) foram analisadas com e sem vírus CHIKV e DENV (coformulados) adicionados a uma concentração de aproximadamente 3 x LoD do **cobas**® CHIKV/DENV. Amostras contendo estas substâncias endógenas não interferiram com a sensibilidade ou especificidade do teste **cobas**® CHIKV/DENV.

Substâncias com interferência exógena

Foram testadas amostras de plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus (CHIKV e DENV) contendo concentrações anormalmente altas de fármacos (Tabela 23), com e sem CHIKV e DENV (coformulados) adicionados a uma concentração de 3 x LoD do **cobas**® CHIKV e DENV para cada vírus. Estas substâncias exógenas não interferiram com a sensibilidade ou especificidade do **cobas**® CHIKV/DENV.

Tabela 23 Concentrações de fármacos adicionados ao plasma EDTA

Nome do fármaco testado	Concentração
Acetaminofeno	1337 µmol/l
Ácido acetilsalicílico	3657 µmol/l
Ácido ascórbico	346 µmol/l
Atorvastatina	606 µg Eq/l
Fluoxetina	11,3 µmol/l
Ibuprofeno	2450 µmol/l
Loratadina	0,8 µmol/l
Nadolol	3,9 µmol/l
Naproxeno	2192 µmol/l
Paroxetina	3,1 µmol/l
Fenilefrina HCL	496 µmol/l
Sertralina	2,0 µmol/l

Correlação

Avaliação do desempenho do cobas® CHIKV/DENV comparado com o teste RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e teste RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0

O desempenho do cobas® CHIKV/DENV foi comparado com o teste RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e o teste RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 (Altona Diagnostics) utilizando 100 amostras individuais positivas para NAT de CHIKV, 100 amostras positivas para NAT de DENV e 100 amostras de plasma negativas para CHIKV e DENV.

As amostras negativas foram testadas puras com o teste cobas® CHIKV/DENV, o teste RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e o teste RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0, as amostras positivas foram testadas puras com o cobas® CHIKV/DENV e o teste RealStar® correspondente.

As amostras seronegativas demonstraram uma especificidade de 100%, ao gerar 100 de 100 resultados não-reativos com os três métodos.

Para amostras positivas, o cobas® CHIKV/DENV é mais sensível ao CHIKV e ao DENV do que o teste RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e do que o teste RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0. Os métodos não estavam em conformidade com base no teste de McNemar (Tabela 24).

Tabela 24 Correlação de amostras positivas (puras)

Métodos		Resultados do alvo viral individual	
Teste RealStar® CHIKV RT-PCR Kit 2.0 Teste RealStar® DENV RT-PCR Kit 2.0	cobas® CHIKV/DENV	CHIKV	DENV
Não reativo	Não reativo	1	0
Reativo	Não reativo	0	0
Não reativo	Reativo	14	19
Reativo	Reativo	85	81
Total		100	100
Teste de McNemar, valor de p (bilateral, $\alpha = 0,05$)		0,0001	0,0000

Falha global do sistema

A taxa de falha global do sistema para o cobas® CHIKV/DENV foi determinada testando 100 réplicas de plasma EDTA adicionadas com CHIKV e DENV (coformulados). Estas amostras foram testadas a uma concentração alvo de aproximadamente 3 x LoD, e foram executadas em pools de 1 (não diluídas). O estudo foi realizado utilizando o cobas® 6800 System com o cobas p 680 instrument (pipetagem e pooling).

Os resultados deste estudo determinaram que todas as réplicas eram reativas para cada um dos alvos, originando uma taxa de falha global do sistema de 0%. O intervalo exato de confiança bilateral de 95% foi de 0% para o limite inferior e 3,62% para o intervalo superior [0%: 3,62%].

Informações adicionais

Características principais do teste

Tipo de amostra	Plasma
Quantidade de amostra mínima necessária	1000 µl
Quantidade de amostra processada	850 µl
Duração do teste	Os resultados ficam disponíveis em menos de 3,5 horas após o carregamento da amostra no sistema.

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.

Tabela 25 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche



Software auxiliar



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limite inferior do intervalo atribuído



Folha de dados de códigos de barras



Fabricante



Código do lote



Armazenar no escuro



Risco biológico



Conteúdo suficiente para $\langle n \rangle$ testes



Referência de catálogo



Limites de temperatura



Consulte as instruções de utilização



Ficheiro de Definição de Teste



Conteúdo do kit



Limite superior do intervalo atribuído



Distribuído por



Prazo de validade



Apenas para avaliação de desempenho do IVD



Global Trade Item Number



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE para dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.

Apoio Técnico a Clientes EUA 1-800-526-1247

Fabricante e distribuidores

Tabela 26

Fabricante e distribuidores

Fabricado nos Estados Unidos



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com



Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguará, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273-3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

Marcas comerciais e patentes

Consultar <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Copyright

©2017 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

1. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. J Virol 1998;72:73-83.
2. Stramer SL. Current perspectives on transfusion-transmitted infectious disease: emerging and re-emerging infections. ISBT Sci Ser 2014;9:30-36.
3. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. Vox Sang 2010;98:495-503.
4. Petersen LR, Tomashek KM, Biggerstaff BJ. Estimated prevalence of dengue viremia in Puerto Rican blood donors, 1995 through 2010. Transfusion 2012;52:1647-1651.
5. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature 2013;496:504-507.
6. Stramer SL, Linnen CM, Carrick JM, et al. Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico. Transfusion 2012;52:1657-1666.
7. Gan VC, Leo YS. Current epidemiology and clinical practice in arboviral infections - implications on blood supply in South-East Asia. ISBT Sci Ser 2014 Jul;9:262-267.
8. ProMed. Dengue virus transmission—China (HK), Archive number 20221011.5526. October 10, 2002. <http://www.promedmail.org> (accessed July 14, 2017).
9. AABB. Dengue viruses. www.aabb.org/tm/eid/Documents/dengue-viruses.pdf (updated February 2014; accessed July 14, 2017).
10. Tambyah PA, Koay ESC, Poon ML, Lin RV, Ong BK; Transfusion-Transmitted Dengue Infection Study Group. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. N Engl J Med 2008;359:1526-1527.
11. Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, et al. Transfusion-transmitted dengue and associated clinical symptoms during the 2012 epidemic in Brazil. J Infect Dis 2016;213:694-702.
12. Levi JE. Dengue virus and blood transfusion. J Infect Dis 2016;213:689-690.
13. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. Transfusion 2009;49:1S-29S.
14. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. Lancet Infect Dis 2017;17:e107-e117.
15. World Health Organization (WHO). Chikungunya fact sheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/ (updated April 2017; accessed July 14, 2017).
16. Brouard C, Bernillon P, Quatresous I, et al. Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. Transfusion 2008;48:1333-1341.
17. Schuffenecker I, Itman I, Michault A, et al. Genome microevolution of chikungunya virus causing Indian Ocean outbreak. PloS Med 2006;3:e263.
18. Liunbruno GM, Calteri D, Petropulacos K, et al. The chikungunya epidemic in Italy and its repercussions on the blood system. Blood Transfus 2008;6:199-210.
19. Zeller H, Bortel Van W, Sudre B. Chikungunya: its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. J Infect Dis 2016;214(suppl 5):S436-S440.

20. Roiz D, Boussès P, Simard F, Paupy C, Fontenille D. Autochthonous chikungunya transmission and extreme climate events in Southern France. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003854.
21. Johansson MA, Powers AM, Pesik N, Cohen NJ, Staples JE. Nowcasting the spread of chikungunya virus in the Americas. *PLoS One* 2014;9:e104915.
22. Pan American Health Organization (PAHO). Number of reported cases of chikungunya fever in the America, by country or territory, 2017 (as of June 2, 2017). www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8975&itemid=40931&lang=en (accessed June 5, 2017).
23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2014 final data for the United States. <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2014.html> (last updated October 30, 2015; last accessed July 20, 2017)
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2015 final data for the United States. <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2015.html> (last updated June 23, 2016; last accessed July 20, 2017)
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus, 2016 provisional data for the United States. www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2016.html (last updated January 18, 2017; accessed June 5, 2017)
26. Rocha V. Virus-transmitting yellow fever mosquitoes discovered in L.A. County. *Los Angeles Times*, October 15, 2014. <http://www.latimes.com/local/lanow/la-me-ln-yellow-fever-mosquito-los-angeles-20141015-story.html>.
27. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990;93:125-128.
28. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature* 1995;373:487-493.
29. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell* 1995;80:869-878.
30. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 1992;10:413-417.
31. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;9:86-994.
32. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
34. Añez G, Jiang Z, Heisey DA, Kerby S, Rios M, Chikungunya virus Collaborative Study Group. Collaborative study for the characterization of a chikungunya virus RNA reference reagent for use in nucleic acid testing. *Vox Sang* 2015;109: 312-318.

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 1.0 09/2017	Primeira publicação.