

Arbovirus ViraChip® IgG Test Kit 2.0

Gebrauchsanweisung



Chip-Immunoblot zum qualitativen Nachweis von **IgG** Antikörpern gegen spezifische **Arbovirus** Antigene der Spezies Zika Virus, Dengue Virus und Chikungunya Virus in humanem Serum.

Der **Arbovirus ViraChip® IgG Test Kit 2.0** ist ein Immunoblot auf Basis eines Enzym-Immunoassays im Microarray-Format bei dem Antikörper gegen drei verschiedene Arboviren nachgewiesen werden können. Hierzu werden aufgereinigte, spezifische Antigene des Zika Virus, Dengue Virus und Chikungunya Virus an definierten Positionen auf Nitrozellulose gebunden. Die aufgereinigten, spezifischen Antigene umfassen Envelope-Proteine und Nicht-Strukturproteine.

Der **Arbovirus ViraChip® IgG Test Kit 2.0** erfüllt die Anforderungen von Qualitätsstandards der Richtlinie **98/79/EG**.

Testprinzip

Am Boden jeder Kavität einer 96 well Standard-Mikrotiterplatte (MTP) befindet sich eine Nitrozellulose-Membran auf der Antigene als Analytspots fixiert sind (Microarray). Während der Seruminkubation binden Arbovirus-spezifische Antikörper im Patientenserum an die fixierten Antigene auf dem Microarray. Während der Konjugatinkubation bindet das Konjugat an den Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Zugabe der Chromogen / Substratlösung setzt die an den Konjugat-Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase das Chromogen / Substrat um und färbt damit den Antigen-Antikörper-Komplex auf dem Microarray lila bis schwarz an. Nach der Seruminkubation, der Konjugatinkubation und der Chromogen / Substratinkubation erfolgt jeweils ein Waschschriff zur Entfernung ungebundener Antikörper und Reagenzien.

Jeder Microarray beinhaltet neben den Analytspots folgende Kontrollspots: **Serumkontrollen**, **Konjugatkontrollen**, **Kalibratorkontrollen** und eine **Negativkontrolle**. Die Analytspots dienen dem Nachweis von Antikörpern gegen die Arbovirus-spezifischen Antigene:

1. die durch ein „Z-“ gekennzeichneten Zika Virus Antigene **Z-E**, **Z-Ei**, **Z-EIII**, **Z-EIII***, **Z-NS1**
2. die durch ein „D-“ gekennzeichneten Dengue Virus Antigene **D-E**, **D-Ei**, **D-EIII**, **D-EIII***, **D-NS1** und
3. das durch ein „C-“ gekennzeichnete Chikungunya Virus Antigen **C-E**.

Somit können mit dem Ansatz eines Arbovirus ViraChip® IgG Microarrays spezifische IgG Antikörper von drei Arboviren parallel nachgewiesen werden.

Zur eindeutigen Kennzeichnung sind die Kavitäten farblich kodiert: Dazu ist der Arbovirus ViraChip® IgG durch einen **blauen Vollkreis** auf dem Kavitätenrand markiert.

Best.-Nr.:	V-ABCGOK
Packungsgröße:	MTP à 96 einzelbrechbaren Kavitäten
Probenmaterial:	10 µl Serum
Testdauer:	ca. 130 Minuten

Kitinhalt

1 MTP à 96 Kavitäten	Arbovirus ViraChip® IgG Antigen Coated Wells Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Prod.-Nr.: V-ABCGAC)
12 ml	ViraChip® AP-Anti-Human IgG Conjugate Anti-human IgG Konjugatlösung für ViraChip® Teste, aus Ziege, mit boviner alkalischer Phosphatase, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCGKI)
100 ml	ViraChip® / ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Buffer Waschpuffer-Konzentrat für ViraChip® Teste, mit Detergenzien und Salzen zum Verhindern unspezifischer Bindungen, 10-fach	(Best.-Nr.: V-UVNUWP)
12 ml	ViraChip® Chromogen / Substrate Solution Chromogen/Substratlösung für ViraChip® Teste, mit BCIP / NBT, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCUCS)

Zusätzlich erforderlicher Puffer für die Probenverdünnung, wird separat mitgeliefert

50 ml	ViraChip® Sample Buffer Probenpuffer für ViraChip® Teste, mit Milchpulver, Detergenzien und Salzen zum Verhindern unspezifischer Bindungen, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCUPP)
-------	---	-----------------------

Optional erhältlich

1 MTP-Riegel à 8 Kavitäten	Arbovirus ViraChip® IgG Antigen Coated Wells (8) Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-ABCGRT)
110 µl	Arbovirus ViraChip® IgG Positive Control IgG positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-ABCGPK)
330 µl	Arbovirus ViraChip® IgG,A,M Negative Control IgG, IgA, IgM negatives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-ABCPNK)

Zusätzlich geforderte Ausrüstung

1. ViraChip Software®	zum Vorbereiten, Durchführen und Auswerten des Testlaufes, ab v1.3.0-1960	(Best.-Nr.: V-VCNUPR)
2. 2D-Barcode Scanner	zum Lesen der DataMatrix-Codes	
3. Mikrotiterplatte mit 96 Leerkavitäten	zum Auffüllen angefangener Riegel der Mikrotiterplatte im Halterahmen	(Best.-Nr.: V-UVNMTP)
4. Orbitalschüttler (750 rpm) oder Linearschüttler (20 Hz)	zur Durchmischung von Proben und Reagenzien während der Prozessierung	
5. ViraChip® Scanner oder ViraChip® Reader	zur Digitalisierung / Messung entwickelter ViraChip® Teste, ab ViraChip® Scanner v1.0 bzw. ViraChip® Reader Rev.01	(Best.-Nr.: V-UVCSCA) (Best.-Nr.: V-UVCCAM)
6. Optional: Ventilator/ Lüfter	zur schnelleren Trocknung der entwickelten Mikrotiterplatten	

Vorbereiten der Reagenzien und der Patientenproben

	Alle Reagenzien und die verpackte Mikrotiterplatte vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT: 20-23°C) bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch gut durchmischen.
Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:	Waschpuffer-Konzentrat 1:10 in destilliertem oder deionisiertem Wasser (H ₂ O) verdünnen: 100 ml Waschpuffer-Konzentrat + 900 ml H ₂ O
Probenpuffer:	Gebrauchsfertig
Konjugatlösung:	Gebrauchsfertig
Chromogen / Substratlösung:	Gebrauchsfertig
MTP-Kavitäten:	Die Mikrotiterplatte (MTP) vorsichtig aus der Verpackung entnehmen und die benötigte Anzahl an Kavitäten in einen leeren Mikrotiterplattenrahmen stecken (Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes, Punkt 3). Nach Entnahme aus der Verpackung Kavitäten sofort verwenden. Nicht benötigte Kavitäten sofort wieder in die Originalverpackung zurückgeben, dicht verschließen und bei 2-8°C lagern.
Patientenproben:	Die Patientenproben werden in einer 1:76 Verdünnung eingesetzt, z.B. 10 µl Patientenprobe + 750 µl Probenpuffer . Von der verdünnten Probe werden bei der Prozessierung 100 µl benötigt.
Kontrollen:	Bei Bedarf wird das positive und das negative Kontrollserum in einer 1:16 Verdünnung eingesetzt, z.B.: 10 µl Kontrollserum + 150 µl Probenpuffer . Von der verdünnten Kontrolle werden bei der Prozessierung 100 µl eingesetzt.

Aufbau des Arbovirus ViraChip® IgG Microarrays

Antigene:

Jedes Zika Virus-spezifische Antigen (**Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*** und **Z-NS1**), Dengue Virus-spezifische Antigen (**D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII*** und **D-NS1**) und Chikungunya Virus-spezifische Antigen (**C-E**) ist als einzelner Spot aufgetragen. Jeder Spot entspricht einer Bande im Western Blot / Immunoblot.

Kontrollen:

Jede ViraChip® Kavität enthält folgende integrierten Kontrollen:

Zwei Serumkontrollen (sc), eine Negativkontrolle (nc), zwei IgG Konjugatkontrollen (ccG), zwei IgM Konjugatkontrollen (ccM) und sechs Kalibratorkontrollen (cal).

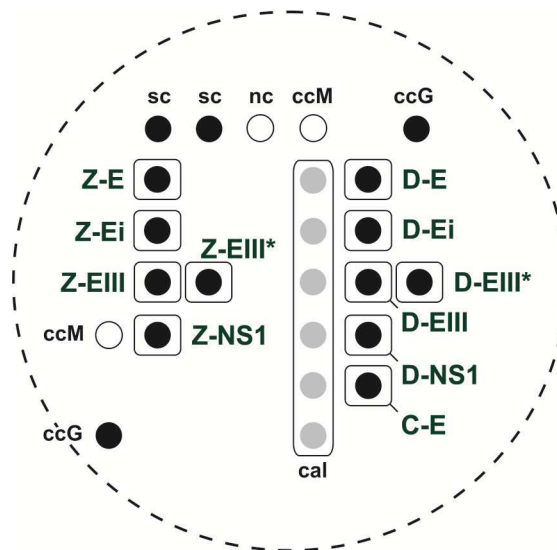


Abbildung 1: Abbildung einer Kavität aus der Mikrotiterplatte mit dem Arbovirus ViraChip® IgG Microarray (vergrößert). Anordnung der Spots für Antigene und der Spots für integrierte Kontrollen.

Nomenklatur und Beschreibung der Arbovirus Antigene aus der Literatur

Arbovirus	Nomenklatur:	Antigen:	Bemerkungen:
Zika Virus	Z-E	Envelope	Das E-Protein des Zika-Virus bildet den Großteil der Virionoberfläche und ist an Prozessen während der Replikation, wie der Bindung von Wirtszellen und der Membranfusion, beteiligt (10,8,23).
	Z-Ei	Envelope	Internes E-Protein- Fragment des Zika Virus.
	Z-EIII	Envelope III	E-Protein Region des Zika Virus.
	Z-EIII*	Envelope III*	Abgewandelte Region des E-Proteins vom Zika Virus.
	Z-NS1	Nicht-Strukturprotein	NS1 ist ein großes Protein mit verschiedenen Funktionen bei der Immunevasion, Pathogenese und viralen Replikation des Zika-Virus (3,13).
Dengue Virus	D-E	Envelope	Das E-Protein des Dengue Virus bildet den Großteil der Virion-Oberfläche und ist an Prozessen während der Replikation, wie der Bindung von Wirtszellen und der Membranfusion, beteiligt (19,17).
	D-Ei	Envelope	Internes E-Protein Fragment des Dengue Virus.
	D-EIII	Envelope III	E-Protein Region des Dengue Virus.
	D-EIII*	Envelope III*	Abgewandelte Region des E-Proteins vom Dengue Virus.
	D-NS1	Nicht-Strukturprotein	NS1 ist ein großes Protein mit verschiedenen Funktionen bei der Immunevasion, Pathogenese und viralen Replikation des Dengue-Virus (22).
Chikungunya Virus	C-E	Envelope	Das E-Protein ist ein Fusionsprotein, das während der Chikungunya Virus-Infektion die Membranfusion vermittelt (6).

Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes

Bei automatisierter Prozessierung können sich Inkubationszeiten, Volumina und die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte von der im Folgenden aufgeführten Arbeitsvorschrift unterscheiden. Eine detaillierte Schritt-für-Schritt Anleitung für die verwendete Automationslösung sowie eine Anleitung für die Benutzung der ViraChip® Software wird bei der Einrichtung der Geräte und Schulung durch die Viramed Biotech AG zur Verfügung gestellt. Siehe auch Abschnitt „Hinweise zu Geräten und Software“.

1. Belegen

Testauswahl und Eintrag der Probanden in den Belegungsplan der ViraChip® Software.

2. Bestücken

Scannen der 2D-Barcodes auf den Etiketten des Test Kits und der Mikrotiterplatte, zur Übertragung der Chargennummern und der chargen-spezifischen Faktoren (lot specific factors).

3. Prozessieren

Alle Schritte der Prozessierung bei RT durchführen.

3.1 Vorbereitung

- Die gemäß der Belegung definierte Anzahl an Kavitäten in den Halterahmen setzen.
- Leere Positionen eines Riegels der Mikrotiterplatte im Halterahmen mit Leerkavitäten auffüllen. Die Riegel sind auf der Mikrotiterplatte mit 1-12 gekennzeichnet.

Darauf achten, dass beim Brechen der Riegel keine Kunststoffpartikel in die Kavitäten fallen.

3.2 Vorinkubation

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.3 Seruminkubation

- Gemäß dem Belegungsplan 100 µl verdünnte Patientenprobe bzw. 100 µl verdünntes Kontrollserum der entsprechenden Kavität zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.4 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Absaugnadeln so einstellen bzw. Pipetten so verwenden, dass die Kavitätenböden nicht beschädigt werden.

3.5 Konjugatinkubation

- Je Kavität 100 µl Konjugatlösung zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Die Kavitätenböden müssen während der Inkubationsschritte vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.

3.6 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Während der Inkubations- und Waschschrte einen Orbitalschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 750 rpm, oder einen Linearschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 20 Hz, verwenden.

3.7 1 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- 1 Minute bei RT inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.8 Substratinkubation

- Je Kavität 100 µl Chromogen/Substratlösung zugeben.
- 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Stoppen: Flüssigkeit absaugen.

3.9 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- Keine Zwischeninkubation.
- Flüssigkeit absaugen.

3.10 Kavitäten trocknen

20 Minuten bei maximal 60% Luftfeuchtigkeit unter kontinuierlichem Luftstrom trocknen lassen.

Bei höherer Luftfeuchtigkeit kann sich die Trockenzeit verlängern. Alternativ 12 Stunden lichtgeschützt bei RT trocknen lassen.

4. Scannen

ViraChip® Microarrays mit dem ViraChip® Scanner oder dem ViraChip® Reader messen.

Messungen der ViraChip® Microarrays sind innerhalb von 24 Stunden nach Prozessierung durchzuführen (Mikrotiterplatte lichtgeschützt aufbewahren). Die genaue Durchführung bitte dem Geräte-Handbuch entnehmen.

5. Analysieren

5.1 Zuordnung der Antigen-Spots und der Kontrollspots überprüfen (Technisch validieren)

Jeder Spot wird aufgrund seiner Position von der ViraChip® Software automatisch dem entsprechenden Antigen-Spot bzw. dem entsprechendem Kontrollspot zugeordnet. Die automatische Zuordnung muss visuell mit dem Muster entsprechend Abb. 1 überprüft werden. Zuordnungen, die nicht dem dargestellten Muster entsprechen im Feld „QC“ auf „nicht gültig“ setzen. Die entsprechende Probe muss wiederholt werden.

5.2 Gültigkeitsprüfung

Die Gültigkeitsprüfung wird von der ViraChip® Software automatisch durchgeführt.

Ein ViraChip® Microarray ist gültig, wenn folgende Kontrollspots die in der ViraChip® Software hinterlegten Kriterien erfüllen:

- **Serumkontrollen** (sc) über Grenzwert
- **Konjugatkontrollen IgG** (ccG) über Grenzwert
Die Konjugatkontrollen IgG müssen stärker reagieren als die Kontrollen der anderen Konjugatklassen.
- **Kalibratorkontrollen** (cal) über Grenzwert
- **Negativkontrolle** (nc) unter Grenzwert

Falls eines der genannten Kriterien nicht erfüllt ist, wird der ViraChip® Microarray als „nicht gültig“ klassifiziert. Nicht gültige ViraChip® Microarrays dürfen nicht ausgewertet werden und müssen wiederholt werden.

5.3 Auswertung der ViraChip® Microarrays

Die Bewertung der Patientenproben wird von der ViraChip® Software automatisch nach den im Folgenden definierten Auswertekriterien durchgeführt:

Die ViraChip® Einheiten jedes Spots werden unter Berücksichtigung der chargen-spezifischen Faktoren relativ zu den Kalibratorkontrollen durch die ViraChip® Software berechnet.

Auswertekriterien

ViraChip®-Einheiten der Spots	Ergebnis	Beurteilung
<p>der Zika Virus Antigene:</p> <p>der Z-NS1 Spot ≥ 100 ViraChip®-Einheiten oder mindestens zwei Antigen-Spots ≥ 100 ViraChip®-Einheiten aus: Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*</p> <p>Kein Spot ≥ 100 ViraChip®-Einheiten oder alle anderen Konstellationen</p>	<p>Positiv für Zika Virus</p> <p>Negativ für Zika Virus</p>	<p>Spezifische IgG Antikörper gegen Zika Virus nachweisbar. Eine Infektion mit dem Zika Virus ist wahrscheinlich.</p> <p>Keine spezifischen IgG Antikörper gegen Zika Virus Antigene nachweisbar. Bei Verdacht auf eine frische Infektion zusätzlich auf IgM Antikörper untersuchen und nach 2 bis 3 Wochen eine zweite Probe auf IgM und IgG Antikörper untersuchen.</p>
<p>der Dengue Virus Antigene:</p> <p>der D-NS1 Spot ≥ 100 ViraChip®-Einheiten oder mindestens zwei Antigen-Spots ≥ 100 ViraChip®-Einheiten aus: D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII*</p> <p>Kein Spot ≥ 100 ViraChip®-Einheiten oder alle anderen Konstellationen</p>	<p>Positiv für Dengue Virus</p> <p>Negativ für Dengue Virus</p>	<p>Spezifische IgG Antikörper gegen Dengue Virus Antigen nachweisbar. Eine Infektion mit dem Dengue Virus ist wahrscheinlich.</p> <p>Keine spezifischen IgG Antikörper gegen Dengue Virus Antigene nachweisbar. Bei Verdacht auf eine frische Infektion zusätzlich auf IgM Antikörper untersuchen und nach 2 bis 3 Wochen eine zweite Probe auf IgM und IgG Antikörper untersuchen.</p>
<p>des Chikungunya Virus Antigens:</p> <p>der C-E Spot ≥ 100 ViraChip®-Einheiten</p> <p>der C-E Spot < 100 ViraChip®-Einheiten</p>	<p>Positiv für Chikungunya Virus</p> <p>Negativ für Chikungunya Virus</p>	<p>Spezifische IgG Antikörper gegen das Chikungunya Virus Envelope-Antigen nachweisbar. Eine Infektion mit dem Chikungunya Virus ist wahrscheinlich.</p> <p>Keine spezifischen IgG Antikörper gegen das Chikungunya Virus Envelope-Antigen nachweisbar. Bei Verdacht auf eine frische Infektion zusätzlich auf IgM Antikörper untersuchen und nach 2 bis 3 Wochen eine zweite Probe auf IgM und IgG Antikörper untersuchen.</p>

Diagnostische Bedeutung von Arbovirus Antikörpern

1. Allgemeines

Zika, Dengue und Chikungunya Viren sind humanpathogene Arboviren, welche primär durch Stechmücken (Gattung Aedes) übertragen werden. Das Zika und Dengue Virus gehören zur Familie der Flaviviren (Gattung Flavivirus), das Chikungunya Virus zur Familie der Togaviren (Gattung Alphavirus) (9). Sowohl die nahe genetische Verwandtschaft als auch das überlappende Verbreitungsgebiet dieser Viren erschweren die serologische Differenzierung.

Eine zuverlässige Diagnostik wird zusätzlich dadurch erschwert, dass viele Flaviviren (wie das Zika und Dengue Virus) ähnliche oder keine Krankheitssymptome hervorrufen und die Antikörper von Zika Virus infizierten Patienten mit anderen Flaviviren kreuzreagieren können (30). Des Weiteren stehen insbesondere Infektionen mit dem Zika Virus bzw. mit dem Chikungunya Virus während der Schwangerschaft im Verdacht, ein Risiko für das ungeborene Kind darzustellen (26,27,4).

2. Zika Virus Antikörper

a) IgG Antikörper werden innerhalb von Tagen nach den IgM Antikörpern gebildet und können Monate bis Jahre nach Infektion detektiert werden (5) oder auch ein Leben lang persistieren (18).

b) IgM Antikörper treten meist wenige Tage nach Krankheitsbeginn auf (14,5) und können bis zu drei Monate nachgewiesen werden. Meist verschwinden die IgM Antikörper bereits 4-8 Wochen nach Symptombeginn (18), allerdings gibt es auch Patienten bei denen IgM Antikörper länger nachgewiesen werden konnten (5).

In der Regel sind IgM Antikörper bei einer kürzlichen Infektion nachweisbar (18) und können somit als Symptom für eine akute Infektion interpretiert werden.

3. Dengue Virus Antikörper

a) IgG Antikörper bei einer Primärinfektion treten meist etwa eine Woche nach Krankheitsbeginn auf, erreichen ihren Höhepunkt einige Wochen nach der Infektion, nehmen anschließend etwas ab und persistieren für Jahrzehnte oder länger (28).

Charakteristisch für eine sekundäre Dengue Virus Infektion ist das Auftreten von hochtitrigen Anti-Dengue-IgG-Antikörpern vor oder zusammen mit dem Auftreten der IgM-Antikörper (20).

b) IgM Antikörper bei einer Primärinfektion treten bereits 3 bis 5 Tage nach Krankheitsbeginn auf. Sie erreichen ihren Höhepunkt etwa 2 Wochen nach der Infektion und klingen danach ab (20).

Bei primären und sekundären Dengue Virus Infektionen sind die Kinetiken der IgM Antikörperbildungen ähnlich (20). Jedoch sind IgM-Antikörpertiter bei sekundären Infektionen meist signifikant

niedriger (20) und können sogar vollständig ausbleiben (11) und somit zu falsch-negativen Ergebnissen führen (18). Aufgrund der engen Verwandtschaft kann es sich bei Sekundärinfektionen mit Flaviviren wie dem Zika Virus ähnlich verhalten.

4. Chikungunya Virus Antikörper

a) IgG Antikörper können bereits ab dem siebten Krankheitstag detektiert werden (18) und persistieren für einige Monate (16). Ein mindestens 4-facher Anstieg der IgG Antikörper in zwei aufeinanderfolgenden Patientenproben gilt als beweisend für eine Infektion (18).

b) IgM Antikörper können in der Regel bereits in der akuten Phase der Erkrankung im Patientenserum nachgewiesen werden (16), spätestens 5-7 Tage nach Krankheitsbeginn (18,15). IgM Antikörpertiter sind 3 bis 5 Wochen nach dem Ausbruch der Krankheit am höchsten und bestehen für etwa 2 Monate (29). Ein alleiniger IgM Antikörper Nachweis gilt als hinweisend auf eine akute Infektion, muss jedoch mit einer Verlaufskontrolle bestätigt werden (18).

5. Für alle Arboviren stellt das Hüllprotein E (Envelope Protein, E-Protein) ein primäres Ziel für die Immunantwort neutralisierender Antikörper dar. Aktuelle Studien zeigen, dass das Zika Virus E-Protein dem des Dengue Virus und des West-Nil Virus stark ähnelt (1,12). Insbesondere für das Chikungunya Virus gilt das E-Protein als hochspezifisch (6).

6. Kreuzreaktivitäten zwischen den jeweiligen Virusantigenen sind beschrieben bei Infektionen mit Zika, Dengue, West-Nil, Gelbfieber, Japanische Enzephalitis, FSME und Chikungunya Viren (31,12,7). In Gebieten, in denen zwei oder mehrere Arboviren endemisch auftreten, erschweren multiple und sequentielle Infektionen die Differentialdiagnose aufgrund bereits vorher vorhandener Arbovirus spezifischer Antikörper (7,30).

7. Nach einer Primärinfektion kann der Krankheitsverlauf einer zweiten Infektion mit einem antigenetisch verwandten Virus aufgrund vorhandener artübergreifender und kreuzreaktiver Antikörper verschärft werden (1,2,21).

8. Polyklonale Stimulationen durch andere virale Infektionen, wie z.B. EBV, können zu positiven Antikörperreaktionen auf dem Arbovirus ViraChip® IgG Test Kit 2.0 führen.

9. Bei der Testauswertung und anschließenden Testinterpretation muss ein früherer Kontakt des Patienten mit Arboviren bei Reisen oder längeren Aufhalten in Endemiegebieten berücksichtigt werden.

Leistungsdaten

Sensitivität

Serumproben mit klinischem Verdacht einer Zika Virus, Dengue Virus und / oder Chikungunya Virus Infektion wurden mit dem Arbovirus ViraChip® IgG auf IgG Antikörper gegen Zika Virus, Dengue Virus und Chikungunya Virus analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a, 1b und 1c dargestellt.

Serumproben	Arbovirus ViraChip® IgG – Zika Virus Ergebnis			
	Gesamt	Positiv	Negativ	% Sensitivität
Zika Virus klinisch definiert*	25	25	0	100% (25/25)

Tabelle 1a: Serumproben mit klinisch definierter Zika Virus Infektion. Arbovirus ViraChip® IgG – Zika Virus Ergebnisse.

Serumproben	Arbovirus ViraChip® IgG – Dengue Virus Ergebnis			
	Gesamt	Positiv	Negativ	% Sensitivität
Dengue Virus klinisch definiert*	12	11	1	92% (11/12)

Tabelle 1b: Serumproben mit klinisch definierter Dengue Virus Infektion. Arbovirus ViraChip® IgG – Dengue Virus Ergebnisse.

Serumproben	Arbovirus ViraChip® IgG – Chikungunya Virus Ergebnis			
	Gesamt	Positiv	Negativ	% Sensitivität
Chikungunya Virus klinisch definiert*	20	20	0	100% (20/20)

Tabelle 1c: Serumproben mit klinisch definierter Chikungunya Virus Infektion. Arbovirus ViraChip® IgG – Chikungunya Virus Ergebnisse.

*) Zu Mehrfachinfektionen mit demselben Arbovirus oder den jeweils anderen Arboviren liegen keine Informationen vor.

Spezifität

Für die Bestimmung der analytischen Spezifität wurden 84 Proben von Blutspendern aus Deutschland (nicht-endemische Region) und 14 Proben von Schwangeren aus Deutschland (nicht-endemische Region) auf dem Arbovirus ViraChip® IgG auf IgG Antikörper gegen Zika Virus, Dengue Virus und Chikungunya Virus analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2a, 2b und 2c dargestellt.

Serumproben	Arbovirus ViraChip® IgG – Zika Virus Ergebnis				
	Gesamt	Negativ	Positiv	% Positiv	% Spezifität
Blutspender (nicht-endemisch)	84	81	3	4%	96% (81/84)
Schwangere (nicht-endemisch)	14	14	0	0%	100% (14/14)
Gesamt	98	95	3	3%	97% (95/98)

Tabelle 2a: Spezifität bei Blutspendern aus Deutschland (nicht-endemische Region) und Schwangeren aus Deutschland (nicht-endemische Region). Arbovirus ViraChip® IgG – Zika Virus Ergebnisse.

Serumproben	Arbovirus ViraChip® IgG – Dengue Virus Ergebnis				
	Gesamt	Negativ	Positiv	% Positiv	% Spezifität
Blutspender (nicht-endemisch)	84	81	3	4%	96% (81/84)
Schwangere (nicht-endemisch)	14	13	1	7%	93% (13/14)
Gesamt	98	94	4	4%	96% (94/98)

Tabelle 2b: Spezifität bei Blutspendern aus Deutschland (nicht-endemische Region) und Schwangeren aus Deutschland (nicht-endemische Region). Arbovirus ViraChip® IgG – Dengue Virus Ergebnisse.

Serumproben	Arbovirus ViraChip® IgG – Chikungunya Virus Ergebnis				
	Gesamt	Negativ	Positiv	% Positiv	% Spezifität
Blutspender (nicht-endemisch)	84	84	0	0%	100% (84/84)
Schwangere (nicht-endemisch)	14	13	1	7%	93% (13/14)
Gesamt	98	97	1	1%	99% (97/98)

Tabelle 2c: Spezifität bei Blutspendern aus Deutschland (nicht-endemische Region) und Schwangeren aus Deutschland (nicht-endemische Region). Arbovirus ViraChip® IgG – Chikungunya Virus Ergebnisse.

Anforderungen an den Anwender

1. Dieser Test ist nur in einem Fachlabor durchzuführen, das die entsprechende Laborausstattung (z.B. nach GLP) und die ggf. erforderlichen behördlichen Genehmigungen zum Umgang mit den zu testenden Proben besitzt.

2. Um ein exaktes Testergebnis zu erhalten, müssen die Gebrauchsanweisung und „Good Laboratory Practice (GLP)“ eingehalten werden.

3. Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, das bezüglich des Testverfahrens geschult wurde.

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

1. **ViraChip® Microarrays:** Verschllossen in der Originalverpackung bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

2. **Waschpuffer-Konzentrat, 10-fach:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

3. **Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:** Bei 2-8°C ca. 2 Wochen haltbar. Bei längerer Aufbewahrung kann die Gebrauchsverdünnung aliquotiert bei -20°C eingefroren werden.

4. **Probenpuffer:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

5. **Konjugatlösung:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

6. **Chromogen/Substratlösung:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum. Vor Lichteinfall schützen!

7. Nach erstmaligem Öffnen der Reagenzien und Kitkomponenten wird bei sachgerechter Anwendung („Good Laboratory Practice“) und Einhaltung der auf dem Etikett angegebenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung die Haltbarkeit in der Regel bis zum angegebenen Verfallsdatum beibehalten.

Vorsichtsmaßnahmen / Sicherheitsvorkehrungen

1. Alle humanen Serumkomponenten wurden auf HCV-, HIV1,2-Antikörper und HBs-Antigen untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kitkomponenten, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös betrachtet und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden. Bei Arbeiten mit potentiell gefährlichen oder infektiösen Materialien sind die entsprechenden nationalen / internationalen Gesetze, Verordnungen und Vorschriften zu beachten. Dies gilt ebenfalls für die Lagerung und Entsorgung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.
2. Die Schutzmaßnahmen für das Arbeiten mit Gefahr- und Biostoffen sind gemäß den aktuell gültigen länderspezifischen Richtlinien für Laboratorien zu beachten. Maßnahmen sind unter anderem:
 - Nicht mit dem Mund pipettieren.
 - Einweg-Handschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
 - Am Arbeitsplatz nicht essen, trinken oder rauchen.

3. Die Berührung von Haut und Schleimhäuten mit Chromogen / Substratlösung vermeiden. Bei Berührung mit Haut und Augen sofort mit viel Wasser nachwaschen.
4. Proben und alle möglicherweise kontaminierten Materialien sowie flüssige infektiöse Abfälle sind gemäß allgemein anerkannter Laborrichtlinien zu dekontaminieren, z.B. durch ein mindestens 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C. Zur Entsorgung flüssiger Abfälle können diese z.B. mit Natriumhypochlorit in einem Volumenverhältnis gemischt werden, so dass das Endgemisch 1% Natriumhypochlorit enthält. Zur vollständigen Desinfektion 30 Minuten einwirken lassen.
5. Angaben über mögliche Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung von größeren Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind in den Sicherheitsdatenblättern dokumentiert.
6. Der Eintritt von Staub und anderen Verschmutzungen in die Kavitäten der MTP ist zu vermeiden, da daraus ungültige Ergebnisse resultieren können.

Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Patientenprobe

1. Der **Arbovirus ViraChip® IgG Test Kit 2.0** ist mit humanem Serum als Probenmaterial durchzuführen.
2. Die Probengewinnung sollte durch medizinisches Fachpersonal nach den geltenden Standards aus Vollblut erfolgen (25).
3. Proben, die mit Hitze vorbehandelt wurden, hämolytisch, ikterisch oder lipämisch sind, können zu ungültigen Ergebnissen führen.
4. Proben dürfen nicht mikrobiell kontaminiert sein.
5. In der Regel können unverdünnte Proben bis zu 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine Lagerung bis zu 24 Monaten sind die Proben in Aliquots bei mindestens -20°C einzufrieren.

6. Vor Beginn der Testdurchführung sollten die Proben auf Raumtemperatur gebracht werden. Proben nach dem Auftauen vorsichtig mischen und bei Bedarf sichtbare Partikel durch Zentrifugation entfernen.
7. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Einschränkungen des Untersuchungsverfahrens

1. Ein positives Testergebnis der jeweiligen Patientenprobe ist als Symptom zu werten. Interpretation und Beurteilung von Testergebnissen dürfen nur durch medizinisches Fachpersonal unter Wertung aller relevanten Daten erfolgen (24).
2. Ein negatives Testergebnis schließt einen Erregerkontakt bzw. eine Infektion nicht aus.
3. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern kann bei Untersuchungen mit verschiedenen Testen bzw. mit verschiedenen Herstellern aufgrund von unterschiedlichen Sensitivitäten, Spezifitäten und Testmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.
4. Bei Immunsuppression gilt eine eingeschränkte Beurteilbarkeit (24).

5. Medikamente und Immunglobulingaben können unspezifische Antikörperreaktionen hervorrufen (24).
6. *In vitro*-Diagnostika dürfen nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden, da zuverlässige Ergebnisse dann nicht mehr gewährleistet sind.
7. Präzises Befolgen der Arbeitsvorschrift ist essentiell für exakte Testergebnisse. Ungenügendes Durchführen der Waschschritte kann falsche Ergebnisse verursachen.
8. Der Ansatz von Poolproben, bei denen mehrere Seren gemeinsam untersucht werden, ist unzulässig, da bei derartigen Ansätzen die Testsensitivität und -spezifität beeinträchtigt werden können.

Hinweise zu Geräten und Software











1. Bei automatisierter Durchführung müssen für den jeweiligen Prozessortyp von Viramed Biotech AG validierte Arbeitsschritte programmiert und verwendet werden.
2. Bei Verwendung von prozessorspezifischen Verbrauchsmaterialien sind die entsprechenden Konfigurationen nach Herstellerangaben von Viramed Biotech AG freizugeben.
3. Die von Viramed Biotech AG bereitgestellte Geräte- und Softwarekonfiguration darf nicht verändert werden. Jegliche Änderung kann falsche Ergebnisse verursachen.

4. Es ist ausschließlich gerätespezifische Software zu verwenden. Änderungen an Konfigurationsdateien dürfen nur von Viramed Biotech AG durchgeführt werden.
5. Als Messgeräte sind nur von Viramed Biotech AG zugelassene Systeme zu verwenden.
6. Die Auswertung der ViraChip® Microarrays erfolgt ausschließlich über die ViraChip® Software. Eine manuelle/visuelle Auswertung ist nicht möglich.

Literatur

1. BARDINA, SV et al.: Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity, Science, 2017
2. BECK, C et al.: Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease, Int J Environ Res Public Health, 2013
3. CAMPOS, GS et al.: Zika virus outbreak, Bahia, Brazil, CDC Emerging Infectious Diseases, 2015
4. CDC National Center for Infectious Diseases: Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects Zika Virus, Stand 28 April 2017, <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/infants-children/zika-syndrome-birth-defects.html>, 2017
5. CHARREL, RN et al.: Background review for diagnostic test development for Zika virus infection, Bull World Health Organ, 2016
6. CHO, B et al.: Intermediate Expression and Evaluation of Chikungunya Virus E1 and E2 Envelope Proteins for Serodiagnosis of Chikungunya Virus Infection, Yonsei Med J, 2008
7. CRILL, WD & CHANG, GJJ: Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein Cross-Reactive Epitopes, J Virol, 2004
8. DAI, L et al.: Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody, Cell Host & Microbe, 2016
9. DOBLER, G, & ASPÖCK, H: Durch Stechmücken übertragene Arboviren als Erreger von Infektionen des Menschen, Denisia, 2010
10. FAYE, O et al.: Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century, PLOS Neglected Tropical Diseases, 2014
11. GIBBS, T & SMITH, DW: Flavivirus Laboratory Case Definition, Australian Government Department of Health, 2016
12. GUZMAN, MG et al.: Dengue: a continuing global threat, Nat Rev Microbiol, 2010
13. HANG, VT et al.: Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses, PLOS Neglected Tropical Diseases, 2009
14. HAYES, E: Zika Virus Outside Africa, CDC Emerging Infectious Diseases, 2009
15. JOHNSON, BW et al.: Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays, Journal of Infectious Diseases, 2016
16. KAM, YW et al.: Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection: Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development, Journal of Virology, 2012
17. KLEIN, DE et al.: Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion, Journal of Virology, 2013
18. WELLINGHAUSEN, N et al.: MiQ 35b: Infektionsimmunologische Methoden - Teil II, ELSEVIER; Urban & Fischer, 2016
19. MODIS, Y et al.: Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein, Journal of Virology, 2005
20. RAVULAPALLI, AR et al.: Recombinant Multi-epitope Protein for Early Detection of Dengue Infections, Clinical And Vaccine Immunology, 2006
21. RODRIGUEZ-MORALES, AJ et al.: The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas, Travel Medicine and Infectious Disease, 2016
22. SCATURRO, P et al.: Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins, PLoS Pathog, 2015
23. SIROHI, D et al.: The 38 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus, Vol 352, Issue, 2016
24. THOMAS, L: Labor und Diagnose, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
25. TUCK, MK et al.: Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection, J Proteome Res, 2009
26. VILLAMIL-GOMEZ, W et al.: Congenital chikungunya virus infection in Sincelejo, Colombia: a case series, J Trop Pediatr, 2015
27. VILLAMIL-GOMEZ, W et al.: Diagnosis, management and follow-up of pregnant women with Zika virus infection: a preliminary report of the ZIKERNCOL cohort study on Sincelejo, Colombia, Travel Med Infect, 2016
28. WAHALA, W & DE SILVA, AM: The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection, Viruses, 2011
29. WHO: Chikungunya, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>, 2017
30. WONG, SJ et al.: A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis, EBioMedicine, 2017
31. KAM, YW et al.: Sero-prevalence and cross-reactivity of chikungunya virus specific anti-E2EP3 antibodies in arbovirus-infected patients. PLoS neglected tropical diseases, 9(1), PLOS Neglected Tropical Diseases, 2015

Symbolerklärungen

	Hersteller		Bestell-Nummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Verwendbar bis / Mindesthaltbarkeitsdatum
	In-Vitro Diagnostikum		Temperaturbegrenzung (Lagerung)
	Chargen-Nummer		Positives Kontrollserum
	Ausreichend für 96 Ansätze		Negatives Kontrollserum