

Test Kit per il test IgM dell'arbovirus ViraChip® 2.0

Istruzioni per l'uso



Immunoblot su chip per la rilevazione qualitativa di anticorpi **IgM** contro antigeni specifici di **arbovirus** delle specie virus Zika, virus Dengue e virus Chikungunya nel siero umano.

Il **Test Kit Arbovirus ViraChip® IgM 2.0** è un immunoblot basato su un saggio immunoenzimatico in formato microarray che consente di rilevare anticorpi contro tre diversi arbovirus. A tal fine, antigeni specifici purificati del virus Zika, del virus della dengue e del virus Chikungunya vengono fissati su nitrocellulosa in posizioni definite. Gli antigeni specifici purificati comprendono proteine dell'involucro, proteine non strutturali e una proteina pre-membrana.

Il **Test Kit Arbovirus ViraChip® IgM 2.0** soddisfa i requisiti degli standard di qualità previsti dalla direttiva **98/79/CE**.

Principio del test

Sul fondo di ciascun pozzetto di una piastra da microtitolazione standard a 96 pozzetti (MTP) è presente una membrana di nitrocellulosa sulla quale sono fissati gli antigeni sotto forma di spot analitici (microarray). Durante l'incubazione del siero, gli anticorpi specifici per gli arbovirus presenti nel siero del paziente si legano agli antigeni fissati sul microarray. Durante l'incubazione con il coniugato, quest'ultimo si lega al complesso antigene-anticorpo. Dopo l'aggiunta della soluzione di Chromogen/Substrate, la fosfatasi alcalina legata all'anticorpo coniugato converte il Chromogen/Substrate, colorando così il complesso antigene-anticorpo sul microarray di un colore che va dal viola al nero. Dopo l'incubazione con il siero, l'incubazione con il coniugato e l'incubazione con il Chromogen/substrato, segue in ciascun caso una fase di lavaggio per rimuovere gli anticorpi e i reagenti non legati.

Ogni microarray contiene, oltre agli spot degli analiti, i seguenti spot di controllo: **controlli del siero, controlli del coniugato, controlli del calibratore** e un **controllo negativo**. Gli spot degli analiti servono a rilevare gli anticorpi contro gli antigeni specifici degli arbovirus:

1. gli antigeni del virus Zika contrassegnati con una «Z»: **Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*, Z-NS1, Z-NS2B, Z-NS5, Z-prM**
2. gli antigeni del virus della dengue contrassegnati con una «D»: **D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII*, D-NS1** e
3. l'antigene del virus Chikungunya contrassegnato con una «C-», **ovvero C-E**.

In questo modo, utilizzando un microarray Arbovirus ViraChip®IgM, è possibile rilevare in parallelo gli anticorpi IgM specifici di tre arbovirus.

Per una chiara identificazione, i pozzetti sono codificati a colori: a tal fine, l'Arbovirus ViraChip®IgM è contrassegnato da un **quarto di cerchio blu** sul bordo del pozzetto.

Codice articolo: **V-ABCMOK**
 Confezione: **MTP da 96 pozzetti separabili singolarmente**
 Campione: **10 µl di siero**
 Durata del test: **circa 130 minuti**

Contenuto del kit

1 MTP da 96 pozzetti	Arbovirus ViraChip® Antigen Coated Wells Pozzetti singolarmente separabili con microarray ViraChip®, pronti all'uso	(Cod. prod.: V-ABCMAC)
12 ml	ViraChip® Conjugate AP-Anti-Human anti-IgM Soluzione di coniugato anti-IgM umana per test ViraChip®, di origine caprina, con fosfatasi alcalina bovina, pronta all'uso	(Cod. art.: V-UVCMKI)
100 ml	ViraChip®/ ViraStripe®/ ViraBlot®Diluente / Wash Buffer Tampone di lavaggio concentrato per test ViraChip®, con detergenti e sali per impedire legami non specifici, 10 volte	(Cod. art.: V-UVNUWP)
12 ml	ViraChip® Chromogen / Substrate Solution UVCUCS) Soluzione Chromogen/substrato per test ViraChip®, con BCIP / NBT, pronta all'uso	(Codice articolo: V-

Tampone aggiuntivo necessario per la diluizione dei campioni, fornito separatamente

50 ml	ViraChip®Sample Buffer Tampone per campioni per test ViraChip®, con latte in polvere, detergenti e sali per prevenire legami non specifici, pronto all'uso	(Cod. art.: V-UVCUPP)
-------	--	-----------------------

Disponibile come opzione

1 striscia MTP da 8 pozzetti	Arbovirus ViraChip®Antigen Coated Wells (8) Cavità separabili singolarmente con microarray ViraChip®, pronte all'uso	(Cod. art.: V-ABCMRT)
110 µl	Arbovirus ViraChip®Positive Control IgM Siero di controllo positivo per IgM, umano, pronto all'uso	(Cod. art.: V-ABCMPPK)
330 µl	Negative Control IgG, A, M per Arbovirus ViraChip® Siero di controllo negativo per IgG, IgA, IgM, umano, pronto all'uso	(Codice articolo: V-ABCPNK)

Attrezzatura aggiuntiva richiesta

1. ViraChip®Software	per la preparazione, l'esecuzione e la valutazione del test, a partire dalla versione v1.3.0-1960	(Cod. art.: V-VCNUPR)
2. Lettore di codici a barre 2D	per la lettura dei codici DataMatrix	
3. Piastra da microtitolazione con 96 pozzetti vuoti	per riempire le strisce parzialmente utilizzate della piastra da microtitolazione nel telaio di supporto	(Cod. art.: V-UVNMTP)
4. Agitatore orbitale (750 giri/min) lineare (20 Hz)	per la miscelazione di campioni e reagenti durante l'elaborazione oppure agitatore	
5. ViraChip®Scanner o ViraChip®Reader	per la digitalizzazione / misurazione dei test ViraChip® sviluppati, a partire da ViraChip® ViraChip® Scanner v1.0 o ViraChip®Reader Rev.01	(cod. art.: V-UVCSCA) (Cod. art.: V-UVCCAM)
6. Opzionale: ventilatore	per un'asciugatura più rapida delle piastre da microtitolazione sviluppate	

Test Kit per il test IgM dell'arbovirus ViraChip[®] 2.0

- 2 -

Preparazione dei reagenti e dei campioni dei pazienti

Portare tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione ancora nella confezione a temperatura ambiente (TA: 20-23 °C) prima dell'uso. Agitare bene tutti i reagenti prima dell'uso.	
Tampone di lavaggio	Diluire il concentrato di tampone di lavaggio in rapporto 1:10 con acqua distillata o deionizzata (H ₂ O): 100 ml
Diluizione finale:	Tampone di lavaggio concentrato + 900 ml di H ₂ O
Tampone per campioni:	Pronto all'uso
Soluzione di coniugato:	Pronto all'uso
Soluzione Chromogen / substrato:	Pronta all'uso
Pozzetti della piastra da microtitolazione (MTP):	Estrarre con cautela la piastra da microtitolazione (MTP) dalla confezione e inserire il numero necessario di pozzetti in un portapietra vuoto (Preparazione ed esecuzione del test, punto 3). Una volta estratti dalla confezione, utilizzare immediatamente i pozzetti. Riporre immediatamente i pozzetti non utilizzati nella confezione originale, chiuderla ermeticamente e conservarla a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.
Campioni dei pazienti:	I campioni dei pazienti vengono utilizzati in una diluizione 1:76 , ad es. 10 µl di campione del paziente + 750 µl di tampone per campioni . Durante l'elaborazione sono necessari 100 µl del campione diluito.
Controlli:	Se necessario, il siero di controllo positivo e quello negativo vengono utilizzati in una diluizione 1:16 , ad es.: 10 µl di siero di controllo + 150 µl di tampone per campioni . Durante l'elaborazione vengono utilizzati 100 µl del controllo diluito.

Struttura del microarray Arbovirus ViraChip[®]IgM

Antigeni:

Ogni antigene specifico del virus Zika (**Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*, Z-NS1, Z-NS2B, Z-NS5 e Z-prM**), gli antigeni specifici del virus della dengue (**D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII* e D-NS1**) e l'antigene specifico del virus Chikungunya (**C-E**) è applicato come singolo spot. Ogni spot corrisponde a una banda nell'immunoblot Western.

Controlli:

Ogni pozzetto^{del} ViraChip[®]contiene i seguenti controlli integrati:

due controlli sierici (sc), un controllo negativo (nc), due controlli di coniugato IgG (ccG), due controlli di coniugato IgM (ccM) e sei controlli di calibrazione (cal).

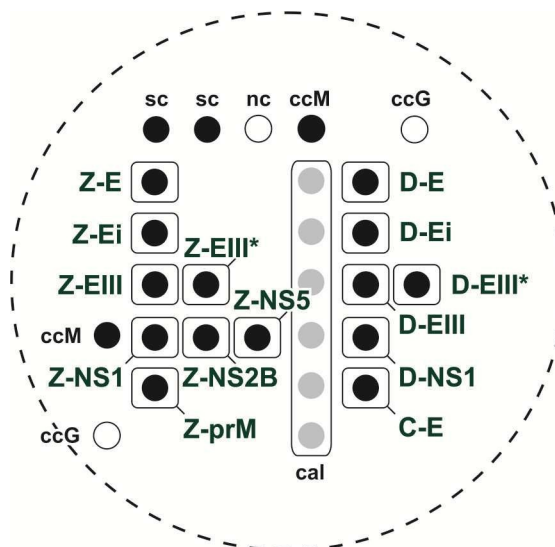


Figura 1: Immagine di una cavità della piastra da microtitolazione con il microarray Arbovirus ViraChip[®]IgM (ingrandita). Disposizione degli spot per gli antigeni e degli spot per i controlli integrati.

Test Kit per il test IgM Arbovirus ViraChip® 2.0

- 3 -

Nomenclatura e descrizione degli antigeni degli arbovirus tratti dalla letteratura

Arbovirus	Nomenclatura:	Antigene:	Osservazioni:
Virus Zika	Z-E	Involucro	La proteina E del virus Zika costituisce la maggior parte della superficie del virione ed è coinvolta nei processi che avvengono durante la replicazione, quali il legame con le cellule ospiti e la fusione di membrana (10,8,25).
	Z-Ei	Involucro	Frammento interno della proteina E del virus Zika.
	Z-EIII	Envelope III	Regione della proteina E del virus Zika.
	Z-EIII*	Envelope III*	Regione modificata della proteina E del virus Zika.
	Z-NS1	Proteina non strutturale	L'NS1 è una proteina di grandi dimensioni con diverse funzioni nell'evasione immunitaria, nella patogenesi e nella replicazione virale del virus Zika (3,13).
	Z-NS2B	Proteina non strutturale 2B	NS2B è un cofattore essenziale per la scissione del capsido (21).
	Z-NS5	Proteina non strutturale 5	NS5 è una RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) e metiltransferasi essenziale per la sintesi dell'RNA virale e per il capping dell'RNA del virus Zika (21,33)
	Z-prM	proteina pre-membrana	La prM, insieme alla proteina E, è importante per l'assemblaggio del virus Zika (18).
Virus della dengue	D-E	Involucro	La proteina E del virus della dengue costituisce la maggior parte della superficie del virione ed è coinvolta in processi che avvengono durante la replicazione, quali il legame con le cellule ospiti e la fusione di membrana (20,17).
	D-Ei	Involucro	Frammento interno della proteina E del virus della dengue.
	D-EIII	Envelope III	Regione della proteina E del virus della dengue.
	D-EIII*	Envelope III*	Regione modificata della proteina E del virus della dengue.
	D-NS1	Proteina non strutturale	La NS1 è una proteina di grandi dimensioni con diverse funzioni nell'evasione immunitaria, nella patogenesi e nella replicazione virale del virus della dengue (24).
Virus Chikungunya	C-E	Involucro	La proteina E è una proteina di fusione che, durante l'infezione da virus Chikungunya, media la fusione delle membrane (6).

Test Kit per il test IgM Arbovirus ViraChip® 2.0

- 4 -

Preparazione ed esecuzione del test

In caso di elaborazione automatizzata, i tempi di incubazione, i volumi e la sequenza delle singole fasi operative possono differire dalle istruzioni riportate di seguito. Durante la configurazione delle apparecchiature e la formazione a cura di Viramed Biotech AG vengono fornite istruzioni dettagliate passo dopo passo relative alla soluzione di automazione utilizzata, nonché le istruzioni per l'uso del ViraChip® Software. Vedi anche la sezione «Note su apparecchiature e software».

1. Registrazione

Selezione dei test e inserimento dei dati dei campioni nel piano di assegnazione del ViraChip® Software.

2. Caricamento

Scansione dei codici a barre 2D presenti sulle etichette del Test Kit e della piastra da microtitolazione, per il trasferimento dei numeri di lotto e dei fattori specifici del lotto (lot specific factors).

3. Elaborazione

Eseguire tutte le fasi della lavorazione a temperatura ambiente.

3.1 Preparazione

- Inserire nel telaio di supporto il numero di pozzetti definito in base alla disposizione.
- Riempire le posizioni vuote di una striscia della piastra da microtitolazione nel telaio di supporto con cavità vuote. Le strisce sono contrassegnate sulla piastra da microtitolazione con i numeri da 1 a 12.

Assicurarsi che, durante la rottura dei sigilli, nessuna particella di plastica cada nei pozzetti.

3.2 Preincubazione

- Aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio già diluito in ogni pozzetto.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.3 Incubazione del siero

- In base allo schema di distribuzione, aggiungere 100 µl di campione del paziente diluito o 100 µl di siero di controllo diluito nella cavità corrispondente.
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (RT) sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.4 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio già diluito per ogni pozzetto.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (RT) sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.5 Incubazione con il coniugato

- Aggiungere 100 µl di soluzione di coniugato in ogni pozzetto.
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.6 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio già diluito in ogni pozzetto.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.7 1 lavaggio

- Aggiungere 300 µl di acqua distillata o deionizzata in ogni pozzetto.
- Incubare per 1 minuto a temperatura ambiente.
- Aspirare il liquido.

3.8 Incubazione del substrato

- Aggiungere 100 µl di soluzione Chromogen/substrato in ogni pozzetto.
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Arresto: aspirare il liquido.

3.9 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di acqua distillata o deionizzata in ogni pozzetto.
- Nessuna incubazione intermedia.
- Aspirare il liquido.

3.10 Asciugare i pozzetti

Lasciare asciugare per 20 minuti con umidità massima del 60% sotto un flusso d'aria continuo.

Regolare gli aghi di aspirazione o utilizzare le pipette in modo tale da non danneggiare i fondi delle cavità.

I fondi delle cavità devono essere completamente coperti di liquido durante le fasi di incubazione.

Durante le fasi di incubazione e lavaggio, utilizzare un agitatore orbitale, regolabile a una frequenza di circa 750 rpm, oppure un agitatore lineare, regolabile a una frequenza di circa 20 Hz.

In caso di elevata umidità dell'aria, il tempo di asciugatura potrebbe prolungarsi. In alternativa, lasciare asciugare per 12 ore al riparo dalla luce a temperatura ambiente.

4. Scansione

Misurare i microarray ViraChip® con lo scanner ViraChip® o il lettore ViraChip®.

Le misurazioni dei microarray ViraChip® devono essere effettuate entro 24 ore dal trattamento (conservare la piastra da microtitolazione al riparo dalla luce). Per le istruzioni dettagliate, consultare il manuale dell'apparecchio.

5. Analisi

5.1 Verifica dell'assegnazione degli spot antigenici e degli spot di controllo (convalida tecnica)

Ogni spot viene automaticamente assegnato dal ViraChip®Software allo spot dell'antigene o allo spot di controllo corrispondente in base alla sua posizione. L'assegnazione automatica deve essere verificata visivamente confrontandola con lo schema riportato nella Fig. 1. Le assegnazioni che non corrispondono allo schema illustrato devono essere contrassegnate come «non valide» nel campo «QC». Il campione in questione deve essere ripetuto.

5.2 Verifica di validità

La verifica di validità viene eseguita automaticamente dal ViraChip®Software.

Un microarray ViraChip® è valido se i seguenti spot di controllo soddisfano i criteri definiti nella ViraChip®Software:

- **Controlli sierici (sc)** superiori al valore limite
- **Controlli del coniugato IgM (ccM)** al di sopra del valore limite
I controlli del coniugato IgM devono presentare una reazione più intensa rispetto ai controlli delle altre classi di coniugati.
- **Controlli di calibrazione (cal)** al di sopra del valore limite
- **Controllo negativo (nc)** al di sotto del valore limite

Se uno dei criteri sopra indicati non è soddisfatto, il microarray ViraChip® viene classificato come «non valido». I microarray ViraChip® non validi non devono essere valutati e devono essere ripetuti.

5.3 Valutazione dei microarray ViraChip®

La valutazione dei campioni dei pazienti viene eseguita automaticamente dal ViraChip®Software in base ai criteri di valutazione definiti di seguito:

Le unità ViraChip® di ogni spot vengono calcolate dal ViraChip®Software tenendo conto dei fattori specifici del lotto rispetto ai controlli di calibrazione.

Criteri di valutazione

Unità ViraChip® degli spot	Risultato	Valutazione
degli antigeni del virus Zika: Spot Z-NS1 ≥ 100 unità ViraChip® oppure almeno tre spot di antigene ≥ 100 unità ViraChip® da: Z-E, Z-Ei, Z-EIII, Z-EIII*, Z-NS2B, Z-NS5, Z-prM Nessuno spot ≥ 100 unità ViraChip® oppure tutte le altre combinazioni	Positivo per il virus Zika Negativo per il virus Zika	Anticorpi IgM specifici contro il virus Zika rilevabili. È probabile un'infezione da virus Zika. Non sono rilevabili anticorpi IgM specifici contro il virus Zika. In caso di sospetta infezione, dopo 2-3 settimane esaminare un secondo campione per gli anticorpi IgM e IgG.
Antigeni del virus della dengue: D-NS1 Spot ≥ 100 unità ViraChip® oppure almeno tre spot antigenici ≥ 100 unità ViraChip® provenienti da D-E, D-Ei, D-EIII, D-EIII* Nessuno spot ≥ 100 unità ViraChip® oppure tutte le altre combinazioni	Positivo per il virus della dengue Negativo per il virus della dengue	Sono rilevabili anticorpi IgM specifici contro il virus della dengue. È probabile un'infezione da virus della dengue. Non sono rilevabili anticorpi IgM specifici contro gli antigeni del virus della dengue. In caso di sospetta infezione, dopo 2-3 settimane eseguire un secondo prelievo per analizzare la presenza di anticorpi IgM e IgG.
dell'antigene del virus Chikungunya: C-E Spot ≥ 100 unità ViraChip® C-E Spot < 100 unità ViraChip®	Positivo per il virus Chikungunya Negativo per il virus Chikungunya	Sono rilevabili anticorpi IgM specifici contro l'antigene dell'involucro del virus Chikungunya. È probabile un'infezione da virus Chikungunya. Non sono rilevabili anticorpi IgM specifici contro l'antigene dell'involucro del virus Chikungunya. In caso di sospetta infezione, dopo 2-3 settimane esaminare un secondo campione per gli anticorpi IgM e IgG.

Significato diagnostico degli anticorpi contro gli arbovirus

1. Informazioni generali

I virus Zika, Dengue e Chikungunya sono arbovirus patogeni per l'uomo, trasmessi principalmente dalle zanzare (genere Aedes). I virus Zika e Dengue appartengono alla famiglia dei Flavivirus (genere Flavivirus), mentre il virus Chikungunya appartiene alla famiglia dei Togavirus (genere Alphavirus) (9). Sia la stretta parentela genetica che la sovrapposizione dell'area di diffusione di questi virus rendono difficile la differenziazione sierologica. Una diagnosi affidabile è ulteriormente complicata dal fatto che molti flavivirus (come il virus Zika e il virus della dengue) provocano sintomi simili o nessun sintomo e che gli anticorpi dei pazienti infetti dal virus Zika possono presentare reazioni crociate con altri flavivirus (32). Inoltre, si sospetta che in particolare le infezioni da virus Zika o da virus Chikungunya durante la gravidanza rappresentino un rischio per il feto (28,29,4).

2. Anticorpi anti-virus Zika

a) Gli anticorpi IgG vengono prodotti pochi giorni dopo gli anticorpi IgM e possono essere rilevati da mesi a anni dopo l'infezione (5) o persistere per tutta la vita (19).

b) Gli anticorpi IgM compaiono solitamente pochi giorni dopo l'insorgenza della malattia (14,5) e possono essere rilevati fino a tre mesi. Nella maggior parte dei casi, gli anticorpi IgM scompaiono già 4-8 settimane dopo l'insorgenza dei sintomi (19); tuttavia, vi sono anche pazienti in cui gli anticorpi IgM sono stati rilevati per un periodo più lungo (5).

Di norma, gli anticorpi IgM sono rilevabili in caso di infezione recente (19) e possono quindi essere interpretati come sintomo di un'infezione acuta.

3. Anticorpi contro il virus della dengue

a) Gli anticorpi IgG in caso di infezione primaria compaiono solitamente circa una settimana dopo l'esordio della malattia, raggiungono il picco alcune settimane dopo l'infezione, poi diminuiscono leggermente e persistono per decenni o più a lungo (30).

Caratteristica di un'infezione secondaria da virus della dengue è la comparsa di anticorpi IgG anti-dengue ad alto titolo prima o contemporaneamente alla comparsa degli anticorpi IgM (22).

b) Gli anticorpi IgM in caso di infezione primaria compaiono già da 3 a 5 giorni dopo l'insorgenza della malattia. Raggiungono il picco circa 2 settimane dopo l'infezione e successivamente diminuiscono (22).

Nelle infezioni primarie e secondarie da virus della dengue, la cinetica di formazione degli anticorpi IgM è simile (22). Tuttavia, i titoli degli anticorpi IgM nelle infezioni secondarie sono solitamente significativamente

più bassi (22) e possono addirittura essere del tutto assenti (11), portando così a risultati falsi negativi (19). A causa della stretta affinità, si può osservare un andamento simile nelle infezioni secondarie da flavivirus come il virus Zika.

4. Anticorpi contro il virus del chikungunya

a) Gli anticorpi IgG possono essere rilevati già a partire dal settimo giorno di malattia (19) e persistono per alcuni mesi (16). Un aumento di almeno 4 volte degli anticorpi IgG in due campioni consecutivi del paziente è considerato prova di un'infezione (19).

b) Gli anticorpi IgM possono di norma essere rilevati nel siero del paziente già nella fase acuta della malattia (16), al più tardi 5-7 giorni dopo l'esordio della malattia (19,15). I titoli degli anticorpi IgM raggiungono il picco da 3 a 5 settimane dopo l'insorgenza della malattia e persistono per circa 2 mesi (31). La sola rilevazione di anticorpi IgM è considerata indicativa di un'infezione acuta, ma deve essere confermata da un monitoraggio del decorso della malattia (19).

5. Per tutti gli arbovirus, la proteina di involucro E (Envelope Protein, proteina E) rappresenta un bersaglio primario per la risposta immunitaria degli anticorpi neutralizzanti. Studi recenti dimostrano che la proteina E del virus Zika è molto simile a quella del virus della dengue e del virus del Nilo occidentale (1,12). In particolare, per il virus Chikungunya, la proteina E è considerata altamente specifica (6).

6. Sono state descritte reattività crociate tra i rispettivi antigeni virali in caso di infezioni da virus Zika, dengue, del Nilo occidentale, della febbre gialla, dell'encefalite giapponese, della FSME e del chikungunya (34,12,7). Nelle aree in cui sono endemici due o più arbovirus, le infezioni multiple e sequenziali rendono difficile la diagnosi differenziale a causa della presenza preesistente di anticorpi specifici per gli arbovirus (7,32).

7. A seguito di un'infezione primaria, il decorso clinico di una seconda infezione causata da un virus antigenicamente affine può essere aggravato dalla presenza di anticorpi interspecifici e a reazione crociata (1,2,23).

8. La stimolazione policlonale causata da altre infezioni virali, come ad esempio l'EBV, possono determinare reazioni anticorpali positive nel Test Kit ViraChip® IgG 2.0 per gli arbovirus.

9. Nella valutazione del test e nella successiva interpretazione dei risultati, è necessario tenere conto di un precedente contatto del paziente con arbovirus durante viaggi o soggiorni prolungati in aree endemiche.

Dati prestazionali

Sensibilità

Campioni di siero positivi predefiniti provenienti da aree endemiche e non endemiche per il virus della dengue e del virus Zika, nonché campioni con infezione da virus Chikungunya clinicamente definita, sono stati analizzati con il kit Arbovirus ViraChip® IgM per rilevare gli anticorpi IgM contro il virus Zika, il virus della dengue e il virus Chikungunya. I risultati sono riportati nelle tabelle 1a, 1b e 1c.

Campioni di siero	Arbovirus ViraChip® IgM – Virus Zika Risultato			
	Totale	Positivo	Negativo	% di sensibilità
Virus Zika: risultato predefinito come positivo*	11	11	0	100% (11/11)

Tabella 1a: Campioni di siero predefiniti come positivi provenienti da aree endemiche e non endemiche per la dengue e il virus Zika. Risultati del test Arbovirus ViraChip® IgM – Virus Zika.

Campioni di siero	Risultato del test Arbovirus ViraChip® IgM – virus della dengue			
	Totale	Positivo	Negativo	% di sensibilità
Virus della dengue predefinito come positivo*	16	16	0	100% (16/16)

Tabella 1b: Campioni di siero predefiniti come positivi provenienti da aree endemiche e non endemiche per il virus della dengue e il virus Zika. Risultati dell'Arbovirus ViraChip® IgM – Virus della dengue.

Campioni di siero	Arbovirus ViraChip® IgM – Virus Chikungunya Risultato			
	Totale	Positivo	Negativo	% di sensibilità
Virus Chikungunya definito clinicamente*	20	19	1	95% (19/20)

Tabella 1c: Campioni di siero con infezione da virus Chikungunya definita clinicamente. Risultati del test Arbovirus ViraChip® IgM – Virus Chikungunya.

*) Non sono disponibili informazioni relative a infezioni multiple causate dallo stesso arbovirus o da altri arbovirus.

Specificità

Per determinare la specificità analitica, sono stati analizzati 61 campioni provenienti da donatori di sangue tedeschi (regione non endemica) e 15 campioni provenienti da donne in gravidanza tedesche (regione non endemica) utilizzando il test Arbovirus ViraChip® IgM per rilevare la presenza di anticorpi IgM contro il virus Zika, il virus della dengue e il virus Chikungunya. I risultati sono riportati nelle tabelle 2a, 2b e 2c.

Campioni di siero	Arbovirus ViraChip® IgM – Virus Zika Risultato				
	Totale	Negativo	Positivo	% di positivi	% di specificità
Donatori di sangue (non endemici)	61	61	0	0%	100% (61/61)
Donne in gravidanza (non endemiche)	15	15	0	0%	100% (15/15)
Totale	76	76	0	0%	100% (76/76)

Tabella 2a: Specificità nei donatori di sangue provenienti dalla Germania (regione non endemica) e nelle donne in gravidanza provenienti dalla Germania (regione non endemica). Risultati del test Arbovirus ViraChip® IgM – Virus Zika.

Campioni di siero	Arbovirus ViraChip® IgM – Risultato per il virus della dengue				
	Totale	Negativo	Positivo	% di positivi	% di specificità
Donatori di sangue (non endemici)	61	59	2	3%	97% (59/61)
Donne in gravidanza (non endemiche)	15	15	0	0%	100% (15/15)
Totale	76	74	2	3%	97% (74/76)

Tabella 2b: Specificità nei donatori di sangue provenienti dalla Germania (regione non endemica) e nelle donne in gravidanza provenienti dalla Germania (regione non endemica). Risultati del test Arbovirus ViraChip® IgM – Virus della dengue.

Campioni di siero	Arbovirus ViraChip® IgM – Risultato per il virus Chikungunya				
	Totale	Negativo	Positivo	% di positivi	% di specificità
Donatori di sangue (non endemici)	61	60	1	2%	98% (60/61)
Donne in gravidanza (non endemiche)	15	15	0	0%	100% (15/15)
Totale	76	75	1	1%	99% (75/76)

Tabella 2c: Specificità nei donatori di sangue provenienti dalla Germania (regione non endemica) e nelle donne in gravidanza provenienti dalla Germania (regione non endemica). Risultati del test Arbovirus ViraChip® IgM – Virus Chikungunya.

Requisiti per l'utilizzatore

1. Questo test deve essere eseguito esclusivamente in un laboratorio specializzato, dotato delle attrezzature di laboratorio adeguate (ad es. conformi alle norme GLP) e delle eventuali autorizzazioni ufficiali necessarie per la manipolazione dei campioni da analizzare.
2. Per ottenere un risultato accurato del test, è necessario attenersi alle istruzioni per l'uso e alle «Buone Pratiche di Laboratorio (GLP)».
3. Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale specializzato che abbia ricevuto una formazione specifica sulla procedura di analisi.

Conservazione e durata di validità dei reagenti

1. **Microarray ViraChip®:** conservabili nella confezione originale chiusa a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino alla data di scadenza.
2. **Tampone di lavaggio concentrato, 10x:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza.
3. **Tampone di lavaggio diluito pronto all'uso:** conservabile a 2-8 °C per circa 2 settimane. In caso di conservazione prolungata, la soluzione diluita pronta all'uso può essere suddivisa in aliquote e congelata a -20 °C.
4. **Tampone per campioni:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza.
5. **Soluzione di coniugato:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza.
6. **Soluzione Chromogen/substrato:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza. Proteggere dalla luce!
7. Dopo la prima apertura dei reagenti e dei componenti del kit, se utilizzati correttamente («Good Laboratory Practice») e nel rispetto delle condizioni di conservazione indicate sull'etichetta nella confezione originale, la stabilità viene generalmente mantenuta fino alla data di scadenza indicata.

Precauzioni / Misure di sicurezza

1. Tutti i componenti sierici umani sono stati sottoposti a test per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV 1 e 2 e per l'antigene HBs, risultando negativi. Tuttavia, tutti i componenti umani del kit, così come i campioni dei pazienti, devono essere considerati potenzialmente infettivi e utilizzati con le opportune precauzioni. Quando si lavora con materiali potenzialmente pericolosi o infettivi, è necessario rispettare le leggi, i regolamenti e le norme nazionali e internazionali applicabili. Ciò vale anche per lo stoccaggio e lo smaltimento delle sostanze chimiche e dei reagenti utilizzati.

2. Le misure di protezione per lavorare con sostanze pericolose e biologiche devono essere rispettate in conformità alle linee guida specifiche per i laboratori attualmente in vigore nel proprio Paese. Tra le misure figurano:

- Non pipettare con la bocca.
- Indossare guanti monouso e occhiali protettivi/mascherina.
- Non mangiare, bere o fumare sul posto di lavoro.

3. Evitare il contatto della pelle e delle mucose con la soluzione Chromogen/substrato. In caso di contatto con la pelle e gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua.

4. I campioni e tutti i materiali potenzialmente contaminati, nonché i rifiuti liquidi infettivi, devono essere decontaminati secondo le linee guida di laboratorio generalmente riconosciute, ad esempio mediante sterilizzazione in autoclave per almeno 20 minuti a 121 °C. Per lo smaltimento dei rifiuti liquidi, questi possono essere miscelati, ad esempio, con ipoclorito di sodio in un rapporto volumetrico tale che la miscela finale contenga l'1% di ipoclorito di sodio. Lasciare agire per 30 minuti per una disinfezione completa.

5. Le informazioni relative a possibili pericoli, misure di primo soccorso, misure da adottare in caso di rilascio accidentale di grandi quantità, manipolazione e stoccaggio, dispositivi di protezione individuale, indicazioni per lo smaltimento e dati tossicologici sono documentate nelle schede di sicurezza.

6. È necessario evitare che polvere e altre impurità penetrino nelle cavità dell'MTP, poiché ciò potrebbe causare risultati non validi.

Prelievo, manipolazione e conservazione del campione del paziente

1. Il Test Kit Arbovirus Virachip® IgM 2.0 deve essere utilizzato con siero umano come materiale campione.

2. Il prelievo del campione deve essere effettuato da personale medico specializzato secondo gli standard vigenti, utilizzando sangue intero (27).

3. I campioni che sono stati pretrattati con calore, che sono emolitici, itterici o lipemici possono portare a risultati non validi.

4. I campioni non devono essere contaminati da microrganismi.

5. Di norma, i campioni non diluiti possono essere conservati fino a 5 giorni a 2-8 °C. Per una conservazione fino a 24 mesi, i campioni devono essere congelati in aliquote a una temperatura di almeno -20 °C.

6. Prima di iniziare l'esecuzione del test, i campioni devono essere portati a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mescolare con cura i campioni e, se necessario, rimuovere le particelle visibili mediante centrifugazione.

7. È necessario evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti dei campioni.

Limiti della procedura di analisi

1. Un risultato positivo del test sul campione del paziente in questione deve essere considerato un sintomo. L'interpretazione e la valutazione dei risultati del test devono essere effettuate esclusivamente da personale medico specializzato, tenendo conto di tutti i dati rilevanti (26).

2. Un risultato negativo del test non esclude il contatto con l'agente patogeno o un'infezione.

3. La rilevazione di anticorpi specifici può portare a risultati diversi a seconda dei test utilizzati o dei diversi produttori, a causa delle diverse sensibilità, specificità e metodi di analisi.

4. In caso di immunosoppressione, la valutabilità è limitata (26).

5. I farmaci e la somministrazione di immunoglobuline possono provocare reazioni anticorpali non specifiche (26).

6. I dispositivi diagnostici *in vitro* non devono essere utilizzati oltre la data di scadenza indicata, poiché in tal caso non è più garantita l'affidabilità dei risultati.

7. Il rispetto rigoroso delle istruzioni operative è essenziale per ottenere risultati accurati. Un'esecuzione inadeguata delle fasi di lavaggio può causare risultati errati.

8. Non è consentito l'utilizzo di campioni in pool, in cui vengono analizzati più sieri contemporaneamente, poiché in tali casi la sensibilità e la specificità del test possono essere compromesse.

Note su apparecchiature e software

1. In caso di esecuzione automatizzata, è necessario programmare e utilizzare le procedure di lavoro convalidate da Viramed Biotech AG per il rispettivo tipo di processore.

2. In caso di utilizzo di materiali di consumo specifici per il processore, le relative configurazioni devono essere approvate da Viramed Biotech AG secondo le indicazioni del produttore.

3. La configurazione delle apparecchiature e del software fornita da Viramed Biotech AG non deve essere modificata. Qualsiasi modifica può causare risultati errati.

4. È consentito utilizzare esclusivamente software specifico per l'apparecchio. Le modifiche ai file di configurazione possono essere effettuate solo da Viramed Biotech AG.

5. Come strumenti di misura devono essere utilizzati esclusivamente sistemi approvati da Viramed Biotech AG.

6. L'analisi dei microarray Virachip® avviene esclusivamente tramite il Virachip® Software. Non è possibile effettuare un'analisi manuale/visiva.

Bibliografia

1. BARDINA, SV et al.: Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity, Science, 2017
2. BECK, C et al.: Flavivirus in Europa: modelli di circolazione complessi e loro conseguenze per la diagnosi e il controllo della malattia del Nilo occidentale, Int J Environ Res Public Health, 2013
3. CAMPOS, GS et al.: Focolaio del virus Zika, Bahia, Brasile, CDC Emerging Infectious Diseases, 2015
4. CDC National Center for Infectious Diseases: Sindrome congenita da Zika e altri difetti congeniti causati dal virus Zika, aggiornato al 28 aprile 2017, <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/infants-children/zika-syndrome-birth-defects.html>, 2017
5. CHARREL, RN et al.: Analisi di fondo per lo sviluppo di test diagnostici per l'infezione da virus Zika, Bollettino dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, 2016
6. CHO, B et al.: Espressione intermedia e valutazione delle proteine di involucro E1 ed E2 del virus Chikungunya per la sierodiagnosi dell'infezione da virus Chikungunya, Yonsei Med J, 2008
7. CRILL, WD & CHANG, GJJ: Localizzazione e caratterizzazione degli epitopi cross-reattivi delle glicoproteine dell'involucro dei flavivirus, J Virol, 2004
8. DAI, L et al.: Strutture della proteina di involucro del virus Zika e del suo complesso con un anticorpo ampiamente protettivo contro i flavivirus, Cell Host & Microbe, 2016
9. DOBLER, G, & ASPÖCK, H: Gli arbovirus trasmessi dalle zanzare come agenti patogeni di infezioni nell'uomo, Denisia, 2010
10. FAYE, O et al.: Evoluzione molecolare del virus Zika durante la sua comparsa nel XX secolo, PLOS Neglected Tropical Diseases, 2014
11. GIBBS, T e SMITH, DW: Definizione di caso di laboratorio per i flavivirus, Dipartimento della Salute del Governo australiano, 2016

Test Kit per il test IgM Arbovirus ViraChip® 2.0

- 9 -

12. GUZMAN, MG et al.: Dengue: una minaccia globale persistente, Nat Rev Microbiol, 2010
13. HANG, VT et al.: Accuratezza diagnostica del test ELISA NS1 e dei test rapidi a flusso laterale per la dengue: sensibilità, specificità e relazione con la viremia e le risposte anticorpali, PLOS Neglected Tropical Diseases, 2009
14. HAYES, E: Il virus Zika al di fuori dell'Africa, CDC Emerging Infectious Diseases, 2009
15. JOHNSON, BW et al.: Diagnosi di laboratorio delle infezioni da virus Chikungunya e fonti commerciali per i test diagnostici, Journal of Infectious Diseases, 2016
16. KAM, YW et al.: Analisi longitudinale della risposta anticorpale umana all'infezione da virus Chikungunya: implicazioni per la sierodiagnosi e lo sviluppo di vaccini, Journal of Virology, 2012
17. KLEIN, DE et al.: Struttura della fusione in fase avanzata della proteina dell'involucro del virus della dengue, Journal of Virology, 2013
18. LI, L et al.: Il complesso proteico precursore della membrana-involucro dei flavivirus: struttura e maturazione, Science, 2008
19. WELLINGHAUSEN, N et al.: MiQ 35b: Metodi di immunologia infettiva - Parte II, ELSEVIER; Urban & Fischer, 2016
20. MODIS, Y et al.: Epitopi di superficie variabili nella struttura cristallina della glicoproteina dell'involucro del virus della dengue di tipo 3, Journal of Virology, 2005
21. MURRAY, CL et al.: Architetture dell'assemblaggio: ruoli delle proteine non strutturali dei Flaviviridae nella morfogenesi dei virioni, Nature Reviews Microbiology, 2008
22. RAVULAPALLI, AR et al.: Proteina multiepitopica ricombinante per la diagnosi precoce delle infezioni da dengue, Clinical And Vaccine Immunology, 2006
23. RODRIGUEZ-MORALES, AJ et al.: Il carico di malattia da arbovirus causato dalla co-circolazione e dalla coinfezione da dengue, chikungunya e Zika nelle Americhe, Travel Medicine and Infectious Disease, 2016
24. SCATURRO, P et al.: La proteina non strutturale 1 del virus della dengue modula la produzione di particelle infettive attraverso l'interazione con le proteine strutturali, PLoS Pathog, 2015
25. SIROHI, D et al.: La struttura del virus Zika ottenuta mediante criomicroscopia elettronica a risoluzione di 38 Å, vol. 352, numero, 2016
26. THOMAS, L: Laboratorio e diagnosi, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
27. TUCK, MK et al.: Procedure operative standard per la raccolta di siero e plasma, J Proteome Res, 2009
28. VILLAMIL-GOMEZ, W et al.: Infezione congenita da virus chikungunya a Sincelejo, Colombia: una serie di casi, J Trop Pediatr, 2015
29. VILLAMIL-GOMEZ, W et al.: Diagnosi, gestione e follow-up delle donne in gravidanza con infezione da virus Zika: un rapporto preliminare dello studio di coorte ZIKERNOL su Sincelejo, Colombia, Travel Med Infect, 2016
30. WAHALA, W e DE SILVA, AM: La risposta anticorpale umana all'infezione da virus della dengue, Viruses, 2011
31. OMS: Chikungunya, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>, 2017
32. WONG, SJ et al.: Un test immunologico multiplex con microsfere per la diagnosi del virus Zika, EBioMedicine, 2017
33. ZHAO, B et al.: Struttura e funzione della proteina NS5 a lunghezza intera del virus Zika, Nature Communications, 2017
34. KAM, YW et al.: Sieroprevalenza e reattività crociata degli anticorpi anti-E2EP3 specifici per il virus chikungunya in pazienti infetti da arbovirus. PLoS neglected tropical diseases, 9(1), PLOS Neglected Tropical Diseases, 2015

Legenda dei simboli

	Produttore		Codice articolo
	Attenersi alle istruzioni per l'uso		Utilizzabile fino al / Data di scadenza
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>		Limiti di temperatura (conservazione)
	Numero di lotto		Siero di controllo positivo
	Sufficiente per 96 test		Siero di controllo negativo