



# Zika-Virus-Infektionen

EUROIMMUN-Testsysteme zum Nachweis einer Zika-Virus-Infektion

## Zika-Virus

Das Zika-Virus (ZIKV) gehört zur Familie der Flaviviren, die insgesamt mehr als 50 Virenarten umfasst. Dengue-, Gelbfieber- und West-Nil-Viren zählen zu den bekanntesten Vertretern. Das Zika-Virus wurde erstmals 1947 isoliert, gelangte jedoch erst durch eine Reihe von Epidemien in den letzten Jahren in den Fokus des Interesses.

Seit 2013 gab es eine zunehmende Zahl von Ausbrüchen an Zika-Virus-Infektionen in verschiedenen Regionen; darunter Südost-Asien, Polynesien und angrenzende Pazifik-Regionen, einige Inseln der Karibik sowie über 30 Länder und Gebiete in Nord-, Mittel- und Südamerika.



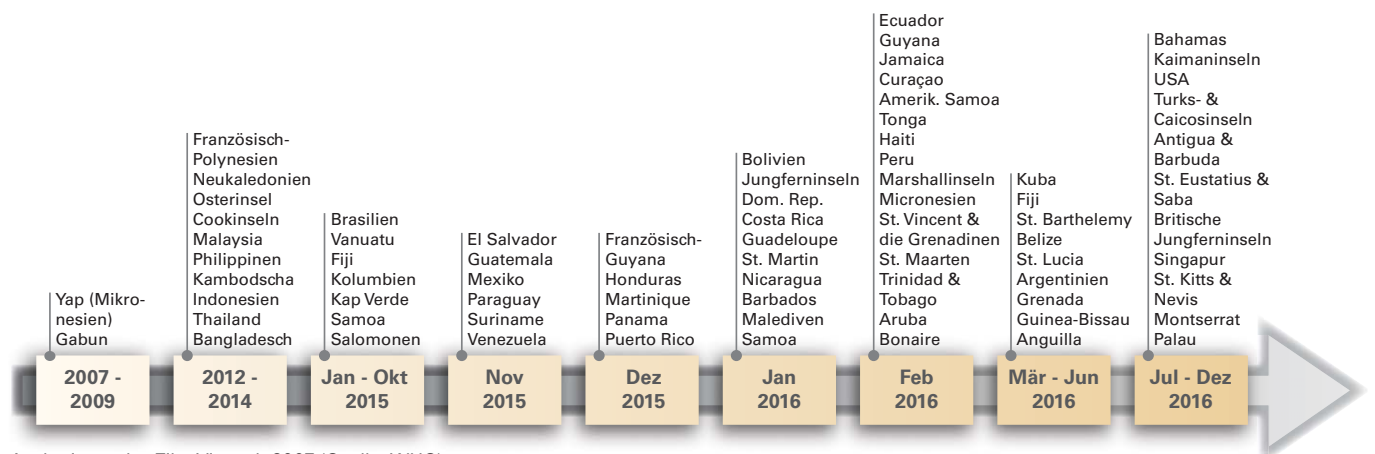
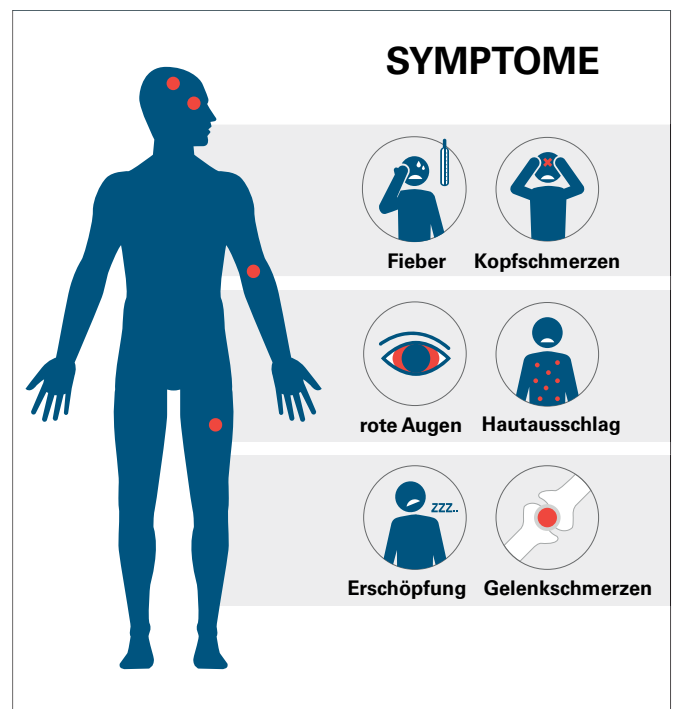
Der Mensch wird durch den Stich weiblicher Mücken der Gattung Aedes infiziert. Diese fungieren als Vektor und übertragen das Zika-Virus während des Blutsaugens. Eine weitere Übertragungsart ist die Weitergabe des Virus von der infizierten Mutter an ihren Fötus während der Schwangerschaft (kongenital) oder der Geburt (perinatal). Inzwischen gibt es aus verschiedenen Ländern auch Berichte von einer Transmission durch Geschlechtsverkehr und Bluttransfusion.

### Symptome

Eine Zika-Virus-Infektion verläuft in der Mehrheit der Fälle (ca. 80%) asymptomatisch, nur etwa 20% der Erkrankten zeigen Symptome, zu denen typischerweise Hautausschlag,

Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen sowie Bindehautentzündung zählen. Diese treten in der Regel 3–12 Tage nach dem Mückenstich auf und halten für 2–7 Tage an. Der Krankheitsverlauf ist meist mild und in der Regel selbstlimitierend. Die Symptome sind denen einer Dengue-, bzw. Chikungunya-Viren-Infektion sehr ähnlich.

In Brasilien und einer Reihe weiterer Länder wurde während der Zika-Epidemie 2015/2016 ein signifikanter Anstieg neurologischer Erkrankungen wie des Guillain-Barré-Syndroms verzeichnet, außerdem kam eine ungewöhnlich hohe Zahl von Babys mit der Schädel-Hirn-Fehlbildung Mikrozephalie zur Welt. Der Zusammenhang zwischen einer Zika-Virus-Infektion und dem Auftreten von neurologischen Erkrankungen bzw. fetalen Missbildungen gilt weitestgehend als gesichert. Die Thematik wird aktuell intensiv erforscht.



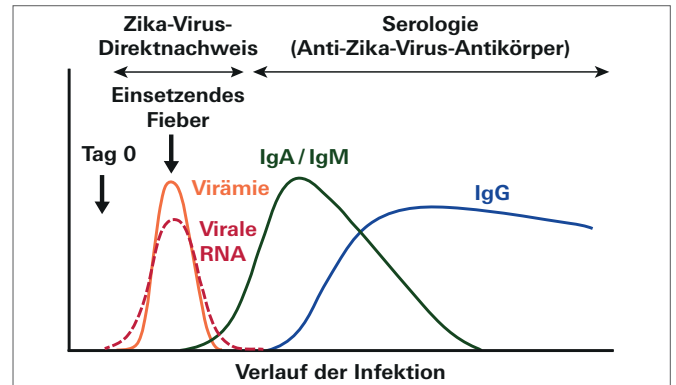
Ausbreitung des Zika-Virus ab 2007 (Quelle: WHO)

## Diagnose

Die Diagnose einer Zika-Virus-Infektion kann entweder durch den Direktnachweis der viralen RNA erfolgen oder durch einen indirekten Nachweis über Antikörper. Nach Einsetzen der Symptome ist ein Direktnachweis des Virus im Blut des Patienten noch für maximal eine Woche möglich. Spezifische Antikörper sind für einen längeren Zeitraum nachweisbar und können neben einer akuten auch eine bereits überstandene Infektion anzeigen.

Ab etwa dem 5. Tag einer Infektion können im Serum eines Patienten IgA- und/oder IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Ungefähr 2–3 Tage nach dem Auftreten von IgA- und IgM-Antikörpern sind auch IgG-Antikörper nachweisbar. Alle Antikörper-Klassen können jedoch auch zeitgleich in Erscheinung treten. Der Antikörper-Nachweis kann mit Hilfe serologischer Tests wie ELISA oder indirekte Immunfluoreszenz (IIFT) durchgeführt werden. Bei der Interpretation serologischer Ergebnisse ist die enge Verwandtschaft der Flaviviren zu berücksichtigen, die die Gefahr von Kreuzreaktionen der spezifischen Antikörper beinhaltet.

Die Kreuzreaktivität ist bei Patienten ohne zurückliegenden Kontakt mit einem anderen Flavivirus nur minimal. Bei vorausgegangener Impfung oder Infektion mit einem anderen Flavivirus muss jedoch mit einer ausgeprägten Kreuzreaktivität gerechnet werden. Durch den Einsatz des hoch-spezifischen NS1-Antigens können diese jedoch nahezu ausgeschlossen werden.



## Diagnostische Zeitfenster für den zuverlässigen Nachweis von Zika-Virus-Infektionen

Die geeignetste Methode zum Nachweis einer Zika-Virus-Infektion ist abhängig von der Krankheitsphase, in der sich der Patient befindet. In einer frühen Phase der Infektion ist ein Nachweis der viralen RNA möglich: Bis etwa eine Woche nach Symptombeginn kann das Zika-Virus mittels RT-PCR im Blut nachgewiesen werden. Bei infizierten schwangeren Frauen kann das Virus in Einzelfällen auch noch mehrere Wochen später nachgewiesen werden (Driggers et al., 2016). Im Urin ist ein Virus-Nachweis durch PCR für einen längeren Zeitraum möglich als im Serum oder Plasma. Positive Ergebnisse können hier noch 2–4 Wochen nach Symptombeginn auftreten. Liegt die Infektion länger als 7 Tage zurück, wird empfohlen, serologische Tests durchzuführen. Antikörper sind etwa ab dem 5. Tag im Blut des Patienten nachweisbar.

Virus-Nachweis: Serum oder Plasma

Virus-Nachweis: Urin

Antikörper-Nachweis: Serum oder Plasma



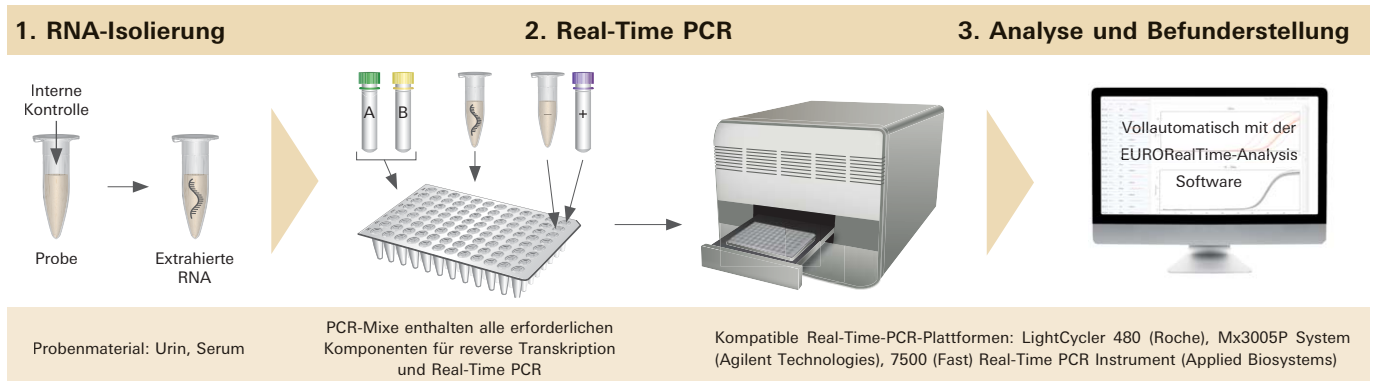
Tage nach Einsetzen der Symptome

Tage nach Einsetzen der Symptome	Virus-Nachweis RT-PCR Serum	Virus-Nachweis RT-PCR Urin	Serologie (IgA/IgG/IgM) ELISA oder IIFT
1–7	+	+	-/+
8–27	-	-/+	+
ab 28	-	-	+

## Direkter Erregernachweis mittels Real-Time PCR

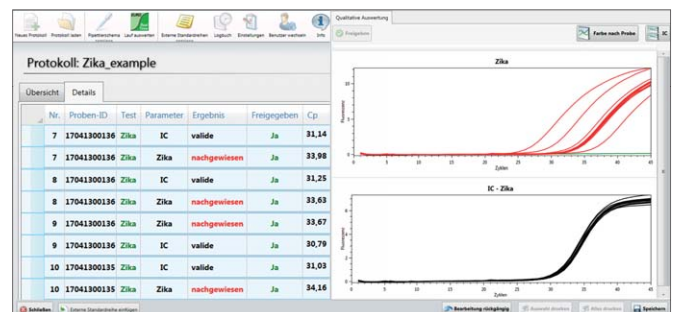
Für den Nachweis der viralen RNA in der Frühphase einer Zika-Virus-Infektion eignet sich die EURORealTime Zika-Viren PCR. Dieses EUROIMMUN-Testsystem umfasst die reverse Transkription der viralen RNA in komplementäre DNA (cDNA), gefolgt von PCR-Amplifikation und Fluoreszenz-basierter Echtzeit-Detektion von definierten Abschnitten des ZIKV-Genoms. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt vollautomatisch mit der EURORealTime-Analysis Software.

### EURORealTime Zika-Viren PCR



### EURORealTime-Analysis Software

- Standardisierte und automatisierte Rohdaten-Analyse für eine schnelle und objektive Ergebnisauswertung
- Vollautomatische Befunderstellung und Ergebnisdokumentation einschließlich aller internen und externen Kontrollen
- Komfortable Führung durch den gesamten Arbeitsablauf
- Automatisierte Erstellung des Layouts für die PCR-Platten inklusive aller notwendigen Kontrollen
- Ergänzt bestehende Real-Time PCR-Plattformen und ist voll kompatibel mit verschiedenen LIS



### Methodenvergleich

In einer Studie wurde die Sensitivität der EURORealTime Zika-Viren PCR im Vergleich zu einem anderen CE-IVD zertifizierten PCR-Test untersucht. Dazu wurden Proben mit 3 verschiedenen Konzentrationen an Zika-Template mit beiden Systemen in Dreifachbestimmung analysiert. Zika-RNA wurde mit beiden Tests in allen drei bzw. 2 von 3 Ansätzen nachgewiesen. Beide Systeme zeigten hier somit eine identische analytische Sensitivität.

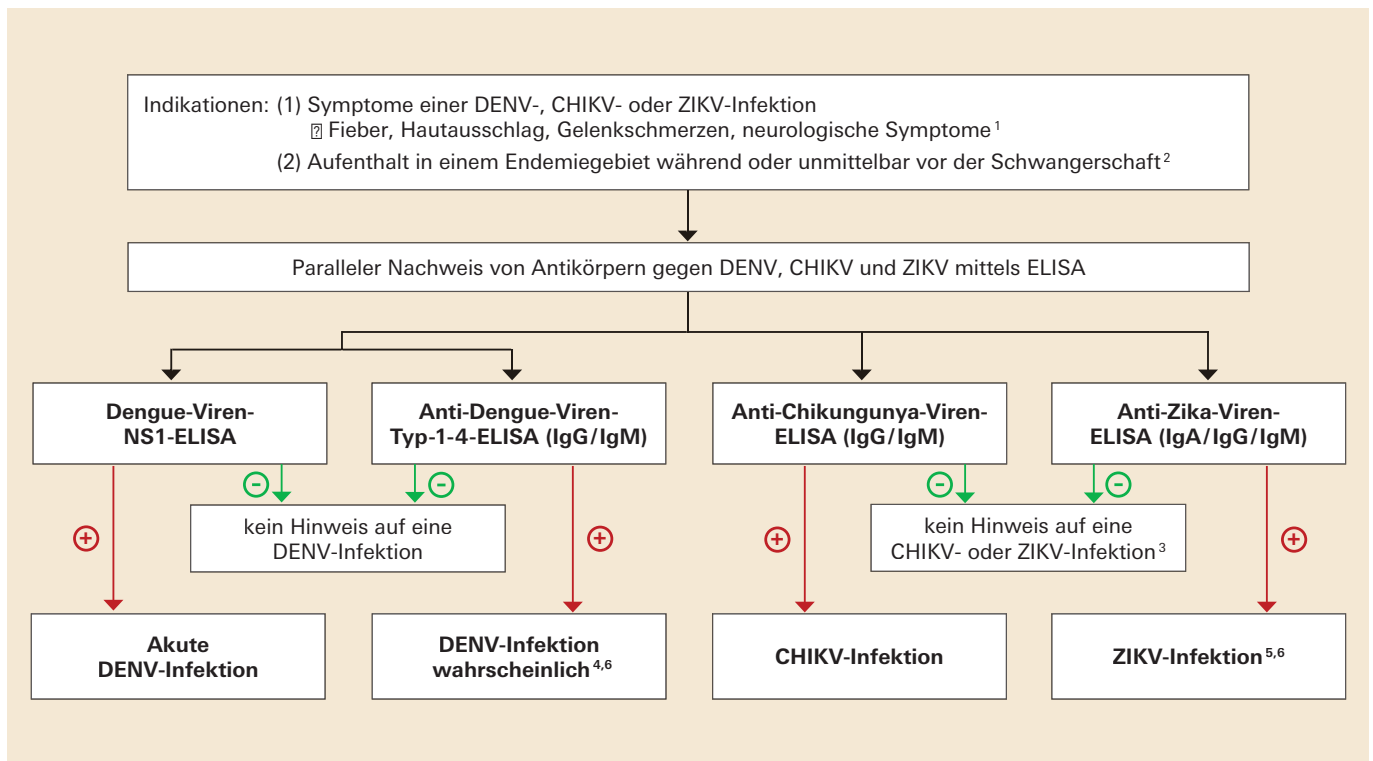
Konzentration Zika-RNA cp/µl Template	EURORealTime Zika-Viren PCR	Real-Time PCR Zika-Test Hersteller A
3	nachgewiesen	nachgewiesen
	nachgewiesen	nachgewiesen
	nachgewiesen	nachgewiesen
1	nicht nachgewiesen	nachgewiesen
	nachgewiesen	nachgewiesen
	nachgewiesen	nicht nachgewiesen
0,5	nachgewiesen	nachgewiesen
	nicht nachgewiesen	nachgewiesen
	nachgewiesen	nicht nachgewiesen

In einer externen Studie in einem brasilianischen Labor wurden 29 klinische Serum- und 26 Urinproben mit der EURORealTime Zika-Viren PCR und einem anderen CE-IVD zertifizierten PCR-Test verglichen. Es wurde eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den mit beiden Tests erzielten positiven und negativen Ergebnissen von 95,2%, bzw. 97,0% ermittelt.

n = 55 (29 Serumproben, 26 Urinproben)		Real-time PCR Zika-Test Hersteller A	
		positiv	negativ
EURORealTime Zika-Viren PCR	positiv	20	1
	negativ	1	33

## Serologische Differenzialdiagnostik mit ELISA-Testsystemen

Bei Verdacht auf eine Infektion mit Dengue-, Chikungunya-, oder Zika-Viren (DENV, CHIKV, ZIKV) empfiehlt EUROIMMUN zur Differenzialdiagnostik das im nachfolgenden Schema gezeigte Vorgehen. Wurde die Blutprobe innerhalb von 7 Tagen nach Symptombeginn entnommen, wird empfohlen, zusätzlich einen RT-PCR-Test aus Serum oder Urin als direkten Erregernachweis durchzuführen.



<sup>1</sup> z. B. Verlust der Beweglichkeit, Taubheitsgefühl in Extremitäten, aufsteigende Paresen, Fazialisparese oder Muskelreflexverlust als Anzeichen eines Guillain-Barré-Syndrom (GBS).

<sup>2</sup> Männer, die sich in Endemiegebieten aufgehalten haben und deren Partnerin schwanger ist, sollten sich ebenfalls untersuchen lassen, da eine Übertragung des Zika-Virus durch Geschlechtsverkehr möglich ist.

<sup>3</sup> Bei klinisch begründeten Verdachtsfällen und in der Schwangerschaftsdiagnostik sollte nach 1–2 Wochen eine Folgeprobe entnommen werden: Ist diese ebenfalls negativ, ist eine akute Infektion sehr unwahrscheinlich.

<sup>4</sup> Kreuzreaktivität mit anderen Flaviviren kann nicht ausgeschlossen werden. Bei Sekundärinfektionen durch andere Flaviviren kann der DENV-IgG-Titer noch oberhalb des Titers des Virus liegen, das die Akut-Infektion verursacht.

<sup>5</sup> Falsch-positive Ergebnisse können bei Seren von Patienten mit akuten Plasmodien-Infektionen auftreten.

<sup>6</sup> Mögliche serologische Konstellationen und ihre Bedeutung bei Infektionen mit Flaviviren (z. B. DENV, ZIKV, FSME-Virus, Gelbfieber-Virus, West-Nil-Virus u.a.):

IgA*	IgM	IgG	Titeranstieg IgG in Folgeprobe nach 1–2 Wochen	Hinweis auf
-/+	+	-/+**	ja	<b>Akute Infektion ohne</b> vorherigen Flavivirus-Kontakt ( <b>Primärinfektion</b> )
-/+	-/+***	+	ja	<b>Akute Infektion</b> nach zurückliegendem Kontakt mit anderem Flavivirus ( <b>Sekundärinfektion</b> )
-	-	+	nein	<b>Abgelaufene Infektion</b> bzw. Viruskontakt in der Vergangenheit

\* IgA-Antikörpernachweis kann die Diagnose einer akuten ZIKV-Infektion unterstützen; \*\* IgG-Antikörper treten in der Regel gemeinsam mit IgA- und/oder IgM-Ak oder kurz danach auf;

\*\*\* Bei zurückliegendem Kontakt mit anderen Flaviviren kann die IgM-Antwort verzögert oder vermindert sein.

## Studiendaten ELISA-Testsysteme

### Sensitivität und Spezifität

#### Anti-Zika-Viren-ELISA (IgG/M)

In einer Studie wurden 129 Proben mit dem Anti-Zika-Viren-ELISA (IgG) und dem Anti-Zika-Viren-ELISA (IgM) untersucht. 29 Proben stammten von Patienten, die nach den Untersuchungen des WHOCC eine Zika-Viren-Infektion aufwiesen. Als Referenzgruppe wurden 100 Serumproben gesunder schwangerer Frauen eingesetzt. Die Sensitivität der Anti-Zika-Viren-ELISA bei Berücksichtigung beider Immunglobulinklassen betrug 97%, die Spezifität jeweils 100%. Bei Betrachtung der einzelnen Immunglobulinklassen betrug die Sensitivität des Anti-Zika-Viren-ELISA (IgG) 73% und die des Anti-Zika-Viren-ELISA (IgM) 89%. In Abhängigkeit des Krankheitsstadiums, in dem sich der Patient befindet, kann unter Umständen nur eine Ig-Klasse vorliegen.

n = 129		WHOCC, Hamburg/ Routinelabor, Deutschland*		
		positiv	grenzwertig	negativ
EUROIMMUN Anti-Zika-Viren- ELISA (IgG und IgM) zusammen	positiv	28	0	0
	grenzwertig	1	0	0
	negativ	0	0	100

\*29 Patientenproben mit Zika-Viren-Infektion: Kooperationszentrum der WHO für Arboviren und Hämorrhagische Fiebertypen (WHOCC), Hamburg, Deutschland; 100 Proben gesunder Schwangerer: Routinelabor, Deutschland

In einer zweiten Studie wurden für die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität zunächst Proben von 38 Patienten genutzt, deren erste Probe per Zika-Viren-RT-PCR als positiv eingestuft wurde (Herkunft Dominikanische Republik; Kolumbien). Die serologische Untersuchung erfolgte mit Proben, deren Abnahme bei >5 Tage nach Symptombeginn lag. Als Referenz wurden 33 Patienten genutzt, bei denen in der ersten Abnahme durch Direktnachweis eine Dengue-Viren-Infektion gesichert werden konnte. Aufgrund der positiven Vorcharakterisierung wurden die Folgeproben zur Bestimmung der Spezifität eingesetzt (Reiserückkehrer, Herkunftsland Deutschland). In gleicher Weise wurden Proben von 33 europäischen Reiserückkehrern mit dem Anti-Zika-Viren-ELISA (IgG) und dem Anti-Zika-Viren-ELISA (IgM) untersucht. Die Sensitivität der Anti-Zika-Viren-ELISA bei Berücksichtigung beider Immunglobulinklassen beträgt 100% bei einer Spezifität von 94%. Bei Betrachtung der einzelnen Immunglobulinklassen beträgt die Sensitivität der Anti-Zika-Viren-ELISA (IgG) 100% in beiden Kollektiven und die des Anti-Zika-Viren-ELISA (IgM) 27% (Kollektiv Kolumbien) bzw. 87% (Kollektiv europäische Reiserückkehrer) bei einer Spezifität von jeweils 97%.

n = 71		Gesicherte Infektion mit Zika-Viren (RT-PCR positiv in der ersten Abnahme)/ Referenzkollektiv (Gesicherte Infektion mit Dengue-Viren)		
		positiv	grenzwertig	negativ
EUROIMMUN Anti-Zika-Viren- ELISA (IgG und IgM) zusammen	positiv	38	0	2
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	0	0	31

n = 66		Gesicherte Infektion mit Zika-Viren (RT-PCR positiv in der ersten Abnahme)/ Referenzkollektiv (Gesicherte Infektion mit Dengue-Viren)		
		positiv	grenzwertig	negativ
EUROIMMUN Anti-Zika-Viren- ELISA (IgG und IgM) zusammen	positiv	33	0	2
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	0	0	31

Zur Bewertung der Spezifität der Anti-Zika-Viren-ELISA wurde eine Studie mit 72 Patientenseren durchgeführt, die seropositiv für Rheumafaktoren und diverse Autoantikörper (ANA) waren. 22 weitere Proben stammten von Patienten mit einer akuten EBV-Infektion. Von den insgesamt 94 Proben wurden mit dem Anti-Zika-Viren-ELISA (IgG) alle Seren negativ getestet, mit dem Anti-Zika-Viren-ELISA (IgM) waren vier Seren positiv.

Mögliche Einflussfaktoren	n	Anti-Zika-Viren- ELISA (IgG) positiv	Anti-Zika-Viren- ELISA (IgM) positiv
Akute EBV-Infektion	22	0%	4,5%
Diverse Autoantikörper	35	0%	5,7%
Rheumafaktoren	37	0%	2,7%

Die hohe Spezifität der EUROIMMUN-ELISA bei gleichzeitig geringer Kreuzreaktivität wurde in einer Studie der Universitätsklinik Freiburg und des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin bestätigt (Huzly et al., 2016). Untersucht wurden Seren europäischer Patienten mit Flaviviren-Infektionen oder -Impfungen sowie Proben von Patienten mit akuten Viruserkrankungen. Die Studie ergab für die Anti-Zika-Viren-ELISA eine Spezifität von 100% (IgG) bzw. 98% (IgM).

Kohorte (Huzly et al.)	Anti-Zika-Viren-ELISA positiv			
	n (IgG)	IgG	n (IgM)	IgM
FSME-Virus-Infektion	21	0%	38	0%
Dengue-Virus-Infektion	10	0%	16	0%
Gelbfieber-Impfung	15	0%	15	0%
Hepatitis-C-Virus-Infektion	16	0%	-	-
Polyklonale IgM	-	-	52	5,8%



## Anti-Zika-Viren-ELISA (IgA)

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität wurden Proben von 38 Patienten aus ZIKV-endemischen Gebieten (Herkunft Dominikanische Republik, Kolumbien) und von 11 Patienten aus ZIKV-nicht-endemischen Gebieten (Reiserückkehrer, Herkunft: Europa) untersucht, deren erste Probe per Zika-Viren-RT-PCR als positiv eingestuft wurde. Für die serologische Untersuchung wurden Proben verwendet, die >5 Tage nach Symptombeginn entnommen wurden. Die Referenzseren stammten von 33 Patienten, bei denen in der ersten Abnahme eine Dengue-Viren-Infektion mittels Direktnachweis gesichert werden konnte. Die Folgeproben wurden aufgrund der positiven Vorcharakterisierung für die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität herangezogen (Reiserückkehrer, Herkunftsland Deutschland). Die Sensitivität beträgt 92%, bei einer Spezifität von 97%.

n = 82		Gesicherte Infektion mit Zika-Viren (RT-PCR positiv in der ersten Abnahme)/ Referenzkollektiv (Gesicherte Infektion mit Dengue-Viren)		
		positiv	grenzwertig	negativ
EUROIMMUN Anti-Zika-Viren- ELISA (IgA)	positiv	45	0	1
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	4	0	32

In einer weiteren Studie zur Bewertung der Spezifität des Anti-Zika-Viren-ELISA (IgA) wurden 71 Seren von Patienten eingesetzt, die seropositiv für Rheumafaktoren und diverse Autoantikörper (ANA) waren. Zudem wurden 22 Proben von Patienten mit einer akuten EBV-Infektion verwendet. Alle 93 Seren zeigten mit dem Anti-Zika-Viren-ELISA (IgA) ein negatives Ergebnis.

Mögliche Einflussfaktoren	n	Anti-Zika-Viren-ELISA (IgA) positiv
Akute EBV-Infektion	22	0%
Diverse Autoantikörper	35	0%
Rheumafaktoren	36	0%

## Kreuzreaktivität

Durch die Verwendung eines hoch-spezifischen rekombinanten Proteins als Antigen werden Kreuzreaktionen bei den EUROIMMUN-ELISA fast vollständig vermieden. Die Untersuchung von Serenkollektiven klinisch und serologisch charakterisierter Patienten mit hohen Antikörpertitern der Klasse IgA, IgG und IgM gegen andere Flaviviren ergab eine sehr geringe Kreuzreaktivität. Die eingesetzten Dengue-Proben stammen von Patienten, bei denen eine Infektion durch eine positive PCR und/oder einen positiven NS1-Nachweis als gesichert gilt.

**Hinweis:** Besonders in Endemiegebieten sind Doppelinfektionen bzw. Infektionen mit einem anderen Flavivirus zu einem früheren Zeitpunkt möglich. Positive Befunde resultieren dann nicht aus einer Kreuzreaktivität der jeweiligen Antikörper.

Antikörper gegen (zusammen >450 Proben)	Anti-Zika-Viren-ELISA positiv					
	n	IgA	n	IgG	n	IgM
<b>Dengue-Viren</b>						
Mit direkten Nachweismethoden charakterisiert (RT-PCR und/oder NS1-Antigen positiv)	86	0,0%	104	0,0%	103	0,0%
Klinisch und serologisch charakterisiert	10	10% (1 Probe)	42	2,4% (1 Probe)	42	0,0%
<b>FSME-Viren</b>						
Nach Impfung	15	0,0%	135	0,0%	134	0,0%
Klinisch und serologisch charakterisiert	54	0,0%	18	0,0%	18	0,0%
<b>Gelbfieber-Viren</b>						
Nach Impfung (Neutralisationstest positiv)	12	0,0%	12	0,0%	12	0,0%
<b>Japanische-Enzephalitis-Viren</b>						
Klinisch und serologisch charakterisiert	13	0,0%	25	4,0%	25	0,0%
<b>West-Nil-Viren</b>						
Mit direkten Nachweismethoden charakterisiert (RT-PCR positiv)	40	2,5% (1 Probe)	40	0,0%	40	0,0%
Klinisch und serologisch charakterisiert (Neutralisationstest positiv)	16	0,0%	34	0,0%	34	2,9% (1 Probe)

## Primäre und sekundäre Immunantwort bei Zika-Virus-Infektionen

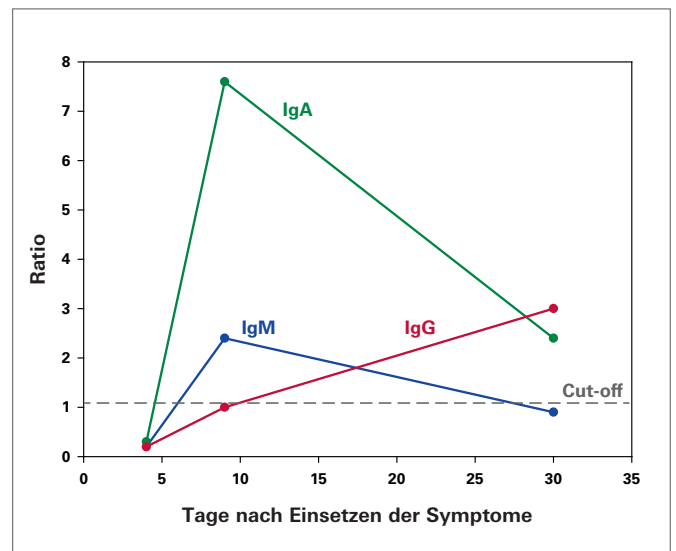
Beim ersten Kontakt mit einem Virus werden IgA- und/oder IgM-Antikörper bereits innerhalb von etwa 3–5 Tagen nach der Infektion gebildet und bleiben für einige Wochen im Blut nachweisbar. Zeitlich verzögert – ca. ab Tag 8 – werden dann zunehmend IgG-Antikörper in das Blut sezerniert (primäre Immunantwort; Fallbeispiele 1 und 2).

### Fallbeispiel 1

**Patient: Reiserückkehrer aus Brasilien (PCR-positiv)**

- In der ersten Serumprobe an Tag 4 nach Symptombeginn sind noch keine Antikörper im Blut nachweisbar. In dieser frühen Phase ist die PCR-Diagnostik unverzichtbar.
- In der Folgeprobe (Tag 9) sind Antikörper der Klasse IgM und IgA vorhanden. Im weiteren Verlauf sind auch IgG-Antikörper nachweisbar.

Tage nach Einsetzen der Symptome	EUROIMMUN Anti-Zika-Viren-ELISA		
	IgA (Ratio)	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
4	0,3	0,2	0,2
9	7,9	2,4	1,0
30	2,4	0,9	3,0

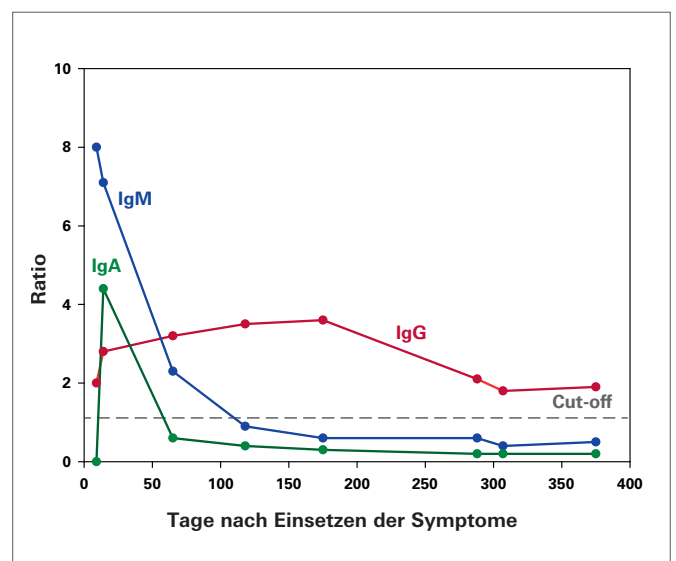


### Fallbeispiel 2

**Patient: Reiserückkehrer aus Kolumbien**

- IgG-Spiegel nach Einsetzen der Symptome positiv. Langsamer Titeranstieg über einen längeren Zeitraum. Nach ca. 175 Tagen fällt der Titer langsam ab, bleibt aber dauerhaft über dem Cut-off.
- IgM-Spiegel anfangs positiv, im weiteren Verlauf abfallend, nach ca. 120 Tagen dann negativ.
- Bei der ersten Serumprobe nach Symptombeginn noch keine IgA-Antikörper nachweisbar. Nach schnellem Anstieg des IgA-Titers zwischen der ersten und der zweiten Serumprobe (Tag 9 und 14) fällt dieser wieder ab.

Tage nach Einsetzen der Symptome	EUROIMMUN Anti-Zika-Viren-ELISA		
	IgA (Ratio)	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
9	0,0	8,0	2,0
14	4,4	7,1	2,8
65	0,6	2,3	3,2
118	0,4	0,9	3,5
175	0,3	0,6	3,6
288	0,2	0,6	2,1
307	0,2	0,4	1,8
375	0,2	0,5	1,9



Semiquantitative Testauswertung über Ratio: Negativ: Ratio < 0,8

Grenzwertig: Ratio ≥ 0,8 < 1,1

Positiv: Ratio ≥ 1,1



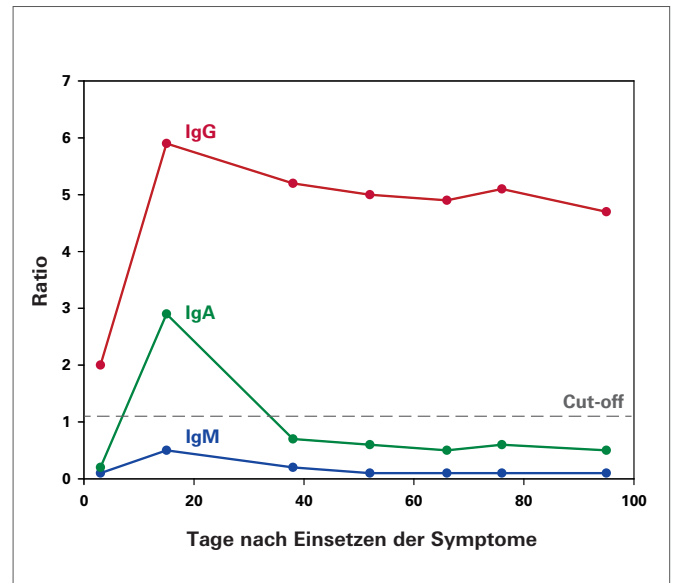
Kommt es zu einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Virus, steigt der IgG-Titer innerhalb der ersten Infektionstage stark an. Spezifische IgM-Antikörper werden hingegen nur in geringen, zum Teil nicht nachweisbaren Mengen, gebildet (sekundäre Immunantwort; Fallbeispiele 3 und 4). Antikörper der Klasse IgA werden im Zuge der Immunantwort häufig parallel zu IgM-Antikörpern gebildet. Die Bestimmung der Anti-Zika-IgA-Antikörper kann in diesen Fällen die Diagnosestellung einer akuten Zika-Virus-Infektion unterstützen und einen wertvollen Beitrag zur Abklärung nicht eindeutiger Befunde leisten.

### Fallbeispiel 3

**Patient: 18 Jahre, männlich, Kolumbien**

- IgG-Spiegel bereits am 3. Tag nach Einsetzen der Symptome positiv (Literatur: ab Tag 5–6).
- IgM-Spiegel über den gesamten Zeitraum negativ.
- IgA-Titer von Tag 8–35 nach Symptombeginn positiv.

Tage nach Einsetzen der Symptome	EUROIMMUN Anti-Zika-Viren-ELISA		
	IgA (Ratio)	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
3	0,2	0,1	2,0
15	2,9	0,5	5,9
38	0,7	0,2	5,2
52	0,6	0,1	5,0
66	0,5	0,1	4,9
76	0,6	0,1	5,1
95	0,5	0,1	4,7

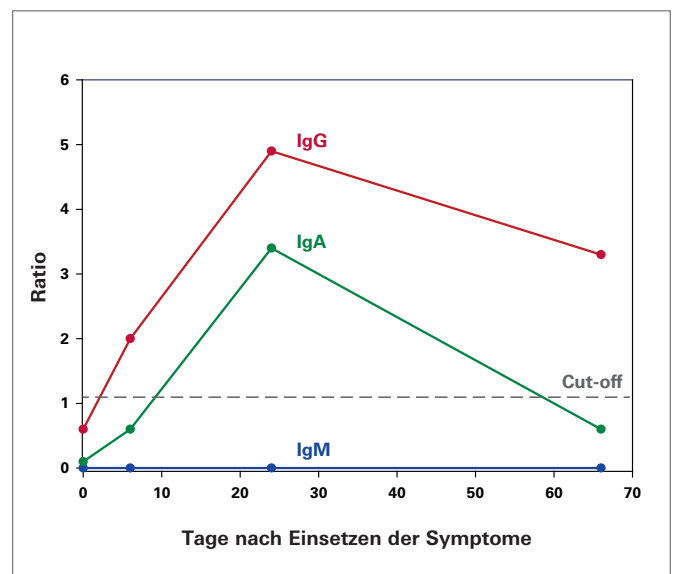


### Fallbeispiel 4

**Patient: 51 Jahre, weiblich, Kolumbien**

- IgG-Spiegel kurz nach Einsetzen der Symptome positiv (Tag 6). Nach weiterem Anstieg fällt der Titer ab, bleibt aber über dem Cut-off.
- IgM-Antikörper sind zu keiner Zeit nachweisbar.
- IgA-Titer erst bei der 3. Probennahme 3 Wochen nach Symptombeginn positiv, danach abfallend und ca. ab Tag 60 negativ.

Tage nach Einsetzen der Symptome	EUROIMMUN Anti-Zika-Viren-ELISA		
	IgA (Ratio)	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
0	0,1	0,02	0,6
6	0,6	0,01	2,0
24	3,4	0,03	4,9
66	0,6	0,02	3,3



Semiquantitative Testauswertung über Ratio:    Negativ: Ratio < 0,8    Grenzwertig: Ratio ≥ 0,8 < 1,1    Positiv: Ratio ≥ 1,1

## Indirekte Immunfluoreszenz

Neben ELISA-Testsystemen bietet EUROIMMUN zum Nachweis von Zika-Virus-Infektionen auch Tests an, die auf der Methode der indirekten Immunfluoreszenz (IIFT) basieren. Drei Produkte stehen dabei zur Verfügung:

- **Anti-Zika-Viren-IIFT:** Zum Screening auf Zika-Virus-Antikörper
- **Arboviren-Fieber-Mosaik 2:** Zur differenzialdiagnostischen Abgrenzung von Zika-, Dengue- und Chikungunya-Virus-Infektionen, die ähnliche Symptome verursachen.
- **Arboviren-Profil 3:** Ideal zur Untersuchung von Kreuzreaktivitäten innerhalb der Flaviviren

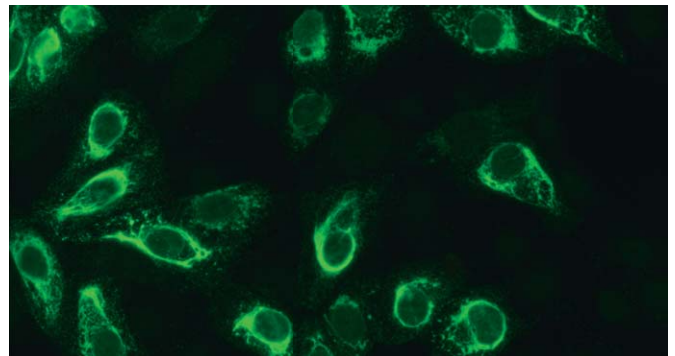
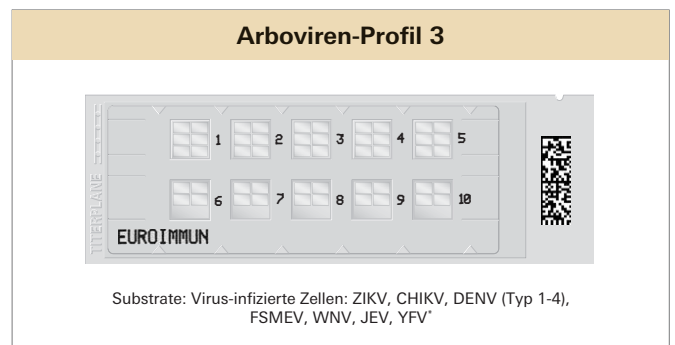
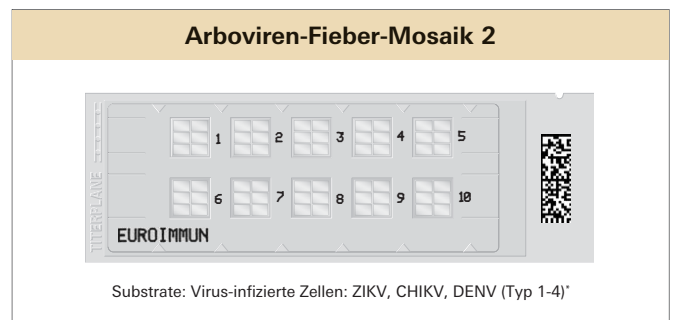
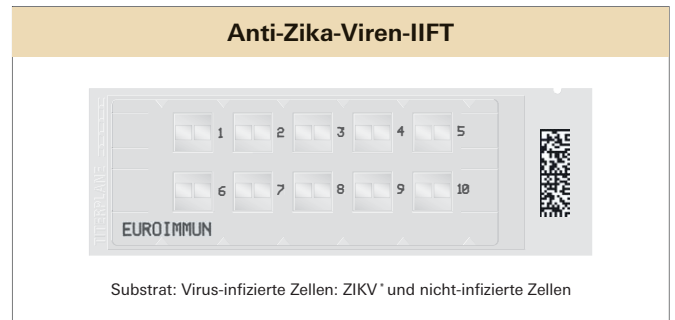
Als Testsubstrat dienen Zellen, die mit verschiedenen Arboviren infiziert sind. Bei einer positiven Reaktion fluoreszieren vor allem im Bereich des Cytoplasmas fein- bis grobgranuläre Strukturen. Speziell bei ZIKV-infizierten Zellen tritt auch ein netzartiges Fluoreszenzmuster mit einer dichten perinukleären Reaktivität auf (vgl. Abbildung unten).

Mit den Flaviviren-Mosaiken/-Profilen können mehrere spezifische Antikörper simultan nachgewiesen werden. Sie können zur Abklärung von Kreuzreaktivitäten zwischen den verschiedenen Flaviviren beitragen und ermöglichen eine zuverlässige Differenzialdiagnostik im Falle ähnlicher Krankheitsbilder.

\* ZIKV: Zika-Virus, DENV: Dengue-Virus, CHIKV: Chikungunya-Virus, FSMEV: Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, WNV: West-Nil-Virus, JEV: Japanische-Enzephalitis-Virus, YFV: Gelbfieber-Virus

## Kreuzreaktivität

Da im Gegensatz zum ELISA bei den IIFT-Produkten komplette Viruspartikel als Antigen dienen, sind bei Antikörpern gegen Viren der Gattung Flavivirus Kreuzreaktivitäten zu erwarten. Bei primären Flavivirus-Infektionen kann in der Regel anhand einer Verdünnungsreihe der Patientenproben der dominante Antikörpertiter der die Infektion hervorrufenden Virus ermittelt werden. Bei sekundären Flavivirus-Infektionen ist von einer hohen Kreuzreaktivität der IgG-Antikörper auszugehen, und die Endpunkttiter sind auf allen Flavivirus-Substraten gleich oder ähnlich. Mittels Nachweis der IgM-Antikörper kann in einigen Fällen dennoch eine Differenzierung erfolgen.



Fluoreszenzbild einer positiven Reaktion: IgG-Antikörper gegen Zika-Viren.

## Automatisierung

### ELISA

Die Anti-Zika-Viren-ELISA sind geeignet für die Abarbeitung mit vollautomatischen Analysegeräten. Die Tests sind validiert für die Geräte Analyzer I und Analyzer I-2P von EUROIMMUN sowie das Gerät DSX der Firma Dynex. Eine Automatisierung auf weiteren offenen vollautomatischen Analysegeräten ist möglich, die Kombination muss jedoch vom Anwender validiert sein.

**EUROIMMUN Analyzer I-2P**



### IIFT

Die IIFT-Tests zum Nachweis einer Zika-Virus-Infektion können mit dem EUROIMMUN Sprinter und Sprinter XL automatisiert abgearbeitet werden. Sämtliche Schritte von der Probenverdünnung und -verteilung bis zum Inkubieren und Waschen der Objektträger werden vollautomatisch durchgeführt. Die Auswertung der inkubierten Objektträger am Mikroskop kann auch mit Hilfe des computergestützten Immunfluoreszenzmikroskops EUROPattern durchgeführt werden.

**EUROIMMUN Sprinter XL**



## Publikationen

- Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, Schinkel J, Grobusch MP, Goorhuis A, Warnecke JM, Lattwein E, Komorowski L, Deeb A, Saschenbrecker S, Stöcker W, Schlumberger W. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(50):pii=30426.
- Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro Surveill.* 2016;21(16):pii=30203.
- Granger D, Gomez LJ, Schimek M, Dubbels M, Mosquera JA, Christensen J, Bistodau S, Strain A, Theel ES. Zika virus Antibody Detection: Evaluation of Three Different Serologic Methodologies. Poster CVS 2016 (USA).
- Borena W, Hofer T, Stiasny K, Aberle SW, Gaber M, von Laer D, Schennach H. No molecular or serological evidence of Zikavirus infection among healthy blood donors living in or travelling to regions where *Aedes albopictus* circulates. *PLoS ONE* 2017 12(5): e0178175.
- Frank C, Cadar D, Schlaphof A, Nedderson N, Günther S, Schmidt-Chansit J, Tappe D. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(23):pii=30252
- Zanluca C, Dos Santos CN. Zika virus – an overview. *Microbes Infect.* 2016 May;18(5):295-301.
- Johansson MA, Mier-Y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the Risk of Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016 May 25
- Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jul;29(3):487-524.
- Zhang FC, Li XF, Deng YO, Tong YG, Qin CF. Excretion of infectious Zika virus in urine. *Lancet Infect Dis.* 2016 May 2.
- Driggers RW, Ho CY, Korhonen, et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *N Engl J Med* (2016) March.
- Fourcade C, Mansuya JM, Dutertre MD, Delobel B. Viral load kinetics of Zika virus in plasma, urine and saliva in a couple returning from Martinique, French West Indies. *Journal of Clinical Virology*, Jun 2016.
- Calleri G, Burdino E, Bonora S, Raso R. Zika virus infection in two travelers returning from an epidemic area to Italy, 2016: Algorithm for diagnosis and recommendations, *Travel Medicine and Infectious Disease* (2016).



## Produktübersicht

Testsysteme	Bestellnummer
Anti-Zika-Viren-ELISA (IgA)	EI 2668-9601 A
Anti-Zika-Viren-ELISA (IgM)	EI 2668-9601 M
Anti-Zika-Viren-ELISA (IgG)	EI 2668-9601 G
Anti-Zika-Viren-ELISA (IgAM)	EI 2668-9601 Q
Anti-Zika-Viren-IIFT (IgG oder IgM)	FI 2668-#### G/M
Anti-Zika-Viren-IIFT EUROPattern (IgG oder IgM)	FR 2668-#### G/M
Arboviren-Fieber-Mosaik 2 (IgG oder IgM)	FI 2668-####-1 G/M
Arboviren-Fieber-Mosaik 2 EUROPattern (IgG oder IgM)	FR 2668-####-1 G/M
Arboviren-Profil 3 (IgG oder IgM)	FI 2668-####-3 G/M
EURORealTime Zika-Viren PCR	MP 2668-####