

cobas[®] **CHIKV/DENV**

In-vitro-Diagnostikum



| | |
|---|------------------|
| cobas [®] CHIKV/DENV – 480 | P/N: 09040650190 |
| cobas [®] CHIKV/DENV Control Kit | P/N: 09040668190 |
| cobas [®] NHP Negative Control Kit | P/N: 09051554190 |
| cobas [®] omni MGP Reagent | P/N: 06997546190 |
| cobas [®] omni Specimen Diluent | P/N: 06997511190 |
| cobas [®] omni Lysis Reagent | P/N: 06997538190 |
| cobas [®] omni Wash Reagent | P/N: 06997503190 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Verwendungszweck | 4 |
| Zusammenfassung und Erklärung des Tests | 4 |
| Reagenzien und Materialien | 9 |
| cobas® CHIKV/DENV-Reagenzien und Kontrollen | 9 |
| cobas® omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung..... | 12 |
| Lagerung und Handhabung der Reagenzien | 13 |
| Zusätzlich benötigtes Material..... | 14 |
| Benötigte Geräte und Software..... | 14 |
| Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung | 15 |
| Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen | 15 |
| Umgang mit Reagenzien | 16 |
| Gute Laborpraxis..... | 16 |
| Entnahme, Transport, Lagerung und Pooling von Proben | 17 |
| Proben lebender Spender und diagnostische Proben..... | 17 |
| Gebrauchsanweisung | 19 |
| Automatisches Pipettieren und Poolen von Proben (optional)..... | 19 |
| Hinweise zum Verfahren | 19 |
| Durchführen des cobas® CHIKV/DENV-Tests | 19 |
| Ergebnisse | 20 |
| Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse | 20 |
| Interpretation der Ergebnisse | 21 |
| Wiederholungsmessung für einzelne Proben..... | 21 |
| Verfahrenseinschränkungen..... | 21 |
| Nichtklinische Leistungsmerkmale | 22 |
| Wichtigste Leistungsmerkmale | 22 |
| Nachweisgrenze (LoD)..... | 22 |
| Reproduzierbarkeit..... | 25 |
| Genotypverifizierung | 26 |
| Analytische Spezifität | 27 |
| Korrelation..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| Gesamtsystemausfall | 29 |
| Bewertung der klinischen Leistung | 30 |
| Diagnostische Sensitivität | 30 |
| Klinische (diagnostische) Spezifität | 30 |
| Weitere Informationen | 31 |
| Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests | 31 |
| Symbole | 32 |
| Technischer Support | 33 |
| Hersteller und Importeur | 33 |
| Marken und Patente | 33 |
| Copyright | 33 |
| Literatur | 34 |

Verwendungszweck

Beim cobas® CHIKV/DENV-Test zur Verwendung auf den cobas® 6800/8800 Systems handelt es sich um einen qualitativen *in-vitro*-Test zur direkten Detektion von RNA des Chikungunya-Virus (CHIKV) und RNA des Dengue-Virus (DENV) der Serotypen 1–4 in Humanplasma.

Der Test wurde für das Screening von Spenderproben auf jeweils CHIKV-RNA oder DENV-RNA sowie auf CHIKV- und DENV-RNA gleichzeitig in Plasmaproben einzelner menschlicher Spender konzipiert, einschließlich Spender von Vollblut und Blutbestandteilen sowie anderer Lebendspenden. Des Weiteren kann dieser Test für das Screening von Organ- und Gewebespendern verwendet werden, wenn die Organ- bzw. Gewebeproben entnommen werden, während das Herz des Spenders noch schlägt. Das Plasma sämtlicher Spender kann dem Screening in Form von Einzelproben unterzogen werden. Bei Vollblutspenden und Spenden von Blutbestandteilen können die Plasmaproben einzeln oder in Pools, die aus gleichen Aliquots einzelner Proben bestehen, getestet werden.

Dieser Test ist nicht für die Verwendung mit Nabelschnurblutproben bestimmt.

Dieser Test kann als Hilfsmittel bei der CHIKV- oder DENV-Diagnose in Proben von Personen eingesetzt werden, bei denen nach Ansicht einer medizinischen Fachkraft der Verdacht auf eine Infektion mit dem Chikungunya- oder Dengue-Virus besteht.

In diesem Fall sollten die Plasmaproben nur einzeln getestet werden.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Hintergrund

DENV ist ein durch Arthropoden übertragenes (Arbovirus) RNA-Virus aus der Familie der Flaviviridae, zu der neben dem West-Nil-Virus (WNV) und Gelbfieberevirus noch ungefähr 70 weitere Viren gehören.¹ Wie andere Arboviren vermehrt sich DENV in einem enzootischen Zyklus zwischen blutsaugenden Stechmücken (hauptsächlich *Aedes aegypti*) und anfälligen Wirbeltieren (Menschen) als Wirten.^{2,3} Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge ist DENV in über 100 Ländern endemisch. Dazu gehören über 2,5 Milliarden Menschen, die in tropischen und subtropischen Regionen der Welt potenziell bedroht sind.² Ein Anstieg der DENV-Inzidenz wurde in den vergangenen Jahren in Lateinamerika und der Karibik, einschließlich Puerto Rico, festgestellt. Damit stieg auch die Angst vor einer möglichen Ausbreitung von *Ae. aegypti* (dem Stechmückenvektor des DENV) und somit des DENV auf die USA.⁴ Die DENV-Pandemie aus dem Jahr 2010 umfasste Schätzungen zufolge weltweit ungefähr 390 Millionen Infektionen, darunter 96 Millionen symptomatische DENV-Infektionen und rund 500.000 Fälle von schweren Krankheitsverläufen.⁵

Bei den meisten DENV-Infektionen handelt es sich um Dengue-Fieber, das einer Definition der WHO zufolge durch Fieber und mindestens 2 weitere Symptome charakterisiert ist. Dazu können Schüttelfrost, Knochenschmerz (häufig schwer, was dem DENV den Ruf des „Knochenbrechervirus“ einbrachte), Myalgie, Arthralgie, Augenschmerz, Hautausschlag und Anfälligkeit für Blutergüsse gehören.² „Schwere Krankheitsverläufe“ gehen mit hämorrhagischem Fieber und Schock einher.² Das DENV ist in vier verwandte, aber immunologisch unterschiedliche Serotypen klassifiziert: DENV-1, DENV-2, DENV-3 und DENV-4. Eine Infektion mit einem DENV-Typ führt zu einer lebenslangen Immunität gegen diesen DENV-Serotyp und zu einer kurzzeitigen (≤ 2 Monate) Kreuzimmunität gegen die anderen drei DENV-Typen.⁶

Das DENV kann über Transfusionen übertragen werden.^{2,6,7} Die erste dokumentierte transfusionsbedingte DENV-Infektion stammt aus dem Jahr 2002 während eines lokalen Ausbruchs in Hongkong. Anhand eines RT-PCR-Tests konnte gezeigt werden, dass sowohl die Spender- als auch die Empfängerprobe DENV-1-RNA-positiv waren.^{8,9} Cluster von transfusionsbedingten DENV-Infektionen wurden im Jahr 2007 in Singapur¹⁰ und Puerto Rico festgestellt, einschließlich eines Falls von transfusionsbedingtem hämorrhagischem Fieber.^{1,6} Während einer Epidemie in Brasilien im Jahr 2012 wurden 42 DENV-4-RNA-positive Spenden an 35 Empfänger transfundiert, was zu sechs transfusionsbedingten DENV-Infektionen führte.^{11,12}

Da die meisten DENV-Infektionen asymptomatisch sind (53 % bis 87 %), kommt es vor, dass infizierte Personen Blut spenden.² Das Screening von Blutspenden im Rahmen einer in Puerto Rico durchgeführten Studie ergab eine Rate von 0,03 % bis 0,31 % in den letzten Jahren des Ausbruchs (2005, 2007, 2010, 2011 und 2012).² Eine Untersuchung von 39.134 Blutspenden, die während der DENV-Epidemie im Jahr 2012 in Brasilien entnommen wurden, ergab eine DENV-4-Virämie von 0,51 % in den Spenden aus Rio de Janeiro und 0,80 % der Spenden aus Recife.^{11,12} Ein ähnlicher Trend wurde in einer Modellierung der US-amerikanischen Behörde CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ermittelt.⁴ Ein Impfstoff befindet sich zwar in Entwicklung, es gibt derzeit jedoch keine Impfung gegen DENV-Infektionen; Standard ist eine unterstützende Therapie.⁵

Das durch Arthropoden übertragene (Arbovirus) RNA-Virus CHIKV gehört zur Familie der Togaviridae. Sein Überleben verdankt das CHIKV dem enzootischen Zyklus zwischen blutsaugenden Stechmücken (*Ae. aegypti* und – seit mindestens 2005 – *Ae. albopictus*) und Menschen.² Das CHIKV („Chikungunya“ bedeutet in Makonde, einer Landessprache in Tansania und Mosambik, „der gekrümmt Gehende“) ist mit ähnlichen Symptomen verbunden und tritt in denselben endemischen Zeiträumen auf wie das DENV, jedoch ist CHIKV durch schwere Gelenkschmerzen und quälende Arthritis charakterisiert, die so schwerwiegend sein können, dass der Betroffene nicht aufstehen kann.^{2,13} Todesfälle durch CHIKV wurden zwar nur selten berichtet, treten jedoch normalerweise infolge einer Enzephalitis oder einer anderen Enzephalopathie, Myokarditis, Hepatitis oder eines Multiorganversagens auf.¹⁴

Das CHIKV wurde 1952 in Tansania entdeckt und führte mehrere Jahrzehnte lang zu sporadischen Ausbrüchen in Afrika und Asien.¹⁴ Für das CHIKV wurden drei verschiedene Linien identifiziert: die westafrikanische Linie (WA), die ost-zentral-südafrikanische Linie (ECSA) und die asiatische Linie (Asian), die sich vom ECSA-Virus ableitet.¹⁴ Das CHIKV ist seit dem Jahr 2000 in verschiedenen Ausbrüchen erneut aufgetreten, die sich durch schwerwiegendere Verlaufsformen auszeichnen, als dies früher beobachtet wurde.¹⁴ In den Jahren 2006 und 2007 führte das CHIKV nach 32 Jahren Abwesenheit zu einem großen Ausbruch in Indien, von dem 13 Staaten betroffen waren.^{14,15} 2006 und 2007 gab es in Indien einen großen Ausbruch von CHIKV. CHIKV-Ausbrüche traten auch in verschiedenen anderen Ländern Südostasiens auf. Seit 2005 wurden über 1,9 Millionen CHIKV-Fälle in Indien, Indonesien, den Malediven, Myanmar und Thailand gemeldet.¹⁵ Auch Pakistan und Kenia werden derzeit (Stand Juli 2017) von andauernden Epidemien heimgesucht, die im Jahr 2016 begannen.¹⁵

Ein besonders explosiv verlaufender CHIKV-Ausbruch trat von Ende 2005 bis 2007 auf der Insel La Réunion und anderen Inseln im südwestlichen Indischen Ozean auf, mit 300.000 klinischen Fällen auf La Réunion (40 % der Inselbevölkerung), von denen 75 % symptomatisch waren.^{2,16} Bei dem Ausbruch auf La Réunion wurde eine Mutation in einem Virushüllprotein entdeckt, die zu einer Virusreplikation in *Ae. albopictus* führte (einer verwandten Spezies von *Ae. aegypti*, dem zuvor bekannten Überträger des CHIKV). Diese Mutation war beim La-Réunion-Ausbruch durch eine erhöhte Viruslast und eine stärkere Virulenz charakterisiert.¹⁷ *Ae. albopictus* war in der Folge als Stechmückenvektor auch an einer Reihe von Ausbrüchen in Indien, Norditalien und der Karibik beteiligt.^{2,18,19} Bei dem La-Réunion-Ausbruch von 2005 bis 2007 wurden zwar keine transfusionsbedingten CHIKV-Infektionen gemeldet, es wurden jedoch aggressive Maßnahmen ergriffen, um dem Risiko transfusionsbedingter Infektionen entgegenzuwirken, welches Schätzungen zufolge bis zu 1500 von 100.000 Spenden (1,5 %) betraf.^{2,16}

Sporadische Fälle von CHIKV wurden auch in Europa gemeldet. Der erste lokale Ausbruch (197 Fälle) in Europa fand 2007 in Nordostitalien statt. Damit galt die Möglichkeit von Ausbrüchen unter Beteiligung von *Ae. albopictus* in Europa als bestätigt.¹⁵ Im Jahr 2014 wurden mindestens 11 autochthone Fälle von CHIKV-Infektionen aus dem französischen Montpellier gemeldet, die von der Asiatischen Tigermücke (*Ae. albopictus*) verursacht wurden und im Umfeld eines importierten Falls auftraten.²⁰

Vor 2013 wurden Ausbrüche von CHIKV-Infektionen in Afrika, Asien, Europa und auf Inseln im Indischen Ozean und Pazifik gemeldet, Nachweise für eine CHIKV-Übertragung in Amerika liegen jedoch nicht vor.^{2,21} Das Potenzial für CHIKV-Ausbrüche ist jedoch schon seit langem bekannt. Hierfür sprechen das große Vorkommen der Überträger und ihre Effizienz bei der Übertragung des Dengue-Virus.²¹ Die erste lokal erworbene CHIKV-Infektion in Amerika wurde im Dezember 2013 aus St. Martin gemeldet.²¹

Das CHIKV stellt auch weiterhin eine Bedrohung für Amerika und die Karibik dar. Die Panamerikanische Gesundheitsorganisation (PAHO) meldete für 2017 (Stand 14. Juli) 58.806 Verdachtsfälle (28.654 bestätigte Fälle) einer autochthonen CHIKV-Übertragung in Südamerika, der Karibik und Nordamerika, darunter 13 Todesfälle in Brasilien.²² Die meisten dieser Fälle (52.724) stammen aus Brasilien, die übrigen Fälle wurden aus Bolivien, Kolumbien, Costa Rica, El Salvador, Französisch-Guayana, Guadeloupe, Guatemala, Martinique, Nicaragua, Panama, Paraguay, Peru, Puerto Rico, Saint-Barthélemy, St. Martin und Venezuela gemeldet.²²

Die Angst vor einer Ausbreitung des CHIKV auf die USA nimmt zu. Die CHIKV-Erkrankung kam vor 2006 kaum bei Reisenden aus den USA vor und es liegen keine Berichte über in den USA erworbene Fälle vor.²³ Über den Zeitraum von 2006 bis 2013 wurden in den USA durchschnittlich 28 Personen pro Jahr (zwischen 5 und 65) positiv auf CHIKV-Infektionen getestet. Dabei handelte es sich in allen Fällen entweder um Besucher oder rückkehrende Reisende aus den betroffenen Regionen in Asien, Afrika oder dem Indischen Ozean.²³ Im Jahr 2014 registrierte ArboNET 2811 Meldungen von CHIKV-Infektionen aus 47 US-Staaten (mit Ausnahme von Alaska, Nebraska und Wyoming), darunter 12 lokal übertragene Fälle in Florida.²³ In allen anderen Fällen waren Reisende betroffen, die aus betroffenen Regionen zurückkehrten.²³ Im Jahr 2014 wurden ArboNET insgesamt 4710 Fälle von CHIKV-Infektionen aus US-Territorien gemeldet, darunter Puerto Rico, Amerikanische Jungferninseln und Amerikanisch-Samoa.²³

Seit 2015 gehört CHIKV zu den national meldepflichtigen Erkrankungen in den USA. Im Jahr 2015 wurden ArboNET 679 Fälle von CHIKV-Infektionen aus 44 US-Staaten (alle Staaten mit Ausnahme von Delaware, Louisiana, New Mexiko, South Dakota, West Virginia und Wyoming) gemeldet. Es waren ausnahmslos Reisende betroffen, die aus betroffenen Regionen zurückkehrten.²⁴ 2015 wurden ArboNET aus den US-Territorien (Puerto Rico und Amerikanische Jungferninseln) 202 Fälle gemeldet, bei denen es sich ausnahmslos um lokal übertragene Infektionen handelte.²⁴ Im Jahr 2016 registrierte ArboNET 175 Fälle von CHIKV-Infektionen in 37 US-Staaten (alle Staaten mit Ausnahme von Alaska, Colorado, Idaho, Maine, Mississippi, Nevada, North Dakota, Oklahoma, Oregon, South Dakota, Vermont, West Virginia und Wyoming).²⁵ Auch hier waren in allen 175 Fällen Reisende betroffen, die aus betroffenen Regionen zurückkehrten; es gab keine lokal übertragenen Infektionen.²⁵ Es wurden insgesamt 171 Fälle von CHIKV-Infektionen aus US-Territorien gemeldet (alle aus Puerto Rico). Dabei handelte es sich in 170 Fällen um lokal erworbene Infektionen; ein Fall stand im Zusammenhang mit einer Reise.²⁵ Die Angst vor einer Ausbreitung des CHIKV über Florida hinaus nahm mit der Entdeckung von *Ae. aegypti*-Stechmücken im Los Angeles County (Commerce und Pico Rivera) zu.²⁶

Nutzen von NAT-Tests

Das DENV kann über Transfusionen übertragen werden.^{2,6,7} Transfusionsübertragungen des CHIKV wurden bisher zwar nicht dokumentiert, das Potenzial für transfusionsbedingte CHIKV-Infektionen lässt sich jedoch aus der Transfusionsübertragbarkeit anderer Arboviren wie z. B. des DENV ableiten.² Da die meisten (53 % bis 87 %) DENV-Infektionen und viele (ungefähr 25 %) der CHIKV-Infektionen asymptomatisch verlaufen, kommt es vor, dass infizierte Personen Blut spenden.^{2,6,7} Infizierte Spender entwickeln u. U. keine klinisch bedeutende Erkrankung oder bleiben asymptomatisch. Daher ist eine Befragung der Blutspender über kürzlich aufgetretene Symptome, die auf eine CHIKV- oder DENV-Infektion hinweisen könnten, kein wirksames Mittel zur Identifizierung infizierter Spender.

Erklärung des Tests

cobas® CHIKV/DENV ist ein qualitativer PCR-Test zur Detektion und Unterscheidung von CHIKV- und DENV-RNA auf dem **cobas**® 6800 System und dem **cobas**® 8800 System. Der **cobas**® CHIKV/DENV-Test ermöglicht die gleichzeitige oder individuelle Detektion von CHIKV- und DENV-RNA in einem einzigen Test einer einzelnen oder gepoolten Spende oder einer einzelnen Probe als Hilfsmittel bei der Diagnose.

Testprinzipien

cobas® CHIKV/DENV beruht auf einer vollautomatisierten Probenvorbereitung (Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäuren) gefolgt von PCR-Amplifikation und Detektion. Die **cobas**® 6800/8800 Systeme bestehen aus einem Probenzufuhrmodul, einem Transfermodul, einem Aufarbeitungsmodul und einem Analysenmodul. Die automatische Datenverwaltung erfolgt über die **cobas**® 6800/8800 Software, die jedem Test das Ergebnis „nicht reaktiv“, „reaktiv“ oder „ungültig“ zuweist. Die Ergebnisse können direkt am Bildschirm des Systems eingesehen und als Bericht gedruckt werden.

Zum Blutspender-Screening können Proben einzeln oder in Pools mit mehreren Proben getestet werden. Wenn Pools erstellt werden sollen, kann vor der Analyse das **cobas**® p 680 Instrument oder die **cobas**® Synergy Software mit dem Hamilton MICROLAB® STAR/STARlet IVD optional zur Vorbereitung der Pools eingesetzt werden.

In der Probe enthaltene Nukleinsäuren und hinzugegebene Armored RNA-IC-Moleküle (die als Prozesskontrolle für die Probenvorbereitung und die Amplifikation/Detektion dienen; IC = interne Kontrolle) werden gleichzeitig extrahiert. Zusätzlich kommen bei dem Test zwei externe Kontrollen zum Einsatz: eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Virale Nukleinsäuren werden durch Zugabe von Proteinase und Lysereagenz zur Probe freigesetzt. Die freigesetzten Nukleinsäuren binden an die Silica-Oberfläche der hinzugefügten magnetischen Glaspartikel. Nicht gebundene Substanzen und Verunreinigungen, beispielsweise denaturierte Proteine, Zelltrümmer und potenzielle PCR-Inhibitoren (etwa Hämoglobin), werden durch anschließende Waschreagenzschritte entfernt. Die aufgereinigten Nukleinsäuren werden danach mit einem Elutionspuffer bei erhöhter Temperatur von den Glaspartikeln gelöst.

Zur selektiven Amplifikation der Zielnukleinsäure aus der Probe werden virusspezifische Forward- und Reverse-Primer eingesetzt, die aus hochkonservierten Regionen der viralen Nukleinsäure ausgewählt wurden. Für die reverse Transkription und die Amplifikation wird ein thermostabiles DNA-Polymeraseenzym eingesetzt. Der Master-Mix enthält anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) Desoxyuridintriphosphat (dUTP), das in die neu synthetisierte DNA (Amplifikat) eingebaut wird.²⁷⁻²⁹ Etwaige Verunreinigungen durch Amplifikate aus früheren PCR-Läufen werden beim Erwärmen im ersten thermozyklischen Schritt durch das im PCR-Master-Mix enthaltene Enzym AmpErase (Uracil-N-Glykosylase) eliminiert. Neu gebildete Amplifikate dagegen werden nicht zerstört, da das AmpErase-Enzym durch Temperaturen über 55 °C inaktiviert wird.

Der **cobas**® CHIKV/DENV-Master-Mix enthält Detektionssonden, die für CHIKV-, DENV- und IC-Nukleinsäure spezifisch sind. Die CHIKV-, DENV- und IC-Detektionssonden sind alle mit einem von drei fluoreszierenden Reporterfarbstoffen markiert. Zudem ist jede Sonde mit einem vierten Farbstoff versehen, der als Quencher dient. Die drei Reporterfarbstoffe werden bei bestimmten Wellenlängen gemessen und ermöglichen so die gleichzeitige Detektion und Unterscheidung der amplifizierten CHIKV- und DENV-Zielsequenzen und der IC.^{30,31} Das Fluoreszenzsignal der intakten, nicht an die Zielsequenz gebundenen Sonden wird durch den Quencher-Farbstoff unterdrückt. Während des PCR-Amplifikationsschritts werden die Sonden an die betreffenden einsträngigen DNA-Templates hybridisiert und durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase gespalten. Dadurch kommt es zur Trennung der Reporter- und Quencher-Farbstoffe, und es entsteht ein Fluoreszenzsignal. Mit jedem PCR-Zyklus werden zunehmende Mengen gespaltener Sonden erzeugt, und das kumulative Signal des Reporterfarbstoffs steigt entsprechend an. Da die drei spezifischen Reporterfarbstoffe bei definierten Wellenlängen gemessen werden, ist die gleichzeitige Detektion und Unterscheidung der amplifizierten CHIKV- und DENV-Zielsequenzen sowie der IC möglich.

Reagenzien und Materialien

cobas® CHIKV/DENV-Reagenzien und Kontrollen

Sämtliche ungeöffnete Reagenzien und Kontrollen sollten wie in Tabelle 1 bis Tabelle 4 empfohlen gelagert werden.

Tabelle 1 cobas® CHIKV/DENV

Bei 2–8 °C lagern.

Kassette mit 480 Tests (P/N 09040650190)

| Kitkomponenten | Reagenzienbestandteile | Menge je Kit 480 Tests |
|---|--|---------------------------|
| Proteinase-Lösung (PASE) | Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, Calciumchlorid, Calciumacetat, 8 % (Massenvol.-%) Proteinase, Glycerin EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. EUH208: Enthält Subtilisin. Kann allergische Reaktionen hervorrufen. | 38 ml |
| Interne Kontrolle (IC) | Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % Armored-RNA-Konstrukt (in Bakteriophage MS2 verkapselte nicht-infektiöse RNA) als interne Kontrolle, < 0,002 % Poly rA RNA (synthetisch), < 0,1 % Natriumazid | 38 ml |
| Elutionspuffer (EB) | Tris-Puffer, 0,2 % Methyl-4-hydroxybenzoat | 38 ml |
| Master-Mix-Reagenz 1 (MMX-R1) | Manganacetat, Kaliumhydroxid, < 0,1 % Natriumazid | 14,5 ml |
| CHIKV/DENV-Master-Mix- Reagenz 2 (CHIKV/DENV MMX-R2) | Tricin-Puffer, Kaliumacetat, Glycerin, 18 % Dimethylsulfoxid, < 0,1 % Tween 20, EDTA, < 0,14 % dATP, dGTP, dCTP, dUTP, < 0,01 % Upstream- und Downstream-CHIKV- und DENV-Primer, < 0,01 % Forward- und -Reverse-Primer für die interne Kontrolle, < 0,01 % fluoreszenzmarkierte CHIKV-, DENV- und IC-Sonden, < 0,01 % Oligonukleotid-Aptamer, < 0,01 % Z05D-DNA-Polymerase, < 0,01 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase, mikrobiell), < 0,1 % Natriumazid | 17,5 ml |

Tabelle 2 cobas® CHIKV/DENV Control Kit

Bei 2–8 °C lagern.
(P/N 09040668190)

| Kitkomponenten | Reagenzienbestandteile | Menge je Kit | Sicherheitssymbole und -hinweise* |
|---|---|----------------------|--|
| CHIKV/DENV Positivkontrolle (CHIKV-DENV (+) C) | < 0,001 % in MS2-Bakteriophagen-Hüllprotein verkapselte synthetische (Armored) CHIKV- und DENV-RNA, Normal-Humanplasma, CHIKV- und DENV-RNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel** | 16 ml (16 × 1 ml) |  <p>WARNUNG</p> <p>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.</p> <p>H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.</p> <p>P261: Einatmen von Nebel oder Dampf vermeiden.</p> <p>P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.</p> <p>P280: Schutzhandschuhe tragen.</p> <p>P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.</p> <p>P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.</p> <p>P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen.</p> <p>55965-84-9 Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).</p> |

* Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

** Gefährliche Substanz

Tabelle 3 cobas® NHP Negative Control Kit

Bei 2–8 °C lagern.
(P/N 09051554190)

| Kitkomponenten | Reagenzienbestandteile | Menge je Kit | Sicherheitssymbole und -hinweise* |
|---|---|----------------------|---|
| Normal-Humanplasma-Negativkontrolle (NHP-NC) | Humanplasma, CHIKV- und DENV-RNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar < 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel** | 16 ml (16 × 1 ml) |   WARNUNG H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. P261: Einatmen von Nebel oder Dampf vermeiden. P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. P280: Schutzhandschuhe tragen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen. 55965-84-9 Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). |

* Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

** Gefährliche Substanz

cobas® omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung

Tabelle 4 cobas® omni Reagenzien für die Probenvorbereitung*

| Reagenzien | Reagenzienbestandteile | Menge je Kit | Sicherheitssymbole und -hinweise** |
|---|---|--------------|--|
| cobas® omni MGP Reagent (MGP) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997546190) | Magnetische Glaspartikel, Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4-hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid | 480 Tests | Keine Angabe |
| cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997511190) | Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4-hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid | 4 × 875 ml | Keine Angabe |
| cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997538190) | 42,56 % (Gew.-%) Guanidinthiocyanat***, 5 % (Massenvol.-%) Polidocanol***, 2 % (Massenvol.-%) Dithiothreitol, Dihydro-Natriumcitrat | 4 × 875 ml |  <p>GEFAHR</p> <p>H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. EUH071: Wirkt ätzend auf die Atemwege. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Schutzbrille/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen. P301 + P330 + P331: BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen. P303 + P361 + P353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P304 + P340 + P310: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P305 + P351 + P338 + P310: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. 593-84-0 Guanidinthiocyanat 9002-92-0 Polidocanol (Poly(oxy-1,2-ethanediyl), α-dodecyl-ω-hydroxy-) 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol</p> |
| cobas® omni Wash Reagent (WASH) Bei 15–30 °C lagern. (P/N 06997503190) | Natriumcitratdihydrat, 0,1 % Methyl-4-Hydroxybenzoat | 4,2 l | Keine Angabe |

* Diese Reagenzien sind nicht Bestandteil des cobas® CHIKV/DENV-Testkits. Siehe Liste der zusätzlich benötigten Materialien (Tabelle 7).

** Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

*** Gefährliche Substanz

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenzien müssen wie in Tabelle 5 und Tabelle 6 angegeben gelagert und gehandhabt werden.

Reagenzien, die sich nicht in den cobas® 6800/8800 Systems befinden, bei der in Tabelle 5 angegebenen Temperatur lagern.

Tabelle 5 Reagenzlagerung (wenn sich das Reagenz nicht im System befindet)

| Reagenz | Lagertemperatur |
|-------------------------------------|-----------------|
| cobas® CHIKV/DENV - 480 | 2–8 °C |
| cobas® CHIKV/DENV Control Kit | 2–8 °C |
| cobas® NHP Negative Control Kit | 2–8 °C |
| cobas® omni Lysis Reagent | 2–8 °C |
| cobas® omni MGP Reagent | 2–8 °C |
| cobas® omni Specimen Diluent | 2–8 °C |
| cobas® omni Wash Reagent | 15–30 °C |

Reagenzien in den cobas® 6800/8800 Systemen werden bei angemessenen Temperaturen aufbewahrt und ihr Verfallsdatum wird vom System überwacht. Das System lässt die Verwendung der Reagenzien nur zu, wenn alle in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen erfüllt sind. Das System verhindert automatisch die Verwendung von abgelaufenen Reagenzien. Tabelle 6 enthält die Bedingungen für die Reagenzhandhabung, die von den cobas® 6800/8800 Systemen geprüft werden.

Tabelle 6 Bedingungen für die Haltbarkeit der Reagenzien, die von den cobas® 6800/8800 Systemen geprüft werden

| Reagenz | Verfallsdatum des Kits | Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits | Anzahl der Läufe, für die dieses Kit verwendet werden kann | Haltbarkeit im Gerät (kumulative Zeit im Gerät außerhalb der Kühlung) |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--|---|
| cobas® CHIKV/DENV – 480 | Datum nicht überschritten | 60 Tage ab erstem Gebrauch | Max. 20 Läufe | Max. 20 Stunden |
| cobas® CHIKV/DENV Control Kit | Datum nicht überschritten | Keine Angabe | Keine Angabe | Max. 10 Stunden |
| cobas® NHP Negative Control Kit | Datum nicht überschritten | Keine Angabe | Keine Angabe | Max. 10 Stunden |
| cobas® omni Lysis Reagent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | Keine Angabe | Keine Angabe |
| cobas® omni MGP Reagent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | Keine Angabe | Keine Angabe |
| cobas® omni Specimen Diluent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | Keine Angabe | Keine Angabe |
| cobas® omni Wash Reagent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | Keine Angabe | Keine Angabe |

* Zeit ab dem erstmaligen Laden des Reagenzes in die cobas® 6800/8800 Systems.

Zusätzlich benötigtes Material

Tabelle 7 Materialien und Verbrauchsmaterialien zur Verwendung auf den **cobas®** 6800/8800 Systems

| Material | P/N |
|--|-------------|
| cobas® omni Processing Plate | 05534917001 |
| cobas® omni Amplification Plate | 05534941001 |
| cobas® omni Pipette Tips | 05534925001 |
| cobas® omni Liquid Waste Container | 07094388001 |
| cobas® omni Lysis Reagent | 06997538190 |
| cobas® omni MGP Reagent | 06997546190 |
| cobas® omni Specimen Diluent | 06997511190 |
| cobas® omni Wash Reagent | 06997503190 |
| Beutel für Festabfälle | 07435967001 |
| Festabfallbehälter | 07094361001 |

Benötigte Geräte und Software

Die **cobas®** 6800/8800 Software und das **cobas®** CHIKV/DENV-Analysenpaket müssen auf dem Instrument (bzw. den Instrumenten) installiert sein. Der IG-Server (Instrument Gateway) ist Bestandteil des Systems.

Tabelle 8 Ausstattung

| cobas® 6800/8800 Systems | P/N |
|--|-----------------------------|
| cobas® 6800 System (mit beweglicher Plattform) | 05524245001 und 06379672001 |
| cobas® 6800 System (feststehend) | 05524245001 und 06379664001 |
| cobas® 8800 System | 05412722001 |
| Probenzufuhrmodul | 06301037001 |
| Geräte und Software für Pipettierung und Pooling | P/N |
| cobas® p 680 Instrument | 06570577001 |
| Elektronische Lizenz für die cobas® Synergy Software (für cobas® 6800/8800 Systems) | 09311238001 |
| Hamilton MICROLAB® STAR IVD | 04640535001 |
| Hamilton MICROLAB® STARlet IVD | 04872649001 |

Zusätzliche Informationen finden Sie in der Benutzerunterstützung der **cobas®** 6800/8800 Systems. Weitere Informationen zu Primär- und Sekundärröhrchen, die auf den Systemen verwendet werden können, enthält die Benutzerunterstützung des **cobas®** p 680 Instruments sowie die Benutzerunterstützung zur **cobas®** **Synergy** Software.

Hinweis: Eine ausführliche Bestellliste für Probenracks, Racks für gestopfte Spitzen und Racktrays, die auf den Geräten verwendet werden können, ist bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die uneingeschränkte Leistung dieses Tests. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Tests ist besonders darauf zu achten, dass die Reagenzien und Amplifikationsgemische nicht kontaminiert werden.

- Nur zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Alle Proben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben zu behandeln.^{32,33} Dieses Verfahren darf nur von Personal angewandt werden, das mit **cobas**® CHIKV/DENV, den **cobas**® 6800/8800 Systems und (optional) dem **cobas**® p 680 Instrument oder dem Hamilton MICROLAB® STAR/STARlet IVD, ggf. in Verbindung mit der **cobas**® Synergy Software vertraut sowie in der Handhabung infektiöser Materialien geschult ist.
- Alle von Menschen gewonnenen Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen unter Anwendung genereller Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Wenn Material verschüttet wurde, betroffenes Areal unverzüglich mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,6%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser desinfizieren oder die jeweiligen Laborverfahren beachten.
- Das **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit und das **cobas**® NHP Negative Control Kit enthalten aus Humanblut gewonnenes Plasma. Bei der Untersuchung dieses Humanplasmas konnte mit PCR-Methoden keine CHIKV- und DENV-RNA nachgewiesen werden. Mit keiner der bekannten Testmethoden kann jedoch eine Übertragung von Infektionserregern durch humane Blutprodukte ausgeschlossen werden.
- Vollblut nicht einfrieren.
- Es wird empfohlen, sterile Einwegpipetten und nukleasefreie Pipettierspitzen zu verwenden. Nur die mitgelieferten oder die als erforderlich angegebenen Verbrauchsmaterialien verwenden, um eine optimale Leistung des Tests zu gewährleisten.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage beim zuständigen Kundendienst von Roche Diagnostics erhältlich.
- Alle Verfahren und Vorschriften sind sorgfältig einzuhalten, um eine korrekte Durchführung des Tests sicherzustellen. Jede Abweichung von den Verfahren und Vorschriften kann sich auf die optimale Leistung des Tests auswirken.
- Eine Vermischung der Plasmaschicht mit Zellen durch äußere Einwirkung oder Diffusion nach dem Zentrifugieren kann zu einer höheren Rate ungültiger Ergebnisse führen.
- Es kann zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, wenn während der Handhabung und Bearbeitung der Proben eine Probenverschleppung nicht vermieden wird.
- Schwerwiegende Vorkommnisse, die bei Verwendung dieses Tests auftreten, müssen den zuständigen Behörden und dem Hersteller gemeldet werden.

Umgang mit Reagenzien

- Alle Reagenzien, Kontrollen und Proben sind gemäß der guten Laborpraxis zu handhaben, um eine Verschleppung der Proben und Kontrollen zu vermeiden.
- Alle Reagenzkassetten, Verdünnungslösungen, Lysereagenzien und Waschreagenzien vor der Verwendung visuell auf auslaufende Flüssigkeit überprüfen. Liegen Anzeichen für undichte Stellen vor, das betreffende Material nicht für den Test verwenden.
- **cobas® omni** Lysis Reagent enthält die potenziell gefährliche Chemikalie Guanidinthiocyanat. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden.
- **cobas®** CHIKV/DENV-Kits, **cobas® omni** MGP Reagent und **cobas® omni** Specimen Diluent enthalten Natriumazid als Konservierungsstoff. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- **cobas® omni** Lysis Reagent enthält Guanidinthiocyanat und darf nicht in Kontakt mit Natriumhypochloritlösung (Haushaltsbleiche) gebracht werden. Dieses Gemisch kann ein hochgiftiges Gas erzeugen.
- Sämtliche Materialien, die mit Proben und Reagenzien in Berührung gekommen sind, gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille zu tragen. Um Kontamination zu vermeiden, müssen die Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben und **cobas®** CHIKV/DENV-Kits sowie **cobas® omni** Reagenzien jeweils gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden.
- Nach Gebrauch der Proben und Kitreagenzien sowie nach dem Ausziehen der Handschuhe gründlich die Hände waschen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,6%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren. Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abwischen.
- Wenn Flüssigkeiten auf den **cobas®** 6800/8800 Systems verschüttet wurden, die Oberflächen gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung der **cobas®** 6800/8800 Systems gründlich reinigen und dekontaminieren.

Entnahme, Transport, Lagerung und Pooling von Proben

Hinweis: Alle Proben und Kontrollen sind wie potenzielle Überträger von Infektionserregern zu behandeln.

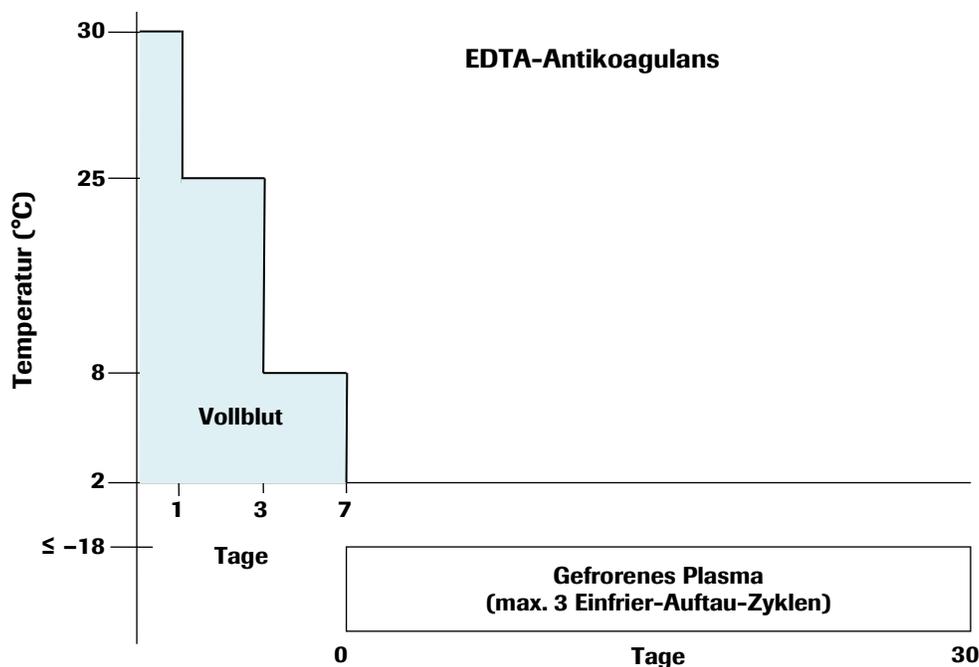
Alle Proben bei den angegebenen Temperaturen lagern.

Erhöhte Umgebungstemperaturen wirken sich auf die Probenstabilität aus.

Proben lebender Spender und diagnostische Proben

- Mit cobas® CHIKV/DENV können Plasmaproben verwendet werden, die in EDTA, CPD, CPDA1 und CP2D entnommen wurden. Bezüglich Handhabung und Zentrifugierung die Anweisungen des Probenröhrchen/-beutel-Herstellers beachten.
- In EDTA gesammeltes Blut kann unter den folgenden Bedingungen bis zu 7 Tage lang gelagert werden:
 - Die Proben müssen innerhalb von 72 Stunden nach der Entnahme zentrifugiert werden.
 - Bei Lagerung über 8 °C können die Proben 72 Stunden bei maximal 25 °C und während dieser 72 Stunden 24 Stunden bei maximal 30 °C gelagert werden.
- Anderenfalls werden Proben bei 2–8 °C gelagert. Von den Zellen abgetrenntes Plasma kann zudem maximal 30 Tage bei ≤ -18 °C gelagert werden und darf dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Siehe Abbildung 1.

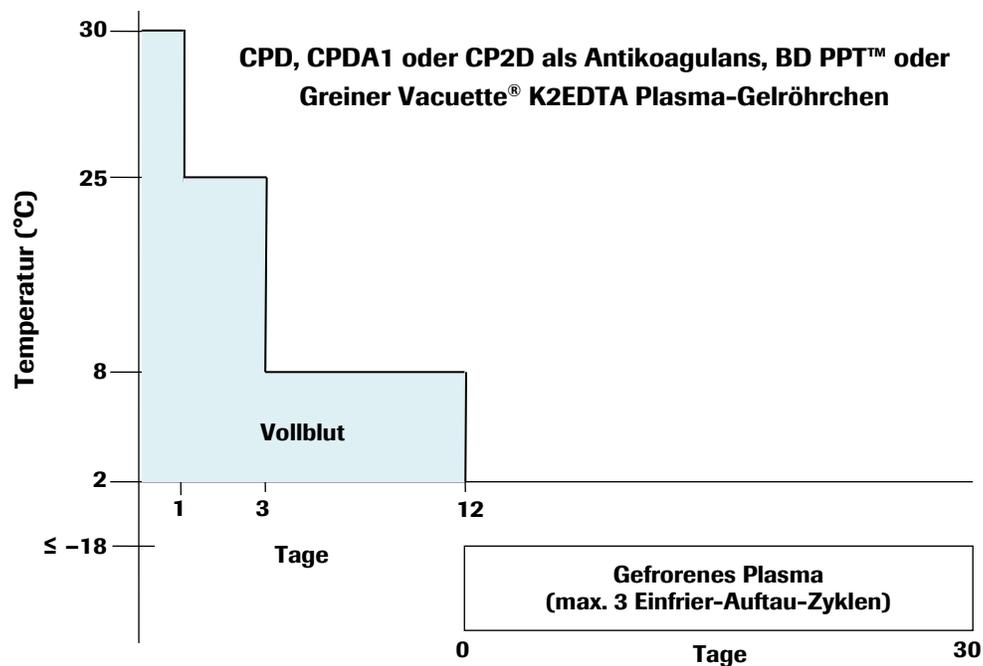
Abbildung 1 Lagerungsbedingungen für EDTA-Proben



- In Röhrchen mit CPD, CPDA1, CP2D, BD PPT™-Röhrchen (Becton-Dickinson EDTA Plasma Preparation Tubes) oder Greiner Vacuette® K2EDTA Plasma-Gelröhrchen gesammeltes Blut kann unter folgenden Bedingungen bis zu 12 Tage lang gelagert werden:
 - Die Proben müssen innerhalb von 72 Stunden nach der Entnahme zentrifugiert werden.
 - Bei Lagerung über 8 °C können die Proben 72 Stunden bei maximal 25 °C und während dieser 72 Stunden 24 Stunden bei maximal 30 °C gelagert werden.

- Anderenfalls werden Proben bei 2–8 °C gelagert. Von den Zellen abgetrenntes Plasma kann zudem maximal 30 Tage bei ≤ -18 °C gelagert werden und darf dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Siehe Abbildung 2.

Abbildung 2 Lagerungsbedingungen für Proben, die in CPD, CPDA1, CP2D, BD PPT™ und Greiner Vacuette® K2EDTA Plasma-Gelröhrchen gesammelt wurden



- Wenn Proben versandt werden sollen, sind sie gemäß den geltenden nationalen und internationalen Vorschriften für den Transport von Proben und Krankheitserregern zu verpacken und zu beschriften.

Gebrauchsanweisung

Automatisches Pipettieren und Poolen von Proben (optional)

Das **cobas**® p 680 Instrument oder die **cobas**® Synergy Software mit dem Hamilton MICROLAB® STAR/STARlet IVD können als optionale Komponente der **cobas**® 6800/8800 Systems zum automatischen Pipettieren und Poolen von Aliquots mehrerer Primärproben in eine gepoolte Probe verwendet werden. Weitere Informationen hierzu enthalten die Benutzerunterstützung des **cobas**® p 680 Instruments und die Benutzerunterstützung zur **cobas**® Synergy Software.

Hinweise zum Verfahren

- Die **cobas**® CHIKV/DENV-Testreagenzien, das **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit, das **cobas**® NHP Negative Control Kit und die **cobas**® omni Reagenzien nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Verbrauchsmaterialien nicht wiederverwenden. Sie sind ausschließlich zum Einmalgebrauch vorgesehen.
- Informationen zur ordnungsgemäßen Wartung enthält das Benutzerhandbuch der **cobas**® 6800/8800 Systems.

Durchführen des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests

Der Testablauf ist in der Benutzerunterstützung der **cobas**® 6800/8800 Systems ausführlich beschrieben; Einzelheiten zu optionalen Pooling-Verfahren finden Sie in der Benutzerunterstützung des **cobas**® p 680 Instrument und in der Benutzerunterstützung zur **cobas**® Synergy Software.

In Abbildung 3 ist der Ablauf zusammenfassend dargestellt.

Abbildung 3 **cobas**® CHIKV/DENV-Testablauf

| | |
|----------|---|
| 1 | Pipettierung und Pooling |
| 2 | Auftrag erstellen. |
| 3 | Reagenzien und Verbrauchsmaterialien auf Anforderung des Systems nachfüllen: <ul style="list-style-type: none"> • Waschreagenz, Lysereagenz und Diluent nachfüllen. • Probenaufarbeitungsplatten und Amplifikationsplatten nachfüllen. • Magnetische Glaspartikel nachfüllen • Testspezifische Reagenzien nachfüllen. • Kontrollkassetten nachfüllen. • Tip-Racks nachfüllen. • Rack für gestopfte Spitzen wechseln. |
| 4 | Lauf starten: <ul style="list-style-type: none"> • Racks mit Proben laden. • Start-Schaltfläche in der Software wählen. |
| 5 | Ergebnisse prüfen und exportieren. |
| 6 | Verbrauchsmaterial entladen: <ul style="list-style-type: none"> • Amplifikationsplatten aus dem Analysenmodul entnehmen. • Leere Kontrollkassetten entnehmen. • Festabfall entsorgen. • Flüssigabfall entsorgen. |

Ergebnisse

Die cobas® 6800/8800 Systems dienen zur automatischen Detektion und Unterscheidung von CHIKV-RNA und DENV-RNA für die Proben und Kontrollen.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

- Mit jedem Batch werden eine Negativkontrolle [(-) C] und eine Positivkontrolle [CHIKV-DENV (+) C] verarbeitet.
- Die cobas® 6800/8800 Software und/oder den Bericht auf Flags und entsprechende Ergebnisse kontrollieren, um die Gültigkeit des Batch zu überprüfen.
- Der Batch ist gültig, wenn für keine der beiden Kontrollen Flags ausgegeben wurden.

Die cobas® 6800/8800 Software markiert Ergebnisse bei ausgefallenen Negativ- und Positivkontrollen automatisch als ungültig.

Kontroll-Flags

Tabelle 9 Kontroll-Flags für Negativ- und Positivkontrollen

| Negativkontrolle | Flag | Ergebnis | Interpretation |
|------------------|------|----------|---|
| (-) C | Q02 | Invalid | Wenn das Ergebnis für (-) C ungültig ist, gilt der gesamte Batch als ungültig. |
| Positivkontrolle | Flag | Ergebnis | Interpretation |
| CHIKV-DENV (+) C | Q02 | Invalid | Wenn das Ergebnis für CHIKV-DENV (+) C ungültig ist, gilt der gesamte Batch als ungültig. |

Wenn der Batch ungültig ist, muss der Test des gesamten Batch einschließlich der Proben und Kontrollen wiederholt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Bei gültigen Batches die einzelnen Proben in der **cobas**® 6800/8800 Software und/oder im Bericht auf Flags kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- Ein gültiger Batch kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten, je nachdem, welche Flags für die einzelnen Proben generiert wurden.
- Probenergebnisse sind nur gültig, wenn die entsprechenden Positivkontrolle und die Negativkontrolle des betreffenden Batch gültig sind.

Bei jeder Probe werden drei Parameter gleichzeitig gemessen: CHIKV, DENV und interne Kontrolle (IC). Die Endergebnisse von **cobas**® CHIKV/DENV für die Proben werden von der Software ausgegeben. Zusätzlich zu den Gesamtergebnissen werden in der **cobas**® 6800/8800 Software die Ergebnisse für die einzelnen Zielsequenzen angezeigt, die wie folgt zu interpretieren sind:

Tabelle 10 Interpretation der Ergebnisse für die einzelnen Zielsequenzen

| Ergebnis für Zielsequenz | Interpretation |
|--------------------------|---|
| CHIKV Non-Reactive | Kein Signal für die CHIKV-Zielsequenz detektiert, IC-Signal detektiert |
| CHIKV Reactive | Signal für die CHIKV-Zielsequenz detektiert, IC-Signal detektiert oder nicht detektiert |
| DENV Non-Reactive | Kein Signal für die DENV-Zielsequenz detektiert, IC-Signal detektiert |
| DENV Reactive | Signal für die DENV-Zielsequenz detektiert, IC-Signal detektiert oder nicht detektiert |
| Invalid | Kein Signal für Zielsequenz und kein IC-Signal detektiert |

Bei Verwendung der **cobas**® Synergy Software sollte die Überprüfung der finalen Ergebnisberechnung ebenfalls durch die **cobas**® Synergy Software erfolgen.

Wiederholungsmessung für einzelne Proben

Bei Probenröhrchen, bei denen das endgültige Ergebnis für eine Zielsequenz ungültig ist, muss der Test ungeachtet der gültigen Ergebnisse für die andere Zielsequenz wiederholt werden.

Verfahrenseinschränkungen

- Der **cobas**® CHIKV/DENV-Test ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit, **cobas**® NHP Negative Control Kit, **cobas**® omni MGP Reagent, **cobas**® omni Lysis Reagent, **cobas**® omni Specimen Diluent und **cobas**® omni Wash Reagent auf den **cobas**® 6800/8800 Systems validiert.
- Zuverlässige Ergebnisse hängen von der sachgemäßen Gewinnung, Lagerung und Bearbeitung der Proben ab.
- Bei diesem Test kein heparinisiertes Plasma verwenden, da Heparin nachweislich die PCR hemmt.
- Die Detektion von CHIKV-RNA und DENV-RNA hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Viruspartikel ab und kann durch Entnahmeverfahren, Lagerung und Handhabung der Proben, patientenbezogene Faktoren (Alter, Vorhandensein von Symptomen) und/oder das Infektionsstadium und die Pool-Größe beeinflusst werden.
- Mutationen in den hochkonservierten Regionen des viralen Genoms, das durch **cobas**® CHIKV/DENV abgedeckt wird, treten zwar selten auf, können jedoch die Primer- und/oder Sondenbindung beeinträchtigen und dadurch zur Nichterkennung des Virus führen.
- Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren im eigenen Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln. Außerdem sollten Benutzer stets die eigenen Richtlinien und Verfahren beachten.

Nichtklinische Leistungsmerkmale

Wichtigste Leistungsmerkmale

Nachweisgrenze (LoD)

Roche-Sekundärstandard

Die Nachweisgrenze von cobas® CHIKV/DENV wurde anhand der folgenden Standards bestimmt:

- Roche-Sekundärstandard für DENV-Serotyp 1 (DENV-1)
- Roche-Sekundärstandard für DENV-Serotyp 2 (DENV-2)
- Roche-Sekundärstandard für DENV-Serotyp 3 (DENV-3)
- Roche-Sekundärstandard für DENV-Serotyp 4 (DENV-4)
- Roche-Sekundärstandard für den CHIKV-Genotyp Asian (CHIKV-Asian)
- Roche-Sekundärstandard für den CHIKV-Genotyp East Central and South African (CHIKV-ECSA)
- Armored-RNA für den CHIKV-Genotyp West African (CHIKV-WA)

Bei den Roche DENV-Sekundärstandards handelt es sich um Überstände von hitzeinaktivierten Viruskulturen und die Titer sind auf das 1. internationale Referenz-Panel der Dengue-Virustypen 1 bis 4 (DENV-1 BB, DENV-2 AA, DENV-3 CC und DENV-4 BB) für Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren rückführbar.

Für das CHIKV sind derzeit keine internationalen Standards erhältlich. Die CHIKV Roche-Standards (CHIKV-Asian, CHIKV-ECSA), die Überstände der hitzeinaktivierten Viruskulturen und die Armored-RNA (CHIKV-WA) sind auf das CBER CHIKV-RNA-Referenzreagenz (CHIKV-RR) rückführbar.³⁴

Für die Roche-Sekundärstandards für DENV-1 und CHIKV-Asian wurden unter Verwendung von normalem, virusnegativem (CHIKV und DENV) EDTA-Humanplasma 3 unabhängige koformulierte Verdünnungsreihen beider Virusstandards hergestellt. Jede Verdünnungsreihe wurde mit drei verschiedenen Chargen von cobas® CHIKV/DENV-Testkits mit ca. 63 Replikaten pro Charge getestet (insgesamt ca. 189 Replikate pro Konzentration).

Für die Roche-Sekundärstandards für DENV-2, DENV-3, DENV-4, CHIKV-ECSA und die Armored-RNA für CHIKV-WA wurden unter Verwendung von normalem, virusnegativem (CHIKV und DENV) EDTA-Humanplasma 3 unabhängige Reihen jedes Virusstandards hergestellt. Die einen wurden mit DENV-2 und CHIKV-ECSA koformuliert und die anderen waren individuelle Formulierungen von DENV-3, DENV-4 und CHIKV-WA. Jede Verdünnungsreihe wurde mit 3 verschiedenen Chargen von cobas® CHIKV/DENV-Testkits mit ca. 42 Replikaten pro Charge getestet (insgesamt ca. 126 Replikate pro Konzentration).

Für jedes Virus wurde eine PROBIT-Analyse der kombinierten Daten aller Verdünnungsreihen und Reagenzchargen durchgeführt, um die Nachweisgrenze sowie die Unter- und Obergrenze des 95%-Konfidenzintervalls zu bestimmen (Tabelle 11). Die in den Studien zur Nachweisgrenze beobachteten Reaktivitätsraten für jedes Virus sind in Tabelle 12 bis Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 11 Ergebnisse der PROBIT-Analysen zur Bestimmung der Nachweisgrenze unter Verwendung von Virusstandards in EDTA-Plasma

| Analyt | Maßeinheit | LoD | Untere 95%-Konfidenzgrenze | Obere 95%-Konfidenzgrenze |
|-------------|------------|-----|----------------------------|---------------------------|
| DENV-1 | IE/ml | 0,6 | 0,5 | 0,8 |
| DENV-2 | IE/ml | 1,0 | 0,8 | 1,3 |
| DENV-3 | IE/ml | 1,0 | 0,9 | 1,3 |
| DENV-4 | IE/ml | 0,4 | 0,3 | 0,5 |
| CHIKV Asian | NE*/ml | 6,8 | 5,9 | 8,1 |
| CHIKV ECSA | NE*/ml | 9,3 | 7,9 | 11,5 |
| CHIKV WA | NE*/ml | 7,1 | 6,1 | 8,7 |

* Nachweisbare Einheiten

Tabelle 12 Zusammenfassung der Reaktivitätsraten für DENV-1 in EDTA-Plasma

| DENV-RNA-Konzentration (IE/ml) | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl gültiger Replikate | % reaktiv | Untere 95%-Konfidenzgrenze (einseitig) |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|--|
| 1,69 | 189 | 189 | 100,0 % | 98,4 % |
| 0,85 | 187 | 189 | 98,9 % | 96,7 % |
| 0,42 | 163 | 189 | 86,2 % | 81,4 % |
| 0,21 | 119 | 189 | 63,0 % | 56,7 % |
| 0,11 | 81 | 189 | 42,9 % | 36,7 % |

Tabelle 13 Zusammenfassung der Reaktivitätsraten für DENV-2 in EDTA-Plasma

| DENV-RNA-Konzentration (IE/ml) | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl gültiger Replikate | % reaktiv | Untere 95%-Konfidenzgrenze (einseitig) |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|--|
| 3,49 | 126 | 126 | 100,0 % | 97,7 % |
| 1,75 | 125 | 126 | 99,2 % | 96,3 % |
| 0,87 | 116 | 126 | 92,8 % | 87,8 % |
| 0,44 | 92 | 126 | 73,0 % | 65,7 % |
| 0,22 | 60 | 126 | 47,6 % | 40,0 % |

Tabelle 14 Zusammenfassung der Reaktivitätsraten für DENV-3 in EDTA-Plasma

| DENV-RNA-Konzentration (IE/ml) | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl gültiger Replikate | % reaktiv | Untere 95%-Konfidenzgrenze (einseitig) |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|--|
| 1,40 | 126 | 126 | 100,00 % | 97,7 % |
| 0,70 | 106 | 126 | 84,1 % | 77,8 % |
| 0,35 | 85 | 124 | 68,5 % | 61,0 % |
| 0,17 | 48 | 125 | 38,4 % | 31,1 % |
| 0,09 | 21 | 125 | 16,8 % | 11,5 % |

Tabelle 15 Zusammenfassung der Reaktivitätsraten für DENV-4 in EDTA-Plasma

| DENV-RNA-Konzentration (IE/ml) | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl gültiger Replikate | % reaktiv | Untere 95%-Konfidenzgrenze (einseitig) |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|--|
| 2,40 | 126 | 126 | 100,0 % | 97,7 % |
| 1,20 | 126 | 126 | 100,0 % | 97,7 % |
| 0,60 | 124 | 126 | 98,4 % | 95,1 % |
| 0,30 | 116 | 126 | 92,1 % | 86,9 % |
| 0,15 | 90 | 126 | 71,4 % | 64,1 % |

Tabelle 16 Zusammenfassung der Reaktivitätsraten für CHIKV-Asian in EDTA-Plasma

| CHIKV-RNA-Konzentration (NE/ml) | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl gültiger Replikate | % reaktiv | Untere 95%-Konfidenzgrenze (einseitig) |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|--|
| 16,0 | 189 | 189 | 100,0 % | 98,4 % |
| 8,0 | 188 | 189 | 99,5 % | 97,5 % |
| 4,0 | 150 | 189 | 79,4 % | 73,9 % |
| 2,0 | 94 | 189 | 49,7 % | 43,5 % |
| 1,0 | 50 | 189 | 26,5 % | 21,2 % |

Tabelle 17 Zusammenfassung der Reaktivitätsraten für CHIKV-ECSA in EDTA-Plasma

| CHIKV-RNA-Konzentration (NE/ml) | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl gültiger Replikate | % reaktiv | Untere 95%-Konfidenzgrenze (einseitig) |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|--|
| 16,0 | 126 | 126 | 100,0 % | 97,7 % |
| 8,0 | 119 | 126 | 94,4 % | 89,8 % |
| 4,0 | 80 | 125 | 64,0 % | 56,3 % |
| 2,0 | 45 | 126 | 35,7 % | 28,6 % |
| 1,0 | 16 | 126 | 12,7 % | 8,1 % |

Tabelle 18 Zusammenfassung der Reaktivitätsraten für CHIKV-WA in EDTA-Plasma

| CHIKV-RNA-Konzentration (NE/ml) | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl gültiger Replikate | % reaktiv | Untere 95%-Konfidenzgrenze (einseitig) |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|--|
| 16,0 | 126 | 126 | 100,0 % | 97,7 % |
| 8,0 | 122 | 126 | 96,8 % | 92,9 % |
| 4,0 | 100 | 126 | 79,4 % | 72,5 % |
| 2,0 | 54 | 126 | 42,9 % | 35,4 % |
| 1,0 | 19 | 126 | 15,1 % | 10,1 % |

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von **cobas**® CHIKV/DENV auf den **cobas**® 6800/8800 Systems wurde unter Verwendung der folgenden Standards bestimmt:

- Roche-Sekundärstandard für DENV-Serotyp 1 (DENV-1)
- Roche-Sekundärstandard für den CHIKV-Genotyp Asian (CHIKV-Asian)

Im Rahmen dieser Studie wurden für jedes Virus 3 Panels von koformulierten CHIKV- und DENV-Proben in Konzentrationen von ungefähr der 0,5fachen, 1fachen und 2fachen Nachweisgrenze des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests getestet. Die Tests wurden für die folgenden Variabilitätskomponenten durchgeführt:

- Tag-zu-Tag-Variabilität über 3 Tage
- Charge-zu-Charge-Variabilität unter Verwendung von 3 verschiedenen Reagenzchargen des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests
- Gerät-zu-Gerät-Variabilität unter Verwendung von 3 verschiedenen **cobas**® 8800 Systems

Jedes der 3 Panels wurde mit ca. 21 Replikaten getestet (insgesamt 63 Replikate pro Reagenzcharge). Alle gültigen Daten zur Reproduzierbarkeit wurden evaluiert, indem der Prozentsatz der reaktiven Testergebnisse für jede Konzentrationsstufe über alle variablen Komponenten berechnet wurde.

Die Grenzen der zweiseitigen 95-%-Konfidenzintervalle für jede Reaktivitätsrate wurden für jede der drei Konzentrationen von CHIKV und DENV berechnet, die an 3 Tagen mit 3 Reagenzchargen auf 3 **cobas**® 8800 Systems getestet wurden. Die Ergebnisse des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests sind über mehrere Tage, Reagenzchargen und Geräte hinweg reproduzierbar. Die Ergebnisse der Charge-zu-Charge-Variabilität sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19 Zusammenfassung der Charge-zu-Charge-Reproduzierbarkeit für den cobas® CHIKV/DENV-Test

| Analyt | Konzentration | Reagenz-charge | % reaktiv (reaktive/gültige Replikate) | Untergrenze des 95-%-Konfidenzintervalls | Obergrenze des 95-%-Konfidenzintervalls |
|-------------|---------------|----------------|--|--|---|
| DENV-1 | 2 × LoD | 1 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 2 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 3 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | 1 × LoD | 1 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 2 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 3 | 96,8 % (61/63) | 89,0 % | 99,6 % |
| | 0,5 × LoD | 1 | 92,1 % (58/63) | 82,4 % | 97,4 % |
| | | 2 | 84,1 % (53/63) | 72,7 % | 92,1 % |
| | | 3 | 82,5 % (52/63) | 70,9 % | 90,9 % |
| CHIKV-Asian | 2 × LoD | 1 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 2 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 3 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | 1 × LoD | 1 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 2 | 100 % (63/63) | 94,3 % | 100,0 % |
| | | 3 | 98,4 % (62/63) | 91,5 % | 100,0 % |
| | 0,5 × LoD | 1 | 77,8 % (49/63) | 65,5 % | 87,3 % |
| | | 2 | 87,3 % (55/63) | 76,5 % | 94,4 % |
| | | 3 | 73,0 % (46/63) | 60,3 % | 83,4 % |

Genotypverifizierung

Die Leistung von cobas® CHIKV/DENV bei der Detektion aller 4 DENV-Serotypen und aller 3 CHIKV-Genotypen wurde bestimmt. Dazu wurden insgesamt 43 verschiedene klinische Proben, 2 Kulturoisolate und 1 Armored-RNA-Probe (aRNA) mit bekannten Serotypen/Genotypen getestet. Alle 43 klinischen Proben wurden unverdünnt und nach Verdünnung mit normalem, virusnegativem (CHIKV und DENV) EDTA-Humanplasma auf das 4fache der Nachweisgrenze des cobas® CHIKV/DENV-Tests getestet.

Alle klinischen Proben und Kulturoisolate wurden unverdünnt und nach Verdünnung auf die 4fache Nachweisgrenze detektiert (Tabelle 20).

Tabelle 20 Klinische Proben, Kulturoisolate und Armored-RNA für CHIKV/DENV

| Ziel | Genotyp/Serotyp | Proben | % reaktiv (reaktiv/getestete Proben) unverdünnt | % reaktiv (reaktiv/getestete Proben) verdünnt auf das 4fache der Nachweisgrenze |
|-------|-----------------|-------------------------------------|---|---|
| CHIKV | Asiaten | 10 klinische Proben | 100 % (10/10) | 100 % (10/10) |
| | ECSA | 1 Kulturoisolat | 100 % (1/1) | 100 % (1/1) |
| | West African | 1 aRNA | 100 % (1/1) | 100 % (1/1) |
| DENV | 1 | 10 klinische Proben | 100 % (10/10) | 100 % (10/10) |
| | 2 | 10 klinische Proben | 100 % (10/10) | 100 % (10/10) |
| | 3 | 3 klinische Proben, 1 Kulturoisolat | 100 % (4/4) | 100 % (4/4) |
| | 4 | 10 klinische Proben | 100 % (10/10) | 100 % (10/10) |

Analytische Spezifität

Zur Ermittlung der analytischen Spezifität von **cobas**® CHIKV/DENV wurde die Kreuzreaktivität mit 31 Mikroorganismen in einer Menge von 10^5 – 10^6 Kopien, Genomäquivalenten, IE oder CFU/ml untersucht; dazu gehörten 24 Virusisolate, sechs Bakterienstämme und ein Hefeisolat (Tabelle 21). Die Mikroorganismen wurden normalem, virusnegativem (CHIKV und DENV) EDTA-Humanplasma zugesetzt und mit und ohne Zugabe von CHIKV und DENV (koformuliert) auf eine Konzentration von ungefähr der 3fachen Nachweisgrenze des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests getestet. Die getesteten Mikroorganismen zeigen keine Kreuzreaktivität mit **cobas**® CHIKV/DENV und stören den Test nicht.

Tabelle 21 Zur Bestimmung der analytischen Spezifität getestete Mikroorganismen

| Viren | Flaviviren | Bakterien | Hefen |
|---|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Adenovirus Typ 5 | Japanisches Enzephalitis-Virus | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> |
| Cytomegalievirus | Murray-Valley-Enzephalitis-Virus | <i>Propionibacterium acnes</i> | |
| Epstein-Barr-Virus | St.-Louis-Enzephalitis-Virus | <i>Staphylococcus aureus</i> | |
| Hepatitis-A-Virus | Usutu-Virus | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | |
| Hepatitis-B-Virus | West-Nil-Virus | <i>Streptococcus viridans</i> | |
| Hepatitis-C-Virus | Gelbfieberevirus | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | |
| Hepatitis-E-Virus | Zika-Virus | | |
| Hepatitis-G-Virus | | | |
| Herpes-simplex-Virus Typ 1 | | | |
| Herpes-simplex-Virus Typ 2 | | | |
| Humanes Immundefizienz-Virus (HIV-1 Gruppe M) | | | |
| Humanes Immundefizienz-Virus (HIV-2) | | | |
| Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ I | | | |
| Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ II | | | |
| Humanes Herpesvirus 6A | | | |
| Influenza-Virus A | | | |
| Varicella-Zoster-Virus | | | |

Die Plasmaproben jeder genannten Erkrankung (Tabelle 22) wurden mit und ohne Zugabe von CHIKV und DENV (koformuliert) auf eine Konzentration der ca. 3fachen Nachweisgrenze des cobas® CHIKV/DENV-Tests für jedes Virus getestet. Die getesteten Erkrankungen zeigen keine Kreuzreaktivität mit dem cobas® CHIKV/DENV-Test und stören den Test nicht.

Tabelle 22 Zur Bestimmung der analytischen Spezifität getestete Erkrankungen

| Erkrankung | | |
|--------------------|---|--|
| Adenovirus Typ 5 | Hepatitis-C-Virus | Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ I |
| Cytomegalievirus | Hepatitis-E-Virus | Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ II |
| Epstein-Barr-Virus | Herpes-simplex-Virus Typ 1 | Parvovirus B19 |
| Hepatitis-A-Virus | Herpes-simplex-Virus Typ 2 | West-Nil-Virus |
| Hepatitis-B-Virus | Humanes Immundefizienz-Virus (HIV-1) Gruppe M | |

Analytische Spezifität – Störsubstanzen

Endogene Störsubstanzen

Plasmaproben mit abnormal hohen Konzentrationen von Triglyceriden (bis 33,0 g/l), Hämoglobin (bis 2,0 g/l), unkonjugiertem Bilirubin (bis 0,20 g/l), Albumin (bis 60,0 g/l) oder Human-DNA (bis 0,002 g/l) wurden mit und ohne Zugabe von CHIKV und DENV (koformuliert) auf eine Konzentration der 3fachen Nachweisgrenze des cobas® CHIKV/DENV-Tests getestet. Diese endogenen Substanzen wirkten sich nicht störend auf die Sensitivität oder Spezifität von cobas® CHIKV/DENV aus.

Exogene Störsubstanzen

Normale, virusnegative (CHIKV und DENV) EDTA-Humanplasmaproben mit abnormal hohen Medikamentenkonzentrationen (Tabelle 23) wurden mit und ohne Zugabe von CHIKV und DENV (koformuliert) auf eine Konzentration der 3fachen Nachweisgrenze des cobas® CHIKV/DENV-Tests für jedes Virus getestet. Diese exogenen Substanzen wirkten sich nicht störend auf die Sensitivität oder Spezifität von cobas® CHIKV/DENV aus.

Tabelle 23 Konzentrationen von Medikamenten, die EDTA-Plasma zugesetzt wurden

| Medikament | Konzentration |
|--------------------|---------------|
| Acetaminophen | 1337 µmol/l |
| Acetylsalicylsäure | 3657 µmol/l |
| Ascorbinsäure | 346 µmol/l |
| Atorvastatin | 606 µg-Äq./l |
| Fluoxetin | 11,3 µmol/l |
| Ibuprofen | 2450 µmol/l |
| Loratadin | 0,8 µmol/l |
| Nadolol | 3,9 µmol/l |
| Naproxen | 2192 µmol/l |
| Paroxetin | 3,1 µmol/l |
| Phenylephrin-HCL | 496 µmol/l |
| Sertralin | 2,0 µmol/l |

Korrelation

Leistungsbewertung des cobas® CHIKV/DENV-Tests im Vergleich zum RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 Test und RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 Test

Die Leistung von cobas® CHIKV/DENV wurde unter Verwendung von 100 CHIKV-NAT-positiven Proben, 100 DENV-NAT-positiven Proben und 100 CHIKV- und DENV-negativen Proben mit dem RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 Test und dem RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 Test (Altona Diagnostics) verglichen.

Die negativen Proben wurden unverdünnt mit dem cobas® CHIKV/DENV-Test, dem RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 Test und dem RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 Test getestet und die positiven Proben wurden ebenfalls unverdünnt mit dem cobas® CHIKV/DENV-Test und dem entsprechenden RealStar® Test getestet.

Die seronegativen Proben zeigten eine Spezifität von 100 %, da mit allen drei Verfahren alle 100 Ergebnisse nicht reaktiv waren.

Der cobas® CHIKV/DENV-Test zeigte bei positiven Proben eine höhere Sensitivität für CHIKV und DENV als der RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 Test und der RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 Test. Auf der Grundlage des McNemar-Tests gab es keine Übereinstimmung zwischen den Methoden (Tabelle 24).

Tabelle 24 Korrelation der positiven Proben (unverdünnt)

| Verfahren | | Ergebnisse der verschiedenen Viruszielsequenzen | |
|---|-------------------|---|--------|
| RealStar® CHIKV RT-PCR Kit 2.0 Test RealStar® DENV RT-PCR Kit 2.0 Test | cobas® CHIKV/DENV | CHIKV | DENV |
| Nicht reaktiv | Nicht reaktiv | 1 | 0 |
| Reaktiv | Nicht reaktiv | 0 | 0 |
| Nicht reaktiv | Reaktiv | 14 | 19 |
| Reaktiv | Reaktiv | 85 | 81 |
| Gesamt | | 100 | 100 |
| McNemar-Test, p-Wert (zweiseitig, $\alpha = 0,05$) | | 0,0001 | 0,0000 |

Gesamtsystemausfall

Zur Ermittlung der Gesamtsystemausfall-Rate von cobas® CHIKV/DENV wurden 100 Replikate von EDTA-Plasma getestet, das mit CHIKV und DENV (koformuliert) versetzt wurde. Diese Proben wurden mit einer Zielsequenzkonzentration der ca. 3fachen Nachweisgrenze und in 1er-Pools (unverdünnt) getestet. Die Studie wurde unter Verwendung des cobas® 6800 Systems in Kombination mit dem cobas® p 680 Instrument (Pipettierung und Pooling) durchgeführt.

Die Studie ergab, dass alle Replikate reaktiv auf die einzelnen Zielsequenzen waren, was einer Gesamtsystemausfall-Rate von 0 % entspricht. Das exakte zweiseitige 95-%-Konfidenzintervall betrug 0 % für die Untergrenze und 3,62 % für die Obergrenze [0 %: 3,62 %].

Bewertung der klinischen Leistung

Diagnostische Sensitivität

Die Bewertung der diagnostischen Sensitivität des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests erfolgte anhand von 111 bestätigten Chikungunya-positiven klinischen Proben und 134 bestätigten Dengue-positiven klinischen Proben, die in einem internen Testzentrum unverdünnt getestet wurden. Mit dem **cobas**® CHIKV/DENV Test wurde das Chikungunya-Virus in 100 % der Fälle (111/111; zweiseitiges 95-%-Konfidenzintervall (KI): 96,7 %–100 %) und das Dengue-Virus ebenso in 100 % der Fälle (134/134; 95-%-KI: 97,3 %–100 %) nachgewiesen (Tabelle 25).

Tabelle 25 Diagnostische Sensitivität bei bekanntermaßen CHIKV- und DENV-positiven Proben (unverdünnt)

| Ziel | Anzahl der getesteten Proben | Anzahl der reaktiven Proben | Anzahl der nicht-reaktiven Proben | Diagnostische Sensitivität | Exaktes 95-%-KI |
|--------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------|
| CHIKV | 111 | 111 | 0 | 100 % | (96,7 %, 100 %) |
| DENV | 134 | 134 | 0 | 100 % | (97,3 %, 100 %) |

Klinische (diagnostische) Spezifität

Die klinische (diagnostische) Spezifität des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests wurde durch das Testen von Einzelproben aus Blutspenden aus für CHIKV/DENV nicht endemischen sowie endemischen Gebieten auf dem Festland der USA und Puerto Rico in einem externen Labor in den USA ermittelt. Für beide Studien wurde dieselbe **cobas**® CHIKV/DENV-Reagenzcharge verwendet. Die klinische Spezifität des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests entspricht dem Prozentsatz (zweiseitiges 95-%-Konfidenzintervall) der Spenden mit negativem CHIKV-/DENV-Spendenstatus, für die mit dem **cobas**® CHIKV/DENV-Test nicht reaktive Ergebnisse erzielt wurden. Es waren 10.528 auswertbare Proben aus nicht endemischen Gebieten und 1.056 auswertbare Proben aus endemischen Gebieten verfügbar.

Die Spezifität des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests lag bei den CHIKV- und den DENV-Zielregionen sowohl für alle Blutspenden insgesamt als auch für die nach nicht endemischen und endemischen Gebieten getrennten Blutspenden bei 100 % (Tabelle 26).

Tabelle 26 Klinische (diagnostische) Spezifität des **cobas**® CHIKV/DENV-Tests – Einzelproben-tests

| Einstufung Entnahmegebiet | Ziel | Gesamtanzahl der Spenden mit negativem Status | cobas ® CHIKV/DENV-Test: Reaktiv | cobas ® CHIKV/DENV-Test: Nicht reaktiv | Diagnostische Spezifität – Prozentsatz (exaktes 95-%-KI) |
|---------------------------|--------------|---|---|---|--|
| Nicht endemisch | CHIKV | 10528 | 0 | 10528 | 100,000 (99,965; 100,000) |
| Nicht endemisch | DENV | 10528 | 0 | 10528 | 100,000 (99,965; 100,000) |
| Endemisch | CHIKV | 1056 | 0 | 1056 | 100,000 (99,651; 100,000) |
| Endemisch | DENV | 1056 | 0 | 1056 | 100,000 (99,651; 100,000) |
| Insgesamt | CHIKV | 11584 | 0 | 11584 | 100,000 (99,968; 100,000) |
| Insgesamt | DENV | 11584 | 0 | 11584 | 100,000 (99,968; 100,000) |

Weitere Informationen

Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests

| | |
|---|----------|
| Probenart | Plasma |
| Erforderliche Probenmindestmenge | 1000 µl* |
| Verarbeitete Probenmenge | 850 µl |

* Teströhrchen können unterschiedliche Totvolumina aufweisen und mehr oder weniger Mindestvolumen erfordern. Für weitere Informationen wenden Sie sich an den zuständigen Servicemitarbeiter von Roche Diagnostics.

Symbole

Die folgenden Symbole werden bei der Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

Tabelle 27 Symbole zur Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten

| | | |
|---|---|---|
| Age/DOB Alter oder Geburtsdatum | Produkt nicht für eine patientennahe Testung geeignet | QS IU/PCR Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Internationalen Einheiten pro PCR-Reaktion |
| Zusatz-Software | Produkt nicht für Selbsttests geeignet | SN Seriennummer |
| Assigned Range [copies/mL] Sollbereich (Kopien/mL) | Vertrieb <i>(Hinweis: ggf. Angabe von Land/Region unter dem Symbol)</i> | Site Zentrum, Labor |
| Assigned Range [IU/mL] Sollbereich (IE/mL) | Nicht wiederverwenden | Procedure Standard Standardverfahren |
| EC REP Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft | Frauen, weiblich | STERILE EO Mit Ethylenoxid sterilisiert |
| BARCODE Barcode-Datenblatt | Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung | Im Dunkeln lagern |
| LOT Chargenbezeichnung | GTIN Globale Artikelnummer GTIN | Temperaturbegrenzung |
| Biogefährdung | Import | Testdefinitionsdatei |
| REF Bestellnummer | IVD <i>In-vitro</i> -Diagnostikum | Diese Seite oben |
| CE CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für <i>In-vitro</i> -Diagnostika. | LLR Unterer Grenzwert des Sollbereichs | Procedure UltraSensitive Ultrasensitives Verfahren |
| Collect Date Entnahmedatum | Männer, männlich | UDI Einmalige Produktkennung |
| Gebrauchsanweisung beachten | Hersteller | ULR Oberer Grenzwert des Sollbereichs |
| Ausreichend für <n> Tests | CONTROL - Negativkontrolle | Urine Fill Line Fülllinie für Urin |
| CONTENT Inhalt des Kits | Nicht steril | Rx Only Nur für die USA: In den USA darf dieses Produkt nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden. |
| CONTROL Kontrolle | Patientennamen | Verwendbar bis |
| Herstellungsdatum | Patienten-ID | |
| Produkt für patientennahe Tests | Hier abziehen | |
| Produkt zur Eigenanwendung | CONTROL + Positivkontrolle | |
| | QS copies / PCR Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Kopien pro PCR-Reaktion | |

Technischer Support

Für technischen Support wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort:

https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Hersteller und Importeur

Tabelle 28 Hersteller und Importeur



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com

Hergestellt in den USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marken und Patente

Siehe <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Copyright

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Literatur

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

20. Roiz D, Boussès P, Simard F, Paupy C, Fontenille D. Autochthonous chikungunya transmission and extreme climate events in Southern France. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003854.
21. Johansson MA, Powers AM, Pesik N, Cohen NJ, Staples JE. Nowcasting the spread of chikungunya virus in the Americas. *PLoS One* 2014;9:e104915.
22. Pan American Health Organization (PAHO). Number of reported cases of chikungunya fever in the Americas, by country or territory, 2017 (as of June 2, 2017). www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8975&itemid=40931&lang=en (accessed June 5, 2017).
23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2014 final data for the United States. <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2014.html> (last updated October 30, 2015; last accessed July 20, 2017)
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2015 final data for the United States. <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2015.html> (last updated June 23, 2016; last accessed July 20, 2017)
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus, 2016 provisional data for the United States. www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2016.html (last updated January 18, 2017; accessed June 5, 2017)
26. Rocha V. Virus-transmitting yellow fever mosquitoes discovered in L.A. County. *Los Angeles Times*, October 15, 2014. <http://www.latimes.com/local/lanow/la-me-In-yellow-fever-mosquito-los-angeles-20141015-story.html>.
27. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990;93:125-128.
28. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature* 1995;373:487-493.
29. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell* 1995;80:869-878.
30. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 1992;10:413-417.
31. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;9:986-994.
32. Centers for Disease Control and Prevention. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition.* CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
34. Añez G, Jiang Z, Heisey DA, Kerby S, Rios M, Chikungunya virus Collaborative Study Group. Collaborative study for the characterization of a chikungunya virus RNA reference reagent for use in nucleic acid testing. *Vox Sang* 2015;109:312-318.

Dokumentversion

| Dokumentversionsübersicht | |
|---------------------------|-----------------------|
| Doc Rev. 1.0 10/2024 | Erstveröffentlichung. |

Unter dem folgenden Link finden Sie eine Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>