

Arbovirus ViraChip® IgM Test Kit 2.0

Használati utasítás



Chip-immunoblot a Zika-vírus, a dengue-vírus és a chikungunya-vírus fajok specifikus **arbovirus**-antigénjei ellen termelődő **IgM** antitestek kvalitatív kimutatására emberi szérumban.

Az **Arbovirus ViraChip® IgM Test Kit 2.0** egy mikroarray formátumú enzimimmunoassay-en alapuló immunoblot, amellyel három különböző arbovirus elleni antitestek kimutathatók. Ehhez a Zika-vírus, a dengue-vírus és a chikungunya-vírus tisztított, specifikus antigéneit meghatározott pozíciókban nitrocellulózra kötik. A tisztított, specifikus antigének közé tartoznak a burkolófehérjék, a nem szerkezeti fehérjék és egy pre-membrán fehérje.

Az **Arbovirus ViraChip® IgM Test Kit 2.0** megfelel a 98/79/EK irányelv minőségi szabványainak.

A vizsgálat elve

Egy 96 üreges standard mikrotiterlemez (MTP) minden üregének alján található egy nitrocellulóz-membrán, amelyen az antigének analitfoltokként vannak rögzítve (mikroarray). A szérumban lévő arbovirus-specifikus antitestek kötődnek a mikroarray-en rögzített antigénekhez. A konjugátum inkubációja során a konjugátum kötődik az antigén-antitest komplexhez. A Chromogen / Substrate oldat hozzáadása után a konjugátum-antitesthez kötődött lúgos foszfatáz átalakítja a Chromogen / Substrate-t, és ezzel lila vagy fekete színűre festi az antigén-antitest komplexet a mikromátrixon. A szérumban lévő konjugátuminkubációt és a kromogén/szubsztrát-inkubációt követően minden esetben egy mosási lépés következik a nem kötődött antitestek és reagensek eltávolítására.

Minden mikromátrix az analitfoltok mellett a következő kontrollfoltokat tartalmazza: **szérumkontrollok**, **konjugátumkontrollok**, **kalibrátorkontrollok** és egy **negatív kontroll**. Az analitfoltok az arbovirus-specifikus antigének elleni antitestek kimutatására szolgálnak:

1. a „Z-” jelöléssel ellátott Zika-vírus antigének: **Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*, Z-NS1, Z-NS2B, Z-NS5, Z-prM**
2. a „D-” jelöléssel ellátott dengue-vírus antigének: **D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII*, D-NS1** és
3. a „C-” jelöléssel ellátott chikungunya-vírus-antigén: **C-E**.

Igy az Arbovirus ViraChip® IgM mikrosorozat használatával három arbovirus specifikus IgM antitestjei párhuzamosan kimutathatók.

Az egyértelmű azonosítás érdekében a mélyedések színnel vannak ellátva: az Arbovirus ViraChip® IgM-et egy **kék negyedkör** jelöli a mélyedés szélén.

Rendelési szám: **V-ABCMOK**
Csomagméret: **MTP, 96 darab, egyenként letörhető üreg**
Mintamateriál: **10 µl szérumban**
A vizsgálat időtartama: **kb. 130 perc**

A készlet tartalma

1 MTP, 96 üreg	Arbovirus ViraChip® IgM Antigen Coated Wells	(Termékszám: V-ABCMAC)
12 ml	Egyenként letörhető üregek ViraChip® mikroarray-ekkel, használatra kész	
	ViraChip® AP-anti-humán IgM Conjugate	(Rend. sz.: V-UVCMKI)
	Anti-humán IgM konjugátumoldat ViraChip® tesztekhez, kecskéből, szarvasmarha-alkalikus foszfatázzal, használatra kész	
100 ml	ViraChip® / ViraStripe® / ViraBlot® hígító / Wash Buffer	(Rend.sz.: V-UVNUWP)
	Mosópuffer-koncentrátum ViraChip® tesztekhez, detergenssel és sókkal a nem specifikus kötődések megakadályozására, 10-szeres	
12 ml	ViraChip® Chromogen / Substrate Solution	(Rend.sz.: V-UVCUCS)
	Kromogén/szubsztrátoldat ViraChip® tesztekhez, BCIP / NBT-vel, használatra kész	

A minták hígításához szükséges kiegészítő puffer, külön szállítva

50 ml	ViraChip® Sample Buffer	(Rendelési szám: V-UVCUPP)
	Mintapuffer a ViraChip® tesztekhez, tejporral, detergenssel és sókkal a nem specifikus kötődések megakadályozására, használatra kész	

Optionálisan kapható

1 db MTP-tábla, 8 üreges	Arbovirus ViraChip® IgM Antigen Coated Wells (8)	(Rendelési szám: V-ABCMRT)
	Egyenként letörhető üregek ViraChip® mikroarray-ekkel, használatra kész	
110 µl	Arbovirus ViraChip® IgM Positive Control	(Rendelési szám: V-ABCMPC)
	IgM-pozitív kontrollszérumban, humán, használatra kész	
330 µl	Arbovirus ViraChip® IgG, A, M Negative Control	(Rendelési szám: V-ABCPNK)
	IgG, IgA, IgM negatív kontrollszérumban, humán, használatra kész	

További szükséges felszerelés

1. ViraChip® Software®	a teszt előkészítéséhez, elvégzéséhez és kiértékeléséhez, v1.3.0-1960-tól	(Rendelési szám: V-VCNUPR)
2. 2D-vonalkód-leolvasó	a DataMatrix-kódok leolvasásához	
3. Mikrotiterlemez	a mikrotiterlemez megkezdett sorainak feltöltéséhez a tartókeretben	(Rendelési szám: V-UVNMTP)
96 üres üreggel		
4. Orbitális rázóegység (750 rpm) (20 Hz)	a minták és reagensek keveréséhez a feldolgozás során, vagy lineáris rázóegység	
5. ViraChip® Scanner	a kifejlesztett ViraChip® tesztek digitalizálásához / méréséhez, a ViraChip®-től kezdve	(rendelési szám: V-UVCSCA)
vagy ViraChip® Reader	szkenner v1.0, illetve ViraChip® Reader Rev.01	(rendelési szám: V-UVCCAM)
6. Optionális: ventilátor/hűtőventilátor	a kifejlesztett mikrotiterlemezek gyorsabb szárításához	

LABORATORY DIAGNOSTIC
S

Viramed Biotech AG • Behringstraße 11 • D-82152 Planegg • Németország • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49

A reagensek és a betegminták előkészítése

Mosópuffer-Használati hígítás:	Használat előtt minden reagenst és a csomagolt mikrotiterlemez szobahőmérsékletre (RT: 20–23 °C) kell hozni. Használat előtt minden reagenst alaposan össze kell keverni.
Mintapuffer:	A mosópuffer-koncentrátumot 1:10 arányban hígítsa desztillált vagy ionmentes vízben (H ₂ O): 100 ml mosópuffer-koncentrátum + 900 ml H ₂ O
Konjugátumoldat:	Használatra kész
Kromogén / szubsztrátoldat:	Használatra kész
MTP-üreges lemezek:	Óvatosan vegye ki a mikrotiterlemez (MTP) a csomagolásból, és helyezze a szükséges számú üreget egy üres mikrotiterlemez-keretbe (A teszt előkészítése és elvégzése, 3. pont). A csomagolásból való kivétel után az üregeket azonnal használja fel. A felesleges üregeket azonnal tegye vissza az eredeti csomagolásba, zárja le szorosan, és 2–8 °C-on tárolja.
Betegminták:	A betegmintákat 1:76 arányú hígításban kell felhasználni, pl. 10 µl betegminta + 750 µl mintapuffer. A feldolgozáshoz a hígított mintából 100 µl szükséges.
Kontrollok:	Szükség esetén a pozitív és a negatív kontrollszérumot 1:16 arányú hígításban kell felhasználni, pl.: 10 µl kontrollszérum + 150 µl mintapuffer. A feldolgozás során a hígított kontrollból 100 µl-t használunk fel.

Az Arbovirus ViraChip®IgM mikrosorozat felépítése

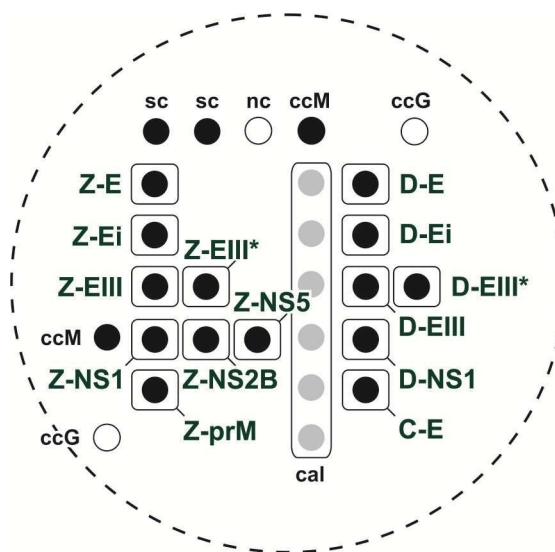
Antigének:

Minden Zika-vírus-specifikus antigén (Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*, Z-NS1, Z-NS2B, Z-NS5 és Z-prM), dengue-vírus-specifikus antigén (D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII* és D-NS1), valamint a chikungunya-vírus-specifikus antigén (C-E) egyetlen pontként van felvitt. Minden pont egy sávnak felel meg a Western blot immunobloton.

Kontrollok:

Minden ViraChip®üreg a következő beépített kontrollokat tartalmazza:

két szérumkontroll (sc), egy negatív kontroll (nc), két IgG-konjugátum-kontroll (ccG), két IgM-konjugátum-kontroll (ccM) és hat kalibrátor-kontroll (cal).



1. ábra: A mikrotiterlemez egyik üregének ábrázolása a ViraChip®IgM mikromátrixszal (nagyítva). Az antigénekhez tartozó foltok és a beépített kontrollokhoz tartozó foltok elrendezése.

Az arbovirus-antigének irodalmi nevezéktana és leírása

Arbovirus	Nomenklatura:	Antigén:	Megjegyzések:
Zika-vírus	Z-E	Burkolat	A Zika-vírus E-fehérje alkotja a virion felületének nagy részét, és részt vesz a replikáció során zajló folyamatokban, mint például a gazdasejtekhez való kötődés és a membránfúzió (10,8,25).
	Z-Ei	Burkolat	A Zika-vírus belső E-fehérje-fragmense.
	Z-EIII	III. burkolat	A Zika-vírus E-fehérje régiója.
	Z-EIII*	Envelope III*	A Zika-vírus E-fehérjéjének módosított régiója.
	Z-NS1	Nem szerkezeti fehérje	Az NS1 egy nagy fehérje, amely különböző szerepet játszik a Zika-vírus immunelkerülésében, patogenezisében és vírusreplikációjában (3,13).
	Z-NS2B	2B-es nem szerkezeti fehérje	Az NS2B a kapszid hasításának elengedhetetlen kofaktora (21).
	Z-NS5	5-ös nem szerkezeti fehérje	Az NS5 egy RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp) és metiltranszferáz, amely elengedhetetlen a vírus RNS szintéziséhez és a Zika-vírus RNS-cappingjéhez (21,33).
Dengue-vírus	Z-prM	pre-membránfehérje	A prM az E-fehérjével együtt fontos szerepet játszik a Zika-vírus összeállításában (18).
	D-E	Burkolat	A dengue-vírus E-fehérje a virion felületének nagy részét képezi, és részt vesz a replikáció során zajló folyamatokban, például a gazdasejtekhez való kötődésben és a membránfúzióban (20,17).
	D-Ei	Burkolat	A dengue-vírus belső E-fehérje-fragmense.
	D-EIII	Envelope III	A dengue-vírus E-fehérje régiója.
	D-EIII*	Envelope III*	A dengue-vírus E-fehérjéjének módosított régiója.
Chikungunya-vírus	D-NS1	Nem szerkezeti fehérje	Az NS1 egy nagy fehérje, amely különböző szerepet játszik a dengue-vírus immunelkerülésében, patogenezisében és vírusreplikációjában (24).
	C-E	Burkolat	Az E-fehérje egy fúziós fehérje, amely a chikungunya-vírus-fertőzés során közvetíti a membránfúziót (6).

A vizsgálat előkészítése és elvégzése

Automatizált feldolgozás esetén az inkubációs idők, a térfogatok és az egyes munkafolyamatok sorrendje eltérhet az alábbiakban felsorolt munkavégzési utasításoktól. A használt automatizálási megoldásra vonatkozó részletes, lépésről lépésre szóló útmutatót, valamint a ViraChip® Software használatára vonatkozó útmutatót a Viramed Biotech AG biztosítja a készülékek beállítása és a képzés során. Lásd még a „Megjegyzések a készülékekről és a szoftverről” című részt.

1. Dokumentálás

A teszt kiválasztása és a minták adatainak bevétele a ViraChip® Software beosztási tervébe.

2. Betöltés

A Test Kit és a mikrotiterlemez címkéin található 2D-vonalkódok beolvasása a tételszámok és a tétel-specifikus tényezők (lot specific factors) átviteléhez.

3. Feldolgozás

Végezze el az RT-kezelés összes lépését.

3.1 Előkészítés

- Helyezze be a foglalatba a foglalatási terv szerint meghatározott számú üreget.
- A mikrotiterlemez egy sorának üres pozícióit töltsük fel üres üregekkel a tartókeretben. A sorok a mikrotiterlemezen 1–12-es számokkal vannak jelölve.

Ügyeljen arra, hogy a reteszek eltérésekor ne kerüljenek műanyag részecskék az üregekbe.

3.2 Előinkubálás

- Minden üregbe adjon 300 µl használatra kész mosópuffert.
- 5 percig szobahőmérsékleten inkubálja a rázógépen.
- A folyadékot leszívja.

3.3 Széruminkubáció

- A beosztási tervnek megfelelően adjon 100 µl hígított betegmintát, illetve 100 µl hígított kontrollszérumot a megfelelő üregbe.
- 30 percig szobahőmérsékleten rázógépen inkubáljuk.
- A folyadékot felszívjuk.

3.4 3-szor mossuk át

- Minden üregbe adjon 300 µl használatra kész mosópuffert.
- 5 percig szobahőmérsékleten inkubálja a rázógépen.
- A folyadékot leszívjuk.

3.5 Konjugátum inkubáció

- Minden üregbe adjon 100 µl konjugátumoldatot.
- 30 percig szobahőmérsékleten rázógépen inkubáljuk.
- A folyadékot felszívjuk.

A leszívó tüket úgy állítsa be, illetve a pipettákat úgy használja, hogy az üregek alja ne sérüljön.

Az üregek alját az inkubációs lépések során teljesen folyadékkal kell borítani.

3.6 3-szor mossuk át

- Minden üregbe adjon 300 µl használatra kész mosópuffert.
- 5 percig szobahőmérsékleten rázógépen inkubáljuk.
- A folyadékot leszívjuk.

Az inkubációs és mosási lépések során használjon orbitális rázógépet, amely kb. 750 rpm frekvenciára állítható, vagy lineáris rázógépet, amely kb. 20 Hz frekvenciára állítható.

3.7 1-szer mossuk

- Minden üregbe adjon 300 µl desztillált vagy ionmentes vizet.
- 1 percig szobahőmérsékleten inkubálja.
- A folyadékot leszívjuk.

3.8 Szubsztrát inkubáció

- Minden üregbe adjon 100 µl kromogén/szubsztrát oldatot.
- 15 percig szobahőmérsékleten rázógépen inkubáljuk.
- Leállítás: a folyadékot felszívjuk.

3.9 3-szor mossuk át

- Minden üregbe adjon 300 µl desztillált vagy ionmentes vizet.
- Nincs közbenső inkubálás.
- A folyadékot leszívjuk.

3.10 Az üregeket megszáritani

Hagyja 20 percig száradni maximálisan 60%-os páratartalom mellett, folyamatos légáram mellett.

Magasabb páratartalom esetén a száradási idő meghosszabbodhat. Alternatív megoldásként hagyja 12 órán át szobahőmérsékleten, fénytől védve száradni.

4. Szkennelés

A ViraChip® mikromátrixokat a ViraChip® Scannerrel vagy a ViraChip® Readerrel mérje meg.

A ViraChip® mikromátrixok méréseit a feldolgozást követő 24 órán belül el kell végezni (a mikrotiterlemezt fénytől védve tárolja). A pontos eljárást kérjük, a készülék kézikönyvében keresse meg.

5. Elemzés

5.1 Az antigén- és kontrollfoltok hozzárendelésének ellenőrzése (technikai validálás)

A ViraChip®Software minden foltot a pozíciója alapján automatikusan a megfelelő antigén- vagy kontrollfoltokhoz rendel. Az automatikus hozzárendelést vizuálisan ellenőrizni kell az 1. ábrán látható mintával. Azokat a hozzárendeléseket, amelyek nem felelnek meg a bemutatott mintának, a „QC” mezőben állítsa „érvénytelen”-re. A megfelelő mintát meg kell ismételni.

5.2 Érvényességi ellenőrzés

Az érvényességi ellenőrzést a ViraChip®Software automatikusan elvégzi.

A ViraChip®mikromátrix akkor érvényes, ha a következő kontrollfoltok megfelelnek a ViraChip®Software-ben rögzített kritériumoknak:

- **Szérumkontrollok** (sc) a határérték felett
- **IgM konjugátum kontrollok** (ccM) a küszöbérték felett
Az IgM konjugátum-kontrolloknak erőteljesebb reakciót kell mutatniuk, mint a többi konjugátum-osztály kontrolljainak.
- **Kalibrátor kontrollok** (cal) a küszöbérték felett
- **Negatív kontroll** (nc) a küszöbérték alatt

Ha a felsorolt kritériumok bármelyike nem teljesül, a ViraChip® mikroarray-t „érvénytelennek” minősítik. Az érvénytelen ViraChip® mikroarray-eket nem szabad kiértékelni, azokat meg kell ismételni.

5.3 A ViraChip®mikromátrixok kiértékelése

A betegminták értékelését a ViraChip®Software automatikusan végzi el az alábbiakban meghatározott értékelési kritériumok alapján:

A ViraChip®Software minden spot ViraChip®egységeit a tétel-specifikus tényezők figyelembevételével, a kalibrátor kontrollokhoz viszonyítva számítja ki.

Értékelési kritériumok

A spotok ViraChip®egységei	Eredmény	Értékelés
a Zika-vírus antigénekre vonatkozóan: Z-NS1 folt ≥ 100 ViraChip®egység <u>vagy</u> legalább három antigén-spot ≥ 100 ViraChip®egység a következők közül: Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*, Z-NS2B, Z-NS5, Z-prM Nincs folt ≥ 100 ViraChip®egység <u>vagy</u> bármely más kombináció	Pozitív a Zika-vírusra Negatív a Zika-vírusra	A Zika-vírus ellen specifikus IgM antitestek kimutathatók. Valószínű a Zika-vírusos fertőzés. A Zika-vírus elleni specifikus IgM antitestek nem mutathatók ki. Fertőzés gyanúja esetén 2–3 hét múlva vegyenek egy második mintát az IgM- és IgG-antitestek vizsgálatához.
a dengue-vírus antigének: D-NS1 folt ≥ 100 ViraChip®egység <u>vagy</u> legalább három antigén-folt ≥ 100 ViraChip®egység a D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII* csoportokból Nincs folt ≥ 100 ViraChip®egység <u>vagy</u> bármely más kombináció	Pozitív a dengue-vírusra Negatív a dengue-vírusra	A dengue-vírus ellen specifikus IgM antitestek kimutathatók. Valószínű a dengue-vírusos fertőzés. A dengue-vírus antigénjei ellen nem mutathatók ki specifikus IgM antitestek. Fertőzés gyanúja esetén 2–3 hét elteltével vegyenek egy második mintát, és vizsgálják meg az IgM- és IgG-antitestek jelenlétét.
a chikungunya-vírus antigénjére: C-E Spot ≥ 100 ViraChip®egység C-E Spot < 100 ViraChip®egység	Pozitív a chikungunya-vírusra Negatív a chikungunya-vírusra	A chikungunya-vírus burkolat-antigén ellen specifikus IgM antitestek kimutathatók. Valószínű a chikungunya-vírusos fertőzés. A chikungunya-vírus burkolat-antigénje ellen specifikus IgM antitestek nem mutathatók ki. Fertőzés gyanúja esetén 2–3 hét múlva végezzen második vizsgálatot IgM- és IgG-antitestek kimutatására.

Az arbovirus-ellenanyagok diagnosztikai jelentősége

1. Általános információk

A Zika-, a dengue- és a chikungunya-vírusok emberre kórokozó arbovirusok, amelyeket elsősorban szúnyogok (*Aedes* nemzetség) terjesztenek. A Zika- és a dengue-vírus a flavivirusok családjába (*Flavivirus* nemzetség) tartozik, a chikungunya-vírus pedig a togavírusok családjába (*Alphavirus* nemzetség) (9). E vírusok közeli genetikai rokonsága és átfedő elterjedési területe egyaránt megnehezíti a szerológiai megkülönböztetést.

A megbízható diagnosztikát tovább nehezíti, hogy sok flavivirus (például a Zika- és a dengue-vírus) hasonló vagy egyáltalán nem okoz betegségtüneteket, és a Zika-vírussal fertőzött betegek antitestjei keresztreakálhatnak más flavivirusokkal (32). Ezenkívül különösen a terhesség alatti Zika-vírus- vagy chikungunya-vírus-fertőzések esetében felmerül a gyanú, hogy kockázatot jelentenek a magzatra nézve (28,29,4).

2. Zika-vírus ellenanyagok

a) Az IgG-ellenanyagok az IgM-ellenanyagok után néhány napon belül képződnek, és a fertőzés után hónapokig vagy évekig kimutathatók (5), illetve akár egész életen át fennmaradhatnak (19).

b) Az IgM antitestek általában a betegség kezdetétől számított néhány nappal később jelennek meg (14,5), és legfeljebb három hónapig kimutathatók. Az IgM antitestek többnyire már a tünetek megjelenésétől számított 4–8 héten belül eltűnnek (19), azonban vannak olyan betegek is, akiknél az IgM antitestek hosszabb ideig kimutathatók voltak (5). Általában az IgM antitestek egy nemrégiben átvitt fertőzés esetén kimutathatók (19), és így akut fertőzés tüneteiként értelmezhetők.

3. Dengue-vírus ellenanyagok

a) Az elsődleges fertőzés során az IgG-antitestek általában körülbelül egy héttel a betegség kezdete után jelennek meg, a fertőzés után néhány héttel érik el csúcspontjukat, ezt követően kissé csökkennek, és évtizedekig vagy még hosszabb ideig fennmaradnak (30).

A másodlagos dengue-vírus-fertőzésre jellemző a magas titerű anti-dengue-IgG-antitestek megjelenése az IgM-antitestek megjelenése előtt vagy azzal egyidejűleg (22).

b) Az elsődleges fertőzés során az IgM antitestek már a betegség kezdetétől számított 3–5 nap múlva megjelennek. Körülbelül 2 héttel a fertőzés után érik el csúcspontjukat, majd ezután csökkennek (22). Az elsődleges és a másodlagos dengue-vírus-fertőzések esetében az IgM-antitestek kialakulásának kinetikája hasonló (22). Azonban a másodlagos fertőzések esetén az IgM-antitest-titer általában jelentősen

alacsonyabbak (22), sőt akár teljesen hiányozhatnak is (11), ami hamis negatív eredményekhez vezethet (19). A szoros rokonság miatt a flavivirusokkal, például a Zika-vírussal történő másodlagos fertőzések esetén is hasonló a helyzet.

4. Chikungunya-vírus ellenanyagok

a) Az IgG-antitestek már a betegség hetedik napjától kimutathatók (19), és néhány hónapig fennmaradnak (16). Az IgG-antitestek legalább négyszeres emelkedése két egymást követő betegmintában a fertőzés bizonyítékának számít (19).

b) Az IgM antitestek általában már a betegség akut fázisában kimutathatók a beteg szérumban (16), legkésőbb 5–7 nappal a betegség kezdete után (19,15). Az IgM-antitestek titerértéke a betegség kitérésétől számított 3–5 héttel a legmagasabb, és körülbelül 2 hónapig fennmarad (31). Az IgM-antitestek önmagában történő kimutatása akut fertőzésre utal, de ezt a betegség lefolyásának nyomon követésével kell megerősíteni (19).

5. Minden arbovirus esetében az E-fehérje (Envelope Protein, E-Protein) jelenti a semlegesítő antitestek immunválaszának elsődleges célpontját. A legújabb tanulmányok azt mutatják, hogy a Zika-vírus E-fehérje nagyjában hasonló a dengue-vírus és a nyugat-nílusi vírus E-fehérjéjéhez (1,12). Különösen a chikungunya-vírus esetében az E-fehérje rendkívül specifikusnak tekinthető (6).

6. Keresztreaktivitásokat írtak le a megfelelő vírusantigének között a Zika-, dengue-, nyugat-nílusi-, sárgaláz-, japán encephalitis-, FSME- és chikungunya-vírusok által okozott fertőzések esetében (34,12,7). Azokon a területeken, ahol két vagy több arbovirus endemikusan fordul elő, a többszörös és egymást követő fertőzések megnehezítik a differenciáldiagnózist a korábban már jelen lévő, arbovirus-specifikus antitestek miatt (7,32).

7. Egy elsődleges fertőzés után egy antigénileg rokon vírus által okozott második fertőzés lefolyása a már jelen lévő, fajok között áttehető és keresztreakáló antitestek miatt súlyosbodhat (1,2,23).

8. Más vírusfertőzések, például például az EBV, pozitív antitest-reakciókat eredményezhetnek az Arbovirus ViraChip® IgM Test Kit 2.0 Test Kit használata során.

9. A vizsgálat kiértékelése és az azt követő eredményértelmezés során figyelembe kell venni, hogy a páciens korábban utazás vagy hosszabb tartózkodás során érintkezett-e arbovirusokkal endémiás területeken.

Teljesítményadatok

Érzékenység

Előre meghatározott pozitív szérumbintákat dengue- és zika-vírus-endemikus, illetve nem endemikus területekről, valamint klinikailag igazolt chikungunya-vírus-fertőzéssel rendelkező mintákat elemeztünk az Arbovirus ViraChip® IgM tesztkészlettel a zika-, dengue- és chikungunya-vírus elleni IgM antitestek kimutatására. Az eredményeket az 1a., 1b. és 1c. táblázat tartalmazza.

Szérumbinták	Arbovirus ViraChip® IgM – Zika-vírus Eredmény			
	Összesen	Pozitív	Negatív	% érzékenység
Zika-vírus előre meghatározott pozitív*	11	11	0	100% (11/11)

1a. táblázat: Előre meghatározott pozitív szérumbinták dengue- és Zika-vírus endémiás és nem endémiás területekről. Arbovirus ViraChip® IgM – Zika-vírus eredmények.

Szérumbinták	Arbovirus ViraChip® IgM – dengue-vírus eredmény			
	Összesen	Pozitív	Negatív	% érzékenység
Dengue-vírus előre meghatározott pozitív*	16	16	0	100% (16/16)

1b. táblázat: Előre meghatározott pozitív szérumbinták dengue- és Zika-vírus endémiás és nem endémiás területekről. Arbovirus ViraChip® IgM – dengue-vírus eredmények.

Szérumminták	Arbovirus ViraChip® IgM – Chikungunya-vírus eredmény			
	Összesen	Pozitív	Negatív	% érzékenység
Klinikailag definiált chikungunya-vírus*	20	19	1	95% (19/20)

1c. táblázat: Klinikailag meghatározott chikungunya-vírus-fertőzéssel rendelkező szérumminták. Arbovirus ViraChip® IgM – chikungunya-vírus eredmények.

*) Ugyanazon arbovírussal vagy más arbovírusokkal történő többszörös fertőzésekre vonatkozóan nincs információ.

Specifitás

Az analitikai specifitás meghatározása érdekében 61, németországi (nem endémiás régióból származó) véradókból származó mintát és 15, németországi (nem endémiás régióból származó) terhes nőtől származó mintát vizsgáltak az Arbovirus ViraChip® IgM teszt segítségével a Zika-vírus, a dengue-vírus és a chikungunya-vírus elleni IgM antitestek kimutatására. Az eredményeket a 2a., 2b. és 2c. táblázat tartalmazza.

Szérumminták	Arbovirus ViraChip® IgM – Zika-vírus Eredmény				
	Összesen	Negatív	Pozitív	% Pozitív	Specifitás (%)
Véradók (nem endemikus)	61	61	0	0%	100% (61/61)
Terhes nők (nem endemikus)	15	15	0	0%	100% (15/15)
Összesen	76	76	0	0%	100% (76/76)

2a. táblázat: Specifitás németországi véradók (nem endémiás régió) és németországi terhes nők (nem endémiás régió) esetében. Arbovirus ViraChip® IgM – Zika-vírus eredmények.

Szérumminták	Arbovirus ViraChip® IgM – dengue-vírus eredmény				
	Összesen	Negatív	Pozitív	% Pozitív	Specifitás (%)
Véradók (nem endemikus)	61	59	2	3%	97% (59/61)
Terhes nők (nem endemikus)	15	15	0	0%	100% (15/15)
Összesen	76	74	2	3%	97% (74/76)

2b. táblázat: Specifitás németországi véradók (nem endémiás régió) és németországi terhes nők (nem endémiás régió) esetében. Arbovirus ViraChip® IgM – dengue-vírus eredmények.

Szérumminták	Arbovirus ViraChip® IgM – chikungunya-vírus eredmény				
	Összesen	Negatív	Pozitív	% Pozitív	Specifitás (%)
Véradók (nem endemikus)	61	60	1	2%	98% (60/61)
Terhes nők (nem endémiás)	15	15	0	0%	100% (15/15)
Összesen	76	75	1	1%	99% (75/76)

2c. táblázat: Specifitás németországi véradók (nem endémiás régió) és németországi terhes nők (nem endémiás régió) esetében. Arbovirus ViraChip® IgM – chikungunya-vírus eredmények.

A felhasználóval szemben támasztott követelmények

1. Ezt a vizsgálatot kizárólag olyan szaklaboratóriumban szabad elvégezni, amely rendelkezik a megfelelő laboratóriumi felszereléssel (pl. a GLP előírásainak megfelelően) és a vizsgálandó minták kezeléséhez esetlegesen szükséges hatósági engedélyekkel.

2. A pontos vizsgálati eredmény elérése érdekében be kell tartani a használati utasítást és a „Good Laboratory Practice (GLP)” előírásait.
3. Ezt a tesztet kizárólag olyan szakember végezheti, aki képzésben részesült a vizsgálati eljárás tekintetében.

A reagensek tárolása és eltarthatósága

- 1. ViraChip® mikromátrixok:** Az eredeti csomagolásban lezárva, 2–8 °C-on a lejárati dátumig tárolhatók.
- 2. Mosópuffer-koncentrátum, 10-szeres:** 2–8 °C-on a lejárati dátumig tárolható.
- 3. Mosópuffer-használati hígítás:** 2–8 °C-on kb. 2 hétig tárolható. Hosszabb tárolás esetén a használati hígítást aliquotokra osztva -20 °C-on fagyasztható.
- 4. Mintapuffer:** 2–8 °C-on a lejárati dátumig tárolható.
- 5. Konjugátumoldat:** 2–8 °C-on a lejárati dátumig tárolható.

- 6. Kromogén/subsztrátoldat:** 2–8 °C-on a lejárati dátumig tárolható. Fénytől védve tartandó!
- 7. A reagensek és a készlet összetevőinek első kinyitása után,** megfelelő alkalmazás („Good Laboratory Practice”) és a címkén feltüntetett tárolási feltételek betartása mellett, az eredeti csomagolásban a termék szavatossága általában a feltüntetett lejárati dátumig megmarad.

Óvintézkedések / Biztonsági előírások

1. Minden humán szérumkomponenst HCV-, HIV1,2-ellenanyagok és HBs-antigén jelenlétére vizsgáltak, és negatívnak találták. Mindazonáltal a készlet összes humán komponensét, valamint a betegmintákat is potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni, és azok kezelése során a megfelelő óvintézkedéseket kell betartani. Potenciálisan veszélyes vagy fertőző anyagokkal végzett munkák során be kell tartani a vonatkozó nemzeti és nemzetközi törvényeket, rendeleteket és előírásokat. Ez vonatkozik a felhasznált vegyi anyagok és reagensek tárolására és ártalmatlanítására is.

2. A veszélyes és biológiai anyagokkal való munkavégzés során a laboratóriumokra vonatkozó, jelenleg hatályos országspecifikus irányelvek szerinti védőintézkedéseket kell betartani. Az intézkedések többek között a következők:

- Ne pipettázzon a szájával.
- Viseljen eldobható kesztyűt és védőszemüveget/arcvédőt.
- A munkahelyen ne egyen, ne igyon és ne dohányozzon.

3. Kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a kromogénnel / szubsztrátoldattal. Bőrrel vagy szemmel való érintkezés esetén azonnal bő vízzel öblítse le.

4. A mintákat és minden esetlegesen szennyezett anyagot, valamint a folyékony fertőző hulladékokat az általánosan elfogadott laboratóriumi irányelveknek megfelelően kell fertőtleníteni, pl. legalább 20 perces autoklavozással 121 °C-on. A folyékony hulladékok ártalmatlanításához azokat pl. nátrium-hipokloritral olyan térfogatarányban keverhetjük össze, hogy a végső keverék 1% nátrium-hipokloritot tartalmazzon. A teljes fertőtlenítés érdekében hagyjuk hatni 30 percig.

5. Az esetleges veszélyekre, az elsősegélynyújtási intézkedésekre, a nagyobb mennyiségek véletlen kibocsátása esetén szükséges intézkedésekre, a kezelésre és tárolásra, a személyi védőfelszerelésre, az ártalmatlanításra vonatkozó utasításokra, valamint a toxikológiai adatokra vonatkozó információk a biztonsági adatlapokban találhatók.

6. Kerülni kell a por és egyéb szennyeződések bejutását az MTP üregeibe, mivel ez érvénytelen eredményekhez vezethet.

A betegminták előkészítése, kezelése és tárolása

1. Az **Arbovirus ViraChip®IgM Test Kit 2.0-t** humán szérummal kell elvégezni.

2. A mintavételt orvosi szakembereknek kell elvégezniük a hatályos szabványoknak megfelelően, teljes vérből (27).

3. A hővel előkezelt, hemolitikus, ikerikus vagy lipémiás minták érvénytelen eredményeket okozhatnak.

4. A minták nem lehetnek mikrobiálisan szennyezettek.

5. Általában a hígítatlan minták 2–8 °C-on legfeljebb 5 napig tárolhatók. 24 hónapos tároláshoz a mintákat alikvotokban legalább –20 °C-on kell fagyasztani.

6. A vizsgálat megkezdése előtt a mintákat szobahőmérsékletre kell hozni. A felolvasztás után a mintákat óvatosan keverjük össze, és szükség esetén centrifugálással távolítsuk el a látható részecskéket.

7. Kerülni kell a minták ismételt fagyasztását és felolvasztását.

A vizsgálati eljárás korlátai

1. Az adott betegmintára vonatkozó pozitív vizsgálati eredményt tünetként kell értelmezni. A vizsgálati eredmények értelmezését és értékelését kizárólag orvosi szakemberek végezhetik, figyelembe véve az összes releváns adatot (26).

2. A negatív teszt eredmény nem zárja ki a kórokozóval való érintkezést vagy a fertőzést.

3. A specifikus antitestek kimutatása különböző tesztekkel vagy különböző gyártók termékeivel végzett vizsgálatok során eltérő eredményekhez vezethet a különböző érzékenységek, specifikitások és vizsgálati módszerek miatt.

4. Immunszuppresszió esetén az értékelhetőség korlátozott (26).

5. A gyógyszerek és az immunglobulin-adagolás nem specifikus antitestreakciókat válthat ki (26).

6. Az *in vitro* diagnosztikai eszközöket a feltüntetett lejárati időn túl nem szabad használni, mivel ekkor már nem garantálhatók a megbízható eredmények.

7. A pontos vizsgálati eredmények érdekében elengedhetetlen a munkavégzési utasítások pontos betartása. A mosási lépések nem megfelelő végrehajtása hibás eredményeket okozhat.

8. A több szérumot együtt vizsgáló pool-minták használata nem megengedett, mivel ilyen esetekben a teszt érzékenysége és specifikitása romolhat.

Megjegyzések a készülékekről és a szoftverekről

1. Automatizált végrehajtás esetén a Viramed Biotech AG által az adott processzortípusra validált munkafolyamatokat kell programozni és alkalmazni.

2. Processzor-specifikus fogyóeszközök használata esetén a megfelelő konfigurációkat a Viramed Biotech AG gyártói utasításai szerint kell jóváhagyni.

3. A Viramed Biotech AG által biztosított készülék- és szoftverkonfigurációt nem szabad módosítani. Bármilyen módosítás hibás eredményeket okozhat.

4. Kizárólag a készülékhez tartozó szoftvert szabad használni. A konfigurációs fájlok módosítását kizárólag a Viramed Biotech AG végezheti el.

5. Mérőeszközként kizárólag a Viramed Biotech AG által jóváhagyott rendszereket szabad használni.

6. A ViraChip®mikrosorozatok kiértékelése kizárólag a ViraChip®Software segítségével történhet. Kézi/vizuális kiértékelés nem lehetséges.

Irodalom

1. BARDINA, SV et al.: A Zika-vírus patogenezisének fokozódása a már meglévő ant flavavírus-immunitás hatására, Science, 2017
2. BECK, C et al.: Flavavírusok Európában: összetett terjedési mintázatok és azok következményei a nyugat-nílusi betegség diagnosztizálására és ellenőrzésére nézve, Int J Environ Res Public Health, 2013
3. CAMPOS, GS et al.: Zika-vírus-járvány, Bahia, Brazília, CDC Emerging Infectious Diseases, 2015
4. CDC Nemzeti Fertőző Betegségek Központja: Veszélyes Zika-szindróma és egyéb születési rendellenességek a Zika-vírus kapcsán, 2017. április 28-i állapot, <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/infants-children/zika-syndrome-birth-defects.html>, 2017
5. CHARREL, RN és munkatársai: Háttéráttekintés a Zika-vírus-fertőzés diagnosztikai tesztjének fejlesztéséhez, Bull World Health Organ, 2016
6. CHO, B et al.: A chikungunya-vírus E1 és E2 burkolófehérjéinek közbeső expressziója és értékelése a chikungunya-vírus-fertőzés szerodiagnosztikájához, Yonsei Med J, 2008
7. CRILL, WD és CHANG, GJJ: A flavavírusok burkoló glikoproteinjeinek keresztreaktív epitópjainak lokalizációja és jellemzése, J Virol, 2004
8. DAL, L et al.: A Zika-vírus burkolófehérjéjének szerkezete és annak komplexe egy széles spektrumú védelmet nyújtó flavavírus-ellenanyaggal, Cell Host & Microbe, 2016
9. DOBLER, G, & ASPÖCK, H: A szúnyogok által terjesztett arbovírusok mint az emberi fertőzések kórokozói, Denisia, 2010
10. FAYE, O et al.: A Zika-vírus molekuláris evolúciója a 20. századi megjelenése során, PLOS Neglected Tropical Diseases, 2014
11. GIBBS, T és SMITH, DW: A flavavírusok laboratóriumi esetmeghatározása, Ausztrál Egészségügyi Minisztérium, 2016

12. GUZMAN, MG et al.: Dengue: a continuing global threat, Nat Rev Microbiol, 2010
13. HANG, VT et al.: Az NS1 ELISA és a laterális áramlású gyors tesztek diagnosztikai pontossága a dengue-láz érzékenysége, specititása, valamint a vírusterheléssel és az antitestválaszokkal való összefüggései tekintetében, PLOS Neglected Tropical Diseases, 2009
14. HAYES, E: A Zika-vírus Afrikán kívül, CDC Emerging Infectious Diseases, 2009
15. JOHNSON, BW et al.: A chikungunya-vírus-fertőzések laboratóriumi diagnosztikája és a diagnosztikai tesztek kereskedelmi forrásai, Journal of Infectious Diseases, 2016
16. KAM, YW et al.: A chikungunya-vírus-fertőzésre adott emberi antitestválasz longitudinális elemzése: következmények a szerodiagnosztikára és a vakcinafejlesztésre nézve, Journal of Virology, 2012
17. KLEIN, DE et al.: A dengue-vírus burkolófehérje késői fázisú fúziójának szerkezete, Journal of Virology, 2013
18. LI, L et al.: A flavivírus prekursor membrán-burkolófehérje komplexe: szerkezet és érés, Science, 2008
19. WELLINGHAUSEN, N et al.: MiQ 35b: Fertőzésimmunológiai módszerek – II. rész, ELSEVIER; Urban & Fischer, 2016
20. MODIS, Y et al.: Változó felszíni epitópok a 3-as típusú dengue-vírus burkoló glikoprotein kristályszerkezetében, Journal of Virology, 2005
21. MURRAY, CL et al.: Az összeszerelés építői – a Flaviviridae nem szerkezeti fehérjéinek szerepe a virion morfogenezisben, Nature Reviews Microbiology, 2008
22. RAVULAPALLI, AR et al.: Rekombináns multiepitóp fehérje a dengue-fertőzések korai kimutatására, Clinical And Vaccine Immunology, 2006
23. RODRIGUEZ-MORALES, AJ et al.: A dengue, a chikungunya és a Zika együttes terjedése és együttes fertőzése által okozott arbovírusos betegségterhelés az amerikai kontinensen, Travel Medicine and Infectious Disease, 2016
24. SCATURRO, P és társai: A dengue-vírus 1. számú nem szerkezeti fehérje a szerkezeti fehérjékkel való kölcsönhatás révén szabályozza a fertőző részecskék termelődését, PLoS Pathog, 2015
25. SIROHI, D és munkatársai: A Zika-vírus 38 Å felbontású kriogénikus elektronmikroszkópos szerkezete, 352. évf., szám, 2016
26. THOMAS, L.: Labor és diagnosztika, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
27. TUCK, MK és munkatársai: Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection, J Proteome Res, 2009
28. VILLAMIL-GOMEZ, W et al.: Veleszületett chikungunya-vírus-fertőzés Sincelejo-ban, Kolumbia: esetsorozat, J Trop Pediatr, 2015
29. VILLAMIL-GOMEZ, W et al.: Zika-vírus-fertőzéssel rendelkező terhes nők diagnosztizálása, kezelése és utánkövetése: előzetes jelentés a kolumbiai Sincelejo-ban végzett ZIKERNOL kohorttanulmányról, Travel Med Infect, 2016
30. WAHALA, W és DE SILVA, AM: Az emberi antitestválasz a dengue-vírus-fertőzésre, Viruses, 2011
31. WHO: Chikungunya, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>, 2017
32. WONG, SJ et al.: Multiplex mikrogömbös immunoassay a Zika-vírus diagnosztizálására, EBioMedicine, 2017
33. ZHAO, B et al.: A Zika-vírus teljes hosszúságú NS5 fehérjéjének szerkezete és funkciója, Nature Communications, 2017
34. KAM, YW et al.: A chikungunya-vírus-specifikus anti-E2EP3 antitestek szeroprevalenciája és keresztreaktivitása arbovírussal fertőzött betegekben. PLoS neglected tropical diseases, 9(1), PLOS Neglected Tropical Diseases, 2015

Jelölések magyarázata

	Gyártó		Rendelési szám
	Kövesse a használati utasítást		Felhasználhatósági idő / Minőségmegőrzési idő
	In vitro diagnosztikum		Hőmérsékleti korlátozás (tárolás)
	Tételszám		Pozitív kontrollszérum
	96 vizsgálatra elegendő		Negatív kontrollszérum