ENZY-WELL

CHIKUNGUNYA IgG

REF 91133 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by:
DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) – Italy

	Capitolo Section
Modifiche introdotte nella revisione corrente **Changes introduced in the current revision**	**4 – 5 – 8 – 9**

CE

INDICE/INDEX

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE

2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE

9. SCHEMA DEL PROTOCOLLO DI PROVA / SCHEME OF TEST PROCEDURE

10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF THE RESULTS

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

13. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

14. PRECISIONE / PRECISION

15. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" GUIDE

16. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

ISTRUZIONI PER L'USO

ENZY-WELL
CHIKUNGUNYA IgG

REF **91133** **(Italiano)**

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI CHIKUNGUNYA VIRUS NEL SIERO UMANO, DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA CHIKUNGUNYA VIRUS.

2. INTRODUZIONE

Il Chikungunya, è un virus appartenente alla famiglia delle Togaviridae, genere Alphavirus che causa una malattia virale "febbre da virus Chikungunya" trasmessa dalla puntura di zanzare infette quali Aedes albopictus (zanzara tigre) e Aedes aegypti. La malattia da Chikungunya spesso mostra gli stessi sintomi di quella provocata dal Virus Dengue quali febbre, cefalea, dolore articolare con e senza segni di flogosi e rush cutaneo. Sebbene siano rare le complicazioni serie, i dolori articolari possono persistere per mesi o addirittura anni dopo l'infezione.
La malattia è attualmente endemica in Africa, India e Asia sud orientale, la rilevazione dei casi importati è associata, principalmente, ai viaggi in tali aree.
È possibile il rischio di trasmissione tramite sangue infetto, da qui l'importanza di test sierologici per la diagnosi e per le donazioni di sangue e/o organi.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
L'antigene, costituito da chikungunya virus inattivato, viene legato alla fase solida (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene.
Dopo lavaggi per eliminare le immunoglobuline che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti-IgG umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP).
Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per HRP.
Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame. Quando la reazione enzimatica è interrotta per aggiunta di una soluzione di acido solforico la colorazione gialla che ne risulta può essere facilmente letta in un lettore per micropiastre ELISA.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 pozzetti sensibilizzati con virus Chikungunya inattivato.
Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (CH 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.

CONJ CONIUGATO 1x15 mL
Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti-IgG umane marcati con HRP in tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL - CONTROLLO NEGATIVO (PF93933) 1x1.6 mL
Contenuto: Siero umano, privo di anticorpi anti-Chikungunya, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO (PF91836) 1x1.6 mL
Contenuto: Siero umano contenente anticorpi IgG anti-Chikungunya, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT OFF (PF91835) 1x2 mL

Contenuto: Siero umano contenente anticorpi IgG anti-Chikungunya, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1x100 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

SORBENT CHG ADSORBENTE (PF30181) 1x6 mL
Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0.09% più colorante (metilarancio).

DILUENT CHK DILUENTE CAMPIONI (PF30266) 1x60 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Da utilizzare per la diluizione dei campioni.
Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0.09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H_2O_2 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Soluzione di H_2SO_4 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 e 405 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
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µL di soluzione

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITÁ 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	6 SETTIMANE 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	6 SETTIMANE 2/8°C
CONIUGATO	6 SETTIMANE 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C; 1 settimana a 15/30°C, conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
ADSORBENTE	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p. uso 2 settimane 2/8°C; 5 giorni 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. In merito alle caratteristiche di sicurezza dei reagenti contenuti nel kit consultare la Schede di Sicurezza (disponibile su richiesta).
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 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, lepiastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
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'utilizzo del kit con strumenti 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°C, 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. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.
Campioni fortemente lipemici, itterici, emolizzati o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il tampone di lavaggio 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Diluire i campioni 1:51 dispensando 10 µL di siero in 0.500 mL di Diluent CHK.
- Dispensare i controlli non diluiti (100 µL per pozzetto) almeno in doppio.
- Dispensare 50 µL di Sorbent CHG in ciascun pozzetto in cui andranno i sieri in esame ed aggiungere 50 µL di ciascun campione diluito.
- Lasciare un pozzetto della strip per il bianco (100 µL di 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 per ciascun 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. Rileggere a 405 nm se ci sono OD superiori a 2.000.

9. SCHEMA DEL PROTOCOLLO DI PROVA

Tecnica manuale

STEP 1	Mettere 100 µl di controlli non diluiti nei pozzetti della strip
STEP 2	Mettere 50 µL di Sorbent CHG nei pozzetti destinati ai campioni
STEP 3	Aggiungere 50 µL di siero diluito 1:51
	Incubare 45 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte (300 µl)
	-
STEP 4	Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto
	-
	Incubare 45 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte (300 µl)
	-
STEP 5	Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto
	-
	Incubare 15 min. a T.A.
	-
STEP 6	Aggiungere 100 µL di Stop Solution
	-
	Leggere la D.O. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (< 0.150) a tutte le altre letture.

Controllo negativo: Il rapporto tra la D.O. del controllo negativo e la D.O. del cut-off deve essere < 0.6.
Controllo positivo: il controllo positivo deve avere una D.O. di almeno 1.5 volte quella del siero cut-off.
Controllo cut-off: la D.O. del cut-off deve essere > 0.200.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Calcolare il Rapporto D.O. campione/D.O. Cut-Off (Index).
Il campione è considerato:

Positivo: se l'Index è >1.1
Negativo: se l'Index è < 0.9
Dubbio: se l'Index è compreso tra 0.9 e 1.1

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.
Il livello delle IgM anti-Chikungunya dovrebbe essere determinato usando il kit Enzy-Well Chikungunya IgM (REF 91134). Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgG.
Plasma o siero inattivato al calore non dovrebbe essere usato in quanto non ne sono stati studiati gli eventuali effetti.
Campioni contenenti anticorpi noti per dare cross-reazioni con il virus Chikungunya non sono stati studiati per potenziali interferenze.
Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti dalla storia del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

13. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione sono stati analizzati 125 campioni con il kit Diesse e con un altro kit del commercio.
Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	**-**	**Totale**
Diesse	+	30	0	30
	-	0	95	95
	Totale	30	95	125

Sensibilità Diagnostica: 100.0% ($CI_{95\%}$: 88.6-99.9)
Specificità Diagnostica: 100.0% ($CI_{95\%}$: 96.1-99.9)

14. PRECISIONE

Campione	**All'interno della seduta**	
	Media (Index)	**CV%**
1	0.2	-
2	2.9	7.2

Campione	**Tra sedute**	
	Media (Index)	**CV%**
1	0.3	13.3
2	1.2	12.5
3	3.4	2.4
4	5.9	14.9

15. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBLI 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	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	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.

16. BIOBLIOGRAFIA

1. Abrahm & Shridharan "Chikungunya Virus Infection a Resurgent Scourge "Indian J. med. Res. 126, December 2007, pp 502-504
2. M. Chhabra, V. Mittal, D. Bhattacharya, UVS Rana, S Lal "Chikungunya Fever: a re-emerging viral infection" Indian J. of Medical Microbiology, 2008- 26(1): pp 5-12

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL
CHIKUNGUNYA IgG

REF 91133 **(English)**

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO CHIKUNGUNYA VIRUS IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Chikungunya Virus, belonging to Togaviridae family, genus Alphavirus, causes a disease called "Chikungunya Fever" spread by bite of Aedes albopictus (tiger mosquito) and Aedes aegypti mosquito.
Chikungunya Virus often produces a mild illness that may be confused with Dengue Virus, indeed symptoms include fever, headache, arthralgia, myalgia and rush.
Although serious complications are uncommon arthralgia can be debilitating and may persist for months, or even years, after infection.
The disease is endemic to Africa, India and South-East Asia, while its detection outside of these countries is normally related to trips to those areas.
The potential risks of transmission through donations of blood or organs should also be considered. For this reason it is of great importance to conduct the serological tests for the diagnosis and for blood and organs donations.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
The antigen, composed of inactivated chikungunya virus, is bound to the solid phase (8-well strips). The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.
After washings to eliminate the immunoglobulins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies conjugated to horse radish peroxidise (HRP).
The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added.
The blue colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.
When the enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulphuric acid solution, the yellow colour which develops can be easily read using a microplate reader.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

Bring to room temperature before use.

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells coated with inactivated Chikungunya virus.
Use: open the package on the opposite side from the code (CH 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.

CONJ CONJUGATE 1x15 mL
Contents: human anti-IgG monoclonal antibodies labelled with HRP, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

CONTROL - NEGATIVE CONTROL (PF93933) 1x1.6 mL
Contents: Human serum not containing anti-Chikungunya antibodies, diluted in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use without further dilution.

CONTROL + POSITIVE CONTROL (PF91836) 1x1.6 mL
Contents: Human serum, containing anti-Chikungunya IgG antibodies, diluted in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF CONTROL (PF91835) 1x2 mL

Contents: Human serum, containing anti-Chikungunya IgG antibodies, diluted in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 1x100 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.

SORBENT CHG SORBENT (PF30181) 1x6 mL
Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0.09% containing methyl orange as dye.

DILUENT CHK SAMPLE DILUENT (PF30266) 1x60 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
To be used to diluite samples.
Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0.09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and H_2O_2 0.01% stabilized in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
H_2SO_4 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 and 405 nm, with linearity up to OD ≥ 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 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	6 weeks at 2/8°C, polythene bag
CONTROLS	6 weeks at 2/8°C
CONJUGATE	6 weeks at 2/8°C
SUBSTRATE	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15/30°C; store in the dark
SAMPLE DILUENT	up to the expiry date at 2/8°C
SORBENT	up to the expiry date at 2/8°C
WASH BUFFER	ready for use 2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C
STOP SOLUTION	up to 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. Consult the relative Material Safety Data Sheet (available on request) for all the information on safety concerning the reagents contained in the kit.
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. 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 sbould 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. CO_2 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. The use of the kit with automated equipment has to 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 shaken carefully before use. 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.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Dilute samples 1:51 distributing 10 µL of serum into 0.500 mL of Diluent CHK.
- Dispense undiluted controls (100 µL per well) in duplicate at least.
- Dispense 50 µL of Sorbent CHG in each well where the examined sera will be placed and add 50 µL of each diluted sample.
- Leave one well for the blank (100 µL of substrate)

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 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. Take the reading again at 405 nm if there are OD higher than 2.000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

Manual Technique

STEP 1 Place 100 µL of undiluted controls in the strip wells.
-
STEP 2 Place 50 µL of Sorbent CHG to the wells for the samples.
-
STEP 3 Add 50 µL of diluted serum 1:51
-
Incubate for 45 min. at 37°C
-
Wash 4 times (300 µL)
-
STEP 4 Add 100 µL of conjugate to each well
-
Incubate for 45 min. at 37°C
-
Wash 4 times (300 µl)
-
STEP 5 Add 100 µL of Substrate to each well
-
Incubate for 15 min. at R.T.
-
STEP 6 Add 100 µL of Stop Solution
-
Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the blank (< 0.150) from all the other readings.

Negative control: the ratio between the negative control OD and cut-off OD must be < 0.6.
Positive control: the positive control must have an OD at least 1.5 times higher than the cut-off.
Cut-off control: the OD of the cut-off must be > 0.200.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Calculate the ratio O.D. sample/OD Cut-off (Index).
The sample is considered:

Positive: if the Index is > 1.1
Negative: if the Index is < 0.9
Doubtful: if the Index is between 0.9 and 1.1

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.
The Chikungunya IgM level should be determined using Enzy-Well Chikungunya IgM kit (REF 91134). Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level.
Plasma or heat-inactivated serum should not be used since it is not known how they could affect the test.
Samples containing antibodies known to give cross-reactions with Chikungunya Virus have not been studied for the potential effects.
The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of the case history or other diagnostic procedures.

13. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In an experimentation 125 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit.
Data are summarized in the following table:

		Reference		
		+	**-**	**Total**
Diesse	+	30	0	30
	-	0	95	95
	Total	30	95	125

Diagnostic Sensitivity: 100.0% ($CI_{95\%}$: 88.6-99.9)
Diagnostic Specificity: 100.0% ($CI_{95\%}$: 96.1-99.9)

14. PRECISION

Sample	**Within-run Precision**	
	Mean (Index)	**CV%**
1	0.2	-
2	2.9	7.2

Sample	**Between-run Precision**	
	Mean (Index)	**CV%**
1	0.3	13.3
2	1.2	12.5
3	3.4	2.4
4	5.9	14.9

15. 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 paragraph 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.

16. REFERENCES

1. Abrahm & Shridharan "Chikungunya Virus Infection a Resurgent Scourge "Indian J. med. Res. 126, December 2007, pp 502-504
2. M. Chhabra, V. Mittal, D. Bhattacharya, UVS Rana, S Lal "Chikungunya Fever: a re-emerging viral infection" Indian J. of Medical Microbiology, 2008- 26(1): pp 5-12

	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 «ν» 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 S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) – Italy
Tel. 0577-587111

CE