



Instructions for Use

Zika Virus IgG (capture) ELISA

IVD

CE

REF EIA-5984



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.

Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.

Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.

Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.

Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.

Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières

1	INTRODUCTION.....	3
2	INTENDED USE.....	3
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY	3
4	MATERIALS.....	4
5	STABILITY AND STORAGE	4
6	REAGENT PREPARATION	5
7	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	5
8	ASSAY PROCEDURE	6
9	RESULTS.....	6
10	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
12	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8

1	EINLEITUNG.....	10
2	VERWENDUNGSZWECK.....	10
3	TESTPRINZIP	10
4	MATERIALIEN	11
5	STABILITÄT UND LAGERUNG	11
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	12
7	ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN	12
8	TESTDURCHFÜHRUNG	13
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	13
10	TESTMERKMALE	14
11	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	15
12	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	15

1	INTRODUZIONE	17
2	USO PREVISTO	17
3	PRINCIPIO DEL TEST	17
4	MATERIALI	18
5	MODALITÀ DI CONSERVAZIONE	18
6	PREPARAZIONE DEI REAGENTI	19
7	PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	19
8	PROCEDIMENTO	20
9	RISULTATI.....	20
10	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	21
11	LIMITAZIONI	22
12	PRECAUZIONI E AVVERTENZE	22

1	INTRODUCCIÓN	23
2	USO PREVISTO	23
3	PRINCIPIO DEL ENSAYO	23
4	MATERIALES.....	24
5	ESTABILIDAD Y ALMACENAJE.....	24
6	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	25
7	TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	25
8	PROCEDIMIENTO	26
9	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	26
10	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	27
11	LIMITACIONES DEL ENSAYO	28
12	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	28
1	INTRODUCTION.....	30
2	INDICATION D'UTILISATION	30
3	PRINCIPE DU TEST	30
4	MATERIEL	31
5	STABILITE ET CONSERVATION	31
6	PREPARATION DES REACTIFS.....	32
7	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	32
8	PROCEDE DE TEST	33
9	RESULTATS	33
10	PERFORMANCES DU TEST.....	34
11	LIMITES DE LA TECHNIQUE	35
12	PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS	35
13	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA	37
14	SCHEME OF THE ASSAY	38
	SYMBOLS USED	39

1 INTRODUCTION

Zika Virus (ZIKV) is a single-stranded RNA virus of the Flaviviridae family (genus Flavivirus). It was first isolated in 1947 from a sentinel rhesus monkey during a yellow fever study in the Zika forest of Uganda.

Since its discovery, ZIKV circulation has been detected in Africa and Asia where it has caused sporadic human infections. In 2007 its emergence on Yap Island, Micronesia was reported, marking transmission of Zika virus outside Africa and Asia. Since 2013, ZIKV has been reported from French Polynesia, New Caledonia, Cook Islands, Easter Island (Chile), Samoa and Vanuatu, and in early 2015 it spread initially to Brazil and subsequently to additional countries of the Americas.

ZIKV is transmitted primarily through the bite of an infected Aedes species mosquito (*A. aegypti* and *A. albopictus*). However, there have been reports of less common transmission modes, such as blood transfusion, perinatal, and sexual contact.

The incubation period of Zika virus disease is not known precisely, but is likely to be a few days.

It is estimated that only one in five people infected with ZIKV develop signs or symptoms. Clinical manifestations of ZIKV infection are described as very similar to those of Dengue virus (DENV) and Chikungunya virus (CHIKV) infections, but usually milder.

The most common clinical signs and symptoms are maculopapular rash, low grade fever, arthralgia, myalgia, headache and conjunctivitis. Less frequently reported are oedema, sore throat, cough, vomiting, and haematospermia.

Human infections with ZIKV are usually mild and self-limiting and the symptoms usually resolve spontaneously after 3 - 7 days; arthralgia may persist for up to 1 month. In rare cases, after a Zika virus infection a Guillain-Barré syndrome (GBS), a disorder of the peripheral nerves, can probably occur. A correlation between a Zika virus infection in pregnancy and congenital brain malformations is now considered likely.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
Zika Virus (ZIKV)	Zika fever	Fever, headache, retro-orbital pain, conjunctivitis, maculopapular rash, myalgias, arthralgias	Primary mode of transmission via bite of <i>Aedes</i> mosquitos

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Isolation in cell culture
- PCR
- Serology: Detection of antibodies by IF, ELISA
Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)

2 INTENDED USE

The Zika Virus IgG capture ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against Zika virus in human serum or plasma (citrate, heparin).

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

Microtiterplates are coated with anti-human IgG-class antibodies to bind the corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled Zika virus antigen is added. This antigen-conjugate binds to the captured specific IgG antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific IgG antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microtiterplate reader.

4 MATERIALS

4.1 Reagents supplied

- **Microtiterplate (IgG):**
12 break-apart 8-well snap-off strips coated with anti-human IgG-class antibodies; in resealable aluminium foil.
- **Sample Dilution Buffer:**
1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2 ; coloured yellow; ready to use; white cap; $\leq 0.0015\% (v/v)$ CMIT/ MIT (3:1).
- **Stop Solution:**
1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):**
1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2 , for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:**
1 bottle containing 15 mL of peroxidase labelled Zika virus antigen; coloured blue; ready to use; black cap; $\leq 0.02\% (v/v)$ MIT.
- **TMB Substrate Solution:**
1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:**
1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; $\leq 0.02\% (v/v)$ MIT.
- **Cut-off Control:**
1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; $\leq 0.02\% (v/v)$ MIT.
- **Negative Control:**
1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; $\leq 0.0015\% (v/v)$ CMIT/ MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1.

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2 Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3 Materials and Equipment needed

- ELISA microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5 STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2 °C - 8 °C.

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

6 REAGENT PREPARATION

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

6.1 Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with anti-human IgG-class antibodies. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2 °C - 8 °C.

6.2 Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e.g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water.

The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20 °C - 25 °C).

In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C, e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3 TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2 °C - 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.

7 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay.

If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2 °C - 8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70 °C to -20 °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 Dilution Buffer.

Dispense 10 µL sample and 1 mL Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8 ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

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

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

Adjust the incubator to 37 °C ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells.
Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 °C ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 seconds. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at 37 °C ± 1 °C.** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1 Measurement

Adjust the ELISA microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value 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 standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

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

9 RESULTS

9.1 Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value **< 0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value **< Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** 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 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43

$$\text{Cut-off} = 0.43$$

9.2.1 Results in Units [DU]

Sample (mean) absorbance value × 10 = [DRG Units = DU]
Cut-off

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interpretation of Results

Cut-off	10 DU	-
Positive	> 11 DU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 DU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 DU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
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 immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.		

10 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

For further information about the specific performance characteristics please contact DRG.

10.1 Precision

Intra-assay	n	Mean (E)	CV (%)
# 1	24	0.422	6.7
# 2	24	1.062	2.1
# 3	24	0.988	2.6
Inter-assay	n	Mean (DU)	CV (%)
# 1	12	32.60	6.2
# 2	12	22.57	5.7
# 3	12	23.84	5.9

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.

It is 99.6 % (95 % confidence interval: 97.92 % - 99.99 %).

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.

It is 98.1 % (95 % confidence interval: 89.93 % - 99.95 %).

10.4 Interferences

Three clinical samples exhibiting differing reactivities were tested for interference with each substance listed in the table below: a positive, a negative, and an equivocal sample. All samples exhibited a change of signal less than 15 % when tested with each potential interferant.

Interferent	Concentration tested
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin conjugated	0.4 mg/mL
Bilirubin unconjugated	0.4 mg/mL
Cholesterol	4 mg/mL
Hemoglobin	10 mg/mL
Triglycerides	15 mg/mL

10.5 Cross Reactivity

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameters did not reveal significant evidence of false-positive results due to cross-reactions. However, in endemic areas, double infection as well as past infection with other flaviviruses should be considered.

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12 PRECAUTIONS AND WARNINGS

- 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 analysers 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 materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- 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.
- Do not interchange reagents or microtiterplates 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 standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1 Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



- | | |
|-----------|---|
| H317 | May cause an allergic skin reaction. |
| P261 | Avoid breathing spray |
| P280 | Wear protective gloves/ protective clothing. |
| P302+P352 | IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. |
| P333+P313 | If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention. |
| P362+P364 | Take off contaminated and Wash it before reuse. |

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2 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 Zikavirus (ZIKV) ist ein einzelsträngiges RNA Virus aus der Familie der Flaviviridae, Gattung Flavivirus. Das Virus wurde 1947 erstmals bei einem sentinel-Rhesusaffen im Zikawald in Uganda, Afrika, im Rahmen einer Gelbfieberstudie isoliert.

Seit seiner Entdeckung wurde eine Zirkulation des Zikavirus in Afrika und Asien festgestellt, wo es sporadisch Infektionen beim Menschen auslöste.

Im Jahr 2007 wurde ein Zikavirus Ausbruch auf der Insel Yap, Mikronesien, gemeldet, was eine Virusübertragung außerhalb von Afrika und Asien markiert.

Seit 2013 gibt es Berichte über das Auftreten des Zikavirus aus Französisch Polynesien, Neukaledonien, den Cookinseln, der Osterinsel (Chile), Samoa und Vanuatu. Anfang 2015 breitete sich das Virus in Brasilien und nachfolgend in weitere amerikanische Länder aus.

ZIKV wird vorwiegend durch den Stich infizierter Aedes Moskitos (*A. aegypti* und *A. albopictus*) übertragen. Allerdings gibt es Berichte über weniger häufige Übertragungsarten wie Bluttransfusionen, perinatal und über sexuellen Kontakt.

Die Inkubationszeit des Zika-Fiebers ist nicht genau bekannt, liegt wahrscheinlich aber bei wenigen Tagen.

Man nimmt an, dass nur einer von fünf mit Zikavirus infizierten Personen Symptome entwickelt. Klinische Manifestationen ähneln denen einer Dengue-Virus (DENV) oder Chikungunya-Virus (CHIKV) Infektion, zeigen aber normalerweise einen mildernden Verlauf.

Die häufigsten Symptome sind makulopapulöser Ausschlag, leichtes Fieber, Arthralgie, Myalgie, Kopfschmerzen und Konjunktivitis. Weniger häufig sind Ödeme, Halsschmerzen, Husten, Erbrechen und Hämatospermie. Infektionen beim Menschen sind gewöhnlich mild und selbstlimitierend, und die Symptome klingen normalerweise nach 3-7 Tagen spontan ab. Arthralgien können bis zu einem Monat andauern. In seltenen Fällen kann nach einer Zikavirus-Infektion wahrscheinlich auch ein Guillain-Barré-Syndrom (GBS), eine Erkrankung der peripheren Nerven, auftreten.

Ein Zusammenhang zwischen einer Zikavirus-Infektion in der Schwangerschaft und Hirnfehlbildungen beim ungeborenen Kind gilt mittlerweile als wahrscheinlich.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
Zikavirus (ZIKV)	Zikafieber	Fieber, Kopfschmerzen, retroorbitale Schmerzen, Konjunktivitis, makulopapulöses Exanthem, Myalgien, Arthralgien	Hauptsächlich über Stechmücken der Gattung <i>Aedes</i>

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Virusisolierung in Zellkultur
- PCR
- Serologie: Nachweis der Antikörper mittels IF, ELISA
Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT)

2 VERWENDUNGSZWECK

Der Zika Virus IgG capture ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen Zikavirus in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

3 TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) capture Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit anti-human IgG-Antikörpern beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Zikavirus Antigens. Dieses Antigen-Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen IgG-Antikörper. In einem zweiten Waschschritt wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen IgG-Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4 MATERIALIEN

4.1 Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:**
12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit anti-human IgG-Antikörpern; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer:**
1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH $7,2 \pm 0,2$; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; $\leq 0,0015\% \text{ (v/v)}$ CMIT/ MIT (3:1).
- **Stoplösung:**
1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):**
1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH $7,2 \pm 0,2$; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:**
1 Flasche mit 15 mL Peroxidase-konjugiertem Zika Virus Antigen; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe; $\leq 0,02\% \text{ (v/v)}$ MIT.
- **TMB-Substratlösung:**
1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), $< 0,1\%$; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:**
1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,02\% \text{ (v/v)}$ MIT.
- **Cut-off Kontrolle:**
1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,02\% \text{ (v/v)}$ MIT.
- **Negativkontrolle:**
1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,0015\% \text{ (v/v)}$ CMIT/ MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2 Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3 Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5 STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2 °C - 8 °C lagern.

Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1 Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit anti-human IgG-Antikörpern beschichtet.

Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2 °C - 8 °C lagern.

6.2 Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z. B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3 TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2 °C - 8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren.

Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7 ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat oder Heparin) verwendet werden.

Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70 °C bis -20 °C). Wieder aufgetaute 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. 10 µL Probe und 1 mL Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriften von drei auf bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 °C ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/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 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 Sekunden betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei 37 °C ± 1 °C inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.1 Messung

Mit Hilfe des **Substratleerwertes** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

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

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout 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

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert **< 0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert **< Cut-off**
- **Cut-off-Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert **> 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 Cut-off-Kontrolle.

Beispiel: $0,44 \text{ OD Cut-off-Kontrolle} + 0,42 \text{ OD Cut-off-Kontrolle} = 0,86 / 2 = 0,43$

$$\text{Cut-off} = 0,43$$

9.2.1 Ergebnisse in Einheiten [DU]

Mittlere Extinktion der Probe $\times 10$ = [DRG Einheiten = DU]

Cut-off

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 DU	-
Positiv	> 11 DU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 DU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als negativ .
Negativ	< 9 DU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.
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 serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.		

10 TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte DRG.

10.1 Präzision

Intra-Assay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
# 1	24	0,422	6,7
# 2	24	1,062	2,1
# 3	24	0,988	2,6
Inter-Assay	n	Mittelwert (DU)	Vk (%)
# 1	12	32,60	6,2
# 2	12	22,57	5,7
# 3	12	23,84	5,9

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 beträgt 99,6 % (95 % Konfidenzintervall: 97,92 % - 99,99 %).

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 98,1 % (95 % Konfidenzintervall: 89,93 % - 99,95 %).

10.4 Interferenzen

Drei klinische Proben mit unterschiedlichen Reaktivitäten wurden auf Interferenzen mit jeder in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Interferenzsubstanz getestet: eine positive, eine negative und eine grenzwertige Probe. Alle Proben wiesen eine Signaländerung von weniger als 15 % auf, wenn sie mit der jeweiligen potenziellen Interferenzsubstanz getestet wurden.

Interferenzsubstanz	Getestete Konzentration
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin konjugiert	0,4 mg/mL
Bilirubin unkonjugiert	0,4 mg/mL
Cholesterin	4 mg/mL
Hämoglobin	10 mg/mL
Triglyceride	15 mg/mL

10.5 Kreuzreaktivität

Die Untersuchung eines Probenpanels mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter ließ keine signifikanten Anzeichen von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von Kreuzreaktivitäten erkennen. Jedoch sollten in Endemiegebieten Doppelinfektionen sowie zurückliegende Infektionen mit anderen Flaviviren in Betracht gezogen werden.

11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12 SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung sind 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 Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reakтив getestet.
- 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, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

12.1 Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.



- | | | |
|---------|-----------|--|
| Achtung | H317 | Kann allergische Hautreaktionen verursachen. |
| | P261 | Einatmen von Aerosol vermeiden. |
| | P280 | Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen |
| | P302+P352 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen. |
| | P333+P313 | Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| | P362+P364 | Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen |

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

12.2 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.

1 INTRODUZIONE

Zika Virus (ZIKV) è un virus a RNA a singolo filamento della famiglia Flaviviridae (genere flavivirus). È stato isolato per la prima volta nel 1947 da una scimmia rhesus sentinella durante uno studio febbre gialla nella foresta Zika dell'Uganda.

Dalla sua scoperta, la circolazione di ZIKV è stata rilevata in Africa e in Asia, dove ha causato infezioni umane sporadiche. Nel 2007 la sua comparsa su Yap Island, la Micronesia è stata segnalata, che segna la trasmissione del virus Zika al di fuori Africa e in Asia. Dal 2013 ZIKA è stata segnalata nella Polinesia francese, Nuova Caledonia, Isole Cook, Isola di Pasqua (Cile), Samoa e Vanuatu, e nei primi mesi del 2015 diffusa inizialmente in Brasile e in seguito per altri paesi delle Americhe.

ZIKA si trasmette principalmente attraverso il morso di zanzara Aedes specie un infetto (A. aegypti e AE. Albopictus). Tuttavia, ci sono state segnalazioni di modalità di trasmissione meno comuni, come la trasfusione di sangue, perinatale, e il contatto sessuale.

Il periodo d'incubazione del virus della malattia Zika non è nota, ma è probabile che sia un paio di giorni.

Si stima che solo uno su cinque persone infettate con ZIKV sviluppano segni o sintomi. Le manifestazioni cliniche d'infezione ZIKA sono descritte come molto simili a quelli del virus della Dengue (DENV) e infezioni da virus Chikungunya (CHIKV), ma di solito più mite.

I segni clinici più comuni ed i sintomi sono rash maculopapulare, dolore retro-orbitale, lieve febbre, artralgia, mialgia, cefalea e congiuntiviti. Meno frequentemente riportati, sono edema, mal di gola, tosse, vomito e ematospermia.

L'infezioni umane con ZIKV sono generalmente lievi e auto-limitante ed i sintomi di solito si risolvono spontaneamente dopo 3-7 giorni; artralgia può persistere fino a 1 mese. In rari casi, dopo una infezione da virus Zika una sindrome di Guillain-Barré (GBS), una malattia dei nervi periferici, probabilmente può verificarsi. Non c'è consenso scientifico che l'infezione da virus Zika in gravidanza può essere una causa di microcefalia.

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
Zika virus (ZIKV)	Febbre Zika	Rash maculopapulare, dolore retro-orbitale, febbre, artralgia, mialgia, cefalea e congiuntiviti	Principalmente attraverso il morso di zanzara Aedes infetta

L'infezione o la presenza di un agente patogeno può essere identificata da:

- L'isolamento del virus in coltura cellulare
- PCR
- Sierologia: Rilevamento degli anticorpi per ELISA, IF
Test di neutralizzazione riduzione placca (d'inglese do inglés Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT))

2 USO PREVISTO

Il Zika Virus IgG capture ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgG contro Zika virus nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

3 PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli anticorpi della classe IgG si basa sulla capture tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Piastre di Microtitolazione sono rivestite con anticorpi della classe IgG anti-umane che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, la perossidasi di rafano (HRP) coniugata con antigeni del virus Zika, viene aggiunto. Quest'antigene coniugato si lega agli anticorpi specifici IgG catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu.

L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici IgG presenti nel campione. acido solforico si per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm sono letto utilizzando un fotometro di Piastre di Microtitolazione ELISA.

4 MATERIALI

4.1 Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:**
12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi anticorpi della classe IgG anti-umane; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone di Diluizione del Campione:**
1 flacone contenente 100 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH $7,2 \pm 0,2$; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Soluzione Bloccante:**
1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di Lavaggio (20x conc.):**
1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH $7,2 \pm 0,2$; tappo bianco.
- **Coniugato:**
1 flacone contenente 15 mL di gli antigeni del virus Zika, coniugati a perossidasi; colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Soluzione Substrato TMB:**
1 flacone contenente 15 mL di 3,3` ,5,5` -Tetrametilbenzidina (TMB); $< 0,1\%$; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo positivo:**
1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Controllo Cut-off:**
1 flacone da 3 mL controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Controllo Negativo:**
1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 12.1.

Per le sostanze potenziali pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

4.2 Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

4.3 Materiali e attrezzi necessari

- Fotometro per Piastre di Microtitolazione con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di Piastre di Microtitolazione
- Micropipette per l'uso tra 10 - 1000 µL
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

5 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2 °C - 8 °C.

I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2 °C - 8 °C.

6 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

6.1 Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con anticorpi della classe IgG anti-umane.

Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillate nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2 °C - 8 °C.

6.2 Tampone di Lavaggio (20x conc.)

Diluire il Tampone di lavaggio 1+19; per esempio 10 mL del Tampone di lavaggio + 190 mL di acqua distillata.

Il Tampone di lavaggio diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

6.3 Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

7 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare per queste teste campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano.

Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2 °C - 8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70 °C a -20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1 Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni **1+100** con Tampone di Diluizione del Campione.

Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL di Tampone di Diluizione del Campione e mescolare bene (Vortex).

8 PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi de 3 a 5 volte e il volume del Tampone di lavaggio da 300 µL a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 °C ± 1 °C.

1. Pipettare 100 µL di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti.
Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora ± 5 min a 37 °C ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo.
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi!
5. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a 37 °C ± 1 °C.** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µL di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µL di Soluzione bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della Soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione bloccante.

8.1 Misurazione

Regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione ELISA **a zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

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

9 RISULTATI

9.1 Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti Istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < 0,100
- **Controllo Negativo:** Valore di assorbanza < Cut-off
- **Controllo Cut-off:** Valore di assorbanza 0,150 – 1,300
- **Controllo Positivo:** Valore di assorbanza > Cut-off

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

9.2 Calcolo dei risultati

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

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,42 = 0,86 / 2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1 Risultati in unità [DU]

Assorbanza media del campione × 10 = [unità DRG = DU]

Cut-off

Esempio: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interpretazione dei risultati

Cut-off	10 DU	-
Positivo	> 11 DU	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).
Zona grigia	9 – 11 DU	Anticorpi contro il patogeno non sono stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. Se il risultato è nuovamente nella zona grigia, il campione viene giudicato come negativo .
Negativo	< 9 DU	Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile.

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test.
È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente.
I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

10 CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato, questi non sono specifiche garantite.

Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare DRG.

10.1 Precisione

Intra dosaggio	n	Media (E)	CV (%)
# 1	24	0,422	6,7
# 2	24	1,062	2,1
# 3	24	0,988	2,6
Inter dosaggio	n	Media (DU)	CV (%)
# 1	12	32,60	6,2
# 2	12	22,57	5,7
# 3	12	23,84	5,9

10.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analita specifici. La specificità diagnostica è 99,6 % (95% Intervallo di confidenza: 97,92 % - 99,99 %).

10.3 Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifici. La sensibilità diagnostica è 98,1 % (95% Intervallo di confidenza: 89,93 % - 99,95 %).

10.4 Possibili interferenze

Sono stati testati tre campioni clinici che presentavano reattività diverse per verificare la presenza di interferenze con ciascuna delle sostanze elencate nella tabella seguente: un campione positivo, uno negativo e uno equivoco. Tutti i campioni hanno mostrato un cambiamento di segnale inferiore al 15 % quando sono stati testati con ogni potenziale interferente.

Sostanza Interferente	Concentrazione testata
Albumina	60 mg/mL
Bilirubina coniugata	0,4 mg/mL
Bilirubina non coniugata	0,4 mg/mL
Colesterolo	4 mg/mL
Emoglobina	10 mg/mL
Trigliceridi	15 mg/mL

10.5 Reattività crociata

L'investigazione di un gruppo di campioni con attività di anticorpi contro parametri potenzialmente interferenti non ha rivelato evidenza significativa di risultati falsamente positivi dovuto a reattività crociata. Tuttavia, in aree endemiche, doppia infezione così come l'infezione passato con altri flavi virus deve essere considerati.

11 LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelamento possono alterare i valori delle assorbanze.

12 PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

12.1 Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 4.1)

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.



Attenzione

- | | |
|-----------|--|
| H317 | Può provocare una reazione allergica cutanea. |
| P261 | Evitare di respirare gli aerosol. |
| P280 | Indossare guanti/ indumenti protettivi. |
| P302+P352 | IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua. |
| P333+P313 | In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. |
| P362+P364 | Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. |

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

12.2 Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

1 INTRODUCCIÓN

Zika Virus (ZIKV) es un virus de ARN monocatenario de la familia Flaviviridae (género Flavivirus). Fue aislado por primera vez en 1947 a partir de un mono rhesus centinela durante un estudio de la fiebre amarilla en el bosque Zika de Uganda.

Desde su descubrimiento, la circulación del virus ZIKA (ZIKV) se ha detectado en África y Asia, donde ha causado infecciones humanas esporádicas. En 2007 su aparición en la isla de Yap, se informó de Micronesia, marcando la transmisión del virus Zika fuera de África y Asia. En 2013, el virus ZIKA (ZIKV) fue encontrado en Polinesia Francesa, Nueva Caledonia, las Islas Cook, Isla de Pascua (Chile), Samoa y Vanuatu, ya principios de 2015 se extendió inicialmente a Brasil y posteriormente a otros países de las Américas.

ZIKA se transmite principalmente a través de la picadura de un mosquito infectado Aedes especies (A. aegypti y AE. Albopictus). Sin embargo, ha habido informes de los modos de transmisión menos comunes, tales como la transfusión sanguínea, perinatal, y el contacto sexual.

El período de incubación de la enfermedad de virus Zika no se conoce con precisión, pero es probable que sea un par de días.

Se estima que sólo una de cada cinco personas infectadas con ZIKA desarrollan signos o síntomas. Las manifestaciones clínicas de la infección ZIKA se describen como muy similares a las del virus del Dengue (DENV) y las infecciones de virus Chikungunya (CHIKV), pero por lo general más suave.

Los signos y síntomas clínicos más comunes son erupción maculopapular, dolor retro-orbital, fiebre de bajo grado, artralgia, mialgia, dolor de cabeza y conjuntivitis. Menos frecuentemente reportados son el edema, dolor de garganta, tos, vómitos y hematospermia.

Las infecciones humanas ZIKA generalmente son leves y autolimitados y los síntomas generalmente se resuelven espontáneamente después de 3-7 días; artralgia puede persistir por hasta 1 mes. En casos raros, después de una infección por el virus Zika un síndrome de Guillain-Barré (GBS), un trastorno de los nervios periféricos, probablemente puede ocurrir. No existe un consenso científico de que la infección por virus Zika en el embarazo puede ser una causa de microcefalia.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
Virus del Zika (ZIKV)	La fiebre del Zika	Erupción maculopapular, dolor retro-orbital, fiebre, artralgia, mialgia, dolor de cabeza y conjuntivitis	Principalmente a través de la picadura de un mosquito Aedes infectado

La infección o la presencia de un patógeno puede identificarse mediante:

- El aislamiento del virus en cultivo celular
- PCR
- Serología: Detección de anticuerpos por ELISA, IF Neutralización por reducción de placas (do inglés Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT))

2 USO PREVISTO

El Enzimoimmunoensayo Zika Virus IgG capture ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos de clase IgG contra Zika en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos de la clase IgG se basa en la capture técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con anticuerpos a la clase IgG anti-humanos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, se añade la peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con antígenos del virus Zika. Este antígeno-conjugado se une a los anticuerpos específico IgG capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo substrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos IgG en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placas de Microtitulaciones ELISA.

4 MATERIALES

4.1 Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulacións:**
12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con anticuerpos de la clase IgG anti- humanos, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de Dilución de Muestras:**
1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solución de Parada:**
1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de Lavado (20x conc.):**
1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca.
- **Conjugado:**
1 botella de 15 mL de conjugado de antigenos de Virus Zika con peroxidasa; color azul; tapa negra; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Solución de Sustrato de TMB:**
1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); < 0,1%; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:**
1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:**
1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Negativo:**
1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2 Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3 Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulacións con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placa de Microtitulacións
- Micropipetas para uso de (10 - 1000 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5 ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2 °C - 8 °C.

Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2 °C - 8 °C.

6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1 Placa de Microtitulación

As tiras rompibles están recubiertas con anticuerpos a la clase IgG anti-humanos. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2 °C - 8 °C.

6.2 Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir el Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 mL del Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada. El Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución

6.3 Solución de Sustrato de TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2 °C - 8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

7 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano.

Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2 °C - 8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-70 °C a -20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1 Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación **1 + 100** con el Tampón de Dilución de Muestras para la muestra de,

por ejemplo 10 µL de la muestra con 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8 PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo antes de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado) en el esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

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

Graduar la incubadora a 37 °C ± 1 °C.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h ± 5 min a 37 °C ± 1 °C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL de la Tampón de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a 37 °C ± 1 °C.** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetear 100 µL de la Solución de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con la Solución de sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.1 Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA **al cero** utilizando **el Blanco**.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en el **esquema de la placa**.

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

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

9 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1 Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < 0,100
- **Control Negativo:** valor de la extinción < Cut-off
- **Control Cut-off:** valor de la extinción 0,150 – 1,300
- **Control Positivo:** valor de la extinción > Cut-off

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

9.2 Cálculo del valor de la medición

El cut-off es el valor promedio de la extinción de las determinaciones del Controle Cut-off.

Ejemplo: 0,42 valor de la extinción Control Cut-off + 0,44 valor de la extinción Control Cut-off = 0,86 / 2 = 0,43

$$\text{Cut-off} = 0,43$$

9.2.1 Resultados en unidades [DU]

Promedio valor de la extinción de la muestra × 10 = [DRG-unidades = DU]
Cut-off

Ejemplo: $\frac{1.591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interpretación de los resultados

Cut-off	10 DU	-
Positivo	> 11 DU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 DU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa .
Negativo	< 9 DU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

10 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto DRG.

10.1 Precisión

Intra ensayo n Promedio (E) CV (%)

# 1	24	0,422	6,7
# 2	24	1,062	2,1
# 3	24	0,988	2,6

Inter ensayo n Promedio (DU) CV (%)

# 1	12	32,60	6,2
# 2	12	22,57	5,7
# 3	12	23,84	5,9

10.2 Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 99,6 % (95% Intervalo de confianza: 97,92 % - 99,99%).

10.3 Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 98,1 % (95% Intervalo de confianza: 89,93 % - 99,95 %).

10.4 Interferencias

Se analizaron tres muestras clínicas que presentaban diferentes reactividades para detectar interferencias con cada una de las sustancias enumeradas en el cuadro que figura a continuación: una muestra positiva, una negativa y una equívoca. Todas las muestras mostraron un cambio de señal inferior al 15 % cuando se probaron con cada interferente potencial.

Sustancias que Interfieren	Concentration tested
Albúmina	60 mg/mL
La bilirrubina conjugada	0,4 mg/mL
Bilirrubina no conjugada	0,4 mg/mL
Colesterol	4 mg/mL
Hemoglobina	10 mg/mL
Triglicéridos	15 mg/mL

10.5 Reactividad cruzada

Pruebas realizadas con un panel de muestras con distinta actividad de anticuerpos para estudiar parámetros de reactividad no reveló evidencia significativa de resultados falsos positivos debidos a reactividad cruzada. No obstante, en las zonas endémicas, la infección doble, así como infección previa por otros flavivirus deben ser considerados.

11 LIMITACIONES DEL ENSAYO

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

12 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrir las y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1 Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.



- Atención**
- | | |
|-----------|---|
| H317 | Puede provocar una reacción alérgica en la piel. |
| P261 | Evitar respirar el aerosol. |
| P280 | Llevar guantes/ prendas de protección. |
| P302+P352 | EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua. |
| P333+P313 | En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. |
| P362+P364 | Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. |

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2 Indicaciones para la eliminación de residuos

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

1 INTRODUCTION

Zika Virus (ZIKV) est un virus à ARN monocaténaire de la famille des Flaviviridae (du genre Flavivirus). Il a été isolé pour la première fois en 1947 à partir d'un singe rhésus sentinelle au cours d'une études sur la fièvre jaune dans la forêt Zika en Ouganda.

Depuis sa découverte, la circulation ZIKV a été détectée en Afrique et en Asie où elle a provoqué des infections humaines sporadiques. En 2007, son émergence sur l'île de Yap, Micronésie a été relaté, marquant ainsi la transmission du virus Zika dehors de l'Afrique et de l'Asie. Depuis 2013, Zika a été rapporté en Polynésie française, en Nouvelle-Calédonie, en les îles Cook, en l'île de Pâques (Chili), en Samoa et en Vanuatu, et au début de 2015, il se propage d'abord au Brésil, puis à d'autres pays des Amériques.

Zika est transmis principalement par la piqûre d'un moustique Aedes des espèces (*A. aegypti* et *AE. Albopictus*) infecté. Cependant, il y a eu des rapports sur les modes de transmission moins courantes, telles que la transfusion sanguine, périnatale et par voie sexuelle.

La période d'incubation de Zika maladie virale ne soit pas connu avec précision, mais est susceptible d'être à quelques jours.

On estime que seulement une personne sur cinq infectées par ZIKV développe des signes ou des symptômes. Les manifestations cliniques de l'infection ZIKV sont décrits comme étant très similaires à ceux du virus de la Dengue (MDE) et le virus Chikungunya (CHIKV) infections, mais généralement plus doux.

Les signes cliniques et les symptômes les plus courants sont éruption cutanée (maculo-papuleux), douleur rétro-orbitaire, une fièvre modérée, arthralgies, myalgies, des céphalées et une conjonctivite. Sont moins fréquemment rapportés l'œdème, des maux de gorge, toux, vomissements et Hémospermie.

Les infections humaines par le virus Zika sont généralement légères et auto-limitation et les symptômes disparaissent généralement spontanément après 3-7 jours; arthralgie peut persister jusqu'à 1 mois. Cependant, en de rares cas, après une infection par le virus Zika un syndrome de Guillain-Barré (SGB), un trouble des nerfs périphériques, peuvent probablement survenir. Il n'y a pas de consensus scientifique que l'infection par le virus Zika pendant la grossesse peut être une cause de microcéphalie.

Espèce	La maladie	Symptômes (p.ex.)	Modes de transmission
Zika Virus (ZIKV)	Zika fièvre	éruption cutanée (maculo-papuleux), douleur rétro-orbitaire, fièvre, arthralgies, myalgies, des céphalées et conjonctivite	Principalement par la piqûre d'un moustique <i>Aedes</i>

L'infection ou la présence d'un agent pathogène peut être identifiée par :

- Isolement en culture cellulaire
- PCR
- Sérologie: Détection des anticorps par IF, ELISA
Séronutralisation par réduction des plages de lyse (du anglais Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT))

2 INDICATION D'UTILISATION

La trousse Zika Virus IgG capture ELISA est prévue pour la détection qualitative des anticorps de classe IgG contre Zika Virus dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

3 PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps spécifiques de la classe d'IgG est basée sur la capture technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Plaques de Microtitrage sont recouvertes avec anticorps classe IgG anti- humaine pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des trous pour éliminer l'échantillon détaché, la peroxydase de raifort (HRP) conjuguée à Zika virus antigènes, est ajouté. L'antigène conjugué se lie aux anticorps spécifique IgG capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques IgG dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un photomètre de Plaques de Microtitrage ELISA.

4 MATERIEL

4.1 Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:**
12 barrettes de 8 puits sécables revêtus des anticorps classe IgG anti- humaine; en sachets d'aluminium refermables.
- **Tampon de Dilution d'Échantillon:**
1 flacon contenant 100 mL de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH $7,2 \pm 0,2$; couleur jaune; bouchon blanc; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solution d'Arrêt:**
1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; couvercle rouge.
- **Tampon de Lavage (concentrée x 20):**
1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois, pH $7,2 \pm 0,2$ pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué:**
1 flacon contenant 15 mL d'antigène Zika Virus conjuguées à peroxydase du raifort; prêt à l'emploi; couleur bleue, bouchon noir; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Solution de Substrat TMB:**
1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB); $< 0,1\%$; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
- **Contrôle Positif:**
1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Contrôle Cut-off:**
1 flacon contenant 3 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon vert; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Contrôle Négatif:**
1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 12.1.

Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

4.2 Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

4.3 Matériel et équipement requis

- Photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des Plaque de Microtitrage
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µL
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

5 STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2 °C - 8 °C.

Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2 °C - 8 °C.

6 PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20 °C - 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

6.1 Plaque de Microtitrage

Les barrettes sécables sont revêtues avec des anticorps de classe IgG anti-humaine.

Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrette restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2 °C - 8 °C.

6.2 Tampon de Lavage (conc. x 20)

Diluer le Tampon de Lavage 1+19; par exemple 10 mL du Tampon de Lavage + 190 mL d'eau distillée.

Le Tampon de Lavage diluée est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20 °C - 25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

6.3 Solution de Substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2 °C - 8 °C, à l'abri de la lumière.

La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

7 PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons de serum humain ou plasma (citrate, héparine) pour ce test.

Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2 °C - 8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70 °C à -20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1 Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués **1+100** avec Tampon de Dilution d'Échantillon.

Diluer 10 µL d'échantillon avec 1 mL Tampon de Dilution d'Échantillon dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8 PROCEDE DE TEST

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un systèmes automatiques pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du Tampon de Lavage de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi sur la feuille présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

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

Régler l'incubateur à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1. Pipeter 100 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs.
Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL du Tampon de Lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être >5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape!
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats.
5. Pipeter 100 µL du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. **Incuber pendant 30 minutes à $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µL de la Solution de Substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante ($20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Pipeter 100 µL de la Solution d'Arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la Solution de Substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la Solution d'Arrêt.

8.1 Mesure

Réglez le Photomètre de Plaques de Microtitrage ELISA **à zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le Photomètre de Plaques de Microtitrage ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

Mesurer l'absorbance de tous les puits **à 450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

9 RESULTATS

9.1 Critères de validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ces instructions d'utilisation doivent être strictement suivies, et les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat:** Valeur d'absorbance $< 0,100$
- **Contrôle Négatif:** Valeur d'absorbance $< \text{Cut-off}$
- **Contrôle Cut-off:** Valeur d'absorbance $0,150 - 1,300$
- **Contrôle Positif:** Valeur d'absorbance $> \text{Contrôle cut-off}$

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommandé.

9.2 Calcul des résultats

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

Exemple: Valeur d'absorbance Contrôle Cut-off 0,44 + Valeur d'absorbance Contrôle Cut-off 0,42 = 0,86 / 2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1 Résultats en unités [DU]

Valeur (moyenne) d'absorbance de l'échantillon x 10 = [unités DRG = DU]
Cut-off

Exemple: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interprétation des résultats

Cut-off	10 DU	-
Positif	> 11 DU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il ya eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin).
Zone grise	9 – 11 DU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène ne pouvaient pas être détectés clairement. Il est recommandé de répéter le test avec un échantillon frais dans 2 à 4 semaines. Si le résultat est encore dans la zone grise l'échantillon est jugé négatif .
Négatif	< 9 DU	L'échantillon ne contient pas d'anticorps contre l'agent pathogène. Un contact préalable avec l'antigène (pathogène resp. vaccin) est peu probable.
Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limité dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.		

10 PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties. Pour plus d'informations sur les performances du test s'il vous plaît contactez DRG.

10.1 Précision

Intra-essai **n** **moyenne (E)** **CV (%)**

# 1	24	0,422	6,7
# 2	24	1,062	2,1
# 3	24	0,988	2,6

Inter-essai **n** **moyenne (DU)** **CV (%)**

# 1	12	32,60	6,2
# 2	12	22,57	5,7
# 3	12	23,84	5,9

10.2 Spécificité diagnostique

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

Elle est 99,6 % (95% Intervalle de confiance: 97,92 % - 99,99 %).

10.3 Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique.

Elle est 98,1 % (95% Intervalle de confiance: 89,93 % - 99,95 %).

10.4 Interférences

Trois échantillons cliniques présentant des réactivités différentes ont été testés pour détecter toute interférence avec chacune des substances énumérées dans le tableau ci-dessous: un échantillon positif, un échantillon négatif et un échantillon équivoque. Tous les échantillons ont présenté une variation du signal inférieure à 15 % lors des tests avec chaque interférant potentiel.

Substance Interférente	Concentration testée
Albumin	60 mg/mL
Bilirubine conjuguée	0,4 mg/mL
Bilirubine non conjuguée	0,4 mg/mL
Cholestérol	4 mg/mL
Hémoglobine	10 mg/mL
Triglycérides	15 mg/mL

10.5 Réaction croisée

L'étude d'un panel d'échantillons avec des anticorps dirigés contre différents paramètres interférents n'a pas révélé d'évidence significative de résultats faussement positifs dus à des réactions croisées. Cependant, dans les zones endémiques, l'infection double et une infection passée avec d'autres flavivirus doivent être considérés.

11 LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

12 PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les Plaque de Microtitrage provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

12.1 Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 4.1)

Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.



Attention

- | | |
|-----------|--|
| H317 | Peut provoquer une allergie cutanée. |
| P261 | Éviter de respirer les aérosols. |
| P280 | Porter des gants de protection/ des vêtements de protection. |
| P302+P352 | EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau. |
| P333+P313 | En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. |
| P362+P364 | Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. |

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

12.2 Elimination des déchets

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

13 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

1. Lanciotti, Robert S.; Kosoy, Olga L.; Laven, Janeen J.; Velez, Jason O.; Lambert, Amy J.; Johnson, Alison J. et al. (2008): Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. In *Emerging infectious diseases* 14 (8), pp. 1232–1239. DOI: 10.3201/eid1408.080287.
2. Lazear, Helen M.; Diamond, Michael S. (2016): Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. In *Journal of virology* 90 (10), pp. 4864–4875. DOI: 10.1128/JVI.00252-16.
3. Musso, Didier; Gubler, Duane J. (2016): Zika Virus. In *Clinical Microbiology Reviews* 29 (3), pp. 487–524. DOI: 10.1128/CMR.00072-15.
4. Petersen, Lyle R.; Jamieson, Denise J.; Powers, Ann M.; Honein, Margaret A. (2016): Zika Virus. In *The New England Journal of Medicine* 374 (16), pp. 1552–1563. DOI: 10.1056/NEJMra1602113.
5. Rasmussen, Sonja A.; Jamieson, Denise J.; Honein, Margaret A.; Petersen, Lyle R. (2016): Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. In *The New England Journal of Medicine* 374 (20), pp. 1981–1987. DOI: 10.1056/NEJMsr1604338.
6. Waggoner, Jesse J.; Pinsky, Benjamin A. (2016): Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. In *Journal of Clinical Microbiology* 54 (4), pp. 860–867. DOI: 10.1128/JCM.00279-16.
7. Weaver, Scott C.; Reisen, William K. (2010): Present and future arboviral threats. In *Antiviral research* 85 (2), pp. 328–345. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
8. Zammarchi, Lorenzo; Stella, Giulia; Mantella, Antonia; Bartolozzi, Dario; Tappe, Dennis; Gunther, Stephan et al. (2015): Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. In *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 63, pp. 32–35. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.12.005.

▪ Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

14 SCHEME OF THE ASSAY**Test Preparation**

Prepare reagents and samples as described.

Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.

Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit					
Incubate for 1 h at 37 °C ± 1 °C					
Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at 37 °C					
Do not expose to direct sunlight					
Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark					
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	In vitro diagnostic medical device *	In-vitro-Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Temperature de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	Unique device Identifier *	einheitige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité
MTP	Microtiterplate	Mikrotiterplatte	Piastre di Microtitolazione	Placa de Microtitulación	Plaque de Microtitrage
CONJ	Conjugate	Konjugat	Coniugato	Conjugado	Conjugué
CONTROL -	Negative Control	Negativkontrolle	Controllo negativo	Control positivo	Contrôle négatif
CONTROL +	Positive Control	Positivkontrolle	Controllo positivo	Control positivo	Contrôle positif
CUT OFF	Cut off control	Cut off-Kontrolle	Controllo Cut-off	Control Cut-off	Contrôle Cut-off
CAL	Standard or Calibrator	Standard oder Kalibrator	Standard o Calibratore	Estándar o Calibrador	Standard o Etalon
DIL	Sample Dilution Buffer	Probenverdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione	Tampón de Dilución de Muestra	Tampon de Dilution d'Echantillon
DIL A	IgA Sample Dilution Buffer	IgA-Proben-verdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgA	Tampón de Dilución de Muestra IgA	Tampon de Dilution d'Echantillon IgA
DIL G	IgG Sample Dilution Buffer	IgG-Proben-verdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgG	Tampón de Dilución de Muestra IgG	Tampon de Dilution d'Echantillon IgG
DIL M	IgM Sample Dilution Buffer	IgM-Proben-verdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgM	Tampón de Dilución de Muestra IgM	Tampon de Dilution d'Echantillon IgM
SOLN STOP	Stop solution	Stopplösung	Soluzione bloccante	Solución de parada	Solution d'arrêt
SUB TMB	TMB Substrate solution	TMB-Substratlösung	Soluzione substrato TMB	Solución de sustrato de TMB	Solution de substrat TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated	Waschpuffer 20x konzentriert	Tampone di lavaggio concentrazione x20	Tampón de lavado concentrado x20	Tampon de lavage concentré 20 x