ENZYWELL

CYTOMEGALOVIRUS IgM

REF 91011 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/ Hersteller:
Κατασκευάζεται από/ Fabricado por/ Fabriqué par:
DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente **Changes introduced in the current revision** **Eingeführte Änderungen in der vorliegenden Fassung** **Τροποποιήσεις που εισήχθησαν στην τρέχουσα διόρθωση** **Cambios introducidos en la revisión actual** **Modifications apportées à la révision courante** **Alterações introduzidas na revisão atual**	**4 – 10**

CE
0123

Rif. IO - 09/002 – Inf. Tecn. 91011 – Ed. 04.02.2019

INDICE / INDEX / INHALT/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE /CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / VERWENDUNGSZWECK/ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / PHYSIOLOGIE/ ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃA DO TESTE

3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / TESTPRINZIP/ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃA DO REAGENTE /

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN /ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN/ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ART UND LAGERUNG DER PROBEN / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / TESTDURCHFÜHRUNG / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /

9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / TESTSCHEMA /ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /

10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / TESTVALIDIERUNG / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃA DO TESTE /

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / GRENZEN DES VERFAHRENS / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /

13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ANALYTISCHE SPEZIFITÄT /ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT /ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

15. PRECISIONE / PRECISION / PRÄZISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / "TROUBLE SHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN) /ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / LITERATUR / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS

ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL
CYTOMEGALOVIRUS IgM

REF 91011 **(Italiano)**

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO A CATTURA PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM ANTI CYTOMEGALOVIRUS NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL' INFEZIONE DA CYTOMEGALOVIRUS.

2. INTRODUZIONE

Il cytomegalovirus è un herpes virus che si trasmette in stretto contatto interumano.
La maggior parte dei soggetti risulta infettata in modo asintomatico. Il virus, al contrario, è molto pericoloso nei pazienti immunodepressi nei quali può provocare la morte. Le donne sieronegative che contraggono la malattia durante la gravidanza la possono trasmettere al feto. Nel 95% dei casi questo avviene senza conseguenze ma nei neonati sintomatici si può avere ittero, epato-splenomegalia e ritardo psicomotorio. Per questo è molto importante conoscere lo stato immunitario della paziente ed osservare l'eventuale sieroconversione.
Il dosaggio delle IgM specifiche è di grande importanza per la diagnosi di infezione primaria.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test per il dosaggio delle IgM anti cytomegalovirus si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline da parte di anticorpi monoclonali anti IgM umane presenti sulla fase solida. Una successiva incubazione con l'antigene del cytomegalovirus complessato con monoclonale coniugato a perossidasi di rafano selezionerà gli anticorpi IgM specifici per l'antigene e rivelabili per aggiunta del substrato per la perossidasi.
Quando la reazione enzimatica è interrotta dall'aggiunta di una soluzione di acido solforico la colorazione diventa gialla. Il colore, proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel siero, può essere letto in un lettore per micropiastre ELISA.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

MT PLATE MICROPIASTRA. 12 x 8 pozzetti sensibilizzate con anticorpi monoclonali anti-IgM umane.
Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (M seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL
Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.
Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT OFF 1x2.5 mL
Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.
Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

Ag ANTIGENE. Liofilo x 6 fiale
Contenuto: Cytomegalovirus, parzialmente purificato e reso non infettivo tramite trattamento con Beta-propiolattone, in tampone fosfato contenente lattosio.
Preparazione: Ricostituire con il volume di coniugato indicato in etichetta, agitando per inversione.

CONJ CONIUGATO 1 x 18 mL
Contenuto: anticorpi monoclonali marcati con perossidasi, in soluzione di tampone fosfato con fenolo 0.05% e conservante.
Preparazione: pronto all'uso.
L'immunocomplesso deve essere preparato 45 minuti circa prima dell'uso.

CONTROL IgM - IgM CONTROLLO NEGATIVO (PF93900) 1x1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .
Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, disciogliерli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Da utilizzare per la diluizione dei campioni.
Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0.09% più colorante (metilarancio).

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

H_2SO_4 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Soluzione di H_2SO_4 0.3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).
BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD ≥ 2.000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.
La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

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

REAGENTE	**CONDIZIONI**
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
ANTIGENE RICOSTITUITO	15 gg 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana; 15/30°C al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.
Attenzione*:*

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

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

Avvertenze per la sicurezza personale

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

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

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
   Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'utilizzo del kit con strumenti automatici deve essere validato da parte dell'utilizzatore.

13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
    - installazione e requisiti particolari
    - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
    - specifiche del produttore e performance dello strumento
    - manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

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

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Preparare l'antigene ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato).In uno strip porre i controlli NON DILUITI (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è 1 negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.
Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL di immunocomplesso (antigene/anticorpi monoclonali marcati con Perossidasi) per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min.

9. Schema del saggio

STEP 1	Mettere 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti dello strip.
	-
	Incubare 45 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte (300 µl)
	-
STEP 2	Mettere 100 µL dell'immunocomplesso per pozzetto
	-
	Incubare 45 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte (300 µl)
	-
STEP 3	Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto
	-
	Incubare 15 min. a t.a.
	-
STEP 4	Aggiungere 100 µL di Stop Solution
	-
	Leggere le D.O. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 0.100) a tutte le altre letture.
Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off.
Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere < 0.6.
La D.O. del Cut-Off deve essere ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.
Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off (INDEX). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2.

Dubbio: = ± 20% del Cut-off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8.

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

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Tutti i risultati positivi necessitano di una attenta interpretazione, in quanto si possono avere dei risultati falso-positivi o delle risposte eterotipiche delle IgM nei sieri di pazienti affetti da mononucleosi eterofilo-positiva, o Varicella Zoster.
Una risposta specifica della classe IgM si può avere nella riattivazione e la reinfezione, come pure nelle infezioni primarie da CMV.
Poiché la diagnosi sierologica dell'infezione congenita comporta notevoli difficoltà, l'isolamento virale dalle urine durante la prima settimana di vita rimane la tecnica più sicura per diagnosticare un'infezione intrauterina. L'assenza delle IgM specifiche anti-CMV non esclude la presenza di un'infezione da CMV. E' stato riferito che il 10-30% di neonati non sviluppa una risposta anticorpale anti-CMV di tipo IgM, malgrado la presenza dell'infezione congenita.
I risultati devono essere sempre interpretati insieme ad altri dati provenienti dalla valutazione clinica e da altre indagini diagnostiche. Campioni fortemente positivi per la presenza di IgM anti-Varicella Zoster (VZV) ed Epstein Barr possono dare risultati falsamente positivi.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 44 campioni di sieri contenti potenziali interferenti:

- Fattore Reumatoide (n=8)
- Anticorpi eterofili (n=4)
- Bilirubina (n=8)
- Trigliceridi (n=9)
- Varicella Zoster IgM positivi (n=2)
- Ipergammaglobulinemia (n=13)

Si sono avuti due risultati dubbi nei campioni VZV ed eterofili positivi e nessuna interferenza in tutti gli altri.

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica, 105 campioni appartenenti a pazienti compatibili con una infezione da CMV erano analizzati con il nostro kit in parallelo al metodo preso come riferimento per stabilire la sensibilità. Nel riferimento, 62 risultavano effettivamente positivi.

Per determinare la specificità si sono impiegati 222 campioni di cui 87 donatori, 92 campioni IgG negativi e 43 pazienti negativi al test di riferimento.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

Il kit Enzywell ha una sensibilità del 98.4 % ed una specificità del 97.8 %.

15. PRECISIONE

Precisione nella prova (n=6):

	MEDIA INDEX	DEV. ST.	CV%
Controllo negativo	0.2	0.02	10
CMM2	3.3	0.15	5
CMM3	10.3	0.45	4
Positivo 1	3.2	0.27	8
Positivo 2	1.6	0.08	5
Positivo 3	4.3	0.24	6
Positivo 4	2.3	0.19	8
Negativo 1	0.2	0.02	10
Negativo 2	0.3	0.04	13
Negativo 3	0.2	0.02	10
Negativo 4	0.4	0.03	8
Negativo 5	0.3	0.04	13
Negativo 6	0.2	0.03	15
Negativo 7	0.3	0.04	13
Negativo 8	0.3	0.04	13

Precisione tra prove (n=6):

	MEDIA INDEX	DEV. ST.	CV%
Controllo negativo	0.2	0.01	5
CMM2	3.3	0.01	0
CMM3	10	0.36	4
Positivo 1	3.2	0.08	3
Positivo 2	1.6	0.11	7
Positivo 3	4.2	0.08	2
Positivo 4	2.6	0.53	20
Negativo 1	0.3	0.06	20
Negativo 2	0.2	0.03	15
Negativo 3	0.3	0.03	10
Negativo 4	0.4	0.07	18
Negativo 5	0.3	0.04	13
Negativo 6	0.2	0.03	15
Negativo 7	0.2	0.03	15
Negativo 8	0.3	0.04	13

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBLI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella

		piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for dtermination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
5. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linmed immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
6. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
7. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
8. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL
CYTOMEGALOVIRUS IgM

REF **91011** **(English)**

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC CAPTURE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO CYTOMEGALOVIRUS IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Cytomegalovirus is a herpes virus transmitted by close human contact. No symptoms of infection are apparent in the majority of cases. However, the virus is very dangerous and may be fatal in immunodepressed patients. Serum-negative female patients who become infected during pregnancy may transmit the disease to the fetus. In 95% of cases this occurs without symptoms, but some neonates may present jaundice, hepato-splenomegaly and retarded psycho-motorial development. For this reason it is of great importance to determine the immunitary state of the patient before the start of pregnancy, if possible, and check for serum conversion.
The assay of specific IgM is of great importance in the diagnosis of primary infection.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test for the assay of Cytomegalovirus IgM is based on the principle of the capture of these immunoglobulins by anti-human IgM monoclonal antibodies found on the solid phase. A subsequent incubation with cytomegalovirus antigen in a complex with monoclonal antibodies conjugated to horse radish peroxidase selects the IgM antibodies specific for the antigen and is revealed by the addition of the peroxidase substrate. When the enzymatic reaction is stopped by the addition of a sulphuric acid solution, a yellow colouring forms. The colour, which is proportional to the amount of specific antibodies present in the sample, can be read in an ELISA microplate reader.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

Bring to room temperature before use.

MT PLATE MICROPLATE 12 x 8 wells coated with anti-human IgM monoclonal antibodies.
Use: open the package on the opposite side from the code (M followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL
Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.
Colour: the colour of the controls is proportional to the relative antibody titer.

CONTROL CUT-OFF CUT OFF CONTROL 1 x 2.5 mL
Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.
Colour: the colour of the controls is proportional to the relative antibody titer.

Ag ANTIGEN Freeze-dried powder x 6 vials
Contents: Partially purified Cytomegalovirus, inactivated by treatment with Beta-propiolactone, in Phosphate buffer containing lactose.
Preparation: reconstitute with the conjugate volume shown on the label, mixing by inversion.

CONJ CONJUGATE 1 x 18 mL
Contents: monoclonal antibodies labelled with peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and preservative.
Preparation: ready for use.
The immunocomplex should be prepared about 45 min. before use.

CONTROL IgM – IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.
Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
To be used to diluite samples.
Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0.09% containing methyl orange as dye.

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

H_2SO_4 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
H_2SO_4 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).
POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.
- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD ≥ 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.
The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
Microplate	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Controls	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Reconstituted antigen	15 days at 2/8°C,
Substrate	until the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	until the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

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

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

Health and Safety Information

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

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

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature**.**
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents sbould be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Avoid the use of self-defrosting freezers for the storage of samples.
6. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
7. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
8. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for excusive use with the various reagents.
9. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
10. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO_2 incubators must not be used.
11. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
12. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.

13. The use of the kit on automatic instruments must be validated by the user.
14. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
    - installation and particular requisites
    - operating principles, instructions, precautions and risks
    - manufacturer's specifications and instrument performance
    - servicing and maintenance.

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

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

8. TEST PROCEDURE

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Prepare the antigen by reconstituting the freeze-dried product with the conjugate (volume reported on the label).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED calibrators (if possible, in duplicate) in a strip (100 µL in each well). Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.
Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl ± 75 µl) , add 100 µL of immunocomplex (antigen/monoclonal antibodies labelled with peroxidase) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.
After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.
The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

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

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the blank (≤ 0.100) from all the other readings.
The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-Off serum.
The ratio between Negative Control and Cut-off must be < 0.6.

The O.D. of the Cut-Off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Qualitative results

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-Off, the sample is positive for the presence of specific IgM.
Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX).
The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2.

Doubtful: ± 20% of the Cut-Off.

Negative: if the ratio is < 0.8.

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

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

All positive test results require careful interpretion since false positive reactions or heterotypic IgM responses may occur with sera from patients with heterophile-positive mononucleosis, or Varicella Zoster.
A specific IgM response may be observed in reactivation and reinfection as well as with primary infections with CMV.
Because of all the complications of serologic diagnosis of congenital infection, virus isolation from urine in the first week of life remains the best way to diagnose intrauterine involvement. Absence of CMV specific IgM does not exclude the possibility of CMV infection. It has been reported that 10-30% of infants may fail to develop CMV IgM antibody response despite congenital infection with CMV.
The test results should be used in conjunction with information available from the clinical evaluation and other diagnostic procedures.
Samples which are strongly positive for the presence of anti-Varicella Zoster (VZV) and Epstein Barr IgM antibodies can give false positive results.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

44 serum samples containing potential interfering substances were tested:
- Rheumatoid factor (n=8)
- Heterophile antibodies (n=4)
- Bilirubin (n=8)
- Triglycerides (n=9)
- Varicella Zoster IgM positive (n=2)
- Hypergammaglobulinemia (n=13).

Two doubtful results were found with the VZV and heterophyl-positive samples, while no interference was noted in the other cases.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial, 105 samples taken from patients whose clinical picture was compatible with a CMV infection, were analysed with the present kit in parallel with the method taken as reference to establish the sensitivity. With the reference method, 62 samples were effectively positive.

To determine the specificity, 222 samples were used, of which 87 came from donors, 92 were IgG-negative and 43 patients were negative in the reference test.

The results are reported in the following table.

		REFERENCE METHOD	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

The Enzywell kit has a sensitivity of 98.4 % and a specificity of 97.8%.

15. PRECISION

In-run Precison (n=6):

	MEAN INDEX	ST. DEV.	CV%
Negative control	0.2	0.02	10
CMM2	3.3	0.15	5
CMM3	10.3	0.45	4
Positive 1	3.2	0.27	8
Positive 2	1.6	0.08	5
Positive 3	4.3	0.24	6
Positive 4	2.3	0.19	8
Negative 1	0.2	0.02	10
Negative 2	0.3	0.04	13
Negative 3	0.2	0.02	10
Negative 4	0.4	0.03	8
Negative 5	0.3	0.04	13
Negative 6	0.2	0.03	15
Negative 7	0.3	0.04	13
Negative 8	0.3	0.04	13

Between-run Precision (n=6):

	MEAN INDEX	ST. DEV.	CV%
Negative control	0.2	0.01	5
CMM2	3.3	0.01	0
CMM3	10	0.36	4
Positive 1	3.2	0.08	3
Positive 2	1.6	0.11	7
Positive 3	4.2	0.08	2
Positive 4	2.6	0.53	20
Negative 1	0.3	0.06	20
Negative 2	0.2	0.03	15
Negative 3	0.3	0.03	10
Negative 4	0.4	0.07	18
Negative 5	0.3	0.04	13
Negative 6	0.2	0.03	15
Negative 7	0.2	0.03	15
Negative 8	0.3	0.04	13

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert paragraph 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow). Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.

	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1.G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3.Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4.Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for dtermination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
5.M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linmed immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
6.F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
7.P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
8.R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZYWELL
CYTOMEGALOVIRUS IgM

REF 91011 **(Deutsch)**

1. VERWENDUNGSZWECK

IMMUNENZYMATISCHER „CAPTURE ASSAY“ ZUR QUALITATIVEN BESTIMMUNG VON IGM-ANTIKÖRPERN GEGEN CYTOMEGALOVIRUS IN HUMANEM SERUM.

2. PHYSIOLOGIE

Cytomegalovirus ist ein Herpesvirus, das durch engen menschlichen Kontakt übertragen wird. In den meisten Infektionsfällen treten keine Symptome auf. Das Virus ist aber durchaus gefährlich und kann bei immunsupprimierten Patienten tödlich sein. Serum-negative weibliche Patienten, die während der Schwangerschaft infiziert werden, können die Erkrankung auf den Fetus übertragen. In 95 % der Fälle bleibrt dies symptomlos, aber einige Neugeborene haben Gelbsucht, Hapato-Splenomegalie und eine verzögerte psycho-motorische Entwicklung. Daher ist es von großer Wichtigkeit, den Immunstatus der Patientinnen vor Eintritt einer Schwangerschaft zu ermitteln und die Serokonversion zu überprüfen.
Der Assay für spezifisches IgM ist von großer Bedeutung für die Diagnose einer Primärinfektion.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der „Capture-Methode“ mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die an die Festphase gebunden sind. In der darauffolgenden Inkubation mit Cytomegalovirus-Antigen in einem Komplex mit monoklonalen Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase gebunden sind, werden die antigenspezifischen IgM-Antikörper erfasst und durch die Zugabe von Peroxidase Substrat angezeigt. Wenn die enzymatische Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt wird, entsteht eine Gelbfärbung. Die entstandene Farbintensität ist proportional zu den in der Probe vorhandenen spezifischen Antikörpern. Sie kann auf einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden.

4. KITKOMPONENTEN

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen.
Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

MT PLATE MIKROTITERPLATTE 12x8 Wells, beschichtet mit Anti-human-IgM-Antikörpern (monoklonal).
Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (M plus Lotnummer) öffnen und die nicht benötigten Streifen im beigefügten Plastikbeutel mit dem Silica Gel lagern; die Luft herausdrücken und gut verschließen.

CONTROL + POSITIVKONTROLLSERUM 1 x 1.6 m*L*
Inhalt: verdünntes Humanserum in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, mit 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig.
Farbe: Die Farbe der Kontrolle ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF KONTROLLSERUM 1 x 2.5 mL
Inhalt: verdünntes Humanserum in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, mit 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig.
Farbe: Die Farbe der Kontrolle ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

Ag ANTIGEN Lyophilisiert 6 Fläschchen.
Inhalt: teilgereinigtes Cytomegalovirus, inaktiviert durch Behandlung mit Betapropiolacton, in Phosphatpuffer, mit Laktose.
Rekonstitution: Mit Konjugat rekonstituieren. Das Rekonstitutionsvolumen ist auf den Fläschchenetiketten angegeben.

CONJ KONJUGAT 1 x 18 mL
Inhalt: monoklonale Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0.05% Phenol und Konservierungsmittel.
Vorbereitung: Gebrauchsfertig. Der Immunkomplex sollte 45 Minuten vor Gebrauch hergestellt werden.

CONTROL IgM - IgM NEGATIVKONTROLLE (PF93910) 1 x 1.6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
Inhalt: Verdünntes Humanserum in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

WASH BUF 10x WASCHPUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0.5% Brij.
Vorbereitung: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten sie vor der Verdünnung bei 37°C gelöst werden.

SAMP DIL 2 VERDÜNNUNGSMITTEL 2 (PF93611) 1x100 mL Für die Verdünnung von Proben. **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
Inhalt: Proteinlösung in Phosphatpuffer mit 0.09% Natriumazid und Methylorange.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Gebrauchsfertig **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
Inhalt: 0.26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0.01% Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0.05 mol/l Zitratpuffer (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602). 1x16 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**
Inhalt: H_2SO_4 0.3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

ABDECKFILM (2).
POLYEHTYLENBEUTEL (1).

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN
- Inkubator bei 37°C
- Mikrotiterplatten Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis ≥2.000
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispensiervolumen zwischen 225-375 µl
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten für die exakte Pipettierung von 10, 100, 1000 µL
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorid-Lösung (5%)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

5. LAGERUNG UND STABILITÄT NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

Die Reagenzien müssen bei 2-8 °C gelagert werden.
Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

Die Reagenzien haben nach dem ersten Öffnen und/oder der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität.

REAGENZ	KONDITIONEN
MIKROTITERPLATTE	5 Wochen bei 2-8°C im Polyethylenbeutel
KONTROLLSEREN	5 Wochen bei 2-8°C
KONJUGAT	5 Wochen bei 2-8°C
IMMUNKOMPLEX	15 Tage bei 2-8°C
SUBSTRAT	bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C, 1 Woche bei 15-30°C im Dunkeln
VERDÜNNUNGSMITTEL	bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C
WASCHPUFFER	2 Wochen bei 2-8 °C, 5 Tage bei 15-30°C.
STOPPLÖSUNG	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO DIAGNOSTIK.

Achtung: Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, die mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ waren. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Erreger enthalten, sollten alle Materialien humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

Entsorgung der Abfälle: Die Serum-Proben und die verwendeten Reagenzmittel müssen als infizierte Abfälle behandelt werden, das heißt, im Einklang mit den geltenden Vorschriften entsorgt werden.

Gesundheits- und Sicherheitsinformationen

7. Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie Einweg-Handschuhe und einen Augenschutz während des Umgangs mit Proben und der Testdurchführung. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.
8. Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen von schädlichen oder reizenden Substanzen:
   Der Waschpuffer enthält Detergenzien
   Das Konjugat und die Kontrollen enthalten Phenol.
   Das Substrat ist eine Säure.
   Die Kontrollen enthalten 0,09 % Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden.
   Falls irgendeines der Reagenzien in Kontakt mit den Augen oder der Haut kommt, waschen Sie den Bereich intensiv mit Wasser.
9. Mehrfach verwendbare Materialien oder Gegenstände sollten nach Gebrauch sterilisiert werden. Die bevorzugte Methode ist das Autoklavieren für eine Stunde bei 121 °C, Einwegmaterialien sollten autoklaviert oder verbrannt werden.
10. Schwefelsäure (Stop Soution) und Salzsäure (wird für das Waschen der Laborgläser benötigt) sind ätzend und sollten mit entsprechender Sorgfalt behandelt werden. Bei Kontakt mit Augen oder Haut gründlich mit Wasser abwaschen.
11. Neutralisierte Säuren oder anderer Flüssigkabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorid mit einer Endkonzentration von mindestens 1,0 % dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorid (1%) ist erforderlich, um eine effektive Dekontamination sicherzustellen.
12. Verschüttete potentiell infektiöse Materialien sollten sofort mit saugfähigem Papier aufgewischt werden, und der kontaminierte Bereich sollte mit Natriumhypochlorid (1 %) nachgewischt werden, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Natriumhypochlorid sollte nicht bei verschütter Flüssigkeit, die Säure enthält, verwendet werden, bevor die Flüssigkeit trocken aufgewischt wurde. Materialien, die für das Aufwischen verschütteter Flüssigkeiten verwendet wurden, inklusive der Handschuhe, sollten wie potentiell biogefährdender Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorid enthalten.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

15. Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30°C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass der Thermostat nicht unterhalb 35 ° und nicht über 39 °C anzeigt.**
16. Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Halbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
17. Die Testduchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
18. Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
19. Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorid-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
20. Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
21. Vermeiden Sie Verschleppung en beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.
22. Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells.
23. Enzymimmunoassays können gelegentlich einen “Edge-Effect” zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37 °C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig,) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO_2 Inkubatoren.
24. Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.
25. Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.

12. Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigen werden

13. Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
- Installation und besondere Bedarfsartikel
- Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
- Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
- Service und Wartung

7. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis" entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Den Gebrauch von Tiefkühlschränken mit automatischem Abtausystem für die Aufbewahrung der Proben vermeiden. Aufgetaute Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Eine Hitzeinaktivierung kann zu falschen Ergebnissen führen. Die Qualität einer Probe kann aber durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden und führt zu falschen Ergebnissen.
Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden. **Es dürfen keine Plasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!**

8. TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Bereiten Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen vor.
- Bereiten Sie den Waschpuffer vor: Verdünnen Sie den Washing Buffer 1:10 mit destilliertem Wasser (Beispiel 100 ml + 900 ml H_2O).
- Bereiten Sie den Immunkomplex vor, indem Sie das lyophilisierte Antigen mit Konjugat rekonstituieren. Das erforderliche Konjugatvolumen ist auf dem Antigen-Fläschchenetikett angegeben.

PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells (Doppelbestimmungen werden empfohlen). 100 µl unverdünnnte Positiv-, Negativkontrolle (Doppelbestimmung) und unverdünntes Cut-Off-Serum (Dreifachbestimmung) in je eine Well pipettieren. (Das Minimum sind 1 Negativkontrolle, 2 Cut-Off und 1 Positivkontrolle.) Lassen Sie eine Well für den Substratleerwert frei (100 µl Substrat pipettieren).

- Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren lassen.
- 4-mal mit 300 ± 75 µl Waschpuffer waschen (mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit).
- 100 µl Immunkomplex in alle Wells pipettieren (außer Substratleerwert).
- Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren lassen.
- 4-mal wie oben beschrieben waschen.
- 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).
- 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).
- Die Extinktion innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm oder 450/620 nm messen.

9. TESTSCHEMA

100 µl der verdünnten Probe und unverdünnten Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettieren.
45 Min. bei 37 °C inkubieren.
4-mal waschen (300 ± 75 µl).
100 µl Immunkomplex in alle Wells pipettieren.
45 Min. bei 37 °C inkubieren.
4-mal waschen (300 ± 75 µl).
100 µl Substrat in alle Wells pipettieren.
15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
100 µl Stopplösung hinzufügen.
Messen Sie die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 Min.

10. TESTVALIDIERUNG

Entfernen Sie den Blindversuch (≤ 0.100) von allen anderen Messwerten.
Das Positive muss O.D. mindestens das 1.5-fache des Cut-offs.
Das Verhältnis zwischen Negativ und Cutoff muss <0.6 sein.
Die D.O. des Cut-Off muss bei 450 nm ≥ 0.2 und bei 450/620 nm ≥ 0.16 sein.

11. QUALITATIVE ERGEBNISSE

Wenn die Extinktion der Probe höher als die des Cut-Off-Serums ist, enthält die Probe spezifische CMV-IgM-Antikörper.
Berechnen Sie das Verhältnis zwischen Extinktionsmittelwert der Probe und dem des Cut-Off (INDEX).
Positiv: > 1.2
Zweifelhaft: ± 20 % des Cuf-off.
Negativ: < 0.8
Falls das Ergebnis zweifelhaft ist, wiederholen Sie den Test. Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Probe, falls das Ergebnis zweifelhaft bleibt.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Alle positiven Ergebnisse erfordern eine sorgältige Interpretation, da falsch positive Reaktionen oder heterotypische IgM-Response bei Sera von Patienten mit heterophil-positiver Mononukleose oder Varizella Zoster auftreten können.
Ein spezifischer IgM-Response wird sowohl bei Reaktivierung und Reinfektion als auch bei primärer Infektion mit CMV beobachtet.
Aufgrund all der Komplikationen bei serologischen Diagnosen kongenitaler Infektionen bleibt die Virusisolierung aus dem Urin in der ersten Lebenswoche die beste Art, eine intrauterine Beteiligung zu diagnostizieren. Das Nichtvorhandensein von CMV-spezifischem IgM schließt die Möglichkeit einer CMV-Infektion nicht aus. Es wurde berichtet, dass 10-30% der Kinder trotz einer CMV-Infektion keine IgM-Antikörper entwickeln.
Zur Erstellung der Diagnose sollte die Bestimmung von Cytomegalovirus immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.
Die Arbeitsanleitung ist genau zu beachten; eine sorgfältige Arbeitstechnik ist für korrekte Ergebnisse erforderlich. Eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.
Stark positive Stichproben auf Grund von Anti-VZV IgM und Epstein Barr EBV können zu falschen positiven Ergebnissen führen.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurden 44 Serum-Stichproben mit potentiell interferierenden Inhalten getestet:

- Rheumafaktor (n=8)
- Heterophile Antikörper (n=4)
- Bilirubin (n=8)
- Triglyceride (n=9)
- Varicella-Zoster IgM positiv (n=2)
- Hypergammaglobulinämie (n=13)

Es gab zwei zweifelhafte Ergebnisse bei den VZV-Stichproben und den positiv heterophilen Stichproben und keine Interferenz bei allen anderen.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Bei einem klinischen Versuch wurden 105 Stichproben von kompatiblen Patienten mit einer CMV-Infektion parallel zur Referenzmethode zur Messung der Empfindlichkeit mit unserem Satz gemessen worden. Bei der Referenz waren 62 Patienten tatsächlich positiv.
Zur Bestimmung der Spezifizität wurden 222 Stichproben verwendet, davon 87 Spender, 92 IgG-negative Stichproben und 43 Patienten, die beim Referenztest negativ waren.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

		REFERENZWERT	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

Der Satz von Enzywell hat eine Empfindlichkeit von 98.4% und eine Spezifizität von 97.8%.

15. PRÄZISION

Intraassay-Präzision (n=6)

	MITTELWERT INDEX	**S.D.**	**CV%**

Negativkontrolle	0.2	0.02	10
CMM2	3.3	0.15	5
CMM3	10.3	0.45	4
Positiv 1	3.2	0.27	8
Positiv 2	1.6	0.08	5
Positiv 3	4.3	0.24	6
Positiv 4	2.3	0.19	8
Negativ 1	0.2	0.02	10
Negativ 2	0.3	0.04	13
Negativ 3	0.2	0.02	10
Negativ 4	0.4	0.03	8
Negativ 5	0.3	0.04	13
Negativ 6	0.2	0.03	15
Negativ 7	0.3	0.04	13
Negativ 8	0.3	0.04	13

Interassay-Präzision (n=6)

	MITTELWERT INDEX	**S.D.**	**CV%**
Negativkontrolle	0.2	0.01	5
CMM2	3.3	0.01	0
CMM3	10	0.36	4
Positiv 1	3.2	0.08	3
Positiv 2	1.6	0.11	7
Positiv 3	4.2	0.08	2
Positiv 4	2.6	0.53	20
Negativ 1	0.3	0.06	20
Negativ 2	0.2	0.03	15
Negativ 3	0.3	0.03	10
Negativ 4	0.4	0.07	18
Negativ 5	0.3	0.04	13
Negativ 6	0.2	0.03	15
Negativ 7	0.2	0.03	15
Negativ 8	0.3	0.04	13

16. " TROUBLESHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN)

Wenn Sie sowohl die Angaben in der Gebrauchsanweisungen für die Testdurchführung und deren Spezifikationen beachten, als auch sorgfältig mit den Reagenzien umgehen und pipettieren, können Sie die folgende Fehler vermeiden.

PROBLEM	**MÖGLICHE URSACHE**	**MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG**
Ungültiger Testrun (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. Wiederholen Sie den Test.
	Nichtreaktive Platte	Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)
		Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.) Wiederholen Sie den Test.
Ungültiger Testrun (alle positiv)	Kontamination des Substrates	Nehmen Sie ein neues Substrat.

	Unvorschriftsmäßiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
Schlechte Präzision	Unvollständiges Waschen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschritt. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.
	Optischer Weg nicht sauber	Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.
Nicht ausreichende Farbentwicklung	Unvorschriftsmäige Inkubationszeit oder -temperatur	Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.
		Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.
	Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.

17. LITERATUR

9. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
10. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
11. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
12. Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for dtermination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
13. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linmed immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
14. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
15. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
16. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

CE

0123

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

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZYWELL
IgM ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ

REF 91011 **(Ελληνικά)**

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΛΛΗΨΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgM ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κυτταρομεγαλοϊός είναι ένας ιός έρπητα που μεταδίδεται με στενή ανθρώπινη επαφή.
Το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων προσβάλλεται με ασυμπτωματική μορφή. Ο ιός, αντίθετα, είναι πολύ επικίνδυνος για τους υπό ανοσοκαταστολή ασθενείς, στους οποίους μπορεί να αποβεί θανατηφόρος. Οι ορροαρνητικές γυναίκες που προσβάλλονται από την ασθένεια κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, μπορούν να την μεταδώσουν στο έμβρυο. Στο 95% των περιπτώσεων αυτό γίνεται χωρίς συνέπειες αλλά στα συμπτωματικά νεογνά μπορεί να προκληθεί ίκτερος, ηπατο-σπληνομεγαλία και καθυστέρηση στην ψυχοκινητική ανάπτυξη. Γι' αυτό τον λόγο έχει μεγάλη σημασία να είναι γνωστή η ανοσολογική κατάσταση της ασθενούς και να παρακολουθείται μια ενδεχόμενη ορομετατροπή.
Η προσδιορισμός των ειδικών IgM παίζει σημαντικό ρόλο στην διάγνωση της πρωτογενούς λοίμωξης.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ προσδιορισμού των IgM κατά του κυτταρομεγαλοϊού, βασίζεται στη σύλληψη αυτών των ανοσοσφαιρινών από τα ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgM συνδεδεμένα με τη στερεά φάση. Στη συνέχεια και μέσω επώασης, με το αντιγόνο του κυτταρομεγαλοϊού που αποτελείται από μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση ραφανίδων, θα επιλέξει τα ειδικά αντισώματα IgM κατά του αντιγόνου, τα οποία ανιχνεύονται με την προσθήκη του υποστρώματος για την υπεροξειδάση.
Όταν η ενζυμική αντίδραση αναστέλλεται με την προσθήκη διαλύματος θειικού οξέος, ο χρωματισμός γίνεται κίτρινος. Το χρώμα, ανάλογο με την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον ορό, μπορεί να διαβαστεί σε έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων ELISA

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ.

Να τα φέρετε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ. 12 x 8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-IgM.
Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (Μ ακολουθούμενο από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε την βάση και όσες ταινίες χρειάζονται. Βάλτε πάλι πίσω στη σακούλα από πολυαιθυλένιο, που περιέχει γέλη πυριτίας, τις ταινίες που δεν χρησιμοποιήσατε, αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε την πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος.

CONTROL + ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΘΕΤΙΚΟΣ 1x1.6 mL
Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.
Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των αντισωμάτων.

CONTROL CUT-OFF ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ CUT-OFF 1x2.5 mL
Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.
Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των αντισωμάτων.

Ag ΑΝΤΙΓΟΝΟ Κρυο-αφυδατωμένο x 6 αμπούλες.

Περιεχόμενο: Κυτταρομεγαλοϊός μερικώς κεκαθαρμένος, που έχει καταστεί μη μολυσματικός μετά από επεξεργασία με Beta-propiolactone (β-προπιολακτόνη), σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει λακτόζη.
Προετοιμασία: Για την ανασύσταση προσθέστε τον όγκο του συζυγούς που αναγράφεται στην ετικέτα και στη συνέχεια ανακινήστε το αναποδογυρίζοντάς το.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ. 1 x 18 mL
Περιεχόμενο: μονοκλωνικά αντισώματα σεσημασμένα με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0.05% και συντηρητικό.
Προετοιμασία: έτοιμο για χρήση.
Το ανοσοσύμπλοκο πρέπει να έχει προετοιμαστεί 45 λεπτά πριν από τη χρήση.

CONTROL IgM - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgM (PF93900) 1x1.6 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5%.
Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν την αραίωση.

SAMP DIL 2 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 2 (PF93611) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Χρησιμοποιείται για την αραίωση των δειγμάτων.
Περιεχόμενο: φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος με πρωτεΐνες, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619). 1x12 mL Έτοιμο για χρήση. **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0.26 mg/mL και H_2O_2 0.01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Διάλυμα H_2SO_4 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).
ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.
- Επωαστήριο σε 37°C
- Αναγνώστης μικροπλακιδίων (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm και 405 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π. ≥ 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μl
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.
- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 10, 100, 1000 μL διαλύματος

5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2/8°C.
Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη σε κάθε σετ και στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.

Τα Αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη διάρκεια σταθερότητας μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	**ΣΥΝΘΗΚΕΣ**
ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ	5 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο
ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ	5 εβδομάδες στους 2/8°C
ΣΥΖΥΓΕΣ	5 εβδομάδες στους 2/8°C
ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΑΝΤΙΓΟΝΟ	15 ημέρες στους 2/8°C
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C στο σκοτάδι

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10Χ	έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C, 5 ημέρες σε 15/30 °C
ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ	μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Προσοχή:

Αυτή η συσκευασία περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από έλεγχο και έχουν βρεθεί αρνητικά, σε εγκεκριμένα από την FDA τεστ, τόσο όσον αφορά την ανίχνευση του HbsAg όσο και για τα αντισώματα αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Χρησιμοποιείτε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις που προβλέπονται από τους κανονισμούς ασφαλείας του εργαστηρίου.

Διαχείριση των κατάλοιπων: τα δείγματα του ορού και ο αντιδραστηρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

7. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε τα δείγματα. Πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μετά από κάθε ανάλυση.
8. Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
   α) το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
   β) το συζυγές περιέχει φαινόλη
   γ) το υπόστρωμα είναι όξινο
   δ) Οι βαθμονομητές περιέχουν Αζίδιο Νατρίου (0,09%) το οποίο μαζί με τον χαλκό και τον μόλυβδο μπορεί να σχηματίσει ισχυρά εκρηκτικά αζιδικά ιζήματα μετάλλων.
   Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνατε με άφθονο νερό.
9. Οι συσκευές που δεν είναι μίας χρήσης, πρέπει να αποστειρώνονται, κατά προτίμηση στον κλίβανο, για 1 h σε 121°C, ενώ το υλικό μίας χρήσης πρέπει να μπαίνει στον κλίβανο ή να αποτεφρώνεται.
10. Το θειικό οξύ, που περιέχεται στο Stop Solution και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα του υάλινου εξοπλισμού, είναι διαβρωτικά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση που έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνατε με άφθονο νερό.
11. Εξουδετερωμένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Μια έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά, υπό κανονικές συνθήκες, είναι αρκετή για να γίνει μία αποτελεσματική απολύμανση.
12. Τυχόν χυμένα υγρά, δυνητικά μολυσματικά, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η επιφάνεια να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την διαδικασία ανάλυσης. Αν τα υγρά περιείχαν ένα οξύ, τότε στεγνώστε πολύ καλά την επιφάνεια πριν χρησιμοποιήσετε το υποχλωριώδες νάτριο. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν για να καθαριστούν τυχόν χυμένα υγρά, πρέπει να απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ό,τι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.

20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χείλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO_2.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ό,τι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ό,τι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
    - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφέςi
    - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
    - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
    - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Το δείγμα αποτελείται από ορό που προέρχεται από αίμα που έχει συλλεχθεί με φλεβική λήψη και έχει περάσει από όλες τις διαδικασίες που προβλέπονται από τους βασικούς κανονισμούς των εργαστηρίων. Ο νωπός ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C, ενώ για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξτε στους –20°C. Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη και πριν να το ρίξετε στην κυψελίδα, ανακινήστε το καλά.. Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του δείγματος, και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Δείγματα με ισχυρή αιμόλυση, με ίκτερο, λιπαιμικά ή μολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. **Το τεστ δεν μπορεί να γίνει πάνω σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος.**

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H_2O)
- Προετοιμάστε το αντιγόνο ρίχνοντας το συζυγές στο κρυο-αφυδατωμένο αντιγόνο (ο όγκος που χρειάζεται αναγράφεται στην ετικέτα).

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 µL ορού σε 1 mL διαλύτη. Στη συνέχεια ρίξτε 100 µL από κάθε αραιωμένο δείγμα σε κάθε κυψελίδα (συνιστάται η εκτέλεση της ανάλυσης να γίνει εις διπλούν). Σε μία ταινία ρίξτε τους ορούς ελέγχου ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΡΑΙΩΣΕΤΕ (100 µL ανά κυψελίδα). Η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα είναι 1 ορός ελέγχου αρνητικός, 2 cut-off και 1 θετικός. Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού ρίχνοντας μόνο 100 µL υποστρώματος.

Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά πό 4 εκπλύσεις, διαρκείας 30 δευτερολέπτων η κάθε μία (300 µl) προσθέστε 100 µL ανοσοσυμπλόκου (μονοκλωνικό αντιγόνο/αντίσωμα σεσημασμένο με υπεροξειδάση) σε κάθε μία κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C, καλύπτοντάς τις με την προστατευτική ταινία. Ξεπλύνατε και πάλι το πλακίδιο 4 φορές, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 µL/ανά κυψελίδα.. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 µL Stop Solution. Διαβάστε την Απορρόφηση (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.

9. Διάγραμμα της ανάλυσης

STEP 1 Ρίξτε 100 µL αραιωμένου ορού/ορού ελέγχων στις κυψελίδες τις ταινίας.

-

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

-

Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)

-

STEP 2 Ρίξτε 100 µL ανοσοσυμπλόκου σε κάθε κυψελίδα

-

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

-
Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
-

STEP 3 Ρίξτε 100 µL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα
-
Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
-

STEP 4 Προσθέστε 100 µL Stop Solution
-
Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά.

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (≤ 0.100) από όλες τις άλλες τιμές.
Ο θετικός ορός πρέπει να έχει Ο.Π. ίση με 1.5 φορά τουλάχιστον την τιμή του Cut-off.
Ο λόγος μεταξύ Αρνητικού ορού και Cut-off πρέπει να είναι < 0.6.
Η Ο.Π. του cut-off πρέπει να είναι ≥ 0.2 στα 450 nm και ≥0.16 στα 450/620 nm.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Ποιοτικά αποτελέσματα
Αν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από το Cut-off το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgM.
Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της τιμής της Ο.Π. του υπό εξέταση δείγματος και εκείνης του Cut-off (INDEX). Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2.

Αμφίβολο: = ± 20% του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8.

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβατε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμείνει αμφίβολο επαναλάβατε την αιμοληψία.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Όλα τα θετικά αποτελέσματα χρειάζονται μία προσεκτική ερμηνεία γιατί μπορεί να προκύψουν αποτελέσματα ψευδώς θετικά ή ετεροτυπικές αποκρίσεις των IgM στους ορούς ασθενών που πάσχουν από ετερόφιλο-θετική μονοπυρήνωση ή από Έρπητα Ζωστήρα.
Μία ειδική απόκριση των IgM μπορεί να υπάρξει σε περίπτωση επανενεργοποίησης ή υποτροπής της λοίμωξης, καθώς και στις πρωτογενείς λοιμώξεις από CMV.
Επειδή η ορολογική διάγνωση συγγενούς λοίμωξης παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες, η απομόνωση του ιού στα ούρα κατά την πρώτη εβδομάδα ζωής, παραμένει η πιο ασφαλής μέθοδος για την διάγνωση μιας ενδομητρίου λοίμωξης. Η απουσία των ειδικών IgM αντι-CMV δεν αποκλείει την παρουσία μιας λοίμωξης από CMV. Έχει αναφερθεί ό,τι ένα ποσοστό 10-30% των νεογνών δεν αναπτύσσει αντισώματα αντι-CMV του τύπου IgM, παρά την παρουσία της συγγενούς λοίμωξης.
Τα αποτελέσματα πρέπει να συνεκτιμούνται μαζί με άλλα δεδομένα που προέρχονται από κλινική αξιολόγηση και από άλλες διαγνωστικές αναλύσεις.
Δείγματα ισχυρά θετικά λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αντισωμάτων IgM αντι-Έρπητα Ζωστήρα και αντί Epstein Barr EBV υπάρχει πιθανότητα να δώσουν αποτελέσματα ψευδώς θετικά.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 44 δείγματα ορών που περιείχαν δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες όπως:

- Ρευματοειδής Παράγοντας (n=8)
- Ετερόφιλα Αντισώματα (n=4)
- Χολερυθρίνη (n=8)
- Τριγλυκερίδια (n=9)
- Αντισώματα IgM θετικά προς τον Έρπητα Ζωστήρα (Varicella Zoster) (n=2)
- υπερ-γ-σφαιριναιμία (n=13)

Βρέθηκαν δύο αποτελέσματα αμφίβολα στα δείγματα VZV και στα ετερόφιλο θετικά ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμβολή και επίδραση σε όλα τα άλλα.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε ένα κλινικό πειραματισμό αναλύθηκαν με το κιτ μας 105 δείγματα ασθενών που έπασχαν από μία λοίμωξη οφειλόμενη στον CMV, παράλληλα με την μέθοδο που είχε ληφθεί ως μέθοδος αναφοράς, με σκοπό τον υπολογισμό της ευαισθησίας. Από αυτά τα δείγματα 62 αποδείχθηκαν πράγματι θετικά.

Για τον υπολογισμό της ειδικότητας αναλύθηκαν 222 δείγματα, εκ των οποίων 87 ήταν δότες, 92 δεν περιείχαν αντισώματα IgG, ενώ 43 ήταν δείγματα ασθενών που είχαν αποδειχθεί αρνητικά με την μέθοδο αναφοράς.
Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

		ΑΝΑΦΟΡΑ	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

Το κιτ Enzywell παρουσιάζει ευαισθησία 98.4 % και ειδικότητα 97.8 %.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά την ανάλυση (n=6):

	***Μέση τιμή* INDEX**	**Τυπ. Απ.**	**CV%**
Ορός Ελέγχου Αρνητικός	0.2	0.02	10
CMM2	3.3	0.15	5
CMM3	10.3	0.45	4
***Θετικός* 1**	3.2	0.27	8
***Θετικός* 2**	1.6	0.08	5
***Θετικός* 3**	4.3	0.24	6
***Θετικός* 4**	2.3	0.19	8
***Αρνητικός* 1**	0.2	0.02	10
***Αρνητικός* 2**	0.3	0.04	13
***Αρνητικός* 3**	0.2	0.02	10
***Αρνητικός* 4**	0.4	0.03	8
***Αρνητικός* 5**	0.3	0.04	13
***Αρνητικός* 6**	0.2	0.03	15
***Αρνητικός* 7**	0.3	0.04	13
***Αρνητικός* 8**	0.3	0.04	13

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων (n=6):

	***Μέση τιμή* INDEX**	**Τυπ. Απ.**	**CV%**
Ορός Ελέγχου Αρνητικός	0.2	0.01	5
CMM2	3.3	0.01	0
CMM3	10	0.36	4
***Θετικός* 1**	3.2	0.08	3
***Θετικός* 2**	1.6	0.11	7
***Θετικός* 3**	4.2	0.08	2
***Θετικός* 4**	2.6	0.53	20
***Αρνητικός* 1**	0.3	0.06	20
***Αρνητικός* 2**	0.2	0.03	15
***Αρνητικός* 3**	0.3	0.03	10
***Αρνητικός* 4**	0.4	0.07	18
***Αρνητικός* 5**	0.3	0.04	13
***Αρνητικός* 6**	0.2	0.03	15
***Αρνητικός* 7**	0.2	0.03	15
***Αρνητικός* 8**	0.3	0.04	13

16. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	**ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ**	**ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ**
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά.	Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβατε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε των κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4

		περί λανθασμένου κωδικού).
		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβατε το τεστ..
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος
	Ανεπαρκής έκπλυση	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά
	Λανθασμένη αναρρόφηση	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.
	Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται με πολύ αργό ρυθμό	Να αποφεύγετε την ξήρανση του πλακιδίου μετά την έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια
	Υπάρχουν φυσαλίδες αέρα	Να αποφεύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων κατά την αναρρόφηση.
	Η οπτική διαδρομή δεν είναι διαυγής	Ελέγξτε αν η φωτεινή πηγή είναι καθαρή. Καθαρίστε το πλακίδιο με ένα χαρτομάντιλο
Ανεπαρκής θερμοκρασία	Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης	Ελέγξτε τον θερμοστάτη και τον χρόνο επώασης.
		Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης
	Η ποσότητα του υποστρώματος που έχει προστεθεί, δεν είναι αρκετή.	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας

17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for dtermination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
5. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linmed immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
6. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
7. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
8. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL
CYTOMEGALOVIRUS IgM

REF **91011** **(Español)**

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO POR CAPTURA PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgM ANTI CYTOMEGALOVIRUS EN SUERO HUMANO COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL CYTOMEGALOVIRUS.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El cytomegalovirus es un herpes virus que se transmite por estrecho contacto humano.
La mayoría de los subjetos resulta infectada de manera asintomática. El virus, al revés, es particularmente grave en los pacientes imunodeprimidos, en los cuales puede causar la muerte. Las mujeres sueronegativas que contraen esta enfermedad durante el embarazo pueden transmitirla al feto. En 95% de los casos esto sucede sin consecuencias pero en los neonatos sintomáticos puede causar ictericia epato-esplenomegalia y retraso psico-motor. Por esta razón es importante determinar el título del anticuerpo de la paciente y observar la eventual sueroconversión. El título de las IgM específicas es muy importante para la diágnosis de infección primaria.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test para la titulación de las IgM anti cytomegalovirus se basa sobre el principio de la captura de estas imunoglobulinas por parte de anticuerpos monoclonales anti IgM humanos presentes sobre la fase sólida. Una succesiva incubación con el antígeno del cytomegalovirus con el monoclonal conjugado de peroxidasa de rábano seleccionará el anticuerpo IgM específico para el antígeno y visible por la adición del sustrato por la peroxidasa
Cuando la reacción enzimática es interrumpida después de la adición de una solución de ácido sulfúrico la coloración se vuelve amarilla. El color resultante, proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero, puede ser facilmente leída con un lector para microplacas ELISA.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO:

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de antícuerpos humanos monoclonales anti-IgM
Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (M seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel di silice; con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1x1.6 mL
Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.
Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1x2.5 mL
Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.
Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

Ag ANTÍGENO. Polvo liofilizado x 6 frascos.
Contenido: Cytomegalovirus parcialmente purificado e inactivado por medio del el tratamiento con el Beta-beta-propiolactone, en tampón fosfato conteniendo lactosa.
Preparación: Reconstituir con el volumen de conjugado indicado en etiqueta, mezclando por inversión.

CONJ CONJUGADO 1 x 18 mL
Contenido: anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, , en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0.05% y conservante.
Preparación: Listo para su uso
El Imunocomplejo debe prepararse 45 minutos antes de ser utilizado.

CONTROL IgM - IgM CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603). 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Solución salina tamponada (PBS) concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 (PF93611). 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Para la dilución de las muestras de suero.
Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como colorante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso. **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H_2O_2 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Solución de H_2SO_4 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).
BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.
- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD ≥ 2.000) (por lo menos)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volumenes entre 225-375 µl
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

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

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

REACTIVO	**CONDICIONES**
MICROPLACA	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
SUEROS DE CONTROL	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	5 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
ANTÍGENO RECONSTITUIDO	15 días 2/8°C,
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la caducidad a 2/8°C
TAMPÓN DE LAVADO 10X	listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la caducidad a 2/8°C

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

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

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

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por via oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
    a) El tampón de lavado contiene detergentes
    b) El conjugado contiene fenol
    c) El substrato es ácido
    d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

    Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben disinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1.0%. Se requier una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una disinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1.0%, antes de se que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada . Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluídos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos . No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta**. **Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" (“efecto filo”) que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador**.** Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO_2.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación micróbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.

13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
- instalación y requisitos específicos
- principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
- especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
- mantenimiento y servicio técnico.

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a –20ºC. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.
No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas. **El test no se puede aplicar a plasma humano.**

8 PROCEDIMIENTO

Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Rinsing Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Preparar el antígeno reconstituyendo el liófilo con el conjugado (volumen indicado en etiqueta).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira, preferiblemente por duplicado (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla substrato.
Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µl). Añadir 100 µL de imunocomplexo a cada pocillo (antígeno/anticuerpos monoclonales marcados con Peroxidasa) e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora.. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo. Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.
Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. Esquema del procedimiento del test

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida//controles en los pocillos.
-
-
Incubar 45 min. a 37°C
-
Lavar 4 veces (300 µl)
-
STEP 2 Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo
-
Incubar 45 min. a 37°C
-
Lavar 4 veces (300 µl)
-
STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo
-
Incubar 15 min. a T.A.
-
STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante
-
Leer la D.Oa 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.100) a todas las otras lecturas.
El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off.

La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser < 0.6.
La D.O. del cut-off debe ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Resultados cualitativos
Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgM específicas para el antígeno.
Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off (INDEX).
La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2.

Dudoso: ± 20% del cut-off.

No-inmune: si la concentración es < 0.8.

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

12. LIMITACIONES

Todos los resultados positivos de la prueba necesitan ser cuidadosamente interpretados, en cuanto pueden ocurrir resultados falsos-positivos u respuestas heterotípico de las IgM en los sueros de pacientes afectados por mononucleosis heterófilo-positiva, u Varicela Zoster.
Una respuesta específica de la clase IgM se puede observar en la reactivación y reinfección, así como en las infecciones primarias provocadas por CMV.
La ausencia de IgM específicas anti-CMV no excluye la presencia de una infección provocada por CMV. Se ha reportado que el 10-30% de infantes no desarrolla una respuesta de anticuerpos anticorporal anti-CMV de tipo IgM, a pesar de la presencia de la infección congénita. Los resultados de la prueba se deben utilizar conjuntamente con la información procedente de la evaluación clínica y de otros procedimientos de diagnóstico. Muestras muy positivas por presencia de IgM anti-Varicella Zoster (VZV) y Epstein Barr pueden proporcionar resultados falsos-positivos.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 44 muestras de suero que contenían sustancias que podían potencialmente interferir :

- Factor Reumatóideo (n=8)
- Anticuerpos eterófilos (n=4)
- Bilirubina (n=8)
- Trigliceridos (n=9)
- Varicella Zoster IgM positivos (n=2)
- Ipergamaglobulinemia (n=13)

Se encontraron dos resultados dudosos en las muestras VZV y eterófilos positivos y ninguna interferencia en los otros.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica externa, 105 muestras pertenecientes a pacientes compatibles con una infección por CMV se analizaron con nuestro kit en paralelo con el método de rutina para establecer la sensibilidad. En el método de referencia, 62 dieron resultados efectivamente posistivos. Para determinar la especificidad se utilizaron 222 muestras de la cuales 87 donadores, 92 muestras IgG negativas y 43 pacientes negativos al método de referencia.

Los resultados están resumidos en la tabla siguiente:

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

El kit Enzywell tiene una sensibilidad del 98.4% y una especificidad del 97.8%.

15. PRECISIÓN

Precisión intra-ensayo (n=6):

	MEDIA INDEX	DESV. EST.	CV%
Control negativo	0.2	0.02	10
CMM2	3.3	0.15	5
CMM3	10.3	0.45	4
Positivo 1	3.2	0.27	8
Positivo 2	1.6	0.08	5
Positivo 3	4.3	0.24	6
Positivo 4	2.3	0.19	8
Negativo 1	0.2	0.02	10
Negativo 2	0.3	0.04	13
Negativo 3	0.2	0.02	10
Negativo 4	0.4	0.03	8
Negativo 5	0.3	0.04	13
Negativo 6	0.2	0.03	15
Negativo 7	0.3	0.04	13
Negativo 8	0.3	0.04	13

Precisión en ensayos (n=6):

	MEDIA INDEX	DESV. EST .	CV%
Control negativo	0.2	0.01	5
CMM2	3.3	0.01	0
CMM3	10	0.36	4
Positivo 1	3.2	0.08	3
Positivo 2	1.6	0.11	7
Positivo 3	4.2	0.08	2
Positivo 4	2.6	0.53	20
Negativo 1	0.3	0.06	20
Negativo 2	0.2	0.03	15
Negativo 3	0.3	0.03	10
Negativo 4	0.4	0.07	18
Negativo 5	0.3	0.04	13
Negativo 6	0.2	0.03	15
Negativo 7	0.2	0.03	15
Negativo 8	0.3	0.04	13

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la

		placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de substrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFIA

1.G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2.H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3.Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. lin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4.Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for dtermination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
5.M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linmed immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
6.F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
7.P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
8.R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

PRECAUTIONS D'UTILISATION

ENZYWELL

CYTOMEGALOVIRUS IgM

REF 91011 **(Français)**

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgM ANTI-CYTOMEGALOVIRUS DANS LE SERUM HUMAIN, EN TANT QU'AIDE AU DIAGNOSTIC D'INFECTION CAUSEE PAR LE CYTOMEGALOVIRUS.

2. INTERET CLINIQUE

Le cytomégalovirus est un virus herpétique qui se transmet dans les situations de rapports humains étroits. La plupart des sujets atteints restent asymptomatiques. Le virus, au contraire, est très dangereux pour les patients immunodéprimés, chez lesquels le virus peut aboutir à la mort. Les femmes séronégatives qui contractent la maladie pendant la grossesse, peuvent la transmettre au fœtus.
Dans 95 % des cas, cela se produit sans autres conséquences, mais le nouveau-né peut présenter des symptômes, comme l'ictère, l'hépatosplénomégalie ou un retard du développement psychomoteur. Pour cette raison, il est très important de connaître l'état immunitaire de la patiente et d'observer l'éventuelle séroconversion. Le dosage des immunoglobulines IgM spécifiques est très important pour le diagnostic de l'infection primaire.

3. PRINCIPE

Le test pour le dosage des IgM anti-cytomégalovirus est basé sur le principe de la capture de ces immunoglobulines par les anticorps monoclonaux anti-IgM humaines présents sur la phase solide. Une incubation avec l'antigène du cytomégalovirus en lien avec des monoclonaux conjugués à la peroxydase sert à sélectionner les anticorps spécifiques vers l'antigène et révélés par l'ajout du sbstrat pour la peroxydase.
Quand on interrompt la réaction enzymatique, avec l'ajout d'une solution d'acide sulfurique, la coloration vire à jaune. La couleur dépend de la quantité d'anticorps spécifiques dans le sérum et elle peut être lue avec un lecteur de microplaques.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Un kit permet de réaliser 96 déterminations.

- **Laisser les réactifs revenir à la température ambiante avant l'utilisation.**

MT PLATE MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec des anticorps monoclonaux anti-IgM humaines
Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (M, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice. Chasser l'air du sachet et le fermer en exerçant une pression sur la fermeture.

CONTROL + CONTROLE POSITIF 1 x 1.6 mL
Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-CMV, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.
Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE CUT OFF 1 x 2.5 mL
Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-CMV, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.
Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

Ag ANTIGENE lyophilisé, x 6 flacons
Composition : Cytomégalovirus partiellement purifié et rendu non infectieux par traitement à la Bêta-propiolactone dans un tampon phosphate contenant du lactose.
Préparation : Reconstituer avec le volume de Conjugué indiqué sur l'étiquette et agiter en renversant.

CONJ CONJUGUE 1 x 18 mL
Composition : Anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05% de phénol et un agent conservateur.
Préparation : Prêt à l'emploi. L'immunocomplexe doit être préparé 45 minutes avant l'emploi.

CONTROL IgM - CONTROLE NEGATIF IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5% de brij.
Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.
En présence de cristaux : chauffer la solution à 37°C pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

SAMP DIL 2 DILUANT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Pour diluer les échantillons de sérum.
Composition : Solution protéique, additionnée d'azide de sodium 0.09% et méthylorange en guise de colorant.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL Prêt à l'emploi. **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/mL) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 0.01%) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H_2SO_4 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : H_2SO_4 (à 0.3 mol/l) en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)
FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI
- Incubateur à 37°C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm et 405 nm avec linéarité jusqu'à 2 000)
- Laveur de microplaques (recommandé) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc.)
- Micropipettes pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à usage unique
- Chronomètre
- Solution d'hypochlorure de sodium (5 %)
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à +2-8 °C. La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette du kit.

Les réactifs ont une stabilité limitée après l'ouverture et/ou la préparation.

REACTIF	**CONDITIONS**
MICROPLAQUE	5 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène.
CONTROLES	5 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	5 semaines à 2/8 °C.
ANTIGENE RECONSTITUE	15 jours à 2/8 °C.
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.
DILUANT	jusqu'à péremption à 2/8 °C.
TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8°C, 5 jours à 15/30°C

SOLUTION D'ARRET jusqu'à péremption à 2/8 °C.

6. PRECAUTIONS D'UTILISATION

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.
ATTENTION :
Ce kit contient des matériaux d'origine humaine. Les réactifs contenant du matériel d'origine humaine ont été contrôlés et trouvés négatifs en ce qui concerne les anticorps anti-VIH-1/VIH-2, anti-VHC et l'antigène HBs (selon la méthode FDA). Cependant, ils doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux et, par conséquent, maniés avec précaution.

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

PRECAUTIONS DE SECURITE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des gants à usage unique et des lunettes de protection lors du maniement des échantillons et pendant l'exécution du test. Se laver soigneusement les mains après le maniement.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
   a) Le tampon de lavage contient des détergents.
   b) b) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol.
   c) Le substrat est acide.
   d) Les contrôles contiennent de l'azide de sodium (0.09%). Les azides peuvent réagir avec les métaux (cuivre et plomb) des canalisations et former aisni des composés explosifs.
   En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Tout matériel non jetable doit être stérilisé après son utilisation, de préférence en autoclave à 121°C pendant 1 h. Tout matériel jetable doit être autoclavé ou incinéré après l'utilisation.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
5. Les acides neutralisés et les déchets liquides doivent être décontaminés avec une quantité de solution d'hypochlorure de sodium suffisante pour que la concentration finale soit de 1 % minimum. Un contact de 30 minutes avec cette solution est nécessaire pour garantir une décontamination efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1%), avant de continuer le test. En présence d'un acide, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorure de sodium. Tout matériel (notamment les gants) souillé par d'éventuelles éclaboussures doit être considéré comme étant potentiellement infectieux et éliminé selon la réglementation en vigueur.

PRECAUTIONS ANALYTIQUES

1. Laisser les réactifs et les échantillons revenir à la température ambiante (+18-30°C) avant leur utilisation. Aussitôt après leur utilisation, conserver les réactifs à la température de conservation recommandée. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit ni descendre au-dessous de 35°C, ni monter au dessus de 39°C. Laisser le sachet contenant les barrettes revenir à température ambiante pendant 30 minutes avant de l'ouvrir.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter toute contamination microbienne des réactifs susceptible d'affecter les résultats.
3. Ne pas modifier le mode opérationnel indiqué, ni remplacer les réactifs par d'autres provenant de lots ou de fournisseurs différents (à moins que cela ne soit spécifié sur la notice d'utilisation). Se référer au paragraphe « CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS »). Ne pas réduire les temps d'incubation indiqués.
4. Toute verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes différentes pour chaque réactif.

8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puit avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec un couvercle et incubées à 37°C soit au bain-marie, soit dans un incubateur ou dans une analyseur adapté. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO_2.
10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. Les échantillons fortement hémolysés, les sérums incomplètement coagulés, les plasmas contenant de la fibrine, ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent causer des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec les instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement le manuel d'utilisation des instruments utilisés ; en particulier les chapitres concernant :
    - L'installation et les précautions spécifiques.
    - Le principe, les instructions, les précautions et les risques d'utilisation.
    - Les spécifications du fabricant et les performances de l'instrument.
    - La maintenance.

7. TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION

Les sérums frais ou décongelés peuvent être utilisés. Les échantillons peuvent être stockés à +2/+8°C pendant 4 jours. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à –20°C. Peut subir jusqu'à un maximum de troi décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant l'utilisation. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés

Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

L'échantillon ne peut pas se constituer de plasma humain.

8. PROCEDURE

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparation de la solution tamponnée de lavage :
  Diluer la solution de lavage concentrée (par exemple : 100 mL + 900 mL d'eau distillée).
- Préparation de l'antigène en reconstituant le lyophilisé avec le conjugué (volume reporté sur l'étiquette).

Diluer les échantillons 1:101 en versant 10µl de sérum dans 1 mL de diluant ; distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double). Mettre dans une barrette les contrôles NON dilués (100 µl/puits). Le minimum indispensable est 1 négatif et positif et 2 seuil. Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits. Couvrir les puits avec la feuille de protection.

Incuber pendant 45 minutes à 37°C. Laver pendant 30 secondes, répéter la phase de lavage 4 fois (300 µl ± 75 µl). Ajouter 100 µl de l'immunocomplexe (antigène/anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase) dans chaque puits.

Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37°C. Laver la plaque encore 4 fois comme cela est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt.

Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes.

9. SCHEMA D'ANALYSE

1e ETAPE	Mettre 100 µl de sérum dilué/contrôles dans les puits de la barrette.
	Incuber pendant 45 minutes à 37°C.
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).
2e ETAPE	Mettre 100 µl de l'immunocomplexe dans les puits.
	Incuber pendant 45 minutes à 37°C.
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).

3e ETAPE Mettre 100 µl de conjugué dans les puits.
Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.

4e ETAPE Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits.

Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.

10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE

Supprimez la valeur de blanc (≤0.100) de toutes les autres lectures.
Le positif doit avoir O.D. au moins 1.5 fois le Cot-off.
Le rapport entre négatif et Cut-off doit être <0.6.
Le D.O. du Cut-off doit être ≥ 0.2 à 450 nm et ≥0.16 à 450/620 nm.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats qualitatifs
Si la valeur du D. O. du sérum est supérieure au sérum seuil, l'échantillon est positif à la présence des IgM spécifiques contre le Cytomégalovirus.
Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Index).
L'échantillon est considéré comme :
Positif : si le rapport est > 1.2
Incertain : si le rapport est compris 0.8 et 1.2
Négatif : si le rapport est > 0.8

Si le résultat est incertain, refaire le test. Si le résultat est de nouveau incertain, réaliser de nouveaux prélèvements d'échantillons de sang.

12. LIMITES DE LA METHODE

Chaque résultat positif oblige à faire une interprétation attentive parce qu'on peut trouver des résultats faux-positifs ou des réponses hétérotypiques des IgM dans le sérum des patients atteints de la mononucléose hétérophile-positive ou la Varicella Zoster.
On peut trouver une réponse spécifique de la classe IgM en cas de réactivation et de réinfection, tout comme pendant les infections primaires de CMV.
Le diagnostic sérologique d'une infection congénitale est très difficile, et la révélation virale dans l'urine pendant les premiers semaines de vie reste la technique la plus sûre pour diagnostiquer une infection intrautérine.
Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection active de CMV. Il y certain que 10-30% des nouveux-nés ne développent pas de réponse en anticorps anti-CMV IgM, malgré la présence d'une infection congénitale.
Le diagnostic ne doit pas se fonder seulement sur les résultats biologiques, mais il faut considérer l'ensemble des données cliniques.
Les échantillons fortement positifs à la présence des IgM anti-varicelle Zostère et Epstein Barr EBV peuvent donner des résultats faux-positifs.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

44 échantillons de sérum contenant des facteurs potentiellement interférents ont été testés.

- Facteur rhumatoïde (8)
- Anticorps hétérophiles (4)
- Bilirubine (8)
- Triglycérides (9)
- Varicelle Zostère IgM positifs (2)
- Hypergammaglobulinemie (13)

On a trouvé deux résultats incertains parmi les échantillons VZV et Hétérophiles-positifs, mais aucune interférence n'a été observée dans les autres cas.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

Dans une expérimentation clinique, 105 échantillons provenant de patients compatibles ayantune infection de CMV ont été analysés avec cette méthode et avec une autre méthode prise en guise de méthode de référence pour établir la sensibilité. Selon la méthode de référence, 62 étaient effectivement positifs.

Pour déterminer la spécificité, on a utilisé 222 échantillons, dont 87 provenant de donneurs, 92 échantillons IgG-négatifs et 43 patients négatifs au test de référence.

Les résultats sont reportés dans le tableau :

		REFERENCE +	REFERENCE -
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

Le kit Enzywell a une sensibilité de 98.4% et une specificité de 97.8%.

15. PRECISION

Précision dans la série (n=6)

	***MOYEN* INDEX**	**DEV. ST.**	**CV%**
Contrôle Négatif	0.2	0.02	10
CMM2	3.3	0.15	5
CMM3	10.3	0.45	4
***Positf* 1**	3.2	0.27	8
***Positf* 2**	1.6	0.08	5
***Positf* 3**	4.3	0.24	6
***Positf* 4**	2.3	0.19	8
***Négatif* 1**	0.2	0.02	10
***Négatif* 2**	0.3	0.04	13
***Négatif* 3**	0.2	0.02	10
***Négatif* 4**	0.4	0.03	8
***Négatif* 5**	0.3	0.04	13
***Négatif* 6**	0.2	0.03	15
***Négatif* 7**	0.3	0.04	13
***Négatif* 8**	0.3	0.04	13

Précision inter-séries (n=6)

	***MOYEN* INDEX**	**DEV. ST.**	**CV%**
Contrôle Négatif	0.2	0.01	5
CMM2	3.3	0.01	0
CMM3	10	0.36	4
***Positf* 1**	3.2	0.08	3
***Positf* 2**	1.6	0.11	7
***Positf* 3**	4.2	0.08	2
***Positf* 4**	2.6	0.53	20
***Négatif* 1**	0.3	0.06	20
***Négatif* 2**	0.2	0.03	15
***Négatif* 3**	0.3	0.03	10
***Négatif* 4**	0.4	0.07	18
***Négatif* 5**	0.3	0.04	13
***Négatif* 6**	0.2	0.03	15
***Négatif* 7**	0.2	0.03	15
***Négatif* 8**	0.3	0.04	13

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	CAUSES POSSIBLES	ACTION/CONTROLE
Série non valable (tous les résultats sont négatifs y compris celui du Contrôle-positif)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou erreur de maniement dans l'ajout des réactifs	Contrôler le protocole. Contrôler s'il y a une solution inutilisée. Refaire le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire les instructions d'utilisation, paragraphe 4).
		Contrôler, sur une microplaque inutilisée, si elle a été exposée à l'humidité. (Le gel de silice doit être d'une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Série non valable (tous les résultats sont positifs y compris celui du Contrôle-négatif)	Contamination du substrat	Prélever un nouvelle quantité de substrat.
	Lavage insuffisant	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Erreur de pipetage	S'assurer que la pipette fonctionne correctement
	Délai trop long pour la distribution des réactifs	Eviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d'air	Eviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage.
	Présence d'impuretés sur le parcours optique	Contrôler l'absence d'impuretés sur la source lumineuse et le détecteur. Essuyer le fond de la microplaque avec un chiffon doux.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
		Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
	Volume de substrat ajouté incorrect	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

17. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
18. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
19. Grint P.C.A. et él.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
20. Van Loon A.M. et él.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for dtermination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
21. M. Musiani et él.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linmed immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
22. F. de Ory et él.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
23. P. Dal Monte et él.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
24. R. Ziegalmaier et él.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL
CITOMEGALOVÍRUS IgM

REF 91011 **(Português)**

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

MÉTODO DE CAPTURA IMUNO-ENZIMÁTICA PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS CLASSE IgM PARA CITOMEGALOVÍRUS NO SORO HUMANO COMO UMA AJUDA NO DIAGNÓSTICO DE CITOMEGALOVIRUS.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O citomegalovirus é um vírus de herpes transmitido por contacto humano próximo. Não há sintomas aparentes de doença na maioria dos casos. Contudo, o vírus é muito perigoso e pode ser fatal em doentes imuno-deprimidos. Pacientes femininos seronegativos que ficaram infectados durante a gravidez podem transmitir a doença ao feto. Em 95% dos casos isto acontece sem sintomas, mas alguns recém-nascidos podem apresentar icterícia, hepato-esplenomegalia e atraso no desenvolvimento psico-motor. Por esta razão é de grande importância a determinação do estado imunitário do paciente antes do início da gravidez, caso seja possível, e verificar a seroconversão.
O ensaio de IgM específico é de grande importância no diagnóstico de infecção primária.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste para ensaio de citomegalovírus IgM é baseado no princípio da captura destas imunoglobulinas por anticorpos monoclonais anti-humanos IgM encontrados na fase sólida. Uma incubação subsequente com antigénio de citomegalovírus num complexo com anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase de rábano selecciona os anticorpos IgM específicos para antigénios e é revelado pela adição de substracto de peroxidase. Quando a reacção enzimática é parada pela adição de uma solução de ácido sulfúrico, a coloração amarela forma-se. A cor, que é proporcional à quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra, podem ser lidos num leitor de amostras ELISA.

4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.

MT PLATE MICROPLACA. 12x8 poços cobertos com anticorpos monoclonais IgM anti-humanos.
Utilização: abra a embalagem no lado oposto do código (M mais o número do lote), retire o suporte e as barras da embalagem folheada para serem usadas, e coloque as barras não usadas no saco de polietileno com gel de sílica, retire o ar e vede premindo o fecho.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL
Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.
Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO DIRECTO 1 x 2.5 mL
Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.
Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

Ag ANTIGÉNIO. Pó seco-congelado x 6 frascos.
Conteúdo: Citomegalovírus parcialmente purificados, inactivados por tratamento com Beta-propiolactona, num tampão fosfatado contendo lactose.
Preparação: reconstitua com volume conjugado mostrado na etiqueta, misturando por inversão.
CONJ CONJUGADO 1 x 18 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0.05% e conservante.
Preparação: Prontos a usar.
O imunocomplexo deve ser preparado uns 45 min. antes de utilização.

CONTROL IgM - CONTROLO NEGATIVO IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

WASH BUF 10x TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij 0.5% .
Preparação: diluir o volume requerido 1:10 com água destilada para obtenção do tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, devem ser dissolvidos a 37ºC antes da diluição.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1x100 mL Para diluição de amostras de soro. **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0.09%, adicionado de metil-orange como corante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Prontos a usar. **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0.26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
H_2SO_4 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).
SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS.
- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas (comprimento de onda 450 ou 450/620 nm, com uma linearidade até DO >= 2000)
- Lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µl
- Água destilada ou desionizada
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, tubos de teste etc.
- Micropipetas para colheita adequada de solução 10, 100, 1000 µl
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Recipientes para colheita de materiais potencialmente infecciosos
- Lenço absorvente.

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.
A data de validade está impressa em cada componente e na etiqueta da embalagem

Os reagentes têm uma estabilidade limitada após abertura e/ou preparação

REAGENTE	CONDIÇÕES
Microplaca	5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Soros de controlo	5 semanas a 2/8°C
Conjugado	5 semanas a 2/8°C
Antigénio reconstituído	15 dias a 2/8°C,
Substrato	até à data de validade a 2/8°C, 1 semana a 15--30°C no escuro
Diluente de amostras	até à data de validade a 2/8°C
Tampão de lavagem	2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C.
Solução de paragem	até à data de validade a 2/8°C

6. PRECAUÇÕES

PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO APENAS.

<u>Cuidado!</u> Este kit contém materiais de origem humana que foram examinados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

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

<u>Informação de Saúde e Segurança</u>

1.Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave as mãos meticulosamente quando tiver acabado.

2.Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.

a) O tampão para enxaguar contém detergentes
b) O conjugado contém fenol
c) O substracto é ácido
d) Os controlos contêm azida de sódio a 0.09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.

3.Aparelhos não-descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.

4.O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e ácido hidroclórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.

5.Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1.0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.

6.Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1.0%, por exemplo, antes de o trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado com salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que tenham hipoclorito de sódio.

<u>Precauções analíticas</u>

1. Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Verifique se o termostato não desce abaixo de 35ºC ou acima de 39ºC.** Abra o envelope que contém as tiras após cerca de 30 minutos à temperatura ambiente, no mínimo**.**

2. Não utilize reagentes além da data de validade anunciada. Contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.

3. Não modifique o procedimento de teste ou substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente a menos que sejam estipulados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos de incubação recomendados.

4. Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidroclórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.

5. Não exponha reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.

6. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.

7. Deve-se ter cuidado para não haver contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.

8. Deve ser tomado cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “assopre” as microplacas.

9. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C tanto num banho de água com suporte flutuante ou para rack para suportar as placas se for necessário, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO_2 não devem ser utilizados.

10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhumas bolhas estão presentes na superfície do líquido antes de a ler.

11. A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados, ou amostras com contaminação microbiana pode dar resultados erróneos.

12. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
13. Para cada instrumento utilizado, leia o manual de instruções do fabricante cuidadosamente para obter informação adicional sobre os seguintes pontos:
    - instalação e requisitos particulares
    - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
    - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
    - manutenção e reparação.

7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta de soro recolhido de maneira normal numa veia e manuseado com todas as precauções por boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a –20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente misturadas antes de efectuar o teste. Inactivação de calor pode levar a resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.
Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictéricas devem ser evitadas. **O teste não é aplicável ao plasma humano.**

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

Técnica manual

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Prepare o antigénio reconstituindo o produto seco e congelado com o conjugado (volume relatado na etiqueta).

Amostras diluídas 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (testes duplicados são recomendados). Coloque calibradores NÃO DILUÍDOS (se for possível, em duplicado) numa tira (100 µL em cada poço). Deixe um poço para a nula, executando com a utilização de 100 µL de mistura de substrato.
Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes durante 30 segundos (300 µl), junte 100 µL de conjugado a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais quatro vezes, como está descrito acima. Finalmente, o substracto é distribuído, 100 µL/poço.
Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada com 100 µL de solução de paragem.
A adsorção (O.D.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

PASSO 1 Coloque 100 µL de amostra diluída/controlos nos poços das tiras.
-
Incube durante 45 minutos a 37°C
-
Lave quatro vezes. (300 µl ± 75 µl)
-
PASSO 2 Junte 100 µL de imunocomplexo a cada poço
-
Incube durante 45 minutos a 37°C
-
Lave quatro vezes. (300 µl ± 75 µl)
-
PASSO 3 Junte 100 µL de substracto a cada poço
-
Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente
-
PASSO 4 Adicione 100 µL de solução de paragem.
-
Leia a adsorção a 450 nm dentro de 30 min.

10. CONTROLO DE QUALIDADE

Subtraia o valor do nulo (≤ 0.100) de todas as outras leituras.
O controlo positivo deve ter um D.O. de pelo menos 1.5 vezes a DO soro directo.

A relação entre Controlo Negativo e Directo deve ser < 0.6.
O valor de D.O. do directo deve ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultados qualitativos
Se a adsorção da amostra for maior que a de controlo, a amostra é positiva para a presença de IgM específico.
Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor directo (ÍNDICE).
A amostra é considerada:

Positiva*:* se a relação for > 1.2.

Duvidosa*:* ± 20% do valor directo.

Negativa*:* se a relação for < 0.8.

se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Todos os resultados d teste necessitam de uma interpretação cuidadosa, já que reacções de falsos positivos ou respostas heterotípicas IgM podem ocorrer com soros de pacientes com mononucleose heterófila-positiva, ou Varicela Zoster.
Uma reacção específica IgM pode ser observada na reactivação e reinfecção assim como com infecções a CMV.
Porque todas as complicações do diagnóstico serológico de infecção congénita, o isolamento do vírus da urina na primeira semana de vida continua a ser a melhor maneira de diagnosticar envolvimento intra-uterino. A ausência de IgM específico para CMV não exclui a possibilidade de infecção a CMV. Foi relatado que 10-30% de crianças podem não desenvolver resposta a anticorpos CMV IgM, apesar da infecção congénita a CMV.
O resultado de teste deve ser usado em conjunção com a informação disponível na avaliação do historial clínico ou em procedimentos de diagnóstico.
Amostras fortemente positivas pela presença de IgM anti-Varicela Zoster e Epstein Barr EBV podem dar resultados falsamente positivos.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram ensaiadas 44 amostras de soros com potenciais interferentes:
- Factor reumatóide (n=8)
- Anticorpos heterófilos (n=4)
- Bilirrubina (n=8)
- Triglicéridos (n=7).
- Varicela Zoster IgM positivos (n=2)
- Hipergamaglobulinemia (n=13)

Obtiveram-se dois resultados duvidosos nas amostras VZV e heterófilos positivos e nenhuma interferência em todos os outros

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Numa experimentação clínica, 105 amostras pertencentes a pacientes compatíveis com uma infecção por CMV eram analisadas com o nosso kit em paralelo ao método considerado como referência para estabelecer a sensibilidade. Na referência, 62 resultavam efectivamente positivas.

Para determinar a especificidade foram empregues 222 amostras, das quais 87 doadores, 92 amostras IgG negativas e 43 pacientes negativos ao teste de referência.

Os resultados estão resumidos na seguinte tabela:

		REFERÊNCIA	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

O kit Enzywell tem uma sensibilidade de 98.4% e uma especificidade de 97.8%.

15. PRECISÃO

Precisão intrínseca (n=6):

	MÉDIA INDEX	DESVIO PADRÃO	CV%
Controlo negativo	0.2	0.02	10
CMM2	3.3	0.15	5
CMM3	10.3	0.45	4
Positivo 1	3.2	0.27	8
Positivo 2	1.6	0.08	5
Positivo 3	4.3	0.24	6
Positivo 4	2.3	0.19	8
Negativo 1	0.2	0.02	10
Negativo 2	0.3	0.04	13
Negativo 3	0.2	0.02	10
Negativo 4	0.4	0.03	8
Negativo 5	0.3	0.04	13
Negativo 6	0.2	0.03	15
Negativo 7	0.3	0.04	13
Negativo 8	0.3	0.04	13

Precisão entre passagens (n=6):

	MÉDIA INDEX	DESVIO PADRÃO	CV%
Controlo negativo	0.2	0.01	5
CMM2	3.3	0.01	0
CMM3	10	0.36	4
Positivo 1	3.2	0.08	3
Positivo 2	1.6	0.11	7
Positivo 3	4.2	0.08	2
Positivo 4	2.6	0.53	20
Negativo 1	0.3	0.06	20
Negativo 2	0.2	0.03	15
Negativo 3	0.3	0.03	10
Negativo 4	0.4	0.07	18
Negativo 5	0.3	0.04	13
Negativo 6	0.2	0.03	15
Negativo 7	0.2	0.03	15
Negativo 8	0.3	0.04	13

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS / SUGESTÕES	TESTE OU ACÇÃO
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verificação do procedimento. Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no anexo da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dissecante de gel de sílica

		deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de substracto.
	Lavagem inadequada	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta de poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se existe sujidade na fonte de luz do instrumento e do detector. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções recomendadas de utilização.
	Volume inadequado do substracto adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

17. REFERÊNCIAS

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for dtermination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
5. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linmed immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
6. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
7. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
8. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

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

CE
0123

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