



ENZYWELL

CMV SCREEN

REF 91013 (96 tests)

REF 91173 (6 x 96 tests)

Prodotto da/Manufactured by:
DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY
15. PRECISIONE / PRECISION
16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING"
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
CMV SCREEN**

REF 91013 (96 tests)

REF 91173 (6 x 96 tests)

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELLE IMMUNOGLOBULINE ANTI CYTOMEGALOVIRUS NEL SIERO O PLASMA UMANO.

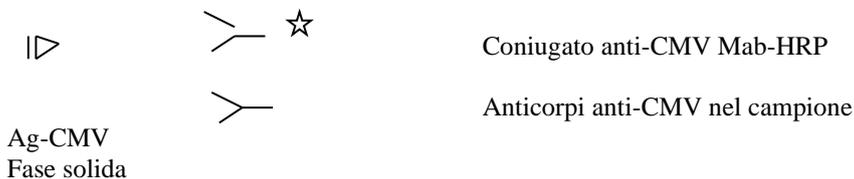
2. INTRODUZIONE

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, in modo particolare a scopi trasfusionali.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test per il dosaggio delle immunoglobuline (Ig totali) anti cytomegalovirus (CMV) si basa sul principio dell'analisi per competizione. Gli anticorpi anti-CMV presenti nel campione in esame competono con il tracciante (coniugato perossidasi-anti CMV monoclonali) per occupare i siti leganti, disponibili in numero limitato, dell'antigene fissato sulla fase solida. Maggiore è la concentrazione degli anticorpi nel campione in esame, minore è la quantità di anticorpi coniugati che si legano. Le componenti non legate vengono eliminate mediante lavaggio e l'attività enzimatica legata viene valutata colorimetricamente per trasformazione di un substrato cromogenico (reazione di colore azzurro che vira al giallo dopo l'aggiunta del reattivo Stop). L'intensità di colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione degli anticorpi nel campione in esame.



4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 tests (**REF** 91013) o 6 x 96 tests (**REF** 91173).

- **Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

Il codice 91013 contiene:

MT PLATE MICROPIASTRA 1 piastra da 12 x 8 pozzetti sensibilizzati con antigeni del Cytomegalovirus.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (G, 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.

CAL CALIBRATORE 1 x 1 mL

Contenuto: Siero di bue in tampone fosfato 0,01 mol/L con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%, liquido, pronto all'uso.

CONTROL + SIERO DI CONTROLLO POSITIVO 1 x 1 mL

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0,01 mol/L con BSA 1%, Bronidox 0,02% e fenolo 0,05%, liquido pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti cytomegalovirus marcati con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso.

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 o deionizzata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619). 1 x 12 mL. Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602). 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

Il codice 91173 contiene:

MT PLATE MICROPIASTRA. 6 piastre da 12 x 8 pozzetti sensibilizzati con antigeni del Cytomegalovirus.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (G, seguito dal numero di lotto); 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.

CAL CALIBRATORE. 1 x 1 mL.

Contenuto: Siero di bue in tampone fosfato 0,01 mol/L con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%, liquido, pronto all'uso.

CONTROL + SIERO DI CONTROLLO POSITIVO. 1 x 1 mL

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0,01 mol/L con BSA 1%, Bronidox 0,02% e fenolo 0,05%, liquido pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONJ CONIUGATO. 6 x 16 mL.

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti cytomegalovirus marcati con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 3 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 o deionizzata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619). 6 x 12 mL. Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602). 1 x 130 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (6).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- Incubatore a 37°-40°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 nel range 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	4 SETTIMANE 2/8°C busta di polietilene
CALIBRATORE	1 SETTIMANA a t.a.
CONTROLLO POSITIVO	1 SETTIMANA a t.a.
CONIUGATO	1 SETTIMANA a t.a.
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C , 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
TAMPONE DI LAVAGGIO	p. uso 2 settimane 2/8°C 5 giorni 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.****Attenzione:**

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti -HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio. Smaltimento dei residui: i campioni di siero, i calibratori e le strip usate devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di leggi vigenti.

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 ed i controlli contengono fenolo
 - c) Il substrato è acido
 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 2 M 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. La OD del calibratore e dei campioni può essere leggermente diversa fra piastre diverse. Quindi, se si utilizzano nella stessa seduta delle strips da piastre diverse anche se dello stesso lotto, è necessario ripetere il calibratore.
2. 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.**
3. 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.
4. 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.
5. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
6. Evitare l'uso di congelatori autosbrinanti per la conservazione dei campioni.
7. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
8. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
9. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso con il substrato e con il coniugato.

10. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
11. 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 CO₂.
12. 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.
13. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato o campioni che presentano inquinamento microbico.
14. Evitare la contaminazione dei pozzetti con la polvere da guanti monouso.
15. L'utilizzo del kit con strumenti automatici deve essere validato da parte dell'utilizzatore.
16. 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 CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Non è richiesta alcuna preparazione particolare del paziente. Si possono usare campioni di siero o plasma. Non sono state osservate interferenze in seguito all'uso di anticoagulanti come citrato, eparina o EDTA. Il campione può essere mantenuto per 7 giorni a 2/8°C. Per conservazioni più lunghe congelare a -20°C; può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Un ciclo di congelamento/scongelamento dei campioni o un'inattivazione al calore per 30 min a 56°C non influenza i risultati.

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

8. PROCEDIMENTO

1. Distribuzione dei campioni:
Dispensare 30 µL del calibratore e del controllo positivo in un pozzetto della piastra (meglio in duplicato) e 30 µL dei campioni in esame nei rimanenti pozzetti.
Aggiungere in tutti i pozzetti 100 µL di coniugato. Miscelare accuratamente.
2. Incubazione:
Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a 36-39°C per 60 ± 5 minuti.
3. Lavaggio:
Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con circa 0,3 mL di soluzione di lavaggio. Attendere 30" prima di ogni lavaggio.
4. Distribuzione del substrato:
Dispensare 100 µL di substrato per ogni pozzetto.
5. Incubazione del substrato:
Incubare la piastra per 15 ± 2 minuti a temperatura ambiente (18-30°C).
6. Arresto della reazione:
Dispensare 100 µL di soluzione bloccante seguendo lo stesso ordine di aggiunta del punto 4.
7. Lettura:
Leggere fotometricamente entro 30 minuti a 450 nm o 450/620 nm.

9. Schema del saggio	
STEP 1	Mettere 30 µL di calibratore, controllo positivo e siero campione nei pozzetti. Aggiungere 100 µL di coniugato in tutti i pozzetti. Agitare.
STEP 2	incubare 60 ± 5 min. a 37-40°C lavare 4 volte (300 µL)
STEP 3	mettere 100 µL di Substrato per pozzetto incubare 15 ± 2 min. a 18-25°C
STEP 4	aggiungere 100 µL di Stop Solution leggere l'O.D. a 450 ± 5 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

D.O. Calibratore ≥ 0.600 a 450 nm o ≥ 0.560 a 450/620 nm.

D.O. Controllo Positivo / OD Calibratore $\leq 0,50$

Se i risultati ottenuti non rientrano nelle specifiche, contattare l'assistenza tecnica.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Il cut-off si calcola moltiplicando la D.O. del Calibratore per un fattore di calcolo:

0,6

Es. Calibratore: D.O. = 1,100 Fattore = 0,6

Cut-Off = 1,100 x 0,6 = 0,660.

Se il valore dell'assorbanza del campione è minore del Cut-Off, il campione risulta positivo per la presenza di immunoglobuline anti-Cytomegalovirus.

I dati di ripetibilità consigliano l'uso di una « zona grigia » attorno alla D.O. del Cut-off di $\pm 10\%$. Nell'esempio risulterebbero dubbi i campioni con D.O. compresa fra 0,6 e 0,72.

12. LIMITAZIONI DEL TEST

Il test non è in grado di discriminare la presenza di IgG da quella delle IgM.

Il test non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica. Un risultato negativo non preclude la eventualità di un'infezione.

Devono essere seguiti i capitoli PROCEDIMENTO e INTERPRETAZIONE DEL TEST.

Con qualsiasi metodo immunoenzimatico si possono avere dei risultati non ripetutamente reattivi.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati campioni contenenti anticorpi anti-Epstein Barr Virus (n=40), Herpes Simplex Virus (n=33) e anti-Nuclear (n=44) e campioni contenenti elevati livelli di bilirubina (n=40), proteine (n=20), lipidi (n=24), emoglobina (n=20) e fattore reumatoide (n=40); in nessun caso si sono osservate discordanze quando i risultati sono stati confrontati con quelli di un kit del commercio.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

Sono stati analizzati 704 sieri umani di donatori sani. In parallelo venivano analizzati per la presenza di IgG specifiche con un kit ELISA del commercio. Si sono trovati 418 sieri negativi e 265 positivi, in accordo fra i due metodi. 20 campioni non erano in accordo e venivano sottoposti ad ulteriori indagini usando altri due metodi commerciali basati su principi analitici diversi dal dosaggio immunoenzimatico. L'uso di questi metodi alternativi indicava la presenza di 2 risultati falsi-negativi e di 1 falso-positivo. In base allo stesso criterio, il metodo comparativo mostrava una mancanza di sensibilità per 2 campioni. In conclusione, i dati trovati nella sperimentazione dimostravano una sensibilità del test del 99,3% ed una specificità del 99,8%.

15. PRECISIONE

La riproducibilità è stata esaminata testando campioni negativi e positivi. Tutte le sedute (n=27) erano valide. Il CV% di 6,4 e 5,8% fu trovato rispettivamente per i controlli negativo e positivo. La variazione tra sedute e nella seduta furono studiate usando un pannello di sieri che erano positivi, negativi borderline agli anticorpi del Cytomegalovirus. I campioni sono stati testati in 10 sedute differenti. I valori di CV% calcolati variavano dall'1,4 al 4,4%.

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI 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	Aspirazione inadeguata 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. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
4. R. Ziegelmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL CMV SCREEN

REF 91013 (96 tests)

REF 91173 (6 x 96 tests)

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF ANTI-CYTOMEGALOVIRUS IMMUNOGLOBULINS IN HUMAN SERUM OR PLASMA.

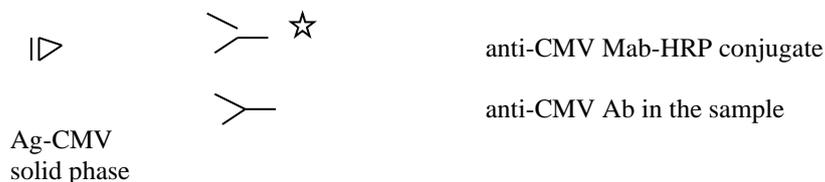
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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 and check for serum conversion, particularly for transfusion purposes.

3. PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The test for the assay of anti-Cytomegalovirus (CMV) immunoglobulins (total Ig) is based on the principle of analysis by competition. The anti-CMV antibodies present in the sample compete with the marker (peroxydase/anti-CMV monoclonal antibody conjugate) to occupy the few binding sites available on the antigen coated on the solid phase. The higher the antibody concentration in the sample, the lower the number of conjugated antibodies which are bound. The unbound components are eliminated by washing, and the bound enzymatic activity is determined colorimetrically by transformation of a chromogen substrate (the blue colouring of the reaction turns yellow after the addition of the Stop reagent). The intensity of the colour which develops is inversely proportional to the antibody concentration in the sample.

This kit also offers the opportunity to monitor sample addition in order to reduce the risk of incorrect results due to omission of the sample. The conjugate which has a yellow-orange colour in the absence of the sample, turns dark red in the presence of serum, plasma or negative or positive controls: The colour change is easily recorded if the plate is read before incubation at 540 nm.



4. REAGENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 tests (**REF** 91013) or 6x96 tests (**REF** 91173).

- **Bring to room temperature before use.**

Code 91013 contains:

MT PLATE MICROPLATE 1 plate with 12x8 wells coated with Cytomegalovirus antigens.

Use: open the package at the opposite end from the code (G, followed by the lot number) which is useful for its identification, 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, expell the air and seal by pressing the closure.

CAL CALIBRATOR 1 x 1 mL

Contents: Newborn Calf Serum in phosphate buffer 0.01 mol/L with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%, liquid, ready for use.

CONTROL + POSITIVE CONTROL SERUM 1 x 1 mL

Contents: Dilute human serum in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1%, Bronidox 0.02% and phenol 0.05%, liquid, ready for use without further dilution.

CONJ CONJUGATE 1 x 16 mL Ready for use

Contents: anti-CMV monoclonal antibodies labelled with Horse Radish Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

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 or deionized water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1 x 12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

Code 91173 contains:

MT PLATE MICROPLATE 6 plates with 12x8 wells coated with Cytomegalovirus antigens.

Use: open the package at the opposite end from the code (G, followed by the lot number), 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, expell the air and seal by pressing the closure.

CAL CALIBRATOR 1 x 1 mL

Contents: Newborn Calf Serum in phosphate buffer 0.01 mol/L with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%, liquid, ready for use.

CONTROL + POSITIVE CONTROL SERUM 1 x 1 mL

Contents: Dilute human serum in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1%, Bronidox 0.02% and phenol 0.05%, liquid, ready for use without further dilution.

CONJ CONJUGATE 6 x 16 mL Ready for use

Contents: anti-CMV monoclonal antibodies labelled with Horse Radish Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 3 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 or deionized water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 6 x 12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x130 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (6).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 or 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionized 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	4 weeks at 2/8°C in the polythene bag
CALIBRATOR	1 week at room temperature
CONTROL SERUM	1 week at room temperature
CONJUGATE	1 week at room temperature.
SUBSTRATE	until the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
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 AND WARNINGS***FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE. STORE AT 2-8°C.*****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: the used devices containing materials of human origin must be handled as infectious material and disposed of according to the full requirements of this issue.

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 Rinsing Buffer contains detergents
 - b) The conjugate and controls contain phenol
 - c) The substrate is acid.
 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 Solution and hydrochloric acid 2 M 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. The extinction value of the calibrator, and also of the samples, may differ slightly from plate to plate. Therefore, if strips taken from different plates, even if from the same batch, are to be used in the same run, the calibrator must be repeated.
2. 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.**
3. 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.
4. 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.
5. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
6. Avoid to use the self-defrosting freezers for the storage of samples.
7. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
8. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
9. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for use with the substrate and for use with the conjugate.
10. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
11. 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. CO₂ incubators must not be used.

12. 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.
13. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
14. Avoid contaminating microwells with the dust from disposable gloves.
15. The use of the kit with automated instruments must be validated by the user.
15. 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 OF SPECIMENS AND STORAGE:

No special preparation of the patient is necessary. Serum or plasma samples can be used. The use of anticoagulants such as citrate, heparin or EDTA does not interfere in the test. Samples can be stored for 7 days at 2-8°C and can be thawed a maximum of 3 times. For longer storage, freeze at -20°C. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Freezing/thawing of the samples or heat inactivation for 30 min at 56°C does not influence the results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

8. TEST PROCEDURE

1. Distribution of the samples:
Dispense 30 µL of calibrator and of the positive control in wells on the plate (preferably in duplicate), and 30 µL of the samples being tested in the remaining wells. Add 100 µL of conjugate to each well. Mix carefully.
2. Incubation:
Incubate the plate covered with the adhesive foil at 36-39°C for 60 ± 5 minutes.
3. Rinsing:
Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with about 0.3 mL of washing solution. Wait 30" between each wash.
4. Distribution of the substrate:
Dispense 100 µL of the substrate in each well.
5. Substrate incubation:
Incubate the plate for 15 ± 2 minutes at room temperature (18-30°C).
6. Interruption of the reaction:
Dispense 100 µL of blocking solution, in the same order as that followed for point 4.
7. Reading:
Take the photometric readings within 30 minutes at 450 nm or 450/620 nm.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Place 30 µL of calibrator, positive control and serum sample in the wells. Add 100 µL of conjugate to all wells. Mix well. |
| STEP 2 | Incubate for 60 ± 5 min. at 37-40°C

Wash 4 times (300 µL) |
| STEP 3 | Place 100 µL of Substrate in each well

Incubate for 15 ± 2 min. at room temperature |
| STEP 4 | Add 100 µL of Stop Solution

Read absorbance at 450 ± 5 nm within 30 min |

10. TEST VALIDATION

The test is valid if:

O.D. Calibrator at 450 nm ≥ 0.600 , or ≥ 0.560 at 450/620 nm.

O.D. Positive Control 450 nm/O.D. Calibrator 450 nm ≤ 0.50 .

If the results obtained do not meet the test validation specifications, contact your local technical assistant.

11. INTERPRETATION OF THE TEST

The Cut-Off is calculated by multiplying the O.D. of the Calibrator by the factor

$$\mathbf{0.6}$$

Example: Calibrator: O.D. = 1.100 Factor = 0.6

$$\text{Cut-Off} = 1.100 \times 0.6 = \mathbf{0.660}.$$

If the absorbance value of the sample is lower than that of the Cut-Off, the sample is positive for the presence of anti-Cytomegalovirus immunoglobulins.

The reproductibility data suggest the use of a “grey zone” of $\pm 10\%$ around the Cut-off O.D. In the example, samples with OD in the range 0.6 to 0.72 would therefore be doubtful.

12. LIMITATIONS

The test is not able to discriminate between the presence of IgG and that of IgM.

The test cannot be used on its own for clinical diagnostic purposes. A negative result does not exclude the possibility of the disease.

The Test Procedure and Interpretation of the Test must be followed. Non-repeatable reactive results may be obtained with any EIA procedure.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

Samples containing antibodies against Epstein Barr Virus (n=40), Herpes Simplex Virus (n=33) and anti-Nuclear (n=44), and samples containing high levels of bilirubin (n=40), proteins (n=20), lipids (n=24), hemoglobin (n=20) and rheumatoid factor (n=40) were tested; in no case was any disagreement found when the results were compared with those found with another commercial method.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

704 human sera from healthy blood donors were analyzed. In parallel, these samples were tested for the presence of specific anti-CMV IgG using a commercial ELISA kit. 418 negative samples and 265 positive samples were found, in agreement between the two methods.

20 samples were not in agreement, and were subjected to further study using two other commercial methods based on different analytical principles from the immunoenzymatic test. The use of these alternative methods led to the conclusion that there were 2 false negative and 1 false positive result. Based on the same criteria, the comparative method also showed a lack of sensitivity with 2 samples. In conclusion, the data found in the experimentation showed that the sensitivity of the test is 99.3% and the specificity 99.8%.

15. REPRODUCIBILITY

Reproducibility was studied by testing negative and positive samples: All the runs (n=27) were valid. The CV% of 6.4 and 5.8% were found respectively with the negative and positive controls. Variations between runs were studied using a panel of serum samples which were positive, negative and borderline for the presence of anti-CMV antibodies. The samples were tested in 10 different runs. The CV% values ranged from 1.4 to 4.4%.

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).
- 2.H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
- 3.P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
- 4.R. Zieglermaier 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 Fabbicante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote

CE
0123

DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577-58711