



CHORUS

TOSCANA VIRUS IgG

REF 81067

REF 81067/12

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

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Cambios introducidos en la revisión actual Alterações introduzidas na revisão atual	4



INDICE / INDEX/ ÍNDICE

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE/ INDICACIONES DE USO / FINALIDADE
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTRODUÇÃO
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPIO DE AÇÃO
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / REAGENTES DO KIT E PREPARO
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TIPO E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE /PROCEDIMIENTO / PROCEDIMENTO DO TESTE
9. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / VALIDACIÓN DEL TEST / ESPECIFICAÇÕES DE VALIDAÇÃO
10. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
11. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITACIONES /LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO
12. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / ESPECIFICIDADE ANALITICA
13. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY/ SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO / SENSIBILIDADE E ESPECIFIDADE CLÍNICA
14. PRECISIONE / PRECISION / REPRODUCIBILIDAD / PRECISÃO
15. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA



ISTRUZIONI PER L'USO

CHORUS TOSCANA VIRUS IgG

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI TOSCANA VIRUS NEL SIERO UMANO CON DISPOSITIVO MONOUSO APPLICATO ALLO STRUMENTO CHORUS.

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.

Il complesso viene determinato per addizione del substrato che assume una colorazione blue in presenza di perossidasi.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

I dispositivi monouso contengono tutti i reagenti per eseguire il test quando applicati allo strumento Chorus.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Il kit è sufficiente per 36 determinazioni (REF 81067).

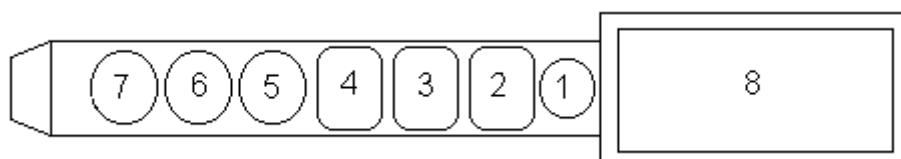
Il kit è sufficiente per 12 determinazioni (REF 81067/12).

DD DISPOSITIVI

6 confezioni da 6 dispositivi ciascuna (REF 81067).

2 confezioni da 6 dispositivi ciascuna (REF 81067/12).

Uso: **equilibrare una busta a temperatura ambiente**, aprire la busta, prelevare i dispositivi occorrenti; riporre gli altri nella busta contenente il gel di silice, far uscire l'aria e **sigillare** premendo sulla chiusura. Conservare a 2/8°C.



Descrizione:

Posizione 8: Spazio disponibile per etichetta con codice a barre

Posizione 7: vuota

Posizione 6: POZZETTO DI MICROPIASTRA sensibilizzato con la nucleoproteina ricombinante del virus Toscana.

Posizione 5: POZZETTO DI MICROPIASTRA non sensibilizzato.

Posizione 4: SUBSTRATO TMB

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H₂O₂ 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

Posizione 3: DILUENTE PER I CAMPIONI

Contenuto: Soluzione proteica, contenente fenolo 0.05%, Bronidox 0.02% e un indicatore per rivelare la presenza di siero.

Posizione 2: CONIUGATO

Contenuto: anticorpi monoclonali anti-IgG umane marcati con perossidasi, in soluzione tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

Posizione 1: POZZETTO VUOTO dove l'utilizzatore deve dispensare il siero indiluito.

CALIBRATOR CALIBRATORE 1 x 0.425 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi con Proclin e Gentamicina, liquido, pronto all'uso.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 0.425 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi con Proclin e Gentamicina, liquido, pronto all'uso.

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 – 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente volumi di 50-200 µl
- Guanti mono-uso
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C. Nel caso di una errata temperatura di conservazione deve essere ripetuta la calibrazione e controllata la correttezza del risultato tramite il siero di controllo (vedi capitolo 9 validazione del test).

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:

DISPOSITIVI	8 settimane a 2/8°C
CALIBRATORE	8 settimane a 2/8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane 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, i calibratori e le strip usate 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. Lavare accuratamente le mani una volta inseriti i dispositivi nello strumento CHORUS .
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il coniugato contiene fenolo

b) Il substrato è acido

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.

3. 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.
4. 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

Prima dell'uso, portare i dispositivi da utilizzare a temperatura ambiente (18-30°C) ed impiegare entro 60 minuti.

1. **Scartare i device con substrato (pozzetto 4) colorato di blu.**
2. Nell'aggiungere il campione al pozzetto verificare che sia perfettamente distribuito sul fondo.
3. Controllare l'effettiva presenza dei reagenti nel dispositivo e la integrità del dispositivo stesso, non utilizzare dispositivi che al controllo visivo presentano mancanza di qualche reagente.
4. I dispositivi devono essere utilizzati insieme allo strumento Chorus, seguendo rigorosamente le Istruzioni per l'Uso e il Manuale dello strumento
5. Controllare che lo strumento Chorus sia impostato correttamente (vedi Manuale d'uso Chorus).
6. Non alterare il codice a barre posto sulla impugnatura del device al fine di permetterne la corretta lettura da parte dello strumento.
7. Codici a barre difettosi possono essere inseriti manualmente nello strumento.
8. Non esporre i dispositivi a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e l'uso.
9. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, o campioni che presentano inquinamento microbico.
10. Prima di inserire il dispositivo sullo strumento Chorus accertarsi che il pozzetto di reazione non contenga corpi estranei.
11. Pipettare il siero in esame (50 µl) nel pozzetto 1 del dispositivo (vedi figura).
12. Non utilizzare il dispositivo dopo la data di scadenza

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Dopo scongelamento agitare con cura prima del dosaggio. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati errati.

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

Il test non è applicabile a plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

1. Aprire la busta (lato contenente la chiusura a pressione), prendere il numero di dispositivi necessario per eseguire gli esami e conservare gli altri richiudendo la busta dopo aver fatto uscire l'aria.
2. Controllare visivamente lo stato del dispositivo secondo le indicazioni riportate nel capitolo 6 Avvertenze Analitiche punti 1 e 8.
3. Dispensare nel pozzetto n°1 di ciascun dispositivo 50 µl di siero indiluito da analizzare, ad ogni cambio di lotto utilizzare un dispositivo per il calibratore.
4. Introdurre i dispositivi sullo strumento Chorus. Eseguire la calibrazione (se richiesto) ed il test come riportato nel Manuale di Istruzione dello strumento.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Utilizzare il siero di controllo per verificare la correttezza del risultato ottenuto, processandolo come indicato nel manuale d'uso dello strumento. Se lo strumento segnala che il siero di controllo ha un valore fuori dal range di accettabilità occorre effettuare nuovamente la calibrazione. I risultati precedenti verranno corretti automaticamente.

Se il risultato del siero di controllo continua ad essere fuori dall'intervallo di accettabilità, contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Lo Strumento Chorus fornisce il risultato in INDEX (rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off) che può essere impiegato come una misura quantitativa essendo proporzionale alla quantità di IgG specifiche.

Il campione risulterà :

Negativo: quando il risultato è < 0.8

Dubbio/Equivoco: quando il risultato è compreso fra 0.8 e 1.2

Positivo: quando il risultato è > 1.2

In caso di risultato dubbio/equivoco ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio/equivoco, ripetere il prelievo dopo 1-2 settimane.

11. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

12. SPECIFICITA' ANALITICA

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

13. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

Sono stati testati 52 campioni a confronto con un metodo Toscana IgG del commercio. 33 sono risultati positivi e 13 negativi con entrambi i metodi. La tabella seguente riassume i dati in cui si riportano i risultati discordi: 5 falsi negativi ed 1 falso positivo.

		RIFERIMENTO	
		+	-
CHORUS	+	33	1
	-	5	13

Il kit mostrava una sensibilità dell' 87% (CI 95%: 72–94) ed una specificità del 93% (CI 95%: 69–99).

14. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta

	No. di repliche	Media Index	Dev. St.	CV%
Lotto no. 017	8	1.8	0.11	6
Lotto no. 018	9	2.9	0.26	9
Lotto no. 019	9	3.3	0.27	8

Precisione tra sedute e tra lotti

Campione	Media Index			Media	Dev. St.	CV%
	Lotto 017	Lotto 018	Lotto 019			
TVG 1	0.7	0.7	0.5	0.6	0.12	20
TVG 2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.12	11
TVG 3	2.2	2.0	2.3	2.2	0.15	7

15. 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

CHORUS TOSCANA VIRUS IgG

(English)

1. INTENDED USE

QUALITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO TOSCANA VIRUS IN HUMAN SERUM, USING A DISPOSABLE DEVICE APPLIED ON THE CHORUS INSTRUMENT

2. INTRODUCTION

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 METHOD

The test is based on the ELISA principle (Enzyme linked Immunosorbent Assay). The IgG are determined after incubation of the test serum with a precoated solid phase sensitized with recombinant nucleoprotein of highly purified Toscana virus. The specific immunoglobulins are bound to the solid phase and are detected through further incubation with a mouse Mab anti-human IgG conjugated to peroxidase.

The complex is determined by addition of the substrate which takes on a blue colour in the presence of peroxidase. The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. The disposable devices contain all the reagents to perform the test when applied on the Chorus instrument.

4. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

The kit is sufficient for 36 tests (REF 81067).

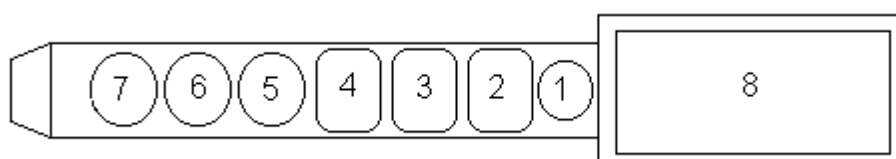
The kit is sufficient for 12 tests (REF 81067/12).

DD DEVICES

6 packages each containing 6 devices (REF 81067).

2 packages each containing 6 devices (REF 81067/12).

Use : **equilibrate a package at room temperature**, open the package and remove the devices required; replace the others in the bag with the silica gel, expel the air and **seal** by pressing the closure. Store at 2-8°C.



Description:

Position 8: Space for application of bar code label

Position 7: empty

Position 6: MICROPLATE WELL coated with recombinant nucleoprotein of Toscana Virus

Position 5: Uncoated MICROPLATE WELL

Position 4: TMB SUBSTRATE

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and H₂O₂ 0.01% stabilized in 0.05 mol/L citrate buffer (pH 3.8)

Position 3: SAMPLE DILUENT

Contents: Proteic solution containing phenol 0.05%, Bronidox 0.02% and an indicator to reveal the presence of the serum.

Position 2: CONJUGATE

Contents: anti-human IgG monoclonal antibodies labelled with horseradish peroxidase, in phosphate buffer containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Position 1: EMPTY WELL in which the operator must place the undiluted serum

CALIBRATOR CALIBRATOR 1 x 0.425 mL

Contents: Diluted human serum, at known antibody concentration, containing Proclin and Gentamycin, **liquid ready for use.**

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 0.425 mL

Contents: Diluted human serum, at known antibody concentration, containing Proclin and Gentamycin, **liquid ready for use.**

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 – 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 50-200 µl solution
- Disposable gloves
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C. In the case of storage at an incorrect temperature the calibration must be repeated and the run validated using the control serum (see point 9, Test validation).

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

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation:

DEVICES	8 weeks at 2/8°C
POSITIVE CONTROL	8 weeks at 2/8°C
CALIBRATOR	8 weeks at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

ONLY FOR DIAGNOSTIC USE IN VITRO.

Attention:

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, calibrators and strips 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. Wash hands thoroughly after placing the devices in the CHORUS instrument.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The conjugate contains phenol

b) The substrate is acid

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.

3. 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.
4. 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

Bring the devices to room temperature (18-30°C) before use; use within 60 min.

1. **Discard devices which show the substrate (well 4) blue colored.**
2. Adding the sample into the well verify that it is perfectly distributed on the bottom.
3. Check for the presence of the reagents in the device and that the device is not damaged; do not use devices which are lacking a reagent.
4. The devices are for use with the Chorus instrument; the instructions for use must be carefully followed and the instrument operating manual must be consulted.
5. Check that the Chorus instrument is set up correctly (see Chorus Operating Manual).
6. Do not alter the bar code placed on the handle of the device in order to allow correct reading by the instrument
7. Defective barcodes can be inserted manually in the instrument.
8. Do not expose the devices to strong light or to hypochlorite vapours during storage and use.
9. The use of strongly hemolyzed samples, or samples presenting microbial contamination may all constitute sources of error.
10. Before inserting the devices in the instrument, check that the reaction well does not contain foreign bodies.
11. Pipette the test serum (50 µl) in well 1 of the device (see figure).
12. Do not use the device after the expiry date

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, hemolyzed or contaminated samples should be avoided.

The test cannot be applied to plasma.

8. PROCEDURE

1. Open the package (on the side containing the pressure-closure), remove the number of devices required and seal the rest in the bag after expelling the air.
2. Check the state of the device according to the indications reported in the Analytical Warnings points 1 and 8.
3. Dispense 50 µl of undiluted test serum in well no. 1 of each device; at each change of batch, use a device for the calibrator.
4. Place the devices in the instrument. Perform the calibration (if necessary) and the test as reported in the Chorus Operating Manual.

9. TEST VALIDATION

Use the control serum to check the validity of the results obtained. It should be used as reported in the operating manual. If the instrument signals that the control serum has a value outside the acceptable range, the calibration must be repeated. The previous results will be automatically corrected.

If the result of the control serum continues to be outside the acceptable range, contact the Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION OF THE RESULTS

The Chorus instrument expresses the result as an INDEX (ratio between the OD value of the test sample and that of the Cut-Off) which can be used as a quantitative measure, as it is proportional to the amount of specific IgG present.

The test serum can be interpreted as follows:

POSITIVE: when the ratio is > 1.2

NEGATIVE: when the ratio is < 0.8 .

DOUBTFUL/EQUIVOCAL: for all values between 0.8 and 1.2

In the case of a doubtful/equivocal result, repeat the test. If the test remains doubtful/equivocal, collect a new sample after 1-2 weeks.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

12. ANALYTICAL SPECIFICITY

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

13. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

52 samples were tested in an experimentation in comparison with another commercial test: 33 were positive, 13 negative. The results are summarized in the following table, which shows 5 false negative and 1 false positive result.

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	33	1
	-	5	13

The kit shows a sensitivity of 87% (CI 95%: 72–94) and a specificity of 93% (CI 95%: 69–99).

14. PRECISION

Within-run precision

	No. of replicates	Mean Index	St. Dev.	CV%
Lot no. 017	8	1.8	0.11	6
Lot no. 018	9	2.9	0.26	9
Lot no. 019	9	3.3	0.27	8

Between-run precision and precision between batches

Sample	Mean Index			Mean	St. Dev.	CV%
	Lot 017	Lot 018	Lot 019			
TVG 1	0.7	0.7	0.5	0.6	0.12	20
TVG 2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.12	11
TVG 3	2.2	2.0	2.3	2.2	0.15	7

15. 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.



GEBRAUCHSANLEITUNG

CHORUS TOSCANA VIRUS IgG

(Deutsch)

1. VERWENDUNGSZWECK

QUALITATIVE BESTIMMUNG DER ANTI-TOSCANA-VIRUS-IgG-ANTIKÖRPER IM HUMANSERUM MIT EINEM EINWEG-TESTMODUL, DAS IN KOMBINATION MIT EINEM CHORUS LABORANALYSATOR VERWENDET WIRD.

2. EINLEITUNG

Das Toscana-Virus gehört zur Gattung der Phleboviren der Familie Bunyaviridae. Es wurde erstmals 1971 in Italien isoliert. Seither wurde seine Präsenz im Mittelmeerraum bestätigt und seine Rolle als ätiologischer Erreger einer menschlichen Erkrankung bewiesen. Die vom Toscana-Virus verursachte Erkrankung zeichnet sich durch Fieber, starke Kopfschmerzen und Meningitis oder Meningoenzephalitis aus. Die Infektion wird von hämatophagen Insekten der Gattung Phlebotomus übertragen. Aufgrund des Lebenszyklus des Vektors zeigt die Infektion einen jahreszeitlichen Verlauf mit einer Häufung in den Sommermonaten. Epidemiologische Daten lassen vermuten, dass in den Gebieten, in denen das Toscana-Virus endemisch auftritt, ein Großteil, wenn nicht die Mehrheit der Fälle aseptischer Meningitis in den Sommermonaten von diesem Virus verursacht sein könnte. Bis heute erfolgt die Diagnostik der Infektion mit dem Toscana-Virus hauptsächlich serologisch. Die spezifischen Antikörper der Klasse IgM sind in der akuten Phase der Krankheit vorhanden, während die spezifischen Antikörper der Klasse IgG bei gleichzeitigem Fehlen der IgM-Antikörper auf eine frühere Infektion hinweisen. Für alle bisher angewandten serologischen Methoden gilt, dass man das Virus in Zellkulturen fortpflanzen muss. Dafür benötigt man spezialisierte Labors und die Diagnostik der Infektion war bisher in den meisten serologischen Labors nicht möglich. Da bewiesen wurde, dass das virale Nukleoprotein das Hauptziel der Anti-Toscana-Virus-Antikörper ist, wurde dieses mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie in *E. coli* exprimiert und für die Entwicklung eines Enzymimmunoassay-Testsatzes verwendet, der dazu dient, die spezifischen IgG- und IgM-Antikörper nachzuweisen und die serologische Suche nach diesem Virus zu erleichtern.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der ELISA-Methode (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Die Bestimmung der IgG-Antikörper erfolgt nach der Inkubation des untersuchten Serums mit einer Festphase, die mit dem rekombinanten Nukleoprotein des stark gereinigten Toscana-Virus vorsensibilisiert wurde. Die spezifischen IgG-Antikörper binden an die Festphase und werden durch eine weitere Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten monoklonalen Maus-anti-human-IgG-Antikörper nachgewiesen.

Der Komplex wird durch Zugabe des Substrats bestimmt, das in Präsenz von Peroxidase eine blaue Farbe annimmt.

Die Intensität der Farbe entwickelt sich proportional zur Konzentration der spezifischen Antikörper im untersuchten Serum.

Die Einweg-Testmodule enthalten alle erforderlichen Reagenzien, um den Test nach Einlegen in den Chorus Laboranalysator durchführen zu können.

4. BESTANDTEILE DES TESTSATZES UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Der Testsatz reicht für 36 Bestimmungen (REF 81067).

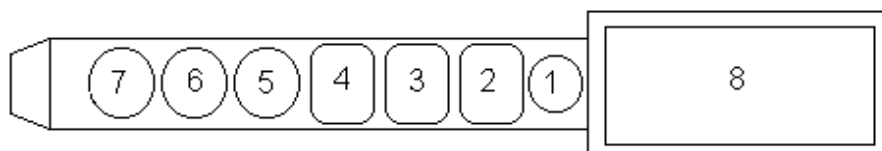
Der Testsatz reicht für 12 Bestimmungen (REF 81067/12).

DD TESTMODULE

6 Packungen mit je 6 Testmodulen (REF 81067).

2 Packungen mit je 6 Testmodulen (REF 81067/12).

Verwendung: Einem Beutel auf Raumtemperatur bringen, den Beutel öffnen und die benötigten Testmodule herausnehmen; die nicht benötigten in den Beutel mit Kieselgel zurück legen, die Luft entweichen lassen und den Beutel durch Drücken auf den Verschluss versiegeln. Bei 2–8 °C aufbewahren.

**Beschreibung:**

Position 8: Platz für Strichcode-Etikett

Position 7: leer

Position 6: MIKROPLATTENVERTIEFUNG, die mit dem rekombinanten Nukleoprotein des Toskana-Virus sensibilisiert wurde

Position 5: nicht sensibilisierte MIKROPLATTENVERTIEFUNG

Position 4: TMB SUBSTRAT

Inhalt: 0.26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0.01% H₂O₂, stabilisiert in Citratpuffer (0.05 mol/l, pH 3.8)

Position 3: VERDÜNNUNGSMITTEL FÜR DIE PROBEN

Inhalt: Proteinlösung mit 0.05% Phenol, 0.02% Bronidox und einem Indikator, der die Präsenz von Serum erfasst

Position 2: KONJUGAT

Inhalt: peroxidase-markierte monoklonale Anti-human-IgG Antikörper in Phosphatpufferlösung mit 0.05% Phenol und 0.02% Bronidox

Position 1: LEERE VERTIEFUNG, in die der Bediener das unverdünnte Serum füllt

CALIBRATOR KALIBRATOR 1 x 0.425 mLInhalt: verdünntes Humanserum mit bekannter Antikörperkonzentration mit Proclin und Gentamycin, flüssig, gebrauchsfertig**CONTROL +** POSITIVE KONTROLLE 1 x 0.425 mLInhalt: verdünntes Humanserum mit bekannter Antikörperkonzentration mit Proclin und Gentamycin, flüssig, gebrauchsfertig**WEITERES ERFORDERLICHES, ABER NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL**

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Übliches Laborglas: Zylinder, Reagenzgläser, usw.
- Mikropipetten zur genauen Entnahme von Volumina zwischen 50 und 200 µl
- Einweghandschuhe
- 5 %ige Natriumhypochlorit-Lösung
- Behälter zum Sammeln potentiell infektiöser Materialien

5. AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Die Reagenzien müssen bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Im Fall einer falschen Aufbewahrungstemperatur muss die Kalibrierung wiederholt und die Richtigkeit des Ergebnisses mit Hilfe des Kontrollserums überprüft werden (siehe Kapitel 9 Testvalidität).

Das Verfalldatum steht auf jeder Komponente und auf dem Außenetikett der Verpackung.

Die Reagenzien besitzen nach dem Öffnen bzw. der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität:

TESTMODULE	8 Wochen bei 2/8°C
KALIBRATOR	8 Wochen bei 2/8°C
POSITIVE KONTROLLE	8 Wochen bei 2/8°C

6. VORSICHTSMASSNAHMEN

AUSSCHLIESSLICH FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSTIK BESTIMMT.

Achtung:

Dieser Testsatz enthält Material humanen Ursprungs, das mit FDA zugelassenen Methoden sowohl auf HBsAg als auch auf Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ getestet wurde. Da kein diagnostischer Test die Präsenz infektiöser Stoffe vollständig ausschließen kann, muss jedes Material humanen Ursprungs als

potentiell infektiös betrachtet werden. Sämtliche Reagenzien und Proben müssen unter Einhaltung der üblicherweise in Labors geltenden Sicherheitsvorschriften gehandhabt werden.

Entsorgung der Abfälle: Die Serumproben, Kalibratoren und gebrauchten Streifen müssen als infektiöser Abfall behandelt und daher unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Warnhinweise für die Sicherheit des Personals

5. Nicht mit dem Mund pipettieren. Beim Handhaben der Proben Einweghandschuhe und einen Augenschutz tragen. Nach dem Einsetzen der Testmodule in den CHORUS Laboranalysator sorgfältig die Hände waschen.
6. Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen schädlicher oder reizender Substanzen:
 - c) Das Konjugat enthält Phenol
 - d) Das Substrat ist sauer
 Wenn ein Reagenz mit der Haut oder mit den Augen in Berührung kommt, diese mit reichlich Wasser spülen.
7. Neutralisierende Säuren und andere flüssige Abfälle müssen durch Zugabe von Natriumhypochlorit desinfiziert werden. Das zugegebene Volumen muss eine Endkonzentration von mindestens 1 % ergeben. Eine 30-minütige Exposition mit 1%igem Natriumhypochlorit sollte für die Gewährleistung einer wirksamen Desinfektion ausreichen.
8. Wird potentiell infektiöses Material versehentlich verschüttet, muss es umgehend mit Saugpapier entfernt werden. Die beschmutzte Fläche muss vor dem Fortsetzen der Arbeit zum Beispiel mit 1%igem Natriumhypochlorit gereinigt werden. Wenn eine Säure vorhanden ist, darf das Natriumhypochlorit nicht verwendet werden, bevor die Fläche getrocknet wurde. Alle für die Reinigung von verschüttetem Material verwendeten Hilfsmittel müssen einschließlich der Handschuhe als potentiell infektiöser Abfall entsorgt werden. Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten, dürfen nicht autoklaviert werden.

Warnhinweise zur Analyse

Die zu verwendenden Testmodule vor dem Gebrauch auf Umgebungstemperatur (18–30 °C) bringen und innerhalb von 60 Minuten verwenden.

1. **Die Testmodule mit blau gefärbtem Substrat (Vertiefung 4) aussortieren.**
2. Beim Einfüllen der Probe in die Vertiefung auf die perfekte Verteilung am Boden achten.
3. Kontrollieren, ob die Reagenzien im Testmodul vorhanden sind und ob letzteres unversehrt ist. Keine Testmodule verwenden, bei denen im Zuge der Sichtkontrolle festgestellt wird, dass Reagenzien fehlen.
4. Die Testmodule müssen zusammen mit dem Chorus Laboranalysator verwendet werden. Dabei sind diese Gebrauchsanleitung und die Anweisungen in der Gebrauchsanleitung des Analysators strikt zu befolgen.
5. Kontrollieren, ob der Chorus Laboranalysator korrekt eingestellt ist (siehe Chorus Gebrauchsanleitung).
6. Den Strichcode auf dem Griff des Testmoduls nicht beschädigen, damit er vom Laboranalysator korrekt gelesen werden kann.
7. Unlesbare Codes können manuell in den Analysator eingegeben werden.
8. Die Testmodule während der Aufbewahrung und des Gebrauchs keiner starken Beleuchtung und keinen Natriumhypochlorit-Dämpfen aussetzen.
9. Stark hämolytische oder mikrobisch verunreinigte Proben können Fehlerquellen bergen.
10. Vor dem Einsetzen des Testmoduls in den Chorus Laboranalysator sicherstellen, dass sich in der Reaktionsvertiefung keine Fremdkörper befinden.
11. Das zu untersuchende Serum (50 µl) in die Vertiefung 1 des Testmoduls pipettieren (siehe Abbildung).
12. Das Testmodul nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.

7. PROBENART UND AUFBEWAHRUNG

Die Probe besteht aus Serum, das aus Blut gewonnen wird, das durch eine normale Punktion von Venen entnommen wurde und das entsprechend den für Labors geltenden Standardverfahren gehandhabt wird. Das frische Serum kann bei 2–8 °C 4 Tage lang aufbewahrt werden; für eine längere Aufbewahrung wird es bei -20 °C eingefroren. Für die Aufbewahrung der Proben keine selbstabtauenden Tiefkühlgeräte verwenden. Die Probe kann maximal dreimal aufgetaut werden. Nach dem Auftauen und vor der Dosierung sorgfältig durchmischen. Durch eine mikrobiische Kontamination kann die Qualität der Probe stark beeinflusst werden, was zu falschen Ergebnissen führen kann. Stark lipämische, ikterische, hämolytische oder kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Der Test ist nicht bei humanem Plasma anwendbar.

8. VORGEHENSWEISE

1. Den Beutel öffnen (Seite mit Druckverschluss), die für die Durchführung der Tests erforderliche Anzahl von Testmodulen entnehmen und den Beutel mit den restlichen Testmodulen nach dem Entfernen der Luft wieder verschließen.
2. Das Testmodul gemäß den Anweisungen in Kapitel 6 Warnhinweise zur Analyse, Punkte 1 und 8, einer Sichtkontrolle unterziehen.

3. In die Vertiefung 1 jedes Testmoduls 50 µl des zu untersuchenden, unverdünnten Serums geben. Bei jedem Chargenwechsel ein Testmodul für den Kalibrator verwenden.
4. Die Testmodule in den Chorus Laboranalysator einsetzen. Die Kalibrierung (sofern erforderlich) und den Test gemäß den Anweisungen der Gebrauchsanleitung des Analysators durchführen.

9. TESTVALIDITÄT

Zur Überprüfung der Richtigkeit des Testergebnisses das Kontrollserum verwenden. Es wird gemäß den Anweisungen der Gebrauchsanleitung des Analysators eingesetzt. Wenn der Analysator für das Kontrollserum einen Wert außerhalb des akzeptablen Bereichs anzeigt, muss die Kalibrierung wiederholt werden. Die vorhergehenden Ergebnisse werden dann automatisch korrigiert.

Wenn das Ergebnis des Kontrollserums weiterhin außerhalb des akzeptablen Bereichs liegt, kontaktieren Sie bitte den Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION DES TESTS

Der Chorus Laboranalysator liefert das Ergebnis als INDEX (Verhältnis zwischen dem Messwert der OD der untersuchten Probe und dem des Cut-off), der als quantitatives Maß verwendet werden kann, da er sich proportional zur Menge der spezifischen IgG-Antikörper verhält.

Die Probe ist:

Negativ: bei Ergebnis <0.8

Grauzone/Mehrdeutig: bei Ergebnis zwischen 0.8 und 1.2

Positiv: bei Ergebnis >1.2

Den Test wiederholen, wenn das Ergebnis in der Grauzone liegt mehrdeutig ist. Sollte das Ergebnis weiterhin in der Grauzone/mehrdeutig liegen, die Blutabnahme nach 1-2 Wochen wiederholen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Das Testergebnis muss in jedem Fall zusammen mit den Daten anderer diagnostischer Untersuchungen beurteilt werden.

12. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Kreuzreaktionen durch andere Serotypen der Gattung Phlebovirus (Sizilien-Typ oder Neapel-Typ) sind nicht auszuschließen.

13. DIAGNOSTISCHE SENSIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Es wurden 52 Proben im Vergleich mit einer im Handel erhältlichen Methode zum Nachweis der Toskana-IgG-Antikörper getestet. 33 Proben waren bei beiden Methoden positiv und 13 negativ. In der Tabelle sind die Daten der nicht übereinstimmenden Ergebnisse zusammengefasst: 5 falsch negative und 1 falsch positives Ergebnis.

		REFERENZ	
		+	-
CHORUS	+	33	1
	-	5	13

Die Sensivität des Testsatzes beträgt 87% (CI 95 %: 72–94) und die Spezifität 93% (CI 95 %: 69–99).

14. PRÄZISION

Präzision innerhalb eines Durchlaufs

	Anzahl der Parallelproben	Mittelwert Index	St.-Testm.	CV %
Chargennr. 017	8	1.8	0.11	6
Chargennr. 018	9	2.9	0.26	9
Chargennr. 019	9	3.3	0.27	8

Präzision zwischen Durchläufen und Chargen

Probe	Mittelwert Index	Mittelwert	St.-Testm.	CV %
-------	------------------	------------	------------	------

	Charge 017	Charge 018	Charge 019			
TVG 1	0.7	0.7	0.5	0.6	0.12	20
TVG 2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.12	11
TVG 3	2.2	2.0	2.3	2.2	0.15	7

15. LITERATUR

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.

	Herstellungsdatum
	Verwendbar bis
	Nicht wieder verwenden
	Achtung, die Gebrauchsanleitung lesen
	Hersteller
	Inhalt reicht für „n“ Tests
	Temperaturgrenzwerte
	Die Gebrauchsanleitung lesen
	Biologisches Risiko
	Katalognummer
	Medizinisches In-vitro-Diagnostikum
	Chargennummer



Diesse Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA) – Italien
Tel. 0039-0577-587111



INSTRUCCIONES DE USO

CHORUS TOSCANA VIRUS IgG

(Español)

1. INDICACIONES

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgG ANTI TOSCANA VIRUS EN SUERO HUMANO CON DISPOSITIVO DESECHABLE APLICADO AL EQUIPO CHORUS

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.

El complejo se determina por adición del sustrato que asume una coloración azul en presencia de peroxidasa. La coloración que se desarrolla es proporcional a la concentración de los anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

Los dispositivos desechables contienen todos los reactivos para ejecutar el test cuando aplicados al equipo Chorus.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reactivos suficientes para 36 determinaciones (REF 81067).

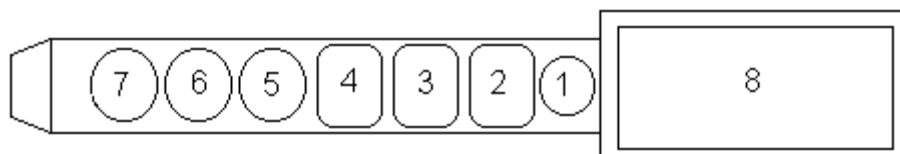
Reactivos suficientes para 12 determinaciones (REF 81067/12).

DD DISPOSITIVOS

6 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 81067).

2 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 81067/12).

Uso: **equilibrar un envase a temperatura ambiente**, abrir el envase, retirar los dispositivos necesarios; colocar los dispositivos no utilizados en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y **cerrar** fuertemente. Conservar a 2/8°C.



Descripción:

Posición 8: espacio libre para etiquetas con códigos de barra

Posición 7: libre

Posición 6: POCILLO DE MICROPLACA sensibilizado con la nucleoproteína recombinante del virus Toscana.

Posición 5: POCILLO DE MICROPLACA no sensibilizado

Posición 4: SUBSTRATO TMB

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y peróxido de hidrógeno 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

Posición 3: DILUYENTE PARA MUESTRAS

Contenido: Solución de proteínas conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox 0.02% y un marcador para revelar la presencia de suero

Posición 2: CONJUGADO

Contenido: anticuerpos monoclonales anti-IgG humanos marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada con fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%.

Posición 1: POCILLO LIBRE donde el usuario dispensa el suero sin diluir

CALIBRATOR CALIBRADOR 1 x 0.425 mL

Contenido: Suero humano diluido a titulación conocida de anticuerpos, con Proclin. y Gentamicin, **líquido, listo para su uso.**

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 0.425 mL

Contenido: Suero humano diluido a titulación conocida de anticuerpos, con Proclin. y Gentamicin, **líquido, listo para su uso.**

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 – 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Agua Destilada u desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer volúmenes de 50-200 µl
- Guantes de un solo uso
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la recogida de materiales potencialmente infecciosos

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. En caso de una errónea temperatura de conservación, la calibración debe ser repetida y la validez del resultado debe ser verificada mediante suero de control (ver capítulo 9 validación del test)

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:

DISPOSITIVOS	8 SEMANAS 2/8°C
CALIBRADOR	8 SEMANAS 2/8°C
CONTROL POSITIVO	8 SEMANAS 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 humano 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, los calibradores y las tiras 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 desechables y la protección para los ojos al manipular las muestras. Lavar las manos a fondo después de colocar los dispositivos en el equipo CHORUS.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El conjugado contiene fenol
 - b) El sustrato es ácido

Si cualquier reactivo entrara en contacto con la piel u ojos, lavar con agua abundante.
3. Los ácidos neutralizados y 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.
4. El vertido de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada debe ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1.0%, antes de continuar con el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en vertidos que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar vertidos, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

Poner todos los dispositivos a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso; utilizar en 60 minutos.

1. **Desechar los dispositivos con sustrato (pocillo 4) de color azul.**
2. Comprobar la presencia de los reactivos en el dispositivo y que éste no esté dañado. No utilizar dispositivos en los que falte algún reactivo.
3. Los dispositivos se deben utilizar junto con el equipo Chorus, siguiendo rigurosamente las Instrucciones de Uso y el Manual del Usuario Chorus.
4. Comprobar que las opciones del equipo Chorus sean correctas (ver Manual del Usuario Chorus).
5. No modificar el código de barras del dispositivo a fin de garantizar la lectura correcta.
6. Los códigos de barras dañados se pueden colocar en el equipo manualmente.
7. No exponer los dispositivos a luz intensa ni a humos de hipoclorito durante su conservación y/o uso.
8. El uso de muestras altamente hemolizadas, o que presenten contaminación microbiana puede ser fuente de error.
9. Antes de colocar el dispositivo en el equipo Chorus comprobar que el pocillo de reacción no contenga cuerpos extraños.
10. Pipetear el suero (50 µl) en el pocillo 1 del dispositivo (ver dibujo).
11. No utilizar el suero después de la fecha de caducidad.

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a -20°C. La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces y no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso. La calidad de la muestra puede verse 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

1. Abrir el envase (por el lado del cierre a presión), retirar los dispositivos necesarios para ejecutar las pruebas y conservar los otros en el envase, extraer el aire y cerrar presionando el cierre.
2. Comprobar visualmente el estado del dispositivo según las indicaciones del capítulo 6 Precauciones Analíticas puntos 1 y 8.
3. Dispensar 50 µl de suero no diluido en el pocillo nº1 de cada dispositivo, por cada cambio de lote utilizar un dispositivo para el calibrador.
4. Colocar los dispositivos en el equipo Chorus. Ejecutar la calibración (si fuera necesario) y el test según indicaciones del Manual del Usuario Chorus.

9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Utilizar el suero de control para verificar la validez del resultado obtenido, procesándolo según indicaciones del Manual del Usuario del equipo. Si el equipo indica que el suero de control tiene un valor fuera de los límites de aceptabilidad, es necesario realizar de nuevo la calibración. Los resultados previos se corregirán automáticamente.

Si el resultado del suero de control continúa estando fuera del rango de aceptabilidad, contactar con Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El equipo Chorus proporciona el resultado en INDEX (relación entre el valor de la D.O. de la muestra y lo del Cut-off) que puede ser empleado como medida cuantitativa siendo proporcional a la cantidad de IgG específicas

La muestra se considera:

Positivo: si el Index es > 1.2

Negativo: si el Index es < 0.8

Dudoso/Equívoco: para todos los valores entre 0.8 y 1.2

En caso de resultado dudoso/ equívoco, se aconseja repetir la prueba.

11. LIMITACIONES

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

12. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

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

13. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

Se evaluaron 52 sueros de pacientes en comparación con un método comercial Toscana. 33 fueron positivas y 13 negativas con los dos métodos.

La tabla siguiente resume los datos en los cuales se indican los resultados en desacuerdo: 5 falsos negativos y 1 falso positivo.

		REFERENCIA	
		+	-
CHORUS	+	33	1
	-	5	13

El kit ofrece una sensibilidad del 87% (CI 95%: 72–94) y una especificidad del 93% (CI 95%: 69–99).

14. REPRODUCIBILIDAD

Precisión intra-ensayo

	Número de réplicas	Media Index	Desv. Estándar	CV%
Lot no. 017	8	1.8	0.11	6
Lot no. 018	9	2.9	0.26	9
Lot no. 019	9	3.3	0.27	8

Reproducibilidad entre ensayos y entre lotes

Muestra	Media Index			Media	Desv. Estándar	CV%
	Lot 017	Lot 018	Lot 019			
TVG 1	0.7	0.7	0.5	0.6	0.12	20
TVG 2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.12	11
TVG 3	2.2	2.0	2.3	2.2	0.15	7

15. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Schwarz et al. 1996. Immunoblot detection of antibodies to Toscana Virus. J. Medical Virology 49, 83-86.
- Valassina M. et al. 1998. Diagnostic potential of Toscana virus in protein expressed in Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 36, 3170-3172.
- 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 POUR L'UTILISATION

CHORUS TOSCANA VIRUS IgG

(Français)

1. UTILISATION

DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgG ANTI-TOSCANA VIRUS DANS LE SERUM HUMAIN EN UTILISANT UN DISPOSITIF MONO USAGE APPLIQUE À L'INSTRUMENT CHORUS

2. INTRODUCTION

Le virus Toscane, appartenant au genre Phlébovirus de la famille Bunyaviridae, a été isolé pour la première fois en Italie en 1971. Ensuite sa présence a été démontrée dans la zone méditerranée et on a établi son rôle comme agent étiologique de la maladie chez l'homme. La maladie causée par le Virus Toscane est caractérisée par fièvre, fort mal de tête et la méningite ou méningo-encéphalite. L'infection se transmet à travers des insectes hématophages du genre Phlébotome et, à cause du cycle vital du vecteur, elle a une cours saisonnale avec un maximum en été. Des dates épidémiologiques indiquent que dans les zones out le virus Toscane est endémique, la grande partie (peut être la plupart) des cas de méningite aseptique est causée par ce virus.

Jusqu'à aujourd'hui le diagnostic d'une infection par le virus Toscane a été effectué surtout en manière sérologique. Les anticorps spécifiques de la classe IgM sont présents pendant la phase aigue de la maladie ; la présence des anticorps spécifiques de la classe IgG en absence des IgM, indique une infection précédente.

Toutes les méthodes sérologiques utilisées jusqu'ici présentent la nécessité de propager le virus en cultures cellulaires, donc il y a la nécessité de laboratoires spécialisés ; le diagnostic de l'infection dans la plupart des laboratoires de sérologie est préclu. Puisqu'on a démontré que la nucléoprotéine virale est la cible principale des anticorps anti-Virus Toscane, elle a été exprimée à travers la technologie de la DNA recombinante en E. coli et utilisé pour la réalisation d'une trousse immunoenzymatique pour la recherche des IgG et des igM spécifiques au fin de faciliter la détermination sérologique de ce virus.

3. PRINCIPE

Le test est basé sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). La détermination des IgG a lieu après l'incubation du sérum un examen avec la phase solide sensibilisée avec la nucléoprotéine recombinante du virus Toscane très purifié. Les immunoglobulines IgG spécifiques se lient sur la phase solide et sont révélées à travers une seconde incubation avec un anticorps monoclonal de souris anti-IgG humaines conjugué à la peroxydase.

On peut déterminer le complexe par addition du substrat. La couleur bleue qui se produit est proportionnelle à la concentration en anticorps spécifiques dans le sérum en examen.

Les dispositifs à jeter contiennent tous les réactifs pour effectuer le test appliqué à l'instrument Chorus.

4. CONTENU DU COFFRET ET PREPARATION DES REACTIFS

Le coffret suffit pour réaliser 36 déterminations (REF 81067).

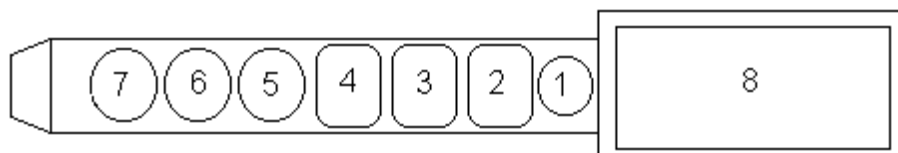
Le coffret suffit pour réaliser 12 déterminations (REF 81067/12).

DD DISPOSITIFS

6 emballages contenant 6 dispositifs chacun (REF 81067).

2 emballages contenant 6 dispositifs chacun (REF 81067/12).

Usage : Équilibrer un sachet à température ambiante, découper le sachet, sortir les dispositifs nécessaires, et placer les autres non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice; chasser l'air et **fermer** le sachet par pression sur la fermeture. Conserver à 2-8°C



Description:

Position 8: Place disponible pour l'étiquette avec le code à barres

Position 7: vide

Position 6: PUIITS DE LA MICROPLAQUE sensibilisé avec la nucléoprotéine recombinante du virus Toscane.

Position 5: PUIITS DE LA MICROPLAQUE non sensibilisé

Position 4: SUBSTRAT TMB

Contenu: Tétraméthylbenzidine à 0.26 mg/mL et du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0.01% stabilisé dans un tampon citrate à 0.05 mol/l (pH = 3.8)

Position 3: DILUENT DES ECHANTILLONS

Contenu: Solution protéique additionnée de 0.05% de phénol et 0.02% de bronidox et une indicateur pour révéler la présence du sérum

Position 2: CONJUGUE

Contenu: anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase, dans une solution tampon phosphate contenant du phénol (0.05%) et du Bronidox (0.02%)

Position 1: PUIITS VIDE dans lequel l'utilisateur doit distribuer le sérum non dilué

CALIBRATOR CALIBRATEUR 1 x 0.425 mL

Contenu: Sérum humain dilué, à une concentration connue d'anticorps, contenant Proclin et Gentamycin, **liquid prêt à l'usage.**

CONTROL + CONTROLE POSITIF 1 x 0.425 mL

Contenu: Sérum humain dilué, à une concentration connue d'anticorps, contenant Proclin et Gentamycin, **liquid prêt à l'usage.**

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 – 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvette, pipette, etc...)
- Micropipette capable de prélever 50-200 µl de solution
- Gants mono-usage
- Solution d'hypochlorure de sodium (5%)
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux

5. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à +2-8°C. En cas d'une température de conservation incorrecte, il faut répéter la calibration et contrôler le résultat à travers l'utilisation du sérum de contrôle (voir section 9, Validation du test). La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette-coffret.

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

DISPOSITIFS	8 semaines à 2/8°C
CALIBRATEUR	8 semaines à 2/8°C
CONTROLE POSITIF	8 semaines à 2/8°C

**6. PRECAUTIONS D'UTILISATION
POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.****ATTENTION:**

Ce coffret contient des matériaux d'origine humaine. Les réactifs contenant du matériel d'origine humaine ont été contrôlés et trouvés négatifs pour les anticorps anti-VIH-1/VIH-2, anti-VHC et pour l'antigène HBsAg (selon la méthode FDA). Cependant, puisqu'il n'existe pas de méthode diagnostique capable de garantir l'absence des agents infectieux, ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et par conséquent manipulés avec précaution.

Elimination des résidus: les échantillos de serum, les etalons et les bandelettes usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

PRECAUTIONS DE SECURITE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des gants à usage unique et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons. Se laver soigneusement les mains après avoir distribué les dispositifs dans le Chorus.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations en substances nocives ou irritantes :
 - a) Le conjugué contient du phénol
 - b) Le substrat est acide.
3. Les acides neutralisés et les déchets liquides doivent être décontaminés avec un volume suffisant de solution d'hypochlorure de sodium pour que la concentration finale soit de 1% minimum. Un contact de 30 minutes avec cette solution est nécessaire pour garantir une décontamination efficace.
4. En cas de versement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1%), avant de continuer le test. En présence d'un acide, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorure de sodium. Tout matériel (notamment les gants) souillé par d'éventuelles éclaboussures doit être considéré comme potentiellement infectieux et éliminé selon la réglementation en vigueur. Ne pas mettre en autoclave de matériaux contenant l'hypochlorure de sodium.

PRECAUTIONS ANALYTIQUES

Laisser les réactifs revenir à température ambiante (+18-30°C) et utiliser entre 60 minutes.

1. **Éliminer les dispositifs avec le substrat (puits 4) coloré de bleu.**
2. En ajoutant l'échantillon dans le puits, il faut contrôler qu'il est bien distribué sur le fond.
3. Contrôler la présence des réactifs dans le dispositif et l'intégrité du dispositif même ; il ne faut pas utiliser des dispositifs qui présentent au contrôle visuel l'absence de quelque réactif.
4. Les dispositifs doivent être utilisés avec l'instrument Chorus, en suivant attentivement les instructions pour l'usage et le Manuel de l'instrument.
5. Contrôler l'assiette de l'instrument Chorus (voir le Manuel d'utilisation Chorus).
6. Ne pas modifier le code à barres sur la poignée du dispositif à la fin de permettre la correcte lecture par l'instrument.
7. Les codes à barres défectueux peuvent être insérés manuellement dans l'instrument.
8. Ne pas exposer les dispositifs à une forte illumination ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant la conservation et l'usage.
9. Les échantillons fortement hémolysés, ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent causer des résultats erronés.
10. Avant d'insérer le dispositif dans l'instrument Chorus, contrôler que le puits de réaction ne contient pas de corps étrangers.
11. Dispenser le sérum en examen (50 µl) dans le puits no. 1 du dispositif (voir la figure).
12. Ne pas utiliser le dispositif après la date de péremption.

7. TYPE D'ÉCHANTILLON ET CONSERVATION

L'échantillon est constitué par sérum obtenu du sang prélevé normalement et manipulé selon les procédés standard de laboratoire. Le sérum frais peut être stocké à +2/+8°C pendant 4 jours ; pour un stockage plus long, congeler les sérums à - 20°C. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Il ne faut pas les décongeler et recongeler plus de 3 fois. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant utilisation. Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

Ne pas utiliser d'échantillon de plasma humain.

8. MODE OPERATOIRE

1. Découper le sachet du côté contenant la fermeture à pression, sortir le numéro de dispositifs nécessaires et conserver les autres dans le sachet après avoir chassé l'air.
2. Contrôler visuellement l'état du dispositif selon les indications reportées au paragraphe 6 : Précautions analytiques no. 1 et 8.
3. Dispenser 50 µl de sérum non dilué dans le puits no. 1 de chaque dispositif; il faut utiliser un dispositif pour le calibrateur à chaque change du lot.
4. Introduire les dispositifs dans l'instrument Chorus. Effectuer la calibration (si nécessaire) et le test selon le procédé reporté dans le Manuel de l'instrument.

9. VALIDATION DU TEST

Utiliser le sérum de contrôle pour vérifier l'exactitude du résultat obtenu (on l'utilise comme décrit dans le Manuel du Chorus). Si l'instrument signale que le sérum de contrôle présente une valeur au dehors du range d'acceptabilité, il faut répéter la calibration. Les résultats précédents viennent corrigés automatiquement.

Si le résultat du sérum de contrôle n'est toujours pas compris dans la plage d'acceptabilité, contacter le Scientific Support.

Tél. : 0039 0577 319554

Fax : 0039 0577 366605

e-mail: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION DES RESULTATS

L'instrument Chorus reporte un résultat comme INDEX (rapport entre la valeur de la D.O. de l'échantillon en examen et celle de la valeur seuil (Cut-Off)); l'index peut être utilisé comme mesure quantitative, proportionnelle à la quantité des IgG spécifiques.

L'échantillon est considéré comme:

Positif: si l'Index est > 1.2

Douteux/Equivoque: si l'Index est compris entre 0.8 et 1.2

Négatif: si l'Index est < 0.8

Si le résultat est douteux/equivoque, répéter le test. Si le résultat est de nouveau douteux/equivoque, réaliser un nouveau prélèvement de l'échantillon de sang.

11. LIMITES DE LA METHODE

Les résultats obtenus servent seulement comme aide pour le diagnostic, et doivent être interprétés ensemble avec des autres observations.

12. SPECIFICITE' ANALYTIQUE

On ne peut pas exclure de réactions croisées avec des autres sérotypes corrélés du genre Phlébovirus, comme la Sicile et la Naples.

13. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE

Dans une expérimentation, 52 échantillons ont été analysés avec cette méthode et avec un autre test Toscana IgG du commerce; 33 étaient positifs et 13 négatifs avec les deux méthodes. La table montre les résultats en désaccord: 5 faux négatifs et 1 faux-positif.

		REFERENCE	
		+	-
CHORUS	+	33	1
	-	5	13

La trousse a une sensibilité de 87% (CI 95%: 72–94) et une spécificité de 93% (CI 95%: 69–99).

14. PRECISION

Précision dans la série

	Nombre de répliques	Moyen Index	S.D.	CV%
Lot no. 017	8	1.8	0.11	6
Lot no. 018	9	2.9	0.26	9
Lot no. 019	9	3.3	0.27	8

Précision inter- séries et entre lots

Echantillon	Moyen Index			Moyen	S.D.	CV%
	Lot 017	Lot 018	Lot 019			
TVG 1	0.7	0.7	0.5	0.6	0.12	20
TVG 2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.12	11

TVG 3	2.2	2.0	2.3	2.2	0.15	7
--------------	-----	-----	-----	-----	------	---

15. 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.
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.

**INSTRUÇÕES PARA O USO****CHORUS
TOSCANA VIRUS IgG****(Português)****1. FINALIDADE****DETECÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS IGG CONTRA O VÍRUS TOSCANA EM SORO HUMANO, USANDO UM DISPOSITIVO DESCARTAVEL APLICADO AO EQUIPAMENTO CHORUS****2. INTRODUÇÃO**

O vírus Toscana pertence ao gênero Phlebovirus da família Bunyaviridae e foi isolado pela primeira vez na Itália no ano 1971. Desde então foi comprovada a sua presença na área do Mediterrâneo e foi demonstrado o seu rolo como agente etiológico de doença humana. A doença provocada pelo vírus Toscana é caracterizada por febre, forte enxaqueca e meningite ou meningoencefalitis. A infecção é transmitida por insetos hematófagos do gênero Phlebotomus e, devido ao ciclo vital do vetor, tem um andamento estacional, com um pique nos meses de verão. Dados epidemiológicos sugerem que nas áreas onde o vírus Toscana está endêmico, uma grande parte ou talvez a maioria das meningites assépticas no período de verão podem ser causadas por este vírus. Até hoje a diagnose de infecção com vírus Toscana foi prioritariamente sorológica. Os anticorpos específicos da classe IgM estão presentes na fase aguda da doença, porem a presença de anticorpos específicos da classe IgG, em ausência de IgM, indica uma infecção anterior. Todos os métodos sorológicos utilizados até agora tem em comum a necessidade de propagar o vírus em culturas celulares, precisando assim de laboratórios especializados e impedindo a diagnose de infecção nas maiorias dos laboratórios sorológicos. Já que foi demonstrado que a nucleoproteína viral é o alvo principal dos anticorpos antivírus Toscana, esta foi expressada através da tecnologia do DNA recombinante em *E. coli* e utilizada para realizar um kit imuno-enzimatico pela detecção de IgG e IgM especificas a fim de favorecer a pesquisa sorológica sobre este vírus

3. PRINCIPIO DO METODO

O teste é baseado sobre o principio do ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). A determinação das IgG acontece depois incubação do soro em analise com uma fase sólida pré-sensibilizada com a nucleoproteína recombinante do vírus Toscana extremamente purificada. As IgG especificas se ligam sobre a fase sólida e são reveladas através de uma outra incubação com um anticorpo monoclonal anti-IgG humanas, conjugado com peroxidase.

O complexo é determinado pela adição do substrato que adquira uma coloração azul na presença de peroxidase.

A cor que se desenvolve é proporcional à concentração dos anticorpos específicos presentes no soro que está sendo analisado.

Os dispositivos descartáveis contem todos os reagentes para desenvolver o teste quando vem aplicados ao instrumento Chorus.

4. REAGENTES DO KIT E PREPARO

O kit é suficiente para 36 determinações (REF 81067).

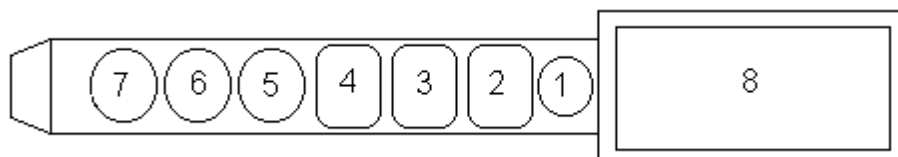
O kit é suficiente para 12 determinações (REF 81067/12).

DD DISPOSITIVOS

6 embalagens de 6 dispositivos cada (REF 81067).

2 embalagens de 6 dispositivos cada (REF 81067/12).

Uso: **equilibrar uma confeção em temperatura ambiente**, abrir a confeção e remover os dispositivos necessários; retornar os dispositivos restantes no envelope com dessecante, esvaziar o ar e **fechar** o envelope pressionando na fechadura. Armazenar a 2/8°C.

**Descrição:**

Posição 8: Espaço disponível para rotular com código de barras

Posição 7: vazio

Posição 6: CAVIDADE DE MICROPLACA sensibilizada com nucleoproteína recombinante do vírus Toscana

Posição 5: CAVIDADE DE MICROPLACA não sensibilizada

Posição 4: TMB SUBSTRATO

Conteúdo: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL e H₂O₂ 0.01% estabilizados em 0.05 mol/L tampão citrato (pH 3.8)

Posição 3: DILUENTE DE AMOSTRAS

Conteúdo: Solução protéica, contendo fenol 0.05%, Bronidox 0.02% e um indicador para revelar a presença de soro

Posição 2: CONJUGADO

Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-IgG humanas marcados com peroxidase, em solução tampão de fosfato com fenol 0.05% e Bronidox 0.02%

Posição 1: CAVIDADE VAZIA na qual o operador precisa dispensar o soro não diluído

CALIBRATOR CALIBRADOR 1 x 0.425 mL

Conteúdo: soro humano diluído contendo concentrações conhecidas de anticorpos, com Proclin e Gentamicin, **líquido, pronto para ser usada**

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 0.425 mL

Conteúdo: soro humano diluído contendo concentrações conhecidas de anticorpos, com Proclin e Gentamicin, **líquido, pronto para ser usada**

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 – 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Água destilada ou desmineralizada
- Vidraria de laboratório graduada e não.
- Micropipetas de precisão e ponteiros descartáveis de 50-200 µl
- Luvas descartáveis
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Contendedores para coleta de matérias potencialmente infecciosas

5. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes devem ser conservados a 2/8°C. Em caso de temperatura de armazenamento errada, é necessário refazer a calibração e verificar a exatidão do resultado por meio do soro de controle (ver item 9: validação do teste).

A data de vencimento é impressa em cada componente e no rótulo caixa.

Os reagentes tem uma validade limitada depois da abertura e/ou preparação:

DISPOSITIVOS 8 semanas a 2/8°C

CONTROLO POSITIVO 8 semanas a 2/8°C

CALIBRADOR 8 semanas a 2/8°C

6. PRECAUÇÕES

SOMENTE PARA USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Atenção:

Este kit contém materiais de origem humana que foram testados com testes aprovados pela FDA e encontrados negativos para presença de HBsAg, anticorpos anti-HIV-1, anti HIV-2 e anti-HCV. De qualquer modo nenhum teste diagnóstico garante a ausência dos agentes infecciosos, todos os materiais de origem humana precisam ser

considerados potencialmente infecciosos. Todos os reagentes e as amostras devem ser manuseados conforme as regras de segurança definidas em cada laboratório.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro, os calibradores e as faixas utilizadas devem ser tratados como resíduos infecciosos e portanto, eliminados em conformidade com as disposições legais aplicáveis.

Precauções de Biossegurança

1. Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis e proteger os olhos quando manusear as amostras e durante o teste. Lavar as mãos depois de inserir o dispositivo no equipamento CHORUS.
2. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias perigosas ou irritantes:
 - a) O conjugado contém fenol
 - b) O substrato é ácido
 Em caso de contato desses reagentes com os olhos e pele, lavar abundantemente com água.
3. Ácidos neutralizados e outros descartes líquidos precisam ser desinfetados adicionando um volume de hipoclorito de sódio suficiente para atingir uma concentração final de 1%. Deixando agir o hipoclorito por 30 minutos geralmente é suficiente para uma desinfecção válida.
4. Derramamentos de materiais potencialmente infecciosos precisam ser removidos imediatamente com mata-borrão e a área infectada deve ser limpa, por exemplo, com hipoclorito de sódio 1%, antes de continuar o trabalho. Caso esteja presente um ácido, o hipoclorito de sódio não pode ser usado antes de enxugar a área. Todos os materiais usados para limpeza, incluindo luvas, devem ser descartados como lixo potencialmente infeccioso. Não esterilizar na autoclave materiais contendo hipoclorito de sódio.

Precauções analíticas

Antes do uso, permitir que os dispositivos atinjam a temperatura ambiente (18-30°C); usar entre 60 minutos.

1. **Deitar fora os dispositivos com substrato (poço 4) azul.**
2. Adicionando a amostra ao poço verifique que está distribuído perfeitamente no fundo.
3. Controlar a presença dos reagentes nas cavidades do dispositivo e a integridade do dispositivo mesmo; não usar dispositivos que, ao controle visual, faltam alguns reagentes.
4. Os dispositivos são para uso exclusivo no equipamento Chorus; seguir rigorosamente as Instruções para Uso e o Manual do equipamento.
5. Controlar que o equipamento Chorus esteja programado corretamente (ver o Manual do Usuário Chorus).
6. Não alterar o código de barras na empunhadura do dispositivo, permitindo uma correta leitura pelo equipamento.
7. Códigos de barras com defeitos podem ser inseridos manualmente no equipamento.
8. Durante o uso e a conservação, não expor os dispositivos a forte luz ou a vapores de hipoclorito.
9. Amostras fortemente hemolizadas, ou amostras com contaminação bacteriana podem gerar resultados errados.
10. Antes de inserir o dispositivo no equipamento Chorus, verificar que a cavidade de reação não contenha corpos estranhos.
11. Pipetar a amostra a ser testada (50 µl) na cavidade 1 do dispositivo (ver figura).
12. Não usar o dispositivo depois do vencimento.

7. TIPO E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

A amostra é soro, obtido de sangue coletado das veias e manuseado segundo as precauções do laboratório. O soro fresco pode ser conservado a 2/8°C por 4 dias; para períodos de tempo maiores conservá-lo a -20°C. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. A amostra pode ser descongelada no máximo 3 vezes. Depois de descongelar, misturar cuidadosamente antes do teste. A qualidade das amostras pode ser gravemente influenciada pela contaminação bacteriana, que pode gerar resultados errados.

Não usar amostras fortemente lipêmicas, ictericas, hemolizadas ou inquinadas. Amostras de plasma não podem ser usadas.

8. PROCEDIMENTO DO TESTE

1. Abrir a confecção (do lado da fechadura por pressão), prender o número de dispositivos necessários para os testes e retornar os dispositivos restantes no envelope com dessecante, esvaziar do ar e fechar o envelope premendo na fechadura.
2. Controlar visualmente as condições do dispositivo em acordo com as indicações do parágrafo 6, Precauções Analíticas itens 1 e 8.
3. Dispensar na cavidade 1 de cada dispositivo 50 µl de amostra a ser testada, não diluída; por cada troca de lote, usar um dispositivo para o calibrador.
4. Inserir o dispositivo no equipamento Chorus. Realizar a calibração (se necessário) e o teste como definido no Manual do Uso do equipamento.

9. ESPECIFICAÇÕES DE VALIDAÇÃO

Usar o Soro de Controle para verificar a exatidão do resultado obtido, testando como indicado no Manual de Uso do equipamento. No caso o equipamento apontar o Soro de Controle fora do range de aceitação, precisa calibrar o equipamento uma outra vez. Os resultados antecedentes serão corrigidos automaticamente.

Se o resultado do soro de controle continuar fora do intervalo de aceitação, contatar o Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O equipamento Chorus fornece resultados em INDEX (relação entre o valor de D.O. da amostra em teste e aquilo do Cut-Off), e pode ser usado como medida quantitativa, sendo proporcional à quantidade das IgG específicas.

A amostra será:

Positiva: quando o Index é >1.2

Negativa: quando o Index é <0.8

Incerto/Equivocado: para todos os valores entre 0.8 e <1.2

No caso de resultado incerto/equivocado, repetir o teste. Se o resultado continua incerto/equivocado, coletar uma outra amostra depois de 1-2 semanas.

11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O resultado do teste deve ser avaliado juntamente com as informações históricas do paciente e/ou outras avaliações diagnósticas.

12. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Não podem-se excluir reações cruzadas com outros sorotipos de Phlebovirus como Sicília e Nápoles.

13. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA

52 amostras foram testadas numa experimentação em confronto com um outro teste comercial: 33 resultaram positivas, 13 negativas. Os resultados reportados na tabela seguinte mostram 5 amostras com resultado falso negativo e 1 amostra com resultado falso positivo.

		REFERÊNCIA	
		+	-
DIESSE	+	33	1
	-	5	13

O produto mostra 87% de sensibilidade (CI 95%: 72–94) e 93% de especificidade (CI 95%: 69–99).

14. PRECISÃO

Precisão no teste

	Número de repetições	Média Index	D.P.	CV%
Lot no. 017	8	1.8	0.11	6
Lot no. 018	9	2.9	0.26	9
Lot no. 019	9	3.3	0.27	8

Precisão entre testes e entre lotes

Amostra	Média Index			Média	D.P.	CV%
	Lot 017	Lot 018	Lot 019			
TVG 1	0.7	0.7	0.5	0.6	0.12	20
TVG 2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.12	11
TVG 3	2.2	2.0	2.3	2.2	0.15	7

15. 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.

	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 jusqu'e Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Do not reuse No reutilizar Non riutilizzare	FR GR PT	Ne pas réutiliser Μην κάνετε επαναληπτική χρήση Não reutilizar
	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