



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

NovaLisa®

Chikungunya Virus

IgM μ -capture ELISA

CE

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Chikungunya virus in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Chikungunyavirus in Humanserum oder Plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination qualitative des anticorps IgM dirigés contre le Virus Chikungunya dans le sérum ou le plasma humain

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgM per Chikungunya virus nel siero o plasma umano

Enzimoimmunoensayo para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra –Chikungunya virus en suero humano o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 7
Deutsch:	Seite	8 bis 13
Francais:	Page	14 à 19
Italiano:	da Pagina	20 a 25
Espanol:	Página	a

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía	Page / Seite / Page / Pagina / Página	26
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	27
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ Pagina / Página	28

1. INTRODUCTION

Chikungunya virus is an arthropod borne virus of the genus Alphavirus (family Togaviridae). The Alphavirus genus contains at least 24 distinct species. These are lipid-enveloped virions with a diameter of 50 to 60 nm.

Alphavirus infections are initiated by the bite of an infected mosquito, which results in the deposition of virus in subcutaneous and possibly cutaneous tissues. After an incubation period of 1 to 12 days the Chikungunya fever develops.

Chikungunya fever (Chikungunya means “that which bends up”, in reference to the crippling manifestations of the disease) is an acute viral infection characterized by a rapid transition from a state of good health to illness that includes severe arthralgia and fever.

Temperature rises abruptly to as high as 40°C and is often accompanied by shaking chills. After a few days, fever may abate and recedes, giving rise to a “saddleback” fever curve. Arthralgia is polyarticular, favoring the small joints and sites of previous injuries, and is most intense on arising. Patients typically avoid movement as much as possible. Joints may swell without significant fluid accumulations. These symptoms may last from 1 week to several months and are accompanied by myalgia. The rash characteristically appears on the first day of illness, but onset may be delayed. It usually arises as a flush over the face and neck, which evolves to a maculopapular or macular form that may be pruritic. The latter lesions appear on the trunk, limbs, face, palms and soles, in that order of frequency. Petechial skin lesions have also been noted. Headache, photophobia, retro-orbital pain, sore throat with objective signs of pharyngitis, nausea and vomiting also occur in this setting. Occasionally, however persistent arthralgia and polyarthritis (lasting months or even years) do occur, sometimes involving joint destruction. Even rarer, sequelae include encephalitis and meningoencephalitis with high lethality rates.

The virus has major importance in Africa and Asia. From 20% to more than 90% of the population of tropical and subtropical show serologic evidence of infection. Because Aedes mosquitoes are increasingly prevalent in North Africa and South America, where the population would be uniformly susceptible to infection, the possibility for epidemics is evident. Chikungunya virus infections are imported to central Europe mainly by travellers to tropical and subtropical countries.

Species	Diseases	Symptoms	Mechanism of infection
Chikungunya virus (Alphavirus)	Chikungunya fever	Fever Exanthema Joint pain Persistent arthralgia and polyarthritis, sometimes involving joint destruction. Even rarer encephalitis and meningoencephalitis	Transmission by bloodsucking mosquitoes Aedes albopictus (Africa) Aedes aegypti (Africa, Asia)

The presence of virus resp. infection may be identified by

- Serology: Detection of antibodies by IF, ELISA

2. INTENDED USE

The Chikungunya IgM μ -capture ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies to Chikungunya virus in human serum and plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies to Chikungunya is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with anti human IgM to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample and control material Chikungunya antigen solution is added. After a further washing step a mixture of biotinylated Chikungunya antibody and Streptavidin conjugate is added. After washing the captured Chikungunya-specific immunocomplex is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Chikungunya-specific IgM antibodies in the patient specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Chikungunya Microplate (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti human IgM, in resealable aluminium foil.
- **Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of ready to use buffer for sample dilution; pH 7.2 \pm 0.2; coloured yellow; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml. Ready to use sulphuric acid, 0.2 mol/l; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle each containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 \pm 0.2) for washing the wells; white cap.

- **Chikungunya antigen, lyophilized:** 6 bottles containing lyophilized Chikungunya antigen solution; red cap
- **Chikungunya antibody Solution ****:** 1 bottle containing 6 ml of biotinylated Chikungunya antibody, ready to use; coloured blue; white cap
- **Streptavidin conjugate**:** 1 bottle containing 6 ml Streptavidin conjugated with peroxidase, ready to use; coloured red, black cap
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Chikungunya IgM Positive Control****:** 1 bottle containing 1.5 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Chikungunya IgM Cut-off Control****:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Chikungunya IgM Negative Control****:** 1 bottle containing 1.5 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

- * contains 0.1 % Bronidox L after dilution
- ** contains 0.2 % Bronidox L
- *** contains 0.1 % Kathon
- **** contains 0.02 % Kathon and 0.02% Bronidox L

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foils
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!

6.1. Microplate

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with anti human IgM. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Chikungunya Antigen

The bottles contain lyophilized Chikungunya antigen solution. The content of each vial has to be resolved in 1 ml diluted washing solution by turning it slowly (no vortex) and 15 min incubation at room temperature. The reconstituted solution is at 2...8°C stable for 1 day.

6.3. Chikungunya Antibody Solution

The bottle contains 6 ml biotinylated Chikungunya antibody, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. They have to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *After first opening the concentrate is stable until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.6. Sample Diluent

The bottle contains 100 ml sample dilution buffer, detergents and preservatives. It is used for the dilution of the patient specimen. *After first opening the buffer solution is stable until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Streptavidin Conjugate

1 bottle contains 6 ml Streptavidin conjugated with peroxidase, detergents and preservatives, coloured red. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C. *After first opening the conjugate is stable until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.8. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

6.9. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

After first opening stability until expiry date.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

It is left to the user to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 50µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 50µl reconstituted Chikungunya antigen into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 50 µl Chikungunya Antibody Solution into all wells except for the blank well (e.g.A1). Cover with foil.
9. **Incubate for 30 min at room temperature.**
10. Repeat step 4.
11. Dispense 50 µl Streptavidin peroxidase conjugate into all wells except for the blank (e.g. A1). Cover with foil.

12. **Incubate for 30 min at room temperature.**
13. Repeat step 4.
14. Dispense 100 µl TMB solution into all wells
15. **Incubate for exact 15 min. in the dark.**
16. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB substrate.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with negative matrix for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

17. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Assay Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 - 1.300**
- **Positive control** in E1: Absorbance value > cut-off

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative → **grey zone**.

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in NovaTec Units

Patient (mean) absorbance value x 10 = [NovaTec-Units = NTU]
Cut-off

Example: $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32$ NTU (NovaTec Units)

Cut-off:	10	NTU
Grey zone:	9-11	NTU
Negative:	<9	NTU
Positive:	>11	NTU

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean value (OD)	CV (%)
Low positive serum	3 (69)	0.61	7.3
Positive serum	3 (72)	1.36	2.9

Intraassay	n	Mean value (OD)	CV (%)
Low positive serum	23	0.62	4.8
Positive serum	24	1,36	3.4

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. Negative samples have been tested. The diagnostic specificity is > 90%.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. Positive samples have been tested. The diagnostic sensitivity is >90%.

10.4. Interferences

No interferences were observed when adding triglycerides, bilirubin and haemoglobin in an excess to the sample.

10.5. Cross reactivity

No cross reactivity were observed by using Rf-samples and samples containing antibodies against Bordetella pertussis, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Dengue Virus, TBE, Helicobacter pylori, HSV 2, Leishmania, Mycoplasma and Schistosoma.

Cross reactivity with antibodies against Borrelia, CMV and Toxoplasma cannot be excluded.

Interference with polyclonal stimulation of EBV infections is likely. In the presence of infectious Mononucleosis (Pfeiffer's Disease, EBV infection) polyclonal stimulation of B lymphocytes can occur. This may result in non-specific reactions in the detection of antibodies of the IgM class. Therefore it is recommended to exclude an EBV infection by differential diagnosis.

Cross reactivity with antibodies against O'Nyong Nyong Virus cannot be excluded.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.
--

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunosuppressed patients and newborns serological data only have restricted value.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious. Wear gloves while performing the test
- **The Chikungunya antigens are inactivated. All materials should still be regarded and handled as potentially infectious. Wear gloves while performing the test. We recommend using the antigen under BSL2 cabinet (clean bench).**
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.

- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa® ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Product Number: CHIM0590

Chikungunya Virus IgM μ -capture ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Das Chikungunya („der gekrümmt Gehende“)-Virus ist ein behülltes Einzel-Strang-RNA-Virus und gehört zur Gattung Alphavirus aus der Familie der Togaviridae. Es hat einen Durchmesser von etwa 60 nm und gehört damit zu den kleineren Viren.

Entsprechend der unterschiedlichen geographischen Verbreitung des Virus wird es heute in fünf verschiedene Varianten eingeteilt: eine westafrikanische, eine zentralafrikanische, eine ost- und südafrikanische, eine des Indischen Ozeans sowie eine asiatische.

Chikungunya-Viren werden durch verschiedene blutsaugende Vektoren auf zahlreiche Vertebraten übertragen. Sie werden üblicherweise nicht direkt von Mensch zu Mensch weiter gegeben, jedoch wurde die Übertragung von erkrankten schwangeren Frauen auf ihre ungeborenen Kinder nachgewiesen.

Beim Menschen verursacht das Virus das Chikungunya-Fieber. Nach 1-6 Tagen Inkubationszeit beginnt die Erkrankung mit abrupt einsetzenden Gelenkschmerzen, häufig Fieber (bis 39°C) mit biphasischem Verlauf, Myalgien und Übelkeit, so dass sich die Betroffenen kaum noch aufrecht halten können. Die Gelenksbeschwerden treten dabei meist in beiden Körperhälften auf. Das Fieber dauert in der Regel nur wenige Tage an. Im weiteren Verlauf entwickeln sich häufig andere Symptome: Lymphknotenschwellung, makulopapulöses Exanthem, punktförmige Hautblutungen (Petechien), leichtere Formen von Schleimhautblutungen, Augenentzündungen, Kopfschmerzen und Erschöpfung. Normalerweise klingt die Erkrankung nach etwa zwei Wochen von selbst wieder ab, Gelenksbeschwerden können jedoch für Monate persistieren. In ganz seltenen Fällen kann es zu Hämorrhagien kommen. Bleibende Schäden und Todesfälle sind selten. Alphavirusinfektionen sind in Europa selten, müssen aber als Import- oder Reiseinfektion beachtet werden.

Spezies	Erkrankung	Symptome	Übertragungsweg
Chikungunya Virus	Chikungunya-Fieber	Fieber (bis 39°C) Makulopapulöses Exanthem Arthritis	Die Infektion erfolgt durch den Stich verschiedener Stechmücken (Aedes aegypti, Aedes albopictus).

Infektionen können folgendermaßen nachgewiesen werden:

RT-PCR als Nukleinsäurenachweis

Mikroskopie: Viele der Alphaviren können in der Akutphase der Infektion in Gewebekulturen angezüchtet werden.

Serologie: Nachweis von Antikörpern mittels der ELISA-Technik

2. VERWENDUNGSZWECK

Der Chikungunya Virus IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Chikungunya Viren in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen das Chikungunya Virus beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit anti-human IgM. Vorhandene Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antikörper der Mikrotiterplatte. Durch den folgenden Waschschrift werden nicht gebundene Antikörper entfernt. Anschließend werden Chikungunya Virus Antigene auf die Platte gegeben. Es folgen ein Waschschrift und die Zugabe von biotinylierten Chikungunya Antikörpern und Streptavidin konjugiert mit Peroxidase. Nach einem weiteren Waschschrift werden die entstandenen Immunkomplexe durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Chikungunya Mikrotiterplatte (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit anti-human IgM; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.

- **Chikungunya Antigen, lyophilisiert:** 6 Flaschen mit lyophilisierter Chikungunya Virus Antigen Lösung, rote Verschlusskappe
- **Chikungunya Antikörperlösung ****:** 1 Flasche mit 6 ml biotinylierter Chikungunya Virus Antikörper Lösung, gebrauchsfertig, blau gefärbt, weiße Verschlusskappe
- **Streptavidin-Konjugat**:** 1 Flasche mit 6 ml Streptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP); rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Chikungunya IgM Positivkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 1,5 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Chikungunya IgM Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Chikungunya IgM Negativkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 1,5 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

**** enthält 0,02 % Kathon und 0,02% Bronidox L

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen 10 - 1000 µl
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!

6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit anti-human IgM beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8° C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. Chikungunya Antigen

Die Flaschen enthalten eine lyophilisierte Chikungunya Virus Antigen Lösung. Der Inhalt jeder Flasche muss mit 1 ml verdünnter Waschlösung unter schwenken gelöst werden. Anschließend muss die Lösung 15 min bei Raumtemperatur inkubieren. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C 1 Tag haltbar.

6.3. Chikungunya Antikörperlösung

Die Flasche enthält 6 ml biotinylierte Chikungunya Virus Antikörper, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. Kontrollen

Die Fläschchen mit Positiv-, Negativ- und Cut off Kontrolle enthalten Kontrolllösungen. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.7. Streptavidin-Konjugat

Die Flasche enthält 6 ml Streptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase, Detergenz, rot gefärbt. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.8. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.9. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!* Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefung	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen.

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 50 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.

2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 50 µl rekonstituiertes Chikungunya Antigen in alle Vertiefungen mit Ausnahme des Leerwertes pipettieren. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
6. **30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.**
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 50 µl Chikungunya Antikörperlösung in alle Vertiefungen mit Ausnahme des Leerwertes pipettieren. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
9. **30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.**
10. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
11. 50µl Streptavidin Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
12. **30 min bei Raumtemperatur inkubieren.** *Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.*
13. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
14. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
15. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
16. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit negativer Matrix 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.
17. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

*Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.*

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktionswerte **< 0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktionswerte **< cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte **> Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: 0.37 OD Cut-off Kontrolle + 0.39 OD Cut-off Kontrolle = 0.76 : 2 = 0.38

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**.

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>Vk (%)</u>
Niedrig positives Serum	3 (69)	0,61	7,3
Hoch positives Serum	3 (72)	1,36	2,9

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>Vk (%)</u>
Niedrig positives Serum	23	0,62	4,8
Hoch positives Serum	24	1,36	3,4

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >90%.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >90%.

10.4. Interferenzen

Die Zugabe von Hämoglobin, Bilirubin und Triglyzeriden im Überschuss führte zu keinerlei Interferenzen.

10.5. Kreuzreaktivität

RF-Proben und Proben mit Antikörpern gegen Bordetella pertussis, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Dengue Virus, FSME, Helicobacter pylori, HSV 2, Leishmania, Mycoplasma und Schistosoma zeigen keine Kreuzreaktivität in diesem Test.

Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern gegen Borrelia, CMV und Toxoplasma können nicht ausgeschlossen werden.

Interferenzen durch EBV induzierte polyklonale Stimulierung sind wahrscheinlich. Während einer infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber, EBV Infektion) kann es zu einer polyklonalen Stimulierung von B Lymphozyten kommen. Hierdurch könnte es zu unspezifischen Reaktionen beim Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse kommen. Es wird daher empfohlen eine EBV Infektion durch Differenzialdiagnose auszuschließen.

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen O'Nyong Nyong Virus können nicht ausgeschlossen werden.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- **Die Chikungunya Antigene sind inaktiviert. Dennoch sollte das Material als potentiell infektiös angesehen und behandelt werden. Der Test sollte mit Handschuhen durchgeführt werden. Es wird empfohlen das Antigen unter einer BSL2 Bank (clean bench) zu pipettieren.**
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG:	Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.
-----------------	--

WARNUNG:	Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
-----------------	--

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: CHIM0590

Chikungunya Virus IgM μ -capture ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUCTION

Le virus Chikungunya est un Arbovirus du genre Alphavirus (Famille des Togaviridae. Les Alphavirus comprennent au moins 24 espèces distinctes. Ce sont des virions à enveloppe lipidique d'un diamètre de 50 à 60 nm.

Les infections par Alphavirus sont provoquées par la piqûre d'un moustique infecté, qui transmet le virus dans les tissus sous-cutanés et parfois cutanés. Après une période d'incubation de 1 à 12 jours, la fièvre Chikungunya se développe.

La fièvre Chikungunya (Chikungunya signifie "homme courbé", en référence aux manifestations invalidantes de la maladie) est une infection virale aiguë caractérisée par une transition rapide d'un état de bonne de santé à la maladie qui se manifeste par une arthralgie sévère et de la fièvre.

La température augmente brusquement jusqu'à 40°C et est souvent accompagnée de frissons et de tremblements. Au bout de quelques jours, la fièvre peut diminuer et reprendre, ce qui donne lieu à une courbe de température à deux pentes. L'arthralgie est poly-articulaire, touchant plus fréquemment les petites articulations et les zones ayant été blessées, elle est plus intense au lever. Les patients évitent le plus possible de bouger. Les articulations peuvent gonfler sans accumulation significative de liquide. Ces symptômes peuvent durer d'une semaine à plusieurs mois et sont accompagnés de myalgie. Le prurit apparaît de façon caractéristique le premier jour de la maladie mais peut survenir plus tardivement. Il apparaît généralement sous la forme d'une éruption sur le visage et le cou, qui évolue pour prendre une forme maculopapulaire ou maculaire pouvant provoquer des démangeaisons. Les lésions similaires apparaissent sur le tronc, les membres, le visage, les paumes des mains et les plantes de pied, dans cet ordre de fréquence. Des pétéchies de la peau ont également été décelées. Maux de tête, photophobie, douleur rétro-orbitale, gorge sèche avec signes objectifs de pharyngite, nausées et vomissements surviennent également. Parfois, une arthralgie et une polyarthrite plus ou moins résistantes (pouvant durer des mois ou des années) surviennent, elles provoquent parfois la destruction des articulations. Des séquelles plus rares peuvent survenir comme l'encéphalite et la méningoencéphalite avec le taux de mortalité est élevé.

Le virus est davantage présent en Afrique et en Asie. De 20 % à plus de 90% de la population des zones tropicales et subtropicales montrent des preuves sérologiques d'infection. Les moustiques Aedes étant de plus en plus présents en Afrique du Nord et en Amérique du Sud, où la population pourrait être susceptible de contracter l'infection, la possibilité d'épidémie est évidente. Les infections au virus Chikungunya ont été importées en Europe centrale principalement par des voyageurs s'étant rendus dans les pays tropicaux et subtropicaux.

Espèce	Maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
Virus Chikungunya (Alphavirus)	Fièvre Chikungunya	Fièvre Exanthème Douleur des articulations Arthralgie et polyarthrite persistantes, avec parfois la destruction des articulations Encéphalites et méningoencéphalites plus rares	Transmission par piqûre de moustique Aedes albopictus (Afrique) Aedes aegypti (Afrique, Asie)

La présence d'une infection peut être identifiée par

- Sérologie : Détection de la production d'anticorps par ELISA

2. INDICATIONS D'UTILISATION

La trousse NovaLisa® ELISA **Chikungunya** IgM sert à la détermination qualitative des anticorps IgM dirigés contre le Virus Chikungunya dans le sérum ou le plasma humain

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination qualitative immunoenzymatique des anticorps IgM dirigés contre le Virus Chikungunya est basée sur la technique ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes IgM pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, la solution antigène Chikungunya est ajoutée. Après une nouvelle étape de lavage l'anticorps biotinylé Chikungunya est pipeté dans les puits ainsi que le conjugué Streptavidine. Le complexe immun est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM spécifiques de Chikungunya dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATÉRIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Microplaque Chikungunya (IgM):** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'anti IgM humaines; en sachet d'aluminium refermable.
- **Diluant pour échantillon ***:** 1 flacon contenant 100 ml de tampon pour la dilution de l'échantillon ; pH 7,2 ± 0,2 ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon blanc.

- **Solution d'arrêt** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0,2 mol/l ; prêt à l'emploi ; bouchon rouge.
 - **Solution de lavage (concentrée x 20.)** * : 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon concentré 20 fois (pH 7,2 ± 0,2) pour laver les puits ; bouchon blanc.
 - **Antigène de Chikungunya , lyophilisée** : 6 flacons contenant l'antigène de Chikungunya lyophilisé, bouchon rouge.
 - **Solution d'anticorps Chikungunya ******: 1 flacon contenant 6 ml d'anticorps de Chikungunya biotinylé, prêt à l'emploi; couleur bleue; bouchon blanc.
 - **Conjugué de Streptavidine ****: 1 flacon contenant 6 ml de Streptavidine conjuguée avec de la peroxydase, prêt à l'emploi; couleur rouge; bouchon noir.
 - **Solution de substrat TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'- tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi ; bouchon jaune.
 - **Contrôle positif IgM Chikungunya****** : 1 flacon contenant 1,5 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon rouge.
 - **Contrôle seuil (cut-off) IgM Chikungunya****** : 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon vert.
 - **Contrôle négatif IgM Chikungunya ***** : 1 flacon contenant 1,5 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon bleu.
- * contient 0,1 % de Bronidox L après dilution
 ** contient 0,2 % de Bronidox L
 *** contient 0,1 % de Kathon
 **** contient 0,02 % de Kathon et 0,02% de Bronidox L

4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 couvercle (feuilles autocollantes)
- 1 notice d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles autocollantes
- 1 notice d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériel et équipement requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur à 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (récemment) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITÉ ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'ils sont conservés entre 2 et 8°C.

6. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (+20...+25°C) avant de commencer le dosage !

6.1. Barrettes revêtues sécables

Les barrettes sécables sont revêtues d'anti IgM humaines et sont prêtes à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. Les barrettes sont emballées sous vide. *Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à +2...+8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Antigène de Chikungunya

Les flacons contiennent de l'antigène lyophilisé Chikungunya. Le contenu de chaque flacon doit être reconstitué par 1 ml de solution de lavage diluée, en agitant doucement (ne pas vortexer) et en laissant reposer à température ambiante pendant 15 min. La solution reconstituée est stable pendant 1 jour à +2...+8°C.

6.3. Solution d'anticorps Chikungunya

Le flacon contient 6 ml d'anticorps de Chikungunya biotinylé, des stabilisants, des conservateurs et un colorant bleu inerte. La solution est prête à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.4. Contrôles

Les flacons de contrôle positif, contrôle seuil (cut-off) et de contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prête à l'emploi. Les contrôles doivent être conservés à +2...+8°C. *Après la première utilisation, les solutions restent stables jusqu'à la date de péremption, si elles sont conservées à +2...+8°C*

6.5. Solution de lavage (conc. x 20)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. Le tampon dilué est stable 5 jours si conservé à température ambiante. Après ouverture, le tampon concentré est stable jusqu'à la date de péremption, s'il est conservé à +2...+8°C. *Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Diluant pour échantillon

Le flacon contient 100 ml d'un tampon, des détergents et des conservateurs. Il est utilisé pour la dilution de l'échantillon du patient. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.7. Conjugué de Streptavidine

Un flacon contient 6 ml de Streptavidine conjuguée avec de la peroxydase, des détergents et des conservateurs. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2...+8°C. *Après la première utilisation, le conjugué reste stable jusqu'à la date de péremption, s'il est conservé à +2...+8°C.*

6.8. Solution de substrat TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2...+8°C, à l'abri de la lumière. *La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.9. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0,2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2-8°C.*

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Utiliser des échantillons de sérum ou de plasma (citrate) humain pour cette analyse. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à +2...+8°C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés congelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.* L'inactivation thermique n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués au 1/101^{ème} avec le diluant pour échantillon. Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml du diluant pour échantillon dans des tubes pour obtenir une dilution au 1/101^{ème} et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCÉDÉ DE DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Si le dosage doit être effectué sur un automate ELISA nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off (seuil) et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

Le choix est laissé à l'utilisateur de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets si nécessaire.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipeter 50 µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape !

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.

5. Pipeter 50µl de la solution reconstituée d'antigène Chikungunya dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.**
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 50 µl de la solution d'anticorps Chikungunya dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle
9. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.**
10. Répéter l'étape numéro 4.
11. Pipeter 50 µl de conjugué de Streptavidine peroxydase dans tous les puits sauf le blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.

12. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Ne pas exposer aux rayons directs du soleil**
13. Répéter l'étape numéro 4.

14. Pipeter 100 µl de solution TMB dans tous les puits

15. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**

16. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB.

La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.

Note: Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec du sérum négatif, par exemple au 1/2. Ensuite diluer l'échantillon au 1/101^{ème} avec le tampon et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.

17. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc substrat dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance** pour tous les doublets, si nécessaire.

9. RÉSULTATS

9.1. Critères de validation

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être respectés :

- | | | |
|-----------------------------------|----------------|--|
| ▪ Blanc Substrat | dans A1 : | Valeur d'absorbance inférieure à 0,100. |
| ▪ Contrôle négatif | dans B1 : | Valeur d'absorbance inférieure à celle du cut-off. |
| ▪ Contrôle seuil (cut-off) | dans C1 et D1: | Valeur d'absorbance entre 0,150 et 1,300 |
| ▪ Contrôle positif | dans E1 : | Valeur d'absorbance égale ou supérieure à la valeur du contrôle seuil (cut-off). |

Si ces critères ne sont pas respectés, le dosage est invalide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple: cont. seuil 0,39 + cont. seuil 0,37 = 0,76 / 2 = 0,38

“Cut-off” = 0,38

9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorbance est supérieure de 10% à la valeur seuil.

Des échantillons avec une valeur d'absorbance comprise entre +10% et -10% autour de la valeur « seuil » ne peuvent pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs → **zone grise**.

Il est conseillé de refaire le dosage 2 à 4 semaines après, avec un nouvel échantillon. Si les résultats du deuxième dosage sont encore dans la zone grise, l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorbance est inférieure de 10% à la valeur « seuil ».

9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorbance du patient x 10 = [unités NovaTec = NTU]
« seuil »

Exemple : $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ NTU}$

« Seuil » :	10	NTU
Zone grise :	9-11	NTU
Négatif :	< 9	NTU
Positif :	> 11	NTU

10. PERFORMANCES DU DOSAGE

10.1. Précision

<u>Inter-séries</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (DO)</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum pos. bas	3 (69)	0,61	7,3
Sérum positif	3 (72)	1,36	2,9

<u>Intra-séries</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (DO)</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum pos. bas	23	0,62	4,8
Sérum positif	24	1,36	3,4

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à 90 %.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à 90 %.

10.4. Interférences

Aucune interférence n'a été observée lors de l'ajout en excès de triglycérides, bilirubine et hémoglobine dans l'échantillon.

10.5. Réactions croisées

Aucune réaction croisée n'a été observée sur des échantillons contenant des facteurs rhumatoïdes ou des anticorps dirigés contre les agents suivants : Bordetella pertussis, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Virus de la Dengue, TBE, Helicobacter pylori, HSV 2, Leishmania, Mycoplasma et Schistosoma. Une réaction croisée avec Borrelia, CMV et Toxoplasma ne peut être exclue ainsi qu'avec O'Nyong Nyong Virus.

Une réaction croisée peut survenir lors d'une stimulation polyclonale suite à une infection à EBV. En présence de Mononucléose infectieuse (Maladie de Pfeiffer, infection EBV), la stimulation polyclonale des lymphocytes B peut survenir. Ceci peut provoquer des réactions non spécifiques dans la détection d'anticorps de la classe IgM. Par conséquent, il est recommandé d'exclure les infections EBV par diagnostic différentiel.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation-décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorbance. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne peut pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis doit tenir compte de l'historique clinique, de la symptomatologie ainsi que des données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et chez les nouveaux-nés.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Porter des gants au cours de la procédure.
- **Les antigènes Chikungunya sont inactifs. Tous les matériels doivent être considérés et manipulés néanmoins comme potentiellement infectieux. Porter des gants au cours du dosage. Nous recommandons l'utilisation de les antigènes conformément à la norme BSL2.**
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse..
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- L'ELISA NovaLisa® a été conçu exclusivement pour un personnel qualifié familier des bonnes pratiques de laboratoire

AVERTISSEMENT : A la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique en cas de contact avec la peau et les muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

12.1. Élimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence : CHIM0590 Chikungunya Virus IgM μ - capture ELISA (96 Déterminations)

1. INTRODUZIONE

Il virus Chikungunya è un virus del genere Alphavirus (famiglia Togaviridae) trasmesso da artropodi. Il genere Alphavirus comprende almeno 24 specie distinte. Si tratta di virioni avvolti da membrana lipoproteica con diametro compreso tra 50 e 60 nm.

L'infezione da Alphavirus si sviluppa in seguito al morso di una zanzara infetta, durante il quale si ha la deposizione del virus nel tessuto cutaneo e sottocutaneo. Dopo un periodo di incubazione che va da 1 a 12 giorni, si sviluppa la febbre Chikungunya.

La febbre Chikungunya (il termine Chikungunya significa "ciò che curva, che contorce", in riferimento alle manifestazioni invalidanti della malattia) è un'infezione virale acuta caratterizzata da una rapida transizione da uno stato di buona salute a malattia che comprende artralgia severa e febbre.

La temperatura corporea sale bruscamente fino ai 40°C ed è spesso accompagnata da brivido squotente. Dopo alcuni giorni, la febbre può diminuire e avere una recrudescenza, dando origine a un andamento febbrile altalenante. L'artralgia è poliarticolare, ad insorgenza molto dolorosa, interessa principalmente le piccole articolazioni e le zone già interessate da dolori articolari. Tipico comportamento dei pazienti è la riduzione al minimo dei movimenti. Le articolazioni possono risultare gonfie senza però un significativo accumulo di liquido. Tali sintomi possono manifestarsi per periodi variabili da una settimana a diversi mesi e sono accompagnati anche che mialgia. Solitamente l'eruzione cutanea compare il primo giorno di malattia, ma l'insorgenza può anche ritardare. Di solito compare come un rossore a livello di viso e collo, che evolve in una forma maculare o maculo-papulosa pruriginosa. Le lesioni successive compaiono a livello del tronco, degli arti, viso, palmi delle mani e piante dei piedi, in questo ordine di frequenza. Si possono osservare anche lesioni petecchiali, oltre a mal di testa, fotofobia, dolore retro-orbitale, mal di gola con segni obiettivi di faringite, nausea e vomito.

Occasionalmente si può osservare una artralgia persistente e una poliartrite (persistente per mesi o anni), che comporta in alcuni casi la distruzione delle giunture. Sebbene raramente, la sequenza di eventi include anche encefalite e meningoencefalite con alti livelli di mortalità.

Il virus ha maggiore importanza in Africa e in Asia. Tra il 20% e il 90% delle popolazioni tropicali e subtropicali mostrano segni sierologici di infezione. Dal momento che le zanzare del genere Aedes stanno aumentando specialmente in Nord Africa e Sud America, zone in cui la popolazione è uniformemente sensibile all'infezione, la probabilità che insorga un'epidemia è palese. L'infezione da virus Chikungunya è stata importata in Europa Centrale principalmente da viaggiatori nei Paesi tropicali e subtropicali.

Specie	Malattia	Sintomatologia	Meccanismo di infezione
virus Chikungunya (Alphavirus)	Febbre Chikungunya	Febbre Esantema Dolori articolari Artralgia e poliartrite persistente, con talvolta distruzione delle articolazioni. Più raramente encefalite e meningoencefalite	Trasmissione tramite puntura di zanzare Aedes albopictus (Africa) Aedes aegypti (Africa, Asia)

La presenza del virus responsabile dell'infezione può essere identificata tramite

- Sierologia: Rilevazione di anticorpi mediante tecniche IF, ELISA

2. USO PREVISTO

Il Chikungunya virus IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per Chikungunya virus nel siero o plasma (citrato) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per Chikungunya virus si basa sul principio ELISA. I pozzetti della micropiastra sono pre-coattati con anti-IgM umane che legano i corrispondenti anticorpi presenti nel campione. Dopo il lavaggio dei pozzetti per rimuovere il campione non legato e il materiale di controllo, si aggiunge la soluzione di antigene Chikungunya. Dopo un ulteriore step di lavaggio, l'anticorpo Chikungunya biotinilato viene aggiunto nel pozzetto. Dopo il lavaggio, si aggiunge il coniugato Streptavidina che si lega all'immunocomplesso Chikungunya-specifico. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per la Chikungunya virus di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni della Chikungunya (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi anticorpi anti-umano della classe IgM; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente***:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2 ; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):*** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2 ; tappo bianco.
- **Antigene Chikungunya liofilizzato:** 6 bottiglie contenenti una soluzione di antigene Chikungunya liofilizzato; tappo rosso
- **Soluzione anticorpo Chikungunya****:** 1 bottiglia contenente 6 ml di anticorpo biotinilato Chikungunya, pronto all'uso; colorato di blue; tappo bianco
- **Coniugato Streptavidina **::** 1 bottiglia contenente 6 ml di coniugato Streptavidina con perossidasi, pronto all'uso; colorato di rosso; tappo nero
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Chikungunya IgM Controllo positivo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Chikungunya IgM Controllo Cut-off***:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Chikungunya IgM Controllo negativo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

**** contiene 0.02 % Kathon e 0,02% Bronidox L

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesi anticorpi anti-umano della classe IgM. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.2. Antigene Chikungunya

La bottiglia contiene soluzione antigene Chikungunya liofilizzato. Il contenuto di ogni fiala deve essere risospeso in 1 ml di soluzione di lavaggio diluita, mescolato lentamente per inversione (no vortex) e lasciato in incubazione 15 min a temperature ambiente. La soluzione ricostituita è stabile per 1 giorno a 2...8°C.

6.3. Soluzione anticorpo Chikungunya

La bottiglia contiene 6 ml di anticorpo Chikungunya biotinilato, stabilizzanti, conservanti e colorante inerte blu. Tale soluzione pronta all'uso deve essere conservata a 2...8°C. *Dopo la prima apertura il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato a 2...8°C.*

6.4. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.5. Tampone diluente

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.7. Coniugato Streptavidina

1 bottiglia contenente 6 ml di coniugato Streptavidina con perossidasi, detergenti e conservanti. Il reagente è pronto all'uso e deve essere conservato a 2...8°C. *Dopo la prima apertura il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato a 2...8°C.*

6.8. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.9. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (citrate) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*
L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre.

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetto	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eeguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a 37° ± 1°C

1. Pipettare 50 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora ± 5 min a 37° ± 1°C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.
Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.
5. Dispensare 50µl di antigene Chikungunya ricostituito in tutti I pozzetti ad eccezione del bianco (e.g. A1). Coprire con il foglietto.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20°...25°C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Dispensare 50 µl di Soluzione Anticorpo Chikungunya in tutti I pozzetti ad eccezione del bianco (e.g.A1). Coprire con il foglietto.
9. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20°...25°C).**
10. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
11. Dispensare 50 µl di coniugato perossidasi Streptavidina in tutti I pozzetti ad eccezione del bianco (e.g. A1). Coprire con il foglietto.
12. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20°...25°C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
13. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
14. Pipettare 100µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
15. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20°...25°C) al buio.**
16. Pipettare 100µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*
Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1+100 con tampone diluente. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.
17. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. *Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.*

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza **< 0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza **< 0.200 e < cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza **>Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off è la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2= 0.38
Cut-Off = 0.38

9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi
→ **Dubbio**.

In questo caso è raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato è ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1. Risultati in unità [NTU]

$$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unità} = \text{NTU}]$$

$$\text{Esempio: } \frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (Units)}$$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

<u>Interdosaggio</u>	<u>n</u>	<u>Media (OD)</u>	<u>Cv (%)</u>
Siero Positivo debole	3 (69)	0.61	7,3
Siero Positivo forte	3 (72)	1.36	2.9

<u>Intradosaggio</u>	<u>n</u>	<u>Media (OD)</u>	<u>CV (%)</u>
Siero Positivo debole.	23	0,62	4.8
Siero Positivo forte	24	1,36	3,4

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a >90%.

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è pari a >90%.

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

10.5. Reattività incrociata

Nessuna cross-reattività è stata osservata utilizzando campioni con FR e campioni contenenti anticorpi anti Bordetella pertussis, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Dengue Virus, TBE, Helicobacter pylori, HSV 2, Leishmania, Mycoplasma e Schistosoma.

La cross-reattività con anticorpi anti Borrelia, CMV e Toxoplasma non può essere esclusa.

È probabile l'interferenza da stimolazione policlonale a seguito di infezione da EBV. In presenza di Mononucleosi infettiva (Malattia di Pfeiffer, infezione da EBV) è possibile la stimolazione policlonale dei Linfociti B. tale evento si esprime come reazione non-specifica nella rilevazione degli anticorpi di classe IgM. Si consiglia pertanto l'esclusione di infezione da EBV nella diagnosi differenziale.

La cross-reattività con anticorpi anti Virus O'Nyong Nyong Virus no può essere esclusa.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.
--

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- **Gli antigeni Chikungunya sono inattivati. Tutto il materiale dovrebbe essere considerato e maneggiato come potenzialmente infetto. Indossare i guanti durante l'esecuzione del test. Si raccomanda l'utilizzo dell'antigene sotto cappa BSL2 (flusso laminare).**
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: CHIM590 Chikungunya Virus IgM-ELISA (96 determinazioni)

1. INTRODUCCIÓN

El virus Chikungunya es un virus de artrópodos del género Alphavirus (familia Togaviridae). El género Alphavirus contiene al menos 24 especies distintas. Estos son viriones de envoltura lipídica con un diámetro de 50 a 60 nm.

Las infecciones de Alphavirus se inician por la picadura de un mosquito infectado, lo que resulta en la deposición de virus en los tejidos subcutáneos y cutáneos posiblemente. Después de un período de incubación de 1 a 12 días, se desarrolla la fiebre de Chikungunya.

Fiebre Chikungunya (Chikungunya significa "lo que se dobla hacia arriba", en referencia a las manifestaciones incapacitantes de la enfermedad) es una infección viral aguda que se caracteriza por una rápida transición de un buen estado de salud a la enfermedad que incluye artralgia grave y fiebre.

La temperatura sube bruscamente hasta un máximo de 40°C y, a menudo se acompaña de escalofríos. Después de unos días, la fiebre puede reducir y recrudescer, dando lugar a una "ensillada" curva de la fiebre. La artralgia es poliarticular, lo que favorece a las pequeñas articulaciones y los sitios de lesiones previas, y es más intensa al levantarse. Los pacientes suelen evitar el movimiento tanto como sea posible. Las articulaciones pueden hincharse sin acumulaciones de líquido significativos. Estos síntomas pueden durar de 1 semana a varios meses y se acompañan por mialgia. La erupción aparece característicamente en el primer día de la enfermedad, pero el inicio puede retrasarse. Por lo general se presenta como un rubor en la cara y el cuello, que evoluciona a una forma maculopapular o macular que puede ser pruriginosa. Estas últimas lesiones aparecen en el tronco, extremidades, cara, palmas y plantas, en ese orden de frecuencia. También se han observado lesiones petequiales de la piel. Dolor de cabeza, fotofobia, dolor retro-orbital, dolor de garganta con signos objetivos de faringitis, náuseas y vómitos también se producen en este contexto. De vez en cuando, sin embargo, artralgias persistentes y poliartritis (meses o incluso años de duración) se producen, a veces con la destrucción articular. Aún más raro, las secuelas incluyen encefalitis y meningoencefalitis con altas tasas de letalidad.

El virus tiene una gran importancia en África y Asia. Desde el 20% hasta más del 90% de la población tropical y subtropical muestran evidencias serológicas de infección. Debido a que los mosquitos Aedes son cada vez más frecuentes en el norte de África y América del Sur, donde la población sería susceptible de manera uniforme a la infección, la posibilidad de epidemias es evidente. Infecciones por virus de Chikungunya se importan a Europa central, principalmente por los viajeros a países tropicales y subtropicales.

Especies	Enfermedad	Síntomas	Mecanismo de infección
Virus Chikungunya (Alphavirus)	Fiebre Chikungunya	Fiebre Exantema Dolor en las articulaciones Artralgia y poliartritis persistente, a veces con destrucción articular. Aún más raro encefalitis y meningoencefalitis	La transmisión por los mosquitos chupadores de sangre Aedes albopictus (África) Aedes aegypti (África, Asia)

La respuesta de la presencia de la infección resp. puede ser identificada por

- Serología: Detección de anticuerpos por IF, ELISA

2. USO PREVISTO

El enzoinmunoensayo se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Chikungunya virus en suero o plasma (citrate) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra Chikungunya virus se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las tiras de microtitulación se recubrieron previamente con anti IgM humana para unirse a los anticuerpos correspondientes de la muestra. Después de lavar los pozos para retirar todo el material de la muestra no unido y material de control se agrega solución de antígeno Chikungunya. Después de una etapa de lavado adicional se pipetea anticuerpo biotinilado de Chikungunya en los pozos. Después de lavar se añade estreptavidina conjugada que se une al inmunocomplejo Chikungunya-específico capturado. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgM) de Chikungunya Virus:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con anticuerpos anti IgM humana, en bolsa de aluminio.

- **Tampón de dilución para la muestra** ***: 1 botella de 100 ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada**: 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.)***: 1 botella de 50 ml de una solución de tampón concentrado 20x para lavar los pozos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Antígeno Chikungunya, liofilizado**: 6 botellas que contienen solución de antígeno Chikungunya liofilizado; tapa roja.
- **Solución anticuerpo Chikungunya******: 1 botella contiene 6 ml de anticuerpo Chikungunya liofilizado, listo para usar; de color azul, tapa blanca.
- **Estreptavidina Conjugada** **: 1 botella contiene 6 ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa, listo para usar; de color azul; tapa negro.
- **Solución de sustrato de TMB**: 1 botella de 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgM (Chikungunya Virus)*****: 1 botella de 1,5 ml; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off de IgM (Chikungunya Virus)*****: 1 botella de 2 ml; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado
- **Control negativo de IgM (Chikungunya Virus)*****: 1 botella de 1,5 ml; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.

* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir

** contiene 0.2% Bronidox L

*** contiene 0.1% Catón

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con puntas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!

6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables están recubiertas con IgM anti-humano. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2. Antígeno Chikungunya

Los frascos contienen solución de antígeno Chikungunya liofilizado. El contenido de cada vial se tiene que preparar en 1 ml de solución de lavado diluida agitandola lentamente (no vórtex) e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. La solución reconstituida es estable durante 1 día de 2 ... 8 ° C.

6.3. Solución de anticuerpo Chikungunya

La botella contiene 6 ml de anticuerpo Chikungunya biotilado, estabilizadores, conservantes y un colorante azul inerte. Esta solución está lista para usar tiene que ser almacenada de 2... 8 ° C. Después de abrir por primera vez estable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena a 2 ... 8 ° C.

6.4. Controles

Las botellas de los controles contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.5. Tampón de dilución para la muestra

La botella contiene 100 ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante amarillo inerte. La solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.6. Solución de lavado (20x conc.)

La botella contiene 50 ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.7. Estreptavidina Conjugada

1 frasco contiene 6 ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa, detergentes y conservantes. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2 8 ° C. *Después de abierto el conjugado es estable hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2 ... 8 ° C.*

6.8. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.9. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra p.e. 10 µl de la muestra con 1 ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar equipos automatizados para ELISA aumentar el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(p. ej. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(p. ej. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(p. ej. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(p. ej. E1)	para el control positivo

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$

1. Pipetear 50 μl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h \pm 5 min a $37\pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 μl de la solución de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!
5. Dispensar 50 μl de antígeno Chikunguya reconstituido en todos los pozos, excepto para el blanco (por ejemplo A1). Cubrir con los autoadhesivos suministrados.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20\dots 25^\circ\text{C}$).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Dispensar 50 μl de solución de anticuerpo Chikunguya en todos los pozos, excepto para el blanco (por ejemplo A1). Cubrir con los autoadhesivos suministrados.
9. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20\dots 25^\circ\text{C}$).**
10. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
11. Dispensar 50 μl de estreptavidina conjugada con peroxidasa en todos los pozos, excepto para el blanco (por ejemplo A1). Cubrir con los autoadhesivos suministrados.
12. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20\dots 25^\circ\text{C}$).** Evitar la luz solar directa.
13. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
14. Pipetear 100 μl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
15. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ($20\dots 25^\circ\text{C}$).**
16. Pipetear en todos los pocillos 100 μl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*
Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgG 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.
17. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la absorbancia de la posición A1 del resto de los valores de absorbancia!

Medir la **absorbancia** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de absorbancia** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- | | | |
|---------------------------|------------|--------------------------------|
| ▪ Blanco | en A1 | extinción < 0.100 |
| ▪ Control negativo | en B1 | extinción < cut-off |
| ▪ Control cut-off | en C1 y D1 | extinción 0,150 – 1,300 |
| ▪ Control positivo | en E1 | extinción >cut-off |

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Calculo del valor de la medición

El **cut-off** se obtiene de los valores de la absorbancia de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,39 OD Cut-off Control + 0,37 OD Cut-off Control = 0,76:2 = 0,38

Cut-off= 0,38

9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la absorbancia es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de absorbancia $\pm 10\%$ del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**.

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la absorbancia esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

9.3.1. Resultados en unidades [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10 = [NovaTec-unidades = NTU]
Cut-Off

Ejemplo: $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32 \text{ NTU (Units)}$

Cut-Off : 10 NTU
Zona intermedia: 9-11 NTU
Negativo: <9 NTU
Positivo: >11 NTU

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

Inter ensayo	n	Promedio (OD)	CV (%)
Suero pos	3 (69)	0.61	7.3
Suero pos.	3 (72)	1.36	2.9
Intra ensayo	n	Promedio (OD)	CV (%)
Suero pos.	23	0.62	4.8
Suero pos	24	1.36	3.4

10.2. Especificad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente > 90%.

10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico > 90%.

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

10.5. Reacción cruzada

No se observaron reacciones cruzadas con Rf muestras y las muestras que contienen anticuerpos contra Bordetella pertussis, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, virus del Dengue, TBE, Helicobacter pylori, HSV 2, Leishmania, Mycoplasma y Schistosoma.

La reacción cruzada con anticuerpos contra Borrelia, CMV y Toxoplasma no se puede excluir.

La interferencia con la estimulación policlonal de infecciones por VEB es probable. En la presencia de mononucleosis infecciosa (enfermedad de Pfeiffer, la infección por VEB) la estimulación policlonal de linfocitos B puede ocurrir. Esto puede dar lugar a reacciones no específicas en la detección de anticuerpos IgM. Por lo tanto se recomienda excluir una infección por VEB por diagnóstico diferencial.

La reacción cruzada con anticuerpos contra O'Nyong Nyong Virus no puede ser excluida.

Nota: Los resultados referidos están basados en grupos de muestras investigadas: : No se trata de especificaciones garantizadas

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la absorbancia.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- **Los antígenos Chikungunya se inactivan. Todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos. Utilice guantes mientras se realiza la prueba. Se recomienda utilizar el antígeno debajo de la cabina BSL2 (banco limpio)**
- No intercambiar reactivos y placas de microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

ADVERTENCIA:	Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.
---------------------	---

ADVERTENCIA:	El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.
---------------------	---

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS






N° del producto: CHIM0590 Chikungunya virus IgM μ -capture ELISA (96 determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin, Principles and practice of Infectious diseases, 2005, Chapter 147, 1913–1919

Patrick Hochedez, Staphane Jaureguiberry, Monique Debruyne, Philippe Bossi, Pierre Hausfater, Gilles Brucker, Francois Bricaire, Eric Caumes, Chikungunya infection in travellers, Emerging Infectious Diseases Vol. 12, No. 10, October 2006, 1565-1566

F.H. Kayser, K.A. Bienz, J. Eckert, R.M. Zinkernagel, Medical Microbiology, Stuttgart 2005, 440-441

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diagnostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE
REF	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
CONJ STRE	Streptavidin Conjugate/ Streptavidin Konjugat/ Conjugué de Streptavidine/ Coniugato Streptavidina/ Conjugado Streptavidina
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative/ Kontrollserum, negativ/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo
CONTROL +	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
CUT OFF	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
AG LYO	Antigen lyophilized/ lyophilisiertes Antigen/ Antigène lyophilisée/ Antigeno liofilizado
AB SOLN	Antibody solution/ Antikörperlösung / Solution d'anticorps / Solución de Anticuerpo
DIL	Sample diluent buffer / Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon / soluzione tampone per i campioni / solución tampón para muestras
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante/ Solución de parada
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Chikungunya Virus IgM μ -capture -ELISA

Assay preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the form supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	50 μ l	-	-	-
Positive control	-	-	50 μ l	-	-
Cut-off control	-	-	-	50 μ l	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	50 μ l
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300 μ l of washing solution					
Reconstituted antigen	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300 μ l of washing solution					
Antibody solution	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300 μ l of washing solution					
Streptavidin conjugate	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300 μ l of washing solution					
TMB	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for exact 15 min at room temperature in the dark					
Stop solution	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
 D-63128 Dietzenbach, Germany
 Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
 Email : info@NovaTec-ID.com
 Internet: www.NovaTec-ID.com

CHIM0590engl.,dt,fr,it,es-21072014-CS