

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Chikungunya Virus IgG capture ELISA

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



DECHIG0590



96

1. INTRODUCTION

Chikungunya virus is an arthropod borne virus of the genus Alphavirus (family Togaviridae). The Alphavirus genus contains at least 24 distinct species. These are lipid-enveloped virions with a diameter of 50 to 60 nm. Alphavirus infections are initiated by the bite of an infected mosquito, which results in the deposition of virus in subcutaneous and possibly cutaneous tissues. After an incubation period of 1 to 12 days the Chikungunya fever develops. Chikungunya fever (Chikungunya means “that which bends up”, in reference to the crippling manifestations of the disease) is an acute viral infection characterized by a rapid transition from a state of good health to illness that includes severe arthralgia and fever. Temperature rises abruptly to as high as 40°C and is often accompanied by shaking chills. After a few days, fever may abate and recrudescence, giving rise to a “saddleback” fever curve. Arthralgia is polyarticular, favoring the small joints and sites of previous injuries, and is most intense on arising. Patients typically avoid movement as much as possible. Joints may swell without significant fluid accumulations. These symptoms may last from 1 week to several months and are accompanied by myalgia. The rash characteristically appears on the first day of illness, but onset may be delayed. It usually arises as a flush over the face and neck, which evolves to a maculopapular or macular form that may be pruritic. The latter lesions appear on the trunk, limbs, face, palms and soles, in that order of frequency. Petechial skin lesions have also been noted. Headache, photophobia, retro-orbital pain, sore throat with objective signs of pharyngitis, nausea and vomiting also occur in this setting. Occasionally, however persistent arthralgia and polyarthritis (lasting months or even years) do occur, sometimes involving joint destruction. Even rarer, sequelae include encephalitis and meningoencephalitis with high lethality rates.

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

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

The presence of virus resp. infection may be identified by

- Serology: Detection of antibodies by IF, ELISA

2. INTENDED USE

The Chikungunya IgG-ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies to Chikungunya in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

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

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Chikungunya Microplate (IgG):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti human IgG, in resealable aluminium foil.
 - **Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of ready to use buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; white cap.
 - **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml. Ready to use acidic solution, 0.4 N; red cap.
 - **Washing Solution (20x conc.):*** 1 bottle each containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
 - **Chikungunya antigen, lyophilized:** 6 bottles containing lyophilized Chikungunya antigen solution; red cap
 - **Chikungunya antibody solution****:** 1 bottle containing 6 ml of biotinylated Chikungunya antibody, ready to use; coloured blue; white cap
 - **Streptavidin conjugate**:** 1 bottle containing 6 ml Streptavidin conjugated with peroxidase, ready to use; coloured blue; black cap
 - **TMB Substrate Solution :** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
 - **Chikungunya IgG Positive Control****:** 1 bottle containing 1.5 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
 - **Chikungunya IgG Cut-off Control****:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
 - **Chikungunya IgG Negative Control***:** 1 bottle containing 1.5 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.
- * contains 0.1 % Bronidox L after dilution
** contains 0.2 % Bronidox L
*** contains 0.1 % Kathon
**** contains 0.02 % Kathon and 0.02% Bronidox L

4.2. Materials supplied

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

4.3. Materials and Equipment needed

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

5. STABILITY AND STORAGE

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

6. REAGENT PREPARATION

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

6.1. Microplate

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

6.2. Chikungunya Antigen

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

6.3. Chikungunya Antibody Solution

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

6.4. Controls

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

6.5. Washing solution (20xconc.)

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

6.6. Sample Diluent

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

6.7. Streptavidin Conjugate

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

6.8. TMB Substrate Solution

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

6.9. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.4 N acidic solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*

Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

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

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

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

Please allocate at least:

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

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

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

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

Adjust the incubator to 37° ± 1 °C.

1. Dispense 50µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 50µl reconstituted Chikungunya Antigen into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 50 µl Chikungunya Antibody Solution into all wells except for the blank well (e.g.A1). Cover with foil.
9. **Incubate for 30 min at room temperature.**
10. Repeat step 4.
11. Dispense 50 µl Streptavidin peroxidase conjugate into all wells except for the blank (e.g. A1). Cover with foil.
12. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
13. Repeat step 4.
14. Dispense 100 µl TMB solution into all wells
15. **Incubate for exact 15 min. in the dark.**
16. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB substrate.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with negative matrix for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in U by 2.
17. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

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

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

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan. Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended. Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Assay Validation Criteria

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

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

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

9.2. Calculation of Results

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

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

9.3. Interpretation of Results

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

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

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**. Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in Demeditec Units

$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Demeditec-Units} = U]$

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

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

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean value (OD)	CV (%)
Low positive serum	3 (69)	0.39	10.9
High positive serum	3 (72)	1.41	3.7
Intraassay	n	Mean value (OD)	CV (%)
Low positive serum	23	0.39	9.4
High positive serum	24	1.44	2.7

10.2. Diagnostic Specificity

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

10.3. Diagnostic Sensitivity

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

10.4. Interferences

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

10.5. Cross reactivity

Samples with IgG antibodies against Dengue virus, Tick born encephalitis, CMV, EBV and Helicobacter pylori showed no cross reactivity. Cross reactivity with antibodies against O'Nyong Nyong virus is not excluded.

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

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious. Wear gloves while performing the test
- **The Chikungunya antigens are inactivated. All materials should still be regarded and handled as potentially infectious. Wear gloves while performing the test. We recommend using the antigen under BSL2 cabinet (clean bench).**
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Acidic solution irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

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

1. EINLEITUNG

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

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

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

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

Alphavirusinfektionen sind in Europa selten, müssen aber als Import- oder Reiseinfektion beachtet werden.

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

Infektionen können folgendermaßen nachgewiesen werden:

RT-PCR als Nukleinsäurenachweis

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

Serologie: Nachweis von Antikörpern mittels der ELISA-Technik

2. VERWENDUNGSZWECK

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

3. TESTPRINZIP

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

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

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Chikungunya Mikrotiterplatte (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit anti-human IgG; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml saure Lösung, 0.4 N, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Chikungunya Antigen, lyophilisiert:** 6 Flaschen mit lyophilisierter Chikungunya Virus Antigen Lösung, rote Verschlusskappe
- **Chikungunya Antikörperlösung ****:** 1 Flasche mit 6 ml biotinylierter Chikungunya Virus Antikörper Lösung, gebrauchsfertig, blau gefärbt, weiße Verschlusskappe
- **Streptavidin-Konjugat**:** 1 Flasche mit 6 ml Streptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Chikungunya IgG Positivkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 1,5 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Chikungunya IgG Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Chikungunya IgG Negativkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 1,5 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

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

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

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

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

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

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

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

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

6.1. Mikrotiterplatte

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

6.2. Chikungunya Antigen

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

6.3. Chikungunya Antikörperlösung

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

6.4. Kontrollen

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

6.5. Waschlösung (20x konz.)

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

6.6. Probenverdünnungspuffer

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

6.7. Streptavidin-Konjugat

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

6.8. TMB-Substratlösung

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

6.9. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,4 N saure Lösung (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

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

7.1. Probenverdünnung

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

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

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

Hierbei mindestens

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

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

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 50 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 50 µl rekonstituiertem Chikungunya Antigen in alle Vertiefungen mit Ausnahme des Leerwertes pipettieren. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
6. **30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.**
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 50 µl Chikungunya Antikörperlösung in alle Vertiefungen mit Ausnahme des Leerwertes pipettieren. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
9. **30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.**
10. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
11. 50µl Streptavidin Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
12. **30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.**
13. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
14. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
15. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
16. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit negativer Matrix 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in U wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.
17. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

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

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

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

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

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

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**9.1. Testgültigkeitskriterien**

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

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

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

9.2. Messwertberechnung

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

Beispiel: $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation der Ergebnisse

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

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

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen.

Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

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

9.3.1. Ergebnisse in Einheiten [U]

Mittlere Extinktion der Patientenprobe x 10 = [Einheiten = U]

Cut-Off

Beispiel: $\underline{1.786} \times 10 = 47 \text{ U (Units)}$

0.38

Cut-Off: 10 U

Grauzone: 9-11 U

Negativ: <9 U

Positiv: >11 U

10. TESTMERKMALE**10.1. Präzision**

Interassay	n	Mittelwert (OD)	Vk (%)
Schwach positives Serum	3 (69)	0,39	10,9
Hoch positives Serum	3 (72)	1,41	3,7

Intraassay	n	Mittelwert (OD)	Vk (%)
Schwach positives Serum	23	0,39	9,4
Hoch positives Serum	24	1,44	2,7

10.2. Diagnostische Spezifität

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

10.3. Diagnostische Sensitivität

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

10.4. Interferenzen

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

10.5. Kreuzreaktivität

Proben mit IgG Antikörpern gegen Dengue Virus, FSME, CMV, EBV und Helicobacter pylori zeigten keine Kreuzreaktivität.

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

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

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

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

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

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

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

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

12.1. Entsorgungshinweise






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

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

SCHEME OF THE ASSAY

Chikungunya Virus IgG capture -ELISA

Assay preparation

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

Assay procedure

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