



ENZYWELL

TOSCANA VIRUS IgG/IgM

REF 91067 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/Fabricado por/
Fabriqué par: DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena) – Italy



INDICE / INDEX / INDICE / SOMMAIRE

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST
13. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES
14. PRECISIONE / PRECISION / PRECISIÓN / PRECISION
15. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES
16. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL TOSCANA VIRUS IgG/IgM

REF 91067

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ED IgM ANTI TOSCANA VIRUS NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA TOSCANA VIRUS.

2. INTRODUZIONE

Il virus Toscana, appartenente al genere Phlebovirus della famiglia Bunyaviridae, è stato isolato per la prima volta in Italia nel 1971. Da allora è stata accertata la sua presenza nell'area mediterranea ed è stato dimostrato il suo ruolo come agente eziologico di malattia umana. La malattia causata dal Virus Toscana è caratterizzata da febbre, forte mal di testa e meningite o meningoencefalite. L'infezione è trasmessa da insetti ematofagi del genere Phlebotomus e, a causa del ciclo vitale del vettore, ha un andamento stagionale, con un picco nei mesi estivi. Dati epidemiologici suggeriscono che, nelle zone dove il virus Toscana è endemico, una gran parte e forse la maggioranza delle meningiti asettiche nel periodo estivo possono essere causate da questo virus. Sino ad oggi la diagnosi di infezione con Virus Toscana è stata prevalentemente sierologica. Gli anticorpi specifici della classe IgM sono presenti nella fase acuta della malattia, mentre la presenza di anticorpi specifici della classe IgG, in assenza di IgM, indica un'infezione pregressa. Tutti i metodi sierologici impiegati finora hanno in comune la necessità di propagare il virus in colture cellulari, necessitando così di laboratori specializzati e precludendo la diagnosi di infezione alla maggior parte dei laboratori di sierologia. Poiché è stato dimostrato che la nucleoproteina virale è il bersaglio principale degli anticorpi anti-Virus Toscana, questa è stata espressa mediante la tecnologia del DNA ricombinante in E. coli e utilizzata per realizzare un kit immunoenzimatico per la ricerca di IgG e IgM specifiche al fine di facilitare l'indagine sierologica su questo virus.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

La determinazione delle IgG avviene dopo incubazione del siero in esame con una fase solida presensibilizzata con la nucleoproteina ricombinante del virus Toscana altamente purificata. Le IgG specifiche si legano sulla fase solida e vengono rivelate per ulteriore incubazione con un Mab di topo anti-IgG umane coniugato con Perossidasi.

La determinazione delle IgM avviene con il metodo "a cattura". Le IgM totali presenti nel siero si legano alla fase solida sensibilizzata con un monoclonale di topo anti-IgM umane. Dopo il lavaggio si aggiunge un complesso formato dalla nucleoproteina ricombinante del virus Toscana biotinilata e il coniugato Streptavidina-perossidasi.

In entrambi i casi l'intero complesso (per le IgG: IgG specifiche anti-virus Toscana con anti-IgG marcate con POD; per le IgM: IgM-nucleoproteina-biotina/Streptavidina-perossidasi) viene determinato per addizione del substrato che assume una colorazione blue in presenza di perossidasi. La colorazione stabile gialla è ottenuta per addizione di una soluzione bloccante.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

N.B. Il presente kit contiene tutti i reattivi necessari per il dosaggio sia delle IgG che per le IgM. I due tipi di dosaggio vengono eseguiti separatamente.

- I reagenti sono sufficienti per 2 x 48 determinazioni.

Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

Per le IgG

MT PLATE MICROPIASTRA 3 x 2 strips sensibilizzate con la nucleoproteina del Virus Toscana (ricombinante) per la determinazione delle IgG.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (TV-G seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO IgG 1 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi IgG anti-Toscana virus, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT-OFF IgG 1 x 2 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi IgG anti-Toscana virus, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO IgG 2 x 5 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi in tampone fosfato contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Per le IgM

MT PLATE MICROPIASTRA 3 x 2 strips sensibilizzate con anticorpi monoclonali anti-IgM umane, per la determinazione delle IgM.

Uso: Aprire l'involucro delle strips dalla parte opposta al codice (M, seguita dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto ed inserire i pozzetti necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

Ag ANTIGENE Liofilo x 6 fiale

Contenuto: Antigene ricombinante del Virus Toscana legato a biotina in tampone fosfato contenente lattosio.

Preparazione: ricostituire con il volume di coniugato indicato in etichetta.

CONJ CONIUGATO IgM 2 x 5 mL

Contenuto: Streptavidina coniugata con perossidasi, in soluzione tampone. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione. L'immunocomplesso deve essere preparato 45 minuti circa prima dell'uso.

- Reagenti comuni ai due dosaggi

CONTROL - IgG/IgM CONTROLLO NEGATIVO 2 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano, privo di anticorpi IgG ed IgM, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 (PF93621) 1 x 100 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) contenente proteine 10% p/v e sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1 x 12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µL
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µL di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti

- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA IgG e IgM	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO IgG	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO IgM	5 settimane 2/8°C
ANTIGENE RICOSTITUITO	la soluzione non è conservabile e deve essere utilizzata dopo la ricostituzione
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana ; 15/30°C al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Attenzione:

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato contiene fenolo
 - c) Il substrato è acido
 - d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.

4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°Ce può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare i pozzetti necessari.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparare l'antigene ricostituendo il liofilo con il volume di coniugato indicato in etichetta.

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli NON DILUITI (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo per le IgG e 2 controlli negativi per le IgM. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL del coniugato (anti-IgG per la determinazione delle IgG o complesso antigene/coniugato per la determinazione delle IgM) per pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO	
-----------------------------	--

STEP 1	Mettere 100 µL di siero diluito /controlli nei pozzetti incubare 45 min. a 37°C lavare 4 volte (300 µl)
STEP 2	Mettere 100 µL di coniugato (anti-IgG per la determinazione delle IgG; complesso antigene/coniugato per la determinazione delle IgM) per pozzetto incubare 45 min. a 37°C lavare 4 volte (300 µl)

- STEP 3 mettere 100 µL di Substrato per pozzetto
- incubare 15 min. a t.a.
- STEP 4 aggiungere 100 µL di Stop Solution
- leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 0.150) a tutte le altre letture. Per il dosaggio delle IgG la OD dell'IgG Controllo Cut-Off deve essere ≥ 0.200 . Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere ≤ 0.6 . Per il dosaggio delle IgM la OD del Controllo Negativo deve essere < 0.150 .

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Calcolo Cut-Off IgM: sommare 0.250 alla OD del Controllo Negativo.

Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di anticorpi specifici per l'antigene.

Calcolare il rapporto (Index) fra il valore medio delle O.D. del campione in esame e quello del Cut-Off. Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ del Cut-off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Non sono da escludere cross reazioni da altri serotipi correlati del genere Phlebovirus come Sicilia e Naples.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

Sono stati testati 97 sieri di pazienti appartenenti ai seguenti 3 gruppi:

- 1- 22 sieri di pazienti con sintomi neurologici di meningite da Virus Toscana
- 2- 22 sieri di soggetti pediatrici
- 3- 53 sieri di pazienti provenienti dalla routine.

I campioni sono stati testati con il kit in oggetto ed i risultati sono stati confrontati con un sistema Elisa che utilizzava l'antigene nativo. I casi discordanti (0 nella determinazione IgM e 10 nella determinazione delle IgG) sono stati analizzati in Western Blotting.

I risultati ottenuti sono qui di seguito riassunti:

Toscana virus IgG

	Altro metodo	
	P	N
Diesse P	38	2
N	2	55

Sensibilità diagnostica 95.0% (IC al 95%: 83.5-98.6%)

Specificità diagnostica 96.5 % (IC al 95%: 88.1-99.0%)

Toscana virus IgM

	Altro metodo	
	P	N
Diesse P	19	0
N	0	78

Sensibilità diagnostica 100.% (IC al 95%: 83.2-100%)

Specificità diagnostica 100 % (IC al 95%: 95.3-100%)

15. PRECISIONE

Toscana virus IgG

Tab.1 Precisione nella prova (12 repliche del Cut Off in tre lotti differenti)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n=12	0.384	0.234	0.386
CV%	8	11	6

Tab.2 Precisione tra prove (media dell'Index in tre lotti differenti)

	036	Lotti 037	038	average	cv%
campione					
1	0.79	0.65	0.5	0.65	22
2	1.74	1.36	1	1.55	17
3	2.4	3.2	2.5	2.7	16

Toscana Virus IgM

Tab.3 Precisione nella prova (12 repliche di un campione borderline)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n=12	0.235	0.245	0.387
CV%	5	5	9

Tab.4 Precisione tra prove (media dell'Index in tre lotti differenti)

	036	Lotti 037	038	average	cv%
Sample					
1	0.68	0.59	0.35	0.54	32
2	1.46	2.08	1.32	1.62	25
3	2.95	5.1	3.23	3.76	32

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. Nicoletti L. et al. 1991. Central Nervous System involvement during infection by Phlebovirus Toscana of residents in natural foci in Central Italy (1977-1988). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 429-434.
2. Schwarz et al. 1996. Immunoblot detection of antibodies to Toscana Virus. *J. Medical Virology* 49, 83-86.
3. Valassina M. et al. 1998. Diagnostic potential of Toscana virus in protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3170-3172.
4. Soldateschi D. et al. 1999. Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* 37, 649-652.



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL TOSCANA VIRUS IgG/IgM

REF 91067

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgG AND IgM ANTIBODIES TO TOSCANA VIRUS IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF TOSCANA VIRUS INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The Toscana Virus, belonging to the Phlebovirus genus of the Bunyaviridae family, was isolated for the first time in Italy in 1971. Since then, its presence in the mediterranean area has been established and its role as an etiological agent in human disease has been demonstrated. The disease caused by Toscana Virus is characterized by fever, strong headache and meningitis or meningoencephalitis. The infection is transmitted by hematophagous insects of the Phlebotomus genus and is seasonal with a peak in the summer months, due to the life cycle of the vector. Epidemiological data indicate that in areas where the Toscana Virus is endemic, many, perhaps the majority of cases of aseptic meningitis during the summer period are caused by this virus. Until now, the diagnosis of Toscana virus infection has been mainly performed serologically. Specific antibodies of the IgM class are present during the acute phase, while the presence of specific IgG antibodies in the absence of IgM indicates a previous infection. All the serological methods adopted up to the present time require propagation of the virus in cell cultures; these methods can only be performed in specialized laboratories, while the infection cannot be diagnosed in the majority of serological laboratories. As it has been shown that the viral nucleoprotein is the chief target of the anti-Toscana virus antibodies, this has been expressed by recombinant DNA technology in E. coli and used to set up an immunoenzymatic kit for the detection of specific IgG and IgM, as an aid in the serological study of this virus.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

Determination for the IgG is performed after incubation of the serum sample with a solid phase precoated with the highly purified recombinant nucleoprotein of the Toscana virus. Specific IgG bind to the solid phase and are detected by further incubation with a mouse anti-human IgG monoclonal antibody conjugated with peroxidase.

The IgM are detected by the capture method. The total IgM present in the serum bind to the solid phase precoated with a mouse anti-human IgM monoclonal antibody. After washing, a complex composed of the biotinylated recombinant nucleoprotein of Toscana virus and the Streptavidin-peroxidase conjugate.

In both cases, the whole complex (for the IgG: specific IgG anti-Toscana virus with anti-IgG labelled with POD; for the IgM: IgM-nucleoprotein-biotin/Streptavidin-peroxidase) is determined by the addition of the substrate which becomes blue coloured in the presence of peroxidase. A stable yellow colour is obtained by addition of a blocking solution.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

N.B. The present kit contains all the reagents necessary for the assay of both IgG and IgM. The two types of assay must be performed separately.

- Reagents are sufficient for 2 x 48 determinations.
- **Bring to room temperature before use.**

For the IgG

MT PLATE MICROPLATE 3 x 2 strips coated with the recombinant nucleoprotein of Toscana virus for the determination of IgG.

Use: open the package on the opposite side from the code (M followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONTROL + IgG POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum containing a known amount of anti-Toscana virus IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour of the controls is proportional to the relative antibody titer.

CONTROL CUT-OFF IgG CUT-OFF CONTROL 1 x 2 mL

Contents: Diluted human serum containing a known amount of anti-Toscana virus IgG in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour of the controls is proportional to the relative antibody titer.

CONJ IgG CONJUGATE 2 x 5 mL

Contents: anti-human IgG monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

For the IgM

MT PLATE MICROPLATE 3 x 2 strips coated with anti-human IgM monoclonal antibodies for the determination of IgM.

Use: open the package on the opposite side from the code (M followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

Ag ANTIGEN Freeze-dried x 6 vials

Contents: Recombinant antigen of the Toscana virus linked to biotin in phosphate buffer containing lactose.

Preparation: reconstitute with the volume of conjugate reported on the label.

CONJ IgM CONJUGATE 2 x 5 mL

Contents: streptavidin conjugated to peroxidase in buffer solution. Ready for use without further dilution.

Stability: The unopened product is stable up to the expiry date. The immunocomplex must be prepared 45 minutes before use.

Reagents used in both assays

CONTROL - IgG/ IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) 2 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 10 DILUENT 10 (PF93621) 1 x 100 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to dilute samples.

Contents: PBS containing proteins 10% w/v and sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1 x 12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)

- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µL solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
Microplate IgG and IgM	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Controls	5 weeks at 2/8°C
Conjugate IgG	5 weeks at 2/8°C
Conjugate IgM	5 weeks at 2/8°C
Reconstituted antigen	the solution cannot be stored and must be used immediately after reconstitution
Substrate	until the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C in the dark
Sample Diluent	until the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	until the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

Caution: This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
 - servicing and maintenance

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully mixed before performing the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

The test is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of wells.
- Prepare the washing buffer by diluting the Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Prepare the antigen by reconstituting the freeze-dried product with the conjugate volume shown on the label.

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off, 1 positive control for IgG and 2 negative controls for IgM. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl), add 100 µL of conjugate (anti-IgG for the determination of IgG, or the antigen/conjugate complex for determination of the IgM) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well. After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1	Place 100 µL of diluted sample/controls to the wells Incubate for 45 min. at 37°C Wash 4 times (300 µl)
STEP 2	Add 100 µL of conjugate to each well (anti-IgG for determination of the IgG; the antigen/conjugate complex for determination of the IgM) Incubate for 45 min. at 37°C Wash 4 times (300 µl)
STEP 3	Add 100 µL of Substrate to each well Incubate for 15 min. at R.T.
STEP 4	Add 100 µL of Stop Solution Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. VALIDATION

Subtract the value of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. For the IgG assay the OD of the IgG Cut-Off must be ≥ 0.200 . The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-Off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be ≤ 0.6 . For the assay of the IgM the OD of the Negative control must be < 0.150 .

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Calculation of the IgM Cut-Off: add 0.250 to the OD of the Negative Control.

Qualitative results

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-Off, the sample is positive for the presence of specific IgG.

Calculate the ratio (Index) between the average O.D. value of the sample and that of the Cut-off. The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2 .

Doubtful: $\pm 20\%$ of the Cut-Off.

Negative: if the ratio is < 0.8 .

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of other diagnostic procedures.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

Cross-reactoins cannot be excluded with other correlated serotypes of the Phlebovirus genus such as Sicily and Naples.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

97 samples were tested from patients belonging to the following 3 groups:

1. 22 sera from patients with neurological symptoms of meningitis caused by Toscana Virus.
2. 22 sera from pediatric patients
3. 53 samples of patients from the routine practice-

The samples were tested with the kit under study and the results were compared with an immunoenzymatic system which utilises the native antigen. Discordant results (0 in the IgM test, 10 in the IgG test) were further studied in Western Blotting. The results obtained are reported below:

Toscana virus IgG :

	Other method	
	P	N
Diesse P	38	2
N	2	55

Diagnostic sensitivity 95.0% (IC at 95%: 83.5 - 98.6%)

Diagnostic specificity 96.5 % (IC at 95%: 88.1 - 99.0%)

Toscana virus IgM

	Other method	
	P	N
Diesse P	19	0
N	0	78

Diagnostic sensitivity 100.% (IC al 95%: 83.2-100%)

Diagnosotic specificity 100 % (IC al 95%: 95.3-100%)

15. PRECISIONToscana virus IgG

Table 1 Precision “In run” (12 replicates of the Cut Off in thre different lots)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n=12	0.384	0.234	0.386
CV%	8	11	6

Table 2 Precision between runs (average of the Index in three different lots)

Sample	Lots			average	cv%
	036	037	038		
1	0.79	0.65	0.5	0.65	22
2	1.74	1.36	1	1.55	17
3	2.4	3.2	2.5	2.7	16

Toscana Virus IgM

Table 3 Precision “in run” (12 replicates of a borderline sample)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n=12	0.235	0.245	0.387
CV%	5	5	9

Table 4 Precision between runs (average of the Index in three different lots)

Sample	Lots			average	cv%
	036	037	038		
1	0.68	0.59	0.35	0.54	32
2	1.46	2.08	1.32	1.62	25
3	2.95	5.1	3.23	3.76	32

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert point 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. Nicoletti L. et al. 1991. Central Nervous System involvement during infection by Phlebovirus Toscana of residents in natural foci in Central Italy (1977-1988). Am. J. Trop. Med. Hyg. 45, 429-434.
2. Schwarz et al. 1996. Immunoblot detection of antibodies to Toscana Virus. J. Medical Virology 49, 83-86.
3. Valassina M. et al. 1998. Diagnostic potential of Toscana virus in protein expressed in Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 36, 3170-3172.
4. Soldateschi D. et al. 1999. Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. J. Clin. Microbiol. 37, 649-652.



INSTRUCCIONES DE USO
ENZYWELL
TOSCANA VIRUS IgG/IgM

REF 91067

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgM e IgG ANTI TOSCANA VIRUS EN SUERO HUMANO, COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL TOSCANA VIRUS.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El virus Toscana, que pertenece al grupo Phlebovirus de la familia Bunyaviridae, ha sido aislado por primera vez en Italia en 1971. Desde entonces se confirmó su presencia en el área mediterránea y fue demostrada su función como agente etiológico de enfermedad humana. La enfermedad causada por el Virus Toscana es caracterizada por fiebre, fuerte dolor de cabeza, meningitis o meningoencefalitis. La infección es transmitida por insectos hematófagos del grupo Phlebotomus y, por razón del ciclo vital del vector, tiene un curso estacional, con un pico en los meses del verano. Datos epidemiológicos sugieren que, en las zonas donde el Virus Toscana es endémico, mucha parte y quizás la mayoría de las meningitis asépticas en el período veraniego pueden ser causadas por este virus. Hasta hoy la diagnóstico de infección con Virus Toscana ha sido prevalentemente serológica. Los anticuerpos específicos de la clase IgM están presentes en la fase aguda de la enfermedad, mientras la presencia de anticuerpos específicos de la clase IgG, en ausencia de IgM, indica una infección antecedente. Todos los métodos serológicos utilizados hasta hoy tienen en común la necesidad de propagar el virus en cultivos celulares, necesitando así de laboratorios especializados y precluyendo la diagnóstico de infección a la mayoría de los laboratorios de serología. Ya que se demostró que la nucleoproteína viral es la mira principal de los anticuerpos anti-Virus Toscana, esta ha sido exprimida por medio de la tecnología del DNA recombinante en E. coli e utilizada para realizar un kit inmunoenzimático para la búsqueda de IgG e IgM específicas con el fin de agilizar la investigación serológica sobre este virus.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). La determinación de las IgG ocurre después de incubación del suero con una fase sólida pre-sensibilizada con la nucleoproteína recombinante del virus Toscana muy purificada. Las IgG específicas se unen sobre la fase sólida y son reveladas por ulterior incubación con un Mab de ratón anti-IgG humanas conjugado con Peroxidasa.

La determinación de las IgM ocurre con el método “de la captura”. Las IgM totales presentes en el suero se unen a la fase sólida sensibilizada con un monoclonal de ratón anti-IgM humanos. Después del lavado se añade un complejo formado por la nucleoproteína recombinante del virus Toscana biotinilada y el conjugado Streptavidina-peroxidasa.

En ambos casos el inmunocomplejo (para las IgG: IgG específicas anti-virus Toscana con anti-IgG marcadas con POD; para las IgM: IgM- nucleoproteína -biotina/Streptavidina-peroxidasa) se determina por adición del substrato que asume una coloración azul en presencia de peroxidasa. La coloración estable amarilla se obtiene por adición de una solución bloqueante.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

N.B. El presente kit contiene todos los reactivos necesarios para la titulación de las IgG y de las IgM. Los dos tipos de titulación se realizan separadamente.

- Los reactivos son suficientes para 2 x 48 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Para las IgG

MT PLATE MICROPLACA 3 x 2 tiras sensibilizadas con la nucleoproteína del Virus Toscana (recombinante) para la determinación de las IgG.

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (TV-G seguido por el número de lote); retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONTROL + SUERO DE CONTROL POSITIVO IgG 1 x 1.6 mL

Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos IgG anti-Toscana virus, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% % y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONTROL CUT-OFF SUERO DE CUT-OFF IgG 1 x 2 mL

Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos IgG anti-Toscana virus, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% % y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO IgG 2 x 5 mL

Contenido: una solución de anticuerpos monoclonales anti IgG humanos marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0,05% Y Bronidox 0,02%. Listo para su uso sin dilución adicional.

Para las IgM

MT PLATE MICROPLACA 3 x 2 tiras sensibilizadas con anticuerpos monoclonales anti-IgM humanos, para la determinación de las IgM.

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (I seguido por el número de lote); retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

Ag ANTÍGENO Polvo liofilizado x 6 frascos

Contenido: Antígeno recombinante del Virus Toscana unido a **biotina** en tampón fosfato conteniendo lactosa .

Preparación: Reconstituir con el volumen de conjugado indicado en la etiqueta.

CONJ CONJUGADO IgM

Contenido: Streptavidina conjugada con peroxidasa, en solución tampón. Listo para su uso sin dilución adicional.

El Inmunocomplejo se tiene que preparar unos 45 minutos antes de su uso.

- Reactivos comunes a las dos titulaciones**CONTROL -** IgG/ IgM CONTROL NEGATIVO (PF93900) 2 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Suero humano sin anticuerpos IgG e IgM, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución salina fosfato tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir

SAMP DIL 10 DILUYENTE 10 (PF93621) 1 x 100 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución de proteínas (10%) en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1 x 12 mL Listo para su uso. **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000)
- Lavadora de Microplacas (no indispensable) dispensante volúmenes entre 225-375 µL
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.

- Agua destilada u desionizada
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja .

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	CONDICIONES
MICROPLACA IgG e IgM	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
SUEROS DE CONTROL	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO IgG	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO IgM	5 SEMANAS 2/8°C
ANTÍGENO RECONSTITUIDO	la solución no se puede conservar y debe ser utilizada después de la reconstitución
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la caducidad a 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SOLUCION BLOQUEANTE	hasta la caducidad a 2/8°C

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Cuidado:

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido probados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos , cualquier material de origen humana debe ser considerado potencialmente infecto. Todos los materiales de origen humano tienen que manejarse según las prácticas comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, según disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El tampón de lavado contiene detergentes
 - b) El conjugado contiene fenol
 - c) El sustrato es ácido
 - d) Los controles contienen ázida sódica (0.09%) que con plomo y cobre puede formar depósitos explosivos de metales ázidas.

Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada . Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos . No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.** Abrir el envase con las tiras después de por lo menos media hora a temperatura ambiente.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroc্লórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación micróbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
 - instalación y requisitos específicos
 - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
 - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
 - mantenimiento y servicio técnico.

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Agitar con cuidado las muestras descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede conducir a resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictericas, hemolizadas o contaminadas.

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo es de 1 control negativo, 2 cut-off y 1 positivo para IgG, y 2 controles negativos para IgM. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato. Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo (anti-IgG para la determinación de las IgG u complejo antígeno/conjugado para la determinación de las IgM) e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.

Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.

Leer la Absorbancia (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

PASO 1	Poner 100 µL de suero diluido/controles en los pocillos. - - Incubar 45 min. a 37°C - Lavar 4 veces (300 µL) -
PASO 2	Añadir 100 µL de conjugado (anti-IgG para la determinación de las IgG u complejo antígeno/conjugado para la determinación de las IgM)a cada pocillo - Incubar 45 min. a 37°C - Lavar 4 veces (300 µL) -
PASO 3	Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo - Incubar 15 min. a T.A. -
PASO 4	Añadir 100 µL de Solución Bloqueante - Leer la D.O.a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.150) a todas las otras lecturas. Para la titulación de las IgG la D.O. del IgG Cut-off Control debe ser ≥ 0.200 . El Control Positivo debe tener D.O. de por lo menos 1.5 veces el valor del Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6 . Para la titulación de las IgM la D.O. del Control Negativo debe ser < 0.150 .

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Cálculo de Cut-Off IgM: añadir 0.250 a la D.O. del Control Negativo.

Resultados cualitativos

Si el valor de las absorbancia de la muestra es superior al cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de anticuerpos específicos para el antígeno. Calcular la relación (Index) entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off.

La muestra se considera:

Inmune: si la relación es > 1.2 .

Dudoso: si la relación es $\pm 20\%$ del cut-off.

No-inmune: relación es < 0.8 .

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

12. LIMITACIONES

El resultado del test debe ser todavía evaluado junto con datos procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

No se pueden excluir reacciones cruzadas por otros suerotipos en correlación del género Phlebovirus como Sicilia e Naples.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

Se evaluaron 97 sueros de pacientes pertenecientes a los siguientes 3 grupos:

1- 22 sueros de pacientes con síntomas neurológicos de meningitis por Virus Toscana

2- 22 sueros de sujetos pediátricos

3- 53 sueros de pacientes procedentes de la rutina.

Las muestras se evaluaron con el kit en objeto y los resultados se compararon con un sistema ELISA que utilizaba el antígeno nativo. Los casos en desacuerdo (0 en la determinación IgM e 10 en la determinación de las IgG) se analizaron en Western Blotting.

Los resultados obtenidos son resumidos aquí abajo:

Toscana virus IgG :

	Otro método	
	P	N
Diese P	38	2
N	2	55

Sensibilidad diagnóstica 95.0% (IC al 95%: 83.5-98.6%)

Specificidad diagnóstica 96.5 % (IC al 95%: 88.1-99.0%)

Toscana virus IgM :

	Altro metodo	
	P	N
Diese P	19	0
N	0	78

Sensibilidad diagnóstica 100.% (IC al 95%: 83.2-100%)

Specificidad diagnóstica 100 % (IC al 95%: 95.3-100%)

15. PRECISIÓN

Toscana virus IgG

Tab.1 Precisión intra-ensayo (12 replicados del Cut Off en tres lotes distintos)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n=12	0.384	0.234	0.386
CV%	8	11	6

Tab.2 Precisión entre pruebas (media del Index en tres lotes distintos)

	Lotes				
	036	037	038	media	cv%
Muestra					
1	0.79	0.65	0.5	0.65	22
2	1.74	1.36	1	1.55	17
3	2.4	3.2	2.5	2.7	16

Toscana Virus IgM

Tab.3 Precisión intra-ensayo (12 réplicados de una muestra border line)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n=12	0.235	0.245	0.387
CV%	5	5	9

Tab.4 Precisión entre pruebas (media del Index en tres lotes distintos)

	Lotes				
	036	037	038	media	cv%
Sample					
1	0.68	0.59	0.35	0.54	32
2	1.46	2.08	1.32	1.62	25
3	2.95	5.1	3.23	3.76	32

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Nicoletti L. et al. 1991. Central Nervous System involvement during infection by Phlebovirus Toscana of residents in natural foci in Central Italy (1977-1988). Am. J. Trop. Med. Hyg. 45, 429-434.
2. Schwarz et al. 1996. Immunoblot detection of antibodies to Toscana Virus. J. Medical Virology 49, 83-86.
3. Valassina M. et al. 1998. Diagnostic potential of Toscana virus in protein expressed in Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 36, 3170-3172.
4. Soldateschi D. et al. 1999. Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. J. Clin. Microbiol. 37, 649-652.



MODE D'EMPLOI

ENZY-WELL TOSCANA VIRUS IgG/IgM

REF 91067

(Français)

1. UTILISATION

MÉTHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DÉTERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgG ET DU VIRUS ANTI-TOSCANA IgM DANS LE SÉRUM HUMAIN. À UTILISER COMME AIDE AU DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIRUS TOSCANA.

2. INTRODUCTION

Le virus Toscana, appartenant au genre Phlebovirus de la famille Bunyaviridae, a été isolé pour la première fois en Italie en 1971. À partir de ce moment, sa présence a été constatée dans la région méditerranéenne et il a été démontré son rôle en tant qu'agent étiologique de la maladie humaine. La maladie causée par le virus Toscana se caractérise par de la fièvre, de grave mal de tête et une méningite ou méningo-encéphalite. L'infection est transmise par des insectes hématophages du genre Phlebotomus et, en raison du cycle de vie du vecteur, présente une tendance saisonnière, avec un pic en été. Les données épidémiologiques suggèrent que, dans les régions où le virus toscan est endémique, une grande partie et peut-être même la majorité des méningites aseptiques en été peuvent être causées par ce virus. Jusqu'à présent, le diagnostic d'infection au Virus Toscana était essentiellement sérologique.

Les anticorps spécifiques de la classe des IgM sont présents dans la phase aiguë de la maladie, tandis que la présence d'anticorps spécifiques de la classe des IgG, en l'absence d'IgM, indique une infection antérieure. Toutes les méthodes sérologiques utilisées jusqu'à présent ont en commun la nécessité de propager le virus dans des cultures cellulaires, ce qui nécessite des laboratoires spécialisés et exclut le diagnostic de l'infection dans la plupart des laboratoires de sérologie. Puisqu'il a été démontré que la nucléoprotéine virale est la cible principale des anticorps anti-Tuscany Virus, celle-ci a été exprimée par la technologie de l'ADN recombinant dans E. coli et utilisée pour réaliser un dosage immunoenzymatique destiné à la recherche d'IgG et d'IgM spécifiques afin de : faciliter l'investigation sérologique de ce virus.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le test est basé sur le principe ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

La détermination des IgG a lieu après l'incubation du sérum à tester avec une phase solide présensibilisée avec la nucléoprotéine recombinante du virus Tuscany hautement purifié. Les IgG spécifiques se lient à la phase solide et elles sont détectées à travers une incubation ultérieure avec un anticorps anti-IgG humain conjugué à la peroxydase.

L'IgM est déterminée par la méthode "capture". L'IgM totale présente dans le sérum est liée à la phase solide sensibilisée avec une IgM anti-humain monoclonal de souris. Après lavage, un complexe constitué de la nucléoprotéine recombinante du virus Toscana biotinylé et du conjugué streptavidine-peroxydase est ajouté.

Dans les deux cas, le complexe entier (pour IgG : anti-virus Toscana spécifique d'une IgG avec une anti-IgG marqué POD, pour IgM : nucléoprotéine-biotine / streptavidine-peroxydase de IgM) est déterminé par addition du substrat qui prend une coloration bleu en présence de peroxydase. La couleur jaune stable est obtenue par addition d'une solution bloquante.

4. COMPOSITION DU KIT ET PRÉPARATION DES RÉACTIFS

N.B. Ce kit contient tous les réactifs nécessaires à la détermination des IgG et des IgM. Les deux types de dosage sont effectués séparément.

- Les réactifs sont suffisants pour 2 x 48 déterminations.

Ramener à température ambiante avant utilisation.

Pour les IgG

MT PLATE MICROPLAQUE 3 x 2 bandes sensibilisées avec la nucléoprotéine du virus Toscana (recombinant) pour la détermination des IgG.

Utilisation : Ouvrez le boîtier de la plaque de l'autre côté du code (TV-G suivi du numéro de lot) qui sert pour sa identification ; prendre le support et les bandes nécessaires. Rangez les autres non utilisés dans le sac en polythène avec du gel de silice ; laissez l'air sortir et scellez en appuyant sur la fermeture

CONTROL + CONTRÔLE POSITIF IgG 1 x 1.6 mL

Contenu : Sérum humain dilué, à la concentration connue d'anticorps IgG anti-virus Toscana, dans un tampon phosphate à 0,01 mol / L contenant 1% de BSA et de l'azoture de sodium à 0,09%, prêt à l'emploi, sans autre dilution.
Couleur : la couleur est proportionnelle au titre d'anticorps

CONTROL CUT-OFF CONTRÔLE CUT-OFF IgG 1 x 2 mL

Contenu : Sérum humain dilué, à la concentration connue d'anticorps IgG anti-virus Toscana, dans un tampon phosphate à 0,01 mol / L contenant 1% de BSA et de l'azoture de sodium à 0,09%, prêt à l'emploi, sans autre dilution.
Couleur : la couleur est proportionnelle au titre d'anticorps

CONJ CONJUGUÉ IgG 2 x 5 mL

Contenu : une solution d'anticorps monoclonaux humains anti-IgG marqués avec peroxydase dans un tampon phosphate contenant 0,05% de phénol et 0,02% de Bronidox. Prêt à l'emploi sans dilution supplémentaire.

Pour les IgM

MT PLATE MICROPLAQUE 3 x 2 bandes sensibilisées avec des anticorps monoclonaux humains anti-IgM, pour la détermination des IgM.

Utilisation : Ouvrir les bandes du côté opposé au code (M, suivi du numéro de lot) utilisé pour son identification. Prendre le support et insérer les puits nécessaires. Ranger les autres non utilisés dans le sac en polythène avec du gel de silice ; laisser l'air sortir et sceller en appuyant sur la fermeture.

Ag ANTIGÈNE Liofilo x 6 flacons

Contenu : Antigène recombinant du virus Toscana lié à la biotine dans un tampon phosphate contenant du lactose.
Préparation : reconstituer avec le volume de conjugué indiqué sur l'étiquette.

CONJ CONJUGUÉ IgM 2 x 5 mL

Contenu : Streptavidine conjuguée à la peroxydase, en solution tampon. Prêt à l'emploi sans dilution supplémentaire.
Le complexe immunitaire doit être préparé environ 45 minutes avant utilisation.

- Réactifs communs aux deux dosages

CONTROL - IgG/IgM CONTRÔLE NÉGATIF 2 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS**

Contenu : Sérum humain, exempt d'anticorps IgG et IgM, dilué dans du tampon phosphate à 0,01 mol / L contenant 1% de BSA et 0,09% d'azoture de sodium, prêt à l'emploi, sans dilution supplémentaire.

WASH BUF 10x TAPIS DE LAVAGE 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS**

Contenu : solution saline tamponnée (PBS) concentrée 10 fois contenant 0,5% de Brij.
Préparation : Diluer le volume requis 1 :10 avec de l'eau distillée pour obtenir le tampon de lavage prêt à l'emploi. Si des cristaux sont présents, dissolvez-les à 37 ° C avant de les diluer.

SAMP DIL 10 DILUANT 10 (PF93621) 1 x 100 mL Prêt à l'emploi **INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS**

A utiliser pour la dilution de l'échantillon.
Contenu : Solution saline tamponnée (PBS) contenant 10% en poids de protéines et 0,09% d'azoture de sodium plus un colorant (méthyl orange).

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL Prêt à l'emploi **INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS**

Contenu : 0,26 mg / mL de tétraméthylbenzidine et 0,01% de H₂O₂ stabilisés dans un tampon citrate à 0,05 mol / L (pH 3,8)

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION BLOQUANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS**

Solution de 0,3 mol / L H₂SO₄ prête à l'emploi.

FILM DE PROTECTION (2).

ENVELOPPE EN POLYETHYLENE (1).

AUTRE MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI.

- Incubateur à 37°C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à OD >= 2 000)
- Laveur de microplaques (non indispensable) capable de distribuer des volumes compris entre 225 et 375 µL
- Eau distillée ou déminéralisée
- Verrerie de laboratoire normale : cylindres, tubes à essai, etc.
- Micropipettes capables de prélever avec précision 10, 100, 1000 µL de solution
- Gants à usage unique
- Horloge
- Solution d'hypochlorite de sodium à 5%
- Conteneurs pour la collecte de matériel potentiellement infecté
- Papier absorbant

5. MODALITÉ DE CONSERVATION ET STABILITÉ DES RÉACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à 2/8 ° C.

La date de péremption est imprimée sur chaque composant et sur l'étiquette extérieure de l'emballage.

Les réactifs ont une stabilité limitée après ouverture et / ou préparation :

RÉACTIF	CONDITIONS
MICROPLAQUE IgG e IgM	5 semaines 2/8°C sac en polyéthylène
CONTRÔLES	5 semaines 2/8°C
CONJUGUÉ IgG	5 semaines 2/8°C
CONJUGUÉ IgM	5 semaines 2/8°C
ANTIGÈNES RECONSTITUÉ	la solution n'est pas conservable et doit être utilisée après reconstitution
SUBSTRAT	jusqu'à expiration à 2/8 °C, 1 semaine ; 15/30°C dans le noir
ÉCHANTILLONS DE DILUANT	jusqu'à expiration à 2/8°C
TAPIS DE LAVAGE	p.utilisation 2 semaines 2/8°C, 5 journées 15/30 °C
SOLUTION BLOQUANTE	jusqu'à expiration à 2/8°C

6. PRÉCAUTIONS

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO SEULEMENT.

Attention :

Ce kit contient des matériaux d'origine humaine qui ont été testés et jugés négatifs par des tests approuvés par la FDA pour les anticorps HBsAg et anti-VIH-1, anti-VIH-2 et anti-VHC. Etant donné qu'aucun test de diagnostic ne peut offrir une garantie complète en absence d'agents infectieux, tout matériel d'origine humaine doit être considéré comme potentiellement infecté. Tous les réactifs et les échantillons doivent être manipulés conformément aux normes de sécurité habituellement adoptées par le laboratoire.

Élimination des résidus : les échantillons de sérum et les réactifs utilisés doivent être traités comme des résidus infectés, puis éliminés conformément à la législation en vigueur.

Avertissement pour la sécurité personnelle

7. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des gants jetables et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et pendant le test. Laver soigneusement les mains une fois le test terminé.
8. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
 - e) Le tampon de lavage contient des détergents
 - f) Le conjugué contient du phénol
 - g) Le substrat est acide
 - h) Les contrôles contiennent de l'azoture de sodium (0.09%) qui, avec le plomb et le cuivre, peut former des dépôts d'azotures métalliques extrêmement explosifs.

Si un réactif entre en contact avec la peau ou les yeux, laver abondamment à l'eau.
9. Le matériel non jetable doit être stérilisé après utilisation, de préférence en autoclave pendant 1 heure à 121°C; les produits jetables doivent être autoclavés ou incinérés.
10. L'acide sulfurique contenu dans la Stop Solution et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver abondamment à l'eau.

11. Les acides neutralisés et autres déchets liquides doivent être désinfectés en ajoutant de l'hypochlorite de sodium à un volume suffisant pour atteindre une concentration finale d'au moins 1%. Une exposition à 1% d'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes devrait suffire à garantir une désinfection efficace.
12. Tout déversement de matériel potentiellement infecté doit être immédiatement éliminé avec du papier absorbant et la zone polluée doit être nettoyée, par exemple avec de l'hypochlorite de sodium à 1%, avant de poursuivre le travail. Si un acide est présent, l'hypochlorite de sodium ne doit pas être utilisé avant que la zone ne sèche. Tous les matériaux utilisés pour nettoyer tout déversement accidentel, y compris les gants, doivent être jetés comme déchets potentiellement infectieux. Ne pas autoclaver les matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.

Avertissements analytiques

14. Avant utilisation, ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18-30 °C). Conservez les réactifs à la température de stockage recommandée immédiatement après utilisation. **Il est important d'avoir un thermostat correct pour l'incubation des barrettes. Vérifiez que le thermostat ne tombe pas en dessous de 35 °C et ne dépasse pas 39 °C.**
Ouvrez l'enveloppe contenant les barrettes au moins une demi-heure à température ambiante.
15. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption. Éviter la contamination microbienne des réactifs car cela réduirait la validité du produit et pourrait donner des résultats incorrects.
16. Ne modifier pas la procédure et ne remplacer pas les réactifs par ceux d'autres fabricants ou de lots, à moins qu'il soit spécifiquement indiqué que le réactif est interchangeable entre les lots. Ne réduire pas les temps d'incubation recommandés.
17. Toute la verrerie à utiliser pour le test doit être soigneusement lavée avec de l'acide chlorhydrique 2M et rincée avec de l'eau distillée ou déminéralisée.
18. Ne pas exposer les réactifs à une lumière intense ou à des vapeurs d'hypochlorite pendant les étapes de stockage et d'incubation.
19. Évitez que les puits ne se dessèchent pendant le test.
20. Éviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes "dédiées".
21. Éviter de toucher le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
22. Les dosages immunoenzymatiques peuvent parfois avoir un effet de bord particulier ("effet de bord") ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les étapes d'incubation. Les plaques doivent être recouvertes avec des plaques de couverture et incubées à 37 °C ou au bain-marie à l'aide d'un porte-plaque ou dans un incubateur. En variante, les plaques peuvent être incubées dans un analyseur approprié. Pour plus de détails, consultez le manuel d'utilisation approprié de l'instrument. Les incubateurs à CO₂ ne peuvent pas être utilisés.
23. Avant de lire la plaque, assurez-vous que le bas de la plaque est propre et sec et qu'il n'y a pas de bulles d'air à la surface du liquide.
24. L'utilisation d'échantillons fortement hémolysés, de sérum non complètement coagulé ou d'échantillons présentant une pollution microbienne peut être une source d'erreur.
25. L'utilisation du kit avec l'outil automatique doit être validée par l'utilisateur.
26. Lire le manuel d'utilisation de tout instrument utilisé, en particulier en référant aux points suivants :
 - installation et exigences spéciales
 - principe de fonctionnement, instructions, précautions, risques
 - spécifications du fabricant et performances de l'instrument
 - entretien et assistance technique

7. TYPE D'ÉCHANTILLON ET CONSERVATION

Le type d'échantillon est représenté par le sérum obtenu à partir du sang prélevé pour une ponction veineuse normale et manipulé avec les précautions appropriées requises par les procédures de laboratoire standard. Le sérum frais peut être conservé pendant 4 jours à 2/8 °C plus longtemps à -20 °C et peut subir jusqu'à 3 décongelations au maximum. Éviter d'utiliser des auto-congélateurs à dégivrage pour conserver les échantillons. Les échantillons décongelés doivent être soigneusement agités avant le dosage. L'inactivation à la chaleur peut donner des résultats erronés. La qualité des échantillons peut être sérieusement affectée par une contamination microbienne qui peut entraîner à des résultats erronés.

Les échantillons fortement lipémiques, ictériques ou pollués ne doivent pas être utilisés.

Le test n'est pas applicable au plasma humain.

8. PROCÉDURE

- Préparer les puits nécessaires.
- Préparer le tampon de lavage en diluant le Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Préparer l'antigène en reconstituant le liophile avec le volume de conjugué indiqué sur l'étiquette.

Diluer les échantillons 1 :101 en distribuant 10 µL de sérum dans 1 mL de diluant, répartir 100 µL de chaque échantillon dilué, par puits (il est préférable de réaliser l'analyse en double). Placer les contrôles NON DILUÉS dans

une barrette (100 µL par puits). Le minimum requis est 1 contrôle négatif, 2 seuils et 1 positif pour IgG et 2 contrôles négatifs pour IgM. Prévoir un puits libre pour réaliser le blanc en utilisant seulement 100 µL du mélange de substrat. Les puits sont recouverts d'un film protecteur et incubés pendant 45 min. à 37 °C. Après 4 lavages de 30 secondes chacun (300 µl), ajouter 100 µL du conjugué (anti-IgG pour la détermination de l'IgG ou complexe antigène / conjugué pour la détermination de l'IgM) par puits, puis incubé à nouveau pendant 45 minutes. min. à 37 °C recouvrant les puits du film protecteur. La plaque est à nouveau lavée 4 fois comme décrit ci-dessus, puis le substrat est distribué, 100 µL/puits. Après 15 min à température ambiante, la réaction enzymatique est bloquée avec 100 µL de solution d'arrêt. L'absorbance (D.O.) est lue à 450 nm ou à 450/620 nm en moins de 30 minutes.

9. PLAN DE L'ÉSSAI

STEP 1	Mettre 100 µL de sérum dilué / contrôles dans les puits
	Incuber 45 min. à 37°C
	Laver 4 fois (300 µl)
STEP 2	Mettre 100 µL de conjugué (anti-IgG pour la détermination des IgG. Antigène /conjugué pour la détermination des IgM) par puits.
	Incuber 45 min. à 37°C
	Laver 4 fois (300 µl)
STEP 3	Mettre 100 µL de substrat par puits
	Incuber 15 min. à t.a.
STEP 4	Ajouter 100 µL de Stop Solution
	Lire l'O.D. à 450 nm dans 30 min.

10. VALIDATION DU TEST

Supprimez la valeur de blanc (≤ 0.150) de toutes les autres lectures. Pour la détermination de l'IgG, la D.O. du contrôle de coupure d'IgG doit être ≥ 0.200 . Le positif doit avoir D.O. au moins 1,5 fois la coupure. Le rapport entre négatif et seuil doit être ≤ 0.6 . Pour le test IgM, la densité optique du contrôle négatif doit être < 0.150 .

11. INTERPRÉTATION DU TEST

Calcul Cut-Off IgM : ajouter 0.250 à la OD du contrôle négatif.

Résultats qualitatifs

Si la valeur d'absorbance de l'échantillon est supérieure à la valeur seuil, l'échantillon est positif en raison de la présence d'anticorps spécifiques à l'antigène.

Calculer le rapport (Index) entre la valeur moyenne de D.O. de l'échantillon considéré et celui du Cut-Off. L'échantillon sera jugé :

Positif : lorsque le ratio est > 1.2 .

Doute : $= \pm 20\%$ du Cut-off.

Négatif : lorsque le rapport est < 0.8 .

En cas de doute, répéter le test. Si le résultat reste douteux, répéter le prélèvement.

12. LIMITATIONS DU TEST

Le résultat du test doit cependant être évalué avec les données d'autres investigations diagnostiques.

13. SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

Des réactions croisées avec d'autres sérotypes apparentés du genre Phlebovirus, tels que Sicile et Naples, ne peuvent pas être exclues.

14. SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE

97 Sérums de patients appartenant aux 3 groupes suivants ont été testés :

4- 22 sérums de patients présentant des symptômes neurologiques de méningite à virus Toscana

5- 22 sérums de sujets pédiatriques

6- 53 sérums de patients issus de la routine.

Les échantillons ont été testés avec le kit en question et les résultats ont été comparés à un système Elisa utilisant l'antigène natif. Les cas discordants (0 en détermination d'IgM et 10 en détermination d'IgG) ont été analysés en Western Blotting. Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous :

Toscana virus IgG

	Autre méthode	
	P	N
Diesse P	38	2
N	2	55

Sensibilité diagnostique 95.0% (IC al 95 % : 83.5-98.6%)

Spécificité diagnostique 96.5 % (IC al 95 % : 88.1-99.0%)

Toscana virus IgM

	Autre méthode	
	P	N
Diesse P	19	0
N	0	78

Sensibilité diagnostique 100 % (IC al 95 % : 83.2-100%)

Spécificité diagnostique 100 % (IC al 95 % : 95.3-100%)

15. PRÉCISION

Toscana virus IgG

Tab.1 Précision dans le test (12 répliques du Cut Off en trois lots différents)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n =12	0.384	0.234	0.386
CV%	8	11	6

Tab.2 Précision entre tests (Index moyen sur trois lots différents)

	Lots				
	036	037	038	moyenne	cv%
Échantillon					
1	0.79	0.65	0.5	0.65	22
2	1.74	1.36	1	1.55	17
3	2.4	3.2	2.5	2.7	16

Toscana Virus IgM

Tab.3 Précision dans le test (12 répliques d'un échantillon borderline)

O.D.	Lot. N. 36	37	38
Cut Off n=12	0.235	0.245	0.387
CV%	5	5	9

Tab.4 Précision entre tests (Index moyen sur trois lots différents)

	Lots				
	036	037	038	moyenne	cv%
Échantillon					
1	0.68	0.59	0.35	0.54	32
2	1.46	2.08	1.32	1.62	25
3	2.95	5.1	3.23	3.76	32

16. GUIDE AUX PROBLÈMES D'UTILISATION

PROBLÈME	SOURCES D'ERREUR POSSIBLES	ACTIONS À ENTREPRENDRE
Session invalide (tout négatif)	Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été ajoutés ou ils ont été ajoutés dans le mauvais ordre	Vérifier la procédure à nouveau. Vérifier si aucun réactif n'a été ajouté. Répéter le test.
	Plaque non réactive	Vérifier le code sur l'enveloppe de la plaque (voir l'étape 4 pour le code correct).
		Vérifier qu'il n'y a pas d'humidité dans la plaque non utilisée. (Le gel de silice doit être jaune pâle). Répéter le test.
Session invalide (tout positif)	Pollution du substrat	Prendre une nouvelle aliquote du substrat.
	Lavage inadéquat	S'assurer que la laveuse fonctionne correctement
Mauvaise précision	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que la laveuse fonctionne correctement
	Erreur de pipetage	Vérifier le fonctionnement de la pipette
	Addition de réactif trop lent	Éviter de sécher la plaque après le lavage. Ajouter les réactifs immédiatement.
	Présence de bulles d'air	Éviter la formation de bulles d'air lors du pipetage.
	Chemin optique pas clair	Vérifier la source de lumière pour la saleté. Nettoyer le fond de la plaque avec un mouchoir en papier.
Développement de couleur insuffisant	Temps ou température d'incubation incorrect	Vérifier la température et le temps d'incubation.
		Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
	Substrat ajouté dans un volume insuffisant	Vérifier le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

1. Nicoletti L. et al. 1991. Central Nervous System involvement during infection by Phlebovirus Toscana of residents in natural foci in Central Italy (1977-1988). Am. J. Trop. Med. Hyg. 45, 429-434.
5. Schwarz et al. 1996. Immunoblot detection of antibodies to Toscana Virus. J. Medical Virology 49, 83-86.
6. Valassina M. et al. 1998. Diagnostic potential of Toscana virus in protein expressed in Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 36, 3170-3172.
7. Soldateschi D. et al. 1999. Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. J. Clin. Microbiol. 37, 649-652.

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbricante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote



DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577-587111