



ENZYWELL

CYTOMEGALOVIRUS IgG

REF 91010 (96 tests)

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



INDICE / INDEX / ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE / CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE /
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ TEST VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE /
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /
14. CROSS-REATTIVI /CROSS REACTION / ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ / REACCIONES CRUZADAS / RÉACTIONS CROISÉES / REAÇÕES CRUZADAS
15. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
16. PRECISIONE / PRECISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO
17. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / “TROUBLE SHOOTING” / ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
18. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgG

REF 91010

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG 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. Un aumento significativo nel titolo di IgG anti Cytomegalovirus suggerisce una infezione recente o una riattivazione di una infezione latente.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

L'antigene, costituito da cytomegalovirus parzialmente purificato ed inattivato, viene legato alla fase solida (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene.

Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane coniugate con perossidasi di rafano.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame. Quando la reazione enzimatica è interrotta per aggiunta di una soluzione di acido solforico la colorazione gialla che ne risulta può essere facilmente letta 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 sensibilizzati con Cytomegalovirus.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (C 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 CALIBRATORI. 5 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-CMV IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione. I valori possono essere espressi sia come UI/ml che come EU/ml (vedere punto 11 per tabella di conversione). Il Calibratore 2 (1 UI/ml o 10 EU/mL) corrisponde al cut-off e può essere usato per l'analisi qualitativa. I valori dei calibratori sono 0.5, 1, 5, 10, 20 UI/ml ottenuti per titolazione contro il "Proposed International Standard -WHO".

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi in tampone fosfato contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL IgG IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF93910). 1 x 1.6 mL

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Siero umano, privo di anticorpi anti-CMV IgG, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione (Calibratore 0).

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, discioglierli 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 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).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm e 405 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
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione

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	6 SETTIMANE 2/8°C busta di polietilene
CALIBRATORI	6 SETTIMANE 2/8°C
CONIUGATO	6 SETTIMANE 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C; 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p. uso 2 settimane 2/8°C 5 giorni 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°

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 calibratori 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 CO₂.
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 dall'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, 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. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

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

Il test non è applicabile a plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

Tecnica manuale

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

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 calibratori possibilmente in duplicato (100 µL per pozzetto). Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL del 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 del coniugato 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 (O.D.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono OD superiori a 2.000.

9. Schema del Saggio

Tecnica manuale

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Mettere 100 µL di siero diluito/calibratori nei pozzetti dello strip. |
| | - |
| | Incubare 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavare 4 volte (300 µL) |
| | - |
| STEP 2 | Mettere 100 µL di coniugato 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 la D.O. a 450 nm entro 30 min. |

10. VALIDAZIONE DEL TEST

1. **CONTROL IgG** - (Calibratore 0): la densità ottica (D.O.) del controllo negativo deve essere $\leq 0,6$ volte la D.O. del Calibratore 2.
2. La D.O. del Calibratore 2 deve essere $\geq 0,2$ a 450 nm; $\geq 0,16$ a 450/620 nm
3. La D.O. dello Calibratore 5 deve essere $\geq 1,5$.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

RISULTATI QUANTITATIVI

Riportare in grafico le D.O. dei calibratori, sottratte dalla D.O. del bianco, in funzione del titolo di ciascun calibratore. Ottenere il titolo corrispondente del campione in esame per interpolazione.

NOTA: Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.

Se la D.O. di un campione o calibratore è superiore a 2,0, leggere a 405 nm e moltiplicare il valore per 3.

Conversione delle D.O. in unità/mL

Le IgG anti-CMV di ciascun campione possono essere espresse in unità arbitrarie (EU/mL) o in IU/mL (anti CMG IgG WHO standard), interpolando i valori in D.O. dei 6 calibratori e confrontando il valore in D.O. del campione con la curva così ottenuta. La Tabella 1 riporta la conversione tra EU/ml e IU/ml.

Tab. 1: Valore dei calibratori in unità arbitrarie e internazionali

	EU/mL	IU/mL
Calibrator 0	0	0
Calibrator 1	5	0.5
Calibrator 2	10	1
Calibrator 3	50	5
Calibrator 4	100	10
Calibrator 5	200	20

Il grado di immunità può essere interpretato come segue:

IMMUNE: quando la concentrazione di IgG Cytomegalovirus nel campione è > 12 EU/mL o 1.2 IU/mL

NON IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-Cytomegalovirus è < 8 EU/mL o < 0.8 IU/mL.

DUBBIO: quando il valore è compreso fra i due valori. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato.

RISULTATI QUALITATIVI

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-Off (Calibratore 2). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2

Dubbio: $\geq 0.8 - \leq 1.2$

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

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

L'inattivazione al calore del siero in esame non produce risultati erranei nella determinazione delle IgG anti Cytomegalovirus a differenza di quanto accade nella determinazione delle IgM; Il livello delle IgM anti-Cytomegalovirus dovrebbe essere determinato usando il kit

ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgM (COD. 91011). Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgG.

Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti dalla storia del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 34 campioni di sieri contenuti potenziali interferenti:

- Fattore Reumatoide (n=4) < 800 UI/ml
- Anticorpi eterofili (n=6)
- Bilirubina (n=10) < 11 mg/dL
- Trigliceridi (n=10) < 1100 mg/dL
- Emolisi (n=4) > 10 mg/dL

In nessun caso si sono osservate interferenze.

14. CROSS-REATTIVI

Sono stati testati 23 campioni negativi al Cytomegalovirus, contenenti anticorpi IgG contro virus quali quello della Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex e Parotite. In nessun caso la presenza di tali anticorpi influenzava il test.

15. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 264 campioni, di cui 47 risultavano negativi e 217 positivi. I campioni sono stati analizzati con un altro metodo immunoenzimatico commerciale: si è trovato un accordo del 100% fra i due metodi.

Il kit ENZYWELL ha specificità e sensibilità del 100%.

16. PRECISIONE**Tab.1 Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi**

Cut Off	Batch. N.	Batch. N.	Batch. N.
n=21	104	105	106
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Tab.2 Precisione tra sedute

Campione	EU/ml			CV%
	I run	II run	III run	
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

17. GUIDA DEI 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	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.

18. 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. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgG

REF 91010

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG-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 and check for serum conversion. A significant increase in the anti-Cytomegalovirus IgG titer is indicative of a recent infection or reactivation of a latent infection.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-7).

The antigen, composed of partially purified and inactivated Cytomegalovirus, is bound to the solid phase (8-well strips). The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies conjugated to horse radish peroxidase.

The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added.

The blue colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. When the enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulphuric acid solution, the yellow colour which develops can be easily read using a microplate reader.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

Bring to room temperature before use.

MT PLATE MICROPLATE. 12x8 wells coated with Cytomegalovirus.

Use: open the package on the opposite side from the code (C plus 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, expell the air and seal by pressing the closure.

CAL CALIBRATORS 5 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum, containing known concentrations of anti-CMV IgG antibodies, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution. The values can be expressed in IU/ml or EU/ml (see section 11 for conversion table). Calibrator 2 (1 IU/ml or 10 EU/mL) corresponds to the cut-off value and can be used in the qualitative test. The calibrators have the following values: 0.5, 1, 5, 10, 20 IU/mL, obtained by titration against the **“Proposed International Standard WHO”**.

Colour: the colour of the calibrators is proportional to the relative antibody titer.

CONJ CONJUGATE. 1x16 mL.

Contents: monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

CONTROL IgG - IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Human serum not containing anti-CMV IgG antibodies, diluted in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution (Calibrator 0).

Stability: The product is stable up to the expiry date when stored unopened at 2/8°C.

WASH BUF 10x WASHING 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 dilute 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% 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).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm and 405 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 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	6 weeks at 2/8°C, polythene bag
Calibrators	6 weeks at 2/8°C
Conjugate	6 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Rinsing Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

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 Rinsing 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 Solution 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 should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. 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.
10. 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.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. The use of the kit with automated equipment has to be validated by the user.
13. 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 shaken carefully before use. 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.

Human plasma cannot be used in the test.

8. TEST PROCEDURE

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

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), add 100 µL of conjugate 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. Take the reading again at 405 nm if there are OD higher than 2,000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

Manual Technique

STEP 1 Place 100 µL of diluted sample/controls to the wells of the strips.

-
- Incubate for 45 min. at 37°C
-
- Wash 4 times (300 µl)
-

STEP 2 Add 100 µL of conjugate 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

1. **CONTROL IgG** - (Calibrator 0): the O.D. of the negative control must be ≤ 0.6 times the O.D. of Calibrator 2.
2. The O.D. of Calibrator 2 must be ≥ 0.2 at 450 nm; ≥ 0.16 at 450/620 nm.
3. The O.D. of Calibrator 5 must be ≥ 1.5 .

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

QUANTITATIVE RESULTS

Report the OD of the calibrators on a graph after subtracting the OD of the blank. The corresponding titer of the test sample can be obtained by extrapolation.

NOTE: A standard curve must be performed for each run.

If the O.D. of any sample or calibrator is over 2.0, take the reading at 405 nm and multiply the value by 3.

Conversion of the O.D. into units/mL

The anti-Cytomegalovirus IgG can be expressed in EU/mL (arbitrary units) or in IU/mL (proposed anti CMV IgG WHO standard), by interpolating the results of the 6 calibrators and comparing the OD of the sample with the curve obtained.

Table 1: Calibrator Values in arbitrary and international units

	EU/mL	IU/mL
Calibrator 0	0	0
Calibrator 1	5	0.5
Calibrator 2	10	1
Calibrator 3	50	5
Calibrator 4	100	10
Calibrator 5	200	20

The degree of immunity can be interpreted as follows:

IMMUNE: when the anti-Cytomegalovirus IgG concentration in the sample is > 12 EU/mL or 1.2 IU/mL

NON IMMUNE: when the anti-Cytomegalovirus concentration is < 8 EU/mL or < 0.8 IU/mL

DOUBTFUL : if the result is between the two values. In this case it is advisable to repeat the test in duplicate.

QUALITATIVE RESULTS

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (Calibrator 2). The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2

Doubtful: >= 0.8 - <= 1.2

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

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.

Heat-inactivation of the test serum does not give rise to erroneous results in the determination of anti-CMV IgG, as in the case of anti-CMV IgM.

The Cytomegalovirus IgM level should be determined using Enzywell Cytomegalovirus IgM kit. Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level.

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

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

34 serum samples containing potential interfering substances were tested:

- Rheumatoid factor (n=4) < 800 UI/ml
- Heterophile antibodies (n=6)
- Bilirubin (n=10) < 11mg/dl
- Triglycerides (n=10) < 1100 mg/dl
- Haemolysis (n=4) > 10 mg/dl

No interference was noted in any case.

14. CROSS REACTION

23 samples which were negative for CMV, but containing IgG antibodies against viruses such as Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex and Mumps, were tested. In no case did the presence of these antibodies influence the test.

15. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 264 samples were analysed, 47 of which proved negative and 217 positive. The samples were analysed with another commercial immunoenzymatic method: 100% agreement was found between the two methods, both in the positive and the negative samples.

The Enzywell kit offers 100% sensitivity and specificity.

16. PRECISION**Table 1 Within-run Precision performed on 3 different lots**

Cut Off n=21	Batch. N.104	Batch. N. 105	Batch. N. 106
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Table 2 “Between-run” Precision

Sample	EU/ml			
	I run	II run	III run	CV%
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

17. 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.

18. 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. 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. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Zieglermaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ
ENZYWELL
IgG ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ

REF 91010

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgG 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 οροαρνητικές 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. Μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των IgG αντι-Κυτταρομεγαλοϊού, είναι δείγμα μιας πρόσφατης λοίμωξης ή επανενεργοποίησης μιας λανθάνουσας λοίμωξης.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

Το αντιγόνο, αποτελούμενο από κυτταρομεγαλοϊό μερικώς κεκαθαρισμένο και αδρανικοποιημένο, συνδέεται με τη στερεά φάση (ταινία κυψελίδων 1x8). Μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό, οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο.

Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgG συζευγμένα με υπεροξειδάση ραφανιδίων.

Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης.

Το μπλε χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον υπό εξέταση ορό. Όταν διακοπεί η ενζυμική αντίδραση, με την προσθήκη διαλύματος θειικού οξέος, ο κίτρινος χρωματισμός που προκύπτει μπορεί εύκολα να διαβαστεί με έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων ELISA.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ

Φέρτε σε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12 x 8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με Κυτταρομεγαλοϊό.

Χρήση: Ανοίξτε το περιβλήμα των ταινιών (strips) από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (C 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.

CAL ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ 5 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός γνωστού τίτλου σε αντισώματα IgG κατά του CMV, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση. Οι τιμές μπορεί να εκφραστούν ή σε IU/ml ή σε EU/ml (βλ. σημείο 11 πίνακα μετατροπής). Ο Βαθμονομητής 2 (1 IU/ml ή 10 EU/mL) αντιστοιχεί στον cut-off και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική ανάλυση. Οι τιμές των βαθμολογητών είναι 0.5, 1, 5, 10, 20 IU/ml, υπολογισμένες με σημείο αναφοράς το Διεθνές Πρότυπο "Proposed International Standard –WHO".

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των αντισωμάτων.

CONJ ΣΥΖΥΓΤΕΣ 1 x 16 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-IgG σεσημασμένων με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

CONTROL IgG - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgG (PF93910) 1 x 1.6 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός αραιωμένος χωρίς αντισώματα IgG κατά του CMV, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση (Βαθμονομητής 0).

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 απαιτούμενη 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 αραιώση.

SAMP DIL 2 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 2 (PF93611) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων.

Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x 12 mL Έτοιμο για χρήση. **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H₂O₂ 0,01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Διάλυμα H₂SO₄ 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

6 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ

6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ σε 2/8°C

ΣΥΖΥΓΕΣ

6 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ σε 2/8°C

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C, αποθηκεύστε στο σκοτάδι

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X

έτοιμος 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 αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

1. 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.
2. 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, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
3. 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.
4. 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, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
5. 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.
6. 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 ότι 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 αλλάζετε 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 χέιλος 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 CO₂.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι 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 προδιαγραφές
 - 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 καταψύξετε 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

Τεχνική manual

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες. .
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 µL ορού σε 1 mL διαλύτη και ρίξτε 100 µL από κάθε αραιωμένο δείγμα σε κάθε κυψελίδα (σας συμβουλεύουμε να κάνετε την ανάλυση εις διπλούν). Ρίξτε τους βαθμονομητές σε μία ταινία, εις διπλούν αν είναι δυνατόν (100 µL ανά κυψελίδα). Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού δείγματος, χρησιμοποιώντας μόνο 100 µL υποστρώματος.

Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν στους 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις των 30 δευτερολέπτων η κάθε μία, (300 µl) προσθέστε 100 µL συζυγούς σε κάθε μία κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι στη συσκευή επώασης για 45 λεπτά σε 37°C καλύπτοντάς τις με την προστατευτική ταινία. Κάνετε και πάλι 4 εκπλύσεις του πλακιδίου, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 µL ανά κυψελίδα. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αναστείλατε την ενζυμική αντίδραση με 100 µL Stop Solution. Διαβάστε την Απορρόφηση (Ο.Π.) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 min. Σε περίπτωση που υπάρχουν τιμές Ο.Π. μεγαλύτερες από 2.000, διαβάστε την και πάλι στα 405 nm.

9. Διάγραμμα της ανάλυσης

- STEP 1 Ρίξτε 100 µL αραιωμένου ορού/ορών ελέγχου στις κυψελίδες της ταινίας
- - Επώαστε για 45 λεπτά στους 37°C
 -
 - Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
 -
- STEP 2 Ρίξτε 100 µL συζυγούς σε κάθε κυψελίδα
- - Επώαστε για 45 λεπτά στους 37°C
 -
 - Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
 -
- STEP 3 Ρίξτε 100 µL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα
- - Επώαστε 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

1. **CONTROL IgG** - (Βαθμονομητής 0): Η Οπτική Πυκνότητα (Ο.Π.) του ορού ελέγχου αρνητικής τιμής, πρέπει να είναι $\leq 0,6$ φορές η Ο.Π. του Βαθμονομητή 2.
2. Η Ο.Π. του Βαθμονομητή 2 πρέπει να είναι $\geq 0,2$ στα 450 nm $\geq 0,16$ στα 450/620 nm
3. Η Ο.Π. του Βαθμονομητή 5 πρέπει να είναι $\geq 1,5$.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεταφέρατε σε διάγραμμα τις Ο.Π. των βαθμονομητών, που έχετε αφαιρέσει από την Ο.Π. του τυφλού, ανάλογα με τον τίτλο κάθε βαθμονομητή.

Εξάγετε τον τίτλο που αντιστοιχεί στο υπό εξέταση δείγμα, με παρεμβολή.

ΣΗΜ.: Πρέπει να κάνετε μία στάνταρντ καμπύλη για κάθε κύκλο ανάλυσης.

Αν η Ο.Π. ενός δείγματος ή βαθμονομητή, είναι μεγαλύτερη από 2,0, διαβάστε την στα 405 nm και πολλαπλασιάστε την τιμή επί 3.

Μετατροπή των Ο.Π. σε μονάδες/mL

Η συγκέντρωση των IgG κατά του CMV κάθε δείγματος, μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες (EU/mL) ή σε IU/mL (IgG αντι CMG WHO standard), κάνοντας παρεμβολή στις τιμές της Ο.Π. των 6 βαθμονομητών και συγκρίνοντας την Ο.Π. του δείγματος με την καμπύλη που έχει προκύψει. Ο Πίνακας 1 παρέχει την μετατροπή μεταξύ EU/ml και IU/ml.

Πίν. 1: Τιμή των βαθμονομητών σε αυθαίρετες και διεθνείς τιμές.

	EU/mL	IU/mL
Βαθμονομητής 0	0	0
Βαθμονομητής 1	5	0.5
Βαθμονομητής 2	10	1
Βαθμονομητής 3	50	5
Βαθμονομητής 4	100	10
Βαθμονομητής 5	200	20

Ο βαθμός ανοσίας μπορεί να ερμηνευτεί όπως ακολουθεί:

ΘΕΤΙΚΟΣ: όταν η συγκέντρωση των IgG Κυτταρομεγαλοϊού στο δείγμα είναι > 12 EU/mL ή 1.2 IU/mL

ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ: όταν η συγκέντρωση των IgG κατά του Κυτταρομεγαλοϊού είναι < 8 EU/mL ή < 0.8 IU/mL.

ΑΜΦΙΒΟΛΟΣ: όταν η συγκέντρωση βρίσκεται μεταξύ των δύο αυτών τιμών. Σε μία τέτοια περίπτωση σας συμβουλεύουμε να επαναλάβετε την ανάλυση εις διπλούν.

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογίστε την σχέση μεταξύ της Ο.Π. του δείγματος και εκείνης του Cut-Off (Βαθμονομητής 2). Το δείγμα θα είναι:

Θετικό: αν ο λόγος είναι > 1.2

Αμφίβολο: >= 0.8 - <= 1.2

Αρνητικό: αν ο λόγος είναι < 0.8

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο επαναλάβετε την αιμοληψία.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Οροί που έχουν συλλεχθεί κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, όταν υπάρχουν μόνο αντισώματα IgM, μπορεί να οδηγήσουν, με αυτή την μέθοδο, σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Η θερμική αδρανοποίηση του υπό ανάλυση ορού δεν παρέχει εσφαλμένα αποτελέσματα κατά τον προσδιορισμό των IgG κατά του Κυτταρομεγαλοϊού, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει κατά τον προσδιορισμό των IgM. Η συγκέντρωση των IgM κατά του Κυτταρομεγαλοϊού, πρέπει να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας το kit ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgM (COD. 91011). Εναλλακτικά μπορεί να αναλυθεί ένα δεύτερο δείγμα που θα συλλεχθεί 8-14 ημέρες αργότερα, για να ελεγχθεί τυχόν αύξηση των IgG.

Το αποτέλεσμα του τεστ πρέπει ωστόσο να συνεκτιμηθεί μαζί με τα δεδομένα που προέρχονται από το ιστορικό του ασθενή ή/και από άλλες διαγνωστικές αναλύσεις.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 34 δείγματα ορόν που περιείχαν δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες όπως:

- Ρευματοειδής Παράγοντας (n=4) < 800 UI/ml
- Ετερόφιλα Αντισώματα (n=6)
- Χολερυθρίνη (n=9) < 11 mg/dl
- Τριγλυκερίδια (n=10) < 1100 mg/dl

- Αιμόλυση (n=4) > 10 mg/dl

Δεν παρουσιάστηκαν παρεμβολές σε καμία περίπτωση

14. ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Αναλύθηκαν 23 δείγματα αρνητικά στον Κυτταρομεγαλοϊό, που περιείχαν αντισώματα IgG εναντίον ιών όπως η Ερυθρά, ο Epstein Barr, ο Απλός Έρπητας και η Παρωτίτιδα. Σε καμία περίπτωση η παρουσία αυτών των αντισωμάτων δεν επηρέασε το τεστ.

15. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν κλινικό πειραματισμό, που έγινε σε ένα νοσοκομειακό εργαστήριο, αναλύθηκαν 264 δείγματα, εκ των οποίων 47 αποδείχθηκαν αρνητικά και 217 θετικά. Τα δείγματα αναλύθηκαν παράλληλα και με μία άλλη εμπορική ανοσοενζυμική μέθοδο: Τα αποτελέσματα αποδείχθηκαν ίδια και με τις δύο μεθόδους σε ποσοστό 100%.

Το kit ENZYWELL παρουσιάζει ειδικότητα και ευαισθησία 100%.

16. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Πίν.1 Ακρίβεια σε μία ανάλυση που έγινε με 3 διαφορετικές παρτίδες

Cut Off n=21	Batch. N. 104	Batch. N. 105	Batch. N. 106
Ο.Π.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Πίν.2 Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

Δείγμα	EU/ml			CV%
	I run	II run	III run	
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

17. 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. Επαναλάβετε 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). Επαναλάβετε 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 με ένα χαρτομάντιλο το πλακίδιο
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

18. 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.M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
- 5.F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
- 6.P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
- 7.R. Zieglermaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgG

REF 91010

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgG ANTI CYTOMEGALOVIRUS EN SUERO HUMANO COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL CYTOMEGALOVIRUS

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El Cytomegalovirus es un virus herpes que se transmite por estrecho contacto humano. La mayoría de los seres humanos resulta infectada de manera asintomática. El virus es particularmente grave en los pacientes inmunodeprimidos, 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 psicomotor. Por esta razón es importante determinar el título del anticuerpo de la paciente y observar la eventual sueroconversión. Un aumento significativo en el título de IgG anti Cytomegalovirus sugiere una recién infección o una reactivación de una infección latente.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

El antígeno, constituido por cytomegalovirus parcialmente purificado e inactivo, está unido a la fase sólida (tiras con 8 pocillos). Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgG marcados con peroxidasa de ráfano.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el substrato peroxidasa. El color azul que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

Cuando la reacción enzimática está interrumpida después de la adición de una solución de ácido sulfúrico la coloración amarilla resultante puede ser fácilmente 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 antígenos Cytomegalovirus.

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (C 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 de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL

Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-CMV IgG, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y azida sódica al 0,09%, líquido, líquido listo para su uso sin diluciones adicionales. El Calibrador 2 (10 EU/mL) corresponde al valor del cut-off y puede ser usado en el test cualitativo. Los calibradores tienen los valores siguientes: 0.5, 1, 5, 10, 20 UI/ml obtenidos por titulación contra el "proposed International Standard -WHO .

Color: el color de los calibradores es proporcional a la relativa titulación del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL.

Contenido: anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%.. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CONTROL IgG - IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Suero humano sin anticuerpos anti- CMV IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y azida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional(Calibrador 0).

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución salina fosfato tamponada, 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 conservante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL. Listo para su uso. **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 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 volúmenes entre 225-375 µl
- Agua Destilada o desionizada
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µl de solución

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	6 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CALIBRADORES	6 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	6 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la caducidad a 2/8°C
TAMPÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C 5 días a 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, según disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía 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 sustrato 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 los otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
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 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, incluidos 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 hidroc্লórico 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 CO₂.
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.
1. 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 está representado por el suero recogido normalmente de la vena y manejado con apropiadas precauciones como requerido por la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C, y deshelar hasta un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes.

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 DEL TEST

Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

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 calibradores SIN DILUIR en una tira, preferiblemente por duplicado (100 µL para cada pocillo). Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.

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 conjugado a cada pocillo 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 (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

Leer otra vez a 405 nm si están OD superiores a 2.000.

9. Esquema del Procedimiento del Test

Método Manual

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/calibradores en los pocillos.

-

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µl)

-

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado 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 absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

1. **CONTROL IgG** - Calibrador 0 (Control Negativo): la densidad óptica (DO.) del control negativo debe ser $\leq 0,6$ veces la D.O. del Calibrador 1.

2. La D.O. del Calibrador 2 debe ser $\geq 0,2$ a 450 nm; $\geq 0,16$ a 450/620 nm

3. La D.O. del Calibrador 5 debe ser $\geq 1,5$.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Resultados Cuantitativos

Poner en el gráfico las D.O. de los calibradores, restando la D.O. del blanco, en función del título de cada un calibrador.

Obtener el título correspondiente de la muestra examinada por interpolación.

NOTA: Hay que hacer una curva estándar por cada ciclo.

Si la D.O. de una muestra u calibrador es más de 2,0, leer a 405 nm y multiplicar el valor por 3.

Conversión de las D. O. en IU/mL

El IgG anti-CMV de cada muestra puede ser expresado en unidades arbitrarias (EU/mL) o en IU/mL (anti CMG IgG WHO standard), interpolando los valores en DO de los 6 calibradores y comparando el valor en DO de la muestra con la curva obtenida. La Tabla 1 indica la conversión entre EU/ml y UI/ml.

Tab. 1: Valor de los calibradores en unidades arbitrarias e internacionales

	EU/mL	IU/mL
Calibrador 0	0	0
Calibrador 1	5	0.5
Calibrador 2	10	1
Calibrador 3	50	5
Calibrador 4	100	10
Calibrador 5	200	20

El grado de inmunidad puede ser interpretado como sigue:

- INMUNE: cuando la concentración de IgG Cytomegalovirus en la muestra es > 12 EU/mL o 1.2 IU/mL
- NO INMUNE: cuando la concentración de IgG anti-Cytomegalovirus es < 8 EU/mL o < 0.8 IU/mL.
- DUDOSO: cuando la concentración está entre los dos valores. En este caso se aconseja repetir el test por duplicado. Si el resultado permanece dudoso, recoger otra muestra de sangre después de 2 semanas.

Resultados Cualitativos

Calcular la proporción entre el valor de la D. O. de la muestra y la del Cut-off (Calibrador 2). La muestra se considera:

Positiva: cuando la proporción es > 1.2

Dudosa: ≥ 0.8 - ≤ 1.2

Negativa: cuando la proporción 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

Las muestras recogidas la durante la fase aguda de la infección, cuando están presentes solamente los anticuerpos IgM, podrían resultar negativas con este procedimiento.

La inactivación al calor del suero examinado no produce resultados erróneos en la determinación de las IgG anti Cytomegalovirus a diferencia de cuanto pasa con la determinación de las IgM; el nivel de las IgM anti-Cytomegalovirus tendría que ser determinado usando el kit

ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgM (COD. 91011). Alternativamente, se analizará una segunda muestra de suero recogida 8-14 días después para determinar un eventual incremento del nivel de anticuerpos IgG.

El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de la historia del paciente u de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 34 muestras de suero contenentes potenciales interferentes:

- Factor Reumatóideo (n=4) < 800 UI/ml
- Anticuerpos eterófilos (n=6)
- Bilirubina (n=10) < 11 mg/dl
- Triglicéridos (n=10) < 1100 mg/dl
- Hemólisis (n=4) > 10 mg/dl

En ningún caso se observaron interferencias.

14. REACCIONES CRUZADAS

Se analizaron 23 muestras negativas al Cytomegalovirus, contenentes anticuerpos IgG contra virus como lo de la Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex y Mumps. En ningún caso la presencia de tales anticuerpos afectaba el test.

15. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 264 muestras, 47 de las cuales fueron negativas y 217 positivas. Las muestras fueron analizadas con otro método inmunoenzimático comercial: se encontró un acuerdo del 100% entre los dos métodos.

El kit Enzywell ofrece el 100% de sensibilidad y especificidad.

16. REPRODUCIBILIDAD

Tab.1 Reproducibilidad intra-ensayo realizada sobre 3 lotes distintos

Cut Off n=21	Lote N.104	Lote N. 105	Lote. N. 106
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Tab.2 Ensayos realizados en series y lotes

Muestra n.1	EU/ml			CV%
	I serie	II serie	III serie	
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

17. 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 sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

- 1.G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay.
- 2.Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- 3.H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
- 4.Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
- 5.M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked 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. Zieglermaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



PRECAUTIONS D'UTILISATION

ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgG

REF 91010

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ANTICORPS IGG 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 est basé sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigène, constitué du Cytomégalovirus purifié et inactif, est lié à la phase solide (puits de la barrette 1x8). A travers l'incubation avec le sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène. Après des lavages permettant d'éliminer les protéines qui ne se sont pas liées, on effectue l'incubation avec le conjugué se constituant d'anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase.

Le conjugué qui ne s'est pas lié est éliminé et l'on ajoute le substrat. La couleur qui apparaît dépend de la concentration en anticorps spécifiques dans le sérum examiné.

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 le Cytomégalovirus

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (C, 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.

CAL CALIBRATEURS 5 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgG 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. Les valeurs peuvent être exprimées en EU/mL ou UI/mL (voir la section 11 - table de conversion). Le calibrateur 2 (1 UI/mL ou 10 EU/mL) correspond au contrôle seuil et il peut être utilisé dans l'analyse qualitative. Les valeurs des calibrateurs sont 0.5, 1, 5, 10, 20 UI/mL, obtenues par titrage vers le « Standard International proposé – OMS ».

Couleur : la couleur des sérums de contrôle dépend de la concentration en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 16 mL

Composition : Anticorps monoclonaux anti-IgG marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox..

Préparation : Prêt à l'emploi.

CONTROL IgG - CONTROLE NEGATIF IgG (PF93910) 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. (Calibrateur 0).

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 de méthylorange en guise de colorant.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Prêt à l'emploi **LOTS INTERCHANGEABLES**

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

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : H₂SO₄ (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...)
- Micropipette capable de prélever 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	6 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène
CALIBRATEURS	6 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	6 semaines 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 échantillons 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) 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 ainsi 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 son 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 suffisante de solution d'hypochlorure de sodium pour que la concentration finale soit de 1 % minimum. Un contact de 30 minutes avec cette solution est nécessaire pour garantir une décontamination efficace.
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 la 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 puits 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 un analyseur adapté. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.
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, ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent causer des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec des 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

Utiliser des échantillons de sérum frais ou décongelé. Les échantillons peuvent être stockés à +2...+8 °C pendant 4 jours. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à -20 °C. Il ne faut pas les décongeler et recongeler plus de 3 fois. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les

sérums décongelés doivent être bien agités avant d'être utilisés. Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés. **Ne pas utiliser d'échantillon de plasma humain.**

8. PROCEDURE

Préparation :

- 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).

Exécution

Diluer les échantillons 1:101 en dispensant 10 µl 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 les contrôles NON dilués (100 µl/puits) dans une barrette. Le numéro minimum indispensable est 1 négatif et positif et 2 cut-off. 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). Ajouter 100 µl du conjugué 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. Lire la D.O. de nouveau à 405 nm s'il y a des D.O. supérieures à 2,000.

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 Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).

3e ETAPE Mettre 100 µl de substrat 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

1. **CONTROL IgG** - (Calibrateur 0) : la D.O. du contrôle négatif doit être $\leq 0,6$ -fois la D.O. du Calibrateur 2.
2. La D.O. du calibrateur 2 doit être $\geq 0,2$ à 450 nm ; $\geq 0,16$ à 450/620 nm.
3. La D.O. du calibrateur 5 doit être $\geq 1,5$.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats quantitatifs

Lire les absorptions des calibrateurs à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O. du blanc ($\leq 0,150$). Réaliser un graphique avec ces valeurs. On obtient le titre de chaque échantillon en interpolant les D.O.

NOTE : Il faut réaliser une courbe standard à chaque séance.

Si la D.O. d'un sérum ou d'un échantillon est supérieure à 2,0, lire la D.O. à 405 nm et multiplier la valeur par 3.

Conversion des D.O. en unité/mL

Les IgG anti-CMV de chaque sérum peuvent être exprimées en unités arbitraires (EU/mL) ou en UI/mL (anti-CMV WHO Standard), en interpolant les valeurs en O.D. des 6 calibrateurs et en comparant la valeur en D.O. de l'échantillon avec la courbe ainsi obtenue.

Table 1 : Valeur des calibrateurs en unités arbitraires et internationales

	EU/mL	EU/mL
Calibrateur 0	0	0
Calibrateur 1	5	0.5
Calibrateur 2	10	1
Calibrateur 3	50	5
Calibrateur 4	100	10
Calibrateur 5	200	20

Le niveau d'immunité peut être interprété comme il est indiqué ci-dessous :

IMMUNE : quand la concentration des IgG anti-CMV dans l'échantillon est > 12 EU/mL ou 1.2 UI/mL

NON IMMUNE : quand la concentration des IgG anti-CMV est < 8 EU/mL ou 0,8 UI/mL

INCERTAIN : quand la valeur est comprise entre les deux valeurs. Dans ce cas il faut répéter la preuve en double.

Résultats qualitatifs

Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Calibreur 2).

L'échantillon est considéré comme étant :

Positif: si le rapport est > 1.2

Incertain: $\geq 0.8 - \leq 1.2$

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

Un sérum obtenu pendant la phase aiguë de l'infection, quand seulement les anticorps IgM sont présents, peut être négatif avec cette méthode.

A la différence du test en IgM, l'inactivation à chaleur du sérum examiné ne donne pas lieu à des résultats erronés.

Le niveau des IgM anti-Cytomégalo virus doit être déterminé en utilisant le kit Enzywell Cytomegalovirus IgM. Autrement, un deuxième échantillon prélevé 8-14 jours plus tard, devrait être contrôlé en parallèle pour déterminer un incrément des anticorps IgG. Les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés avec d'autres observations.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

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

- Facteur rhumatoïde (n=4) < 800 UI/ml
- Anticorps hétérophiles (n=6)
- Bilirubine (n=10) < 11 mg/dl
- Triglycérides (n=10) < 1100 mg/dl
- Hémolyse (n=4) > 10 mg/dl

Aucune interférence n'a été observée.

14. RÉACTIONS CROISÉES

23 échantillons de sérum négatifs à la présence des anticorps anti-CMV, contenant des IgG vers des autres virus, comme la Rubéole, l'Epstein Barr, l'Herpes Simplex et la Parotidite, ont été testés.

Aucune interférence n'a été observée.

15. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

264 échantillons ont été analysés lors d'une expérimentation clinique effectuée dans un laboratoire hospitalier : 47 ont été négatifs et 217 positifs. Une autre méthode immunoenzymatique était utilisée en comparaison. Il y a eu une similitude de 100 % entre les deux méthodes.

Cette méthode présente une sensibilité et une spécificité de 100 %.

16. PRECISION

Table 1 Précision dans la série effectuée avec 3 lots différents

Cut Off n=21	Lot N.104	Lot N. 105	Lot N. 106
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV %	4.62	4.73	4.07

Table 2 Précision inter-séries et inter-lots

Echantillon	EU/mL			
	I run	II run	III run	CV %
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	CAUSES POSSIBLES	ACTION/CONTROLE
Session non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en ordre erroné	Contrôler le processus. 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 le mode d'emploi, section 4).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Session non valable (tous positifs)	Contamination du substrat	Prélever une 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
	Ajout des réactifs trop long	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.
	Parcours optique pas propre	Contrôler la source lumineuse et la présence d'impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec du papier.
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 incorrect du substrat ajouté à la plaque	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

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



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

**ENZYWELL
CITOMEGALOVÍRUS IgG**
REF 91010

(Português)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ANTICORPOS CLASSE IgG PARA CITOMEGALOVÍRUS NO SORO HUMANO COMO UMA AJUDA NO DIAGNÓSTICO DE CITOMEGALOVÍRUS.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O citomegalovírus 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, hepatoesplenomegalia e atraso no desenvolvimento psico-motor. Por esta razão é de grande importância a determinação DO estado imunitária DO paciente e verificar a seroconversão. Um aumento significativa DO grau de anti-citomegalovírus IgG é um indicador de uma infecção recente ou reactivação de uma infecção latente.

3. PRINCÍPIOS DO TESTE

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática) (1-7)

O antígeno, composto de citomegalovirus parcialmente purificados e inativados, liga-se à fase sólida (barras de oito poços). As imunoglobulinas são ligadas ao antígeno por incubação com soro humano diluído.

Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto de anticorpos IgG humanos monoclonais conjugados com peroxidase de rábano.

O conjugado desligado é eliminado, e o substrato de peroxidase é adicionado.

A cor azul que se desenvolve é proporcional à concentração de anti-corpos específicos presentes na amostra de soro. Quando a reacção enzimática é interrompida pela adição de uma solução de ácido sulfúrico, a cor amarela que se desenvolve pode ser facilmente lida usando um leitor de microplacas.

4. CONTEÚDA 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 cytomegalovirus.

Utilização: abra a embalagem no lado oposta DO código (C mais o número DO lote), retire o suporte e as barras da embalagem folheada para serem usadas, e coloque as barras inusadas no saco de polietileno com gel de sílica, retire o ar e vede premindo o fecho.

CAL CALIBRADORES 5 x 1.6 mL

Conteúdo: O soro humano, contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-CMV IgG, 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.

Os valores podem ser exprimidos em UI/ml ou EU/ml (ver secção 11 na tabela de conversão). O Calibrador 2 (1 UI/ml ou 10 EU/ml) corresponde ao valor de corte directo e pode ser usado no teste qualitativo. Os calibradores têm os valores seguintes: 0,5, 1, 5, 10, 20 UI/mL obtidos por titulação segundo **“Proposed International Standard WHO”**.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais marcados com Peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CONTROL IgG - IgG CONTROLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: O soro humano, contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-CMV IgG, 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 (Calibrador 0).

Estabilidade: O produto fica estável até à data de validade quando for armazenado fechado a 2/8°C.

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 37°C 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. Instruções de utilização. **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).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602). 1x16 mL. **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ 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 e 405 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	6 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Calibradores	6 semanas a 37°C
Conjugado	6 semanas a 2/8°C
Substrato	até à data de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C; guardar ao abrigo da luz
Diluyente de amostragem	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.

Este kit contém materiais de origem humana que foram examinados e deram uma resposta negativo 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.

Informação de Saúde e Segurança

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 e 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 atenção apropriada. 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%.
6. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
7. 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.

Precauções analíticas

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 35°C ou acima de 39°C.** 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 CO₂ não devem ser utilizados.
10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhuma bolha está presente na superfície do líquido antes de a ler.
11. A utilização de amostras altamente hemolisadas, 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 batidas cuidadosamente antes de utilização. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.

Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictericas devem ser evitadas.

Plasma humano não pode ser usado no teste.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

Técnica manual

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Preparar o tampão de lavagem diluindo o tampão de lavagem 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

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 substrato 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 (D.O. é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min. Faça novamente a leitura a 405 nm se houver DO maior do que 2,000.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

Técnica manual

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)

PASSO 2 Junte 100 µL de conjugado a cada poço

- Incube durante 45 minutos a 37°C
-

Lave quatro vezes. (300 µl)

PASSO 3 Junte 100 µL de substrato 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. VALIDAÇÃO DO TESTE

1. CONTROLO IgG - (Calibrador 0): a D.O. do controlo negativo deve ser ≤ 0.6 vezes a D.O. do Calibrador 2

2. A D.O. do Calibrador 2 deve ser ≥ 0.2 a 450 nm; ≥ 0.16 a 450/620 nm.

3. A D.O. do Calibrador 5 deverá ser ≥ 1.5 .

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADOS QUANTITATIVOS

Coloque a DO dos calibradores num gráfico depois de subtrair a DA DO nulo (≤ 0.150). O grau correspondente da amostra de teste pode ser obtida por interpolação.

NOTA: Para obter resultados válidos, é necessário executar uma curva standard para cada ensaio.

Se a D.O. de cada amostra ou calibrador estiver acima de 2.0, faça a leitura a 405 nm e multiplique o valor por 3.

Conversão de D.O. em unidades/mL

O anti-citomegalovírus IgG pode ser exprimido em EU/mL (unidades arbitrárias) ou em UI/mL (norma proposta anti-CMV IgG OMS), interpolando os resultados dos seis calibradores e comparando a DO da amostra com a curva obtida.

Tabela 1: valores do calibrador em unidades arbitrárias e internacionais

	EU/mL	UI/ml
Calibrador 0	0	0
Calibrador 1	5	0.5
Calibrador 2	10	1
Calibrador 3	50	5
Calibrador 4	100	10
Calibrador 5	200	20

O grau de imunidade pode ser interpretado como se segue:

IMUNE: quando a concentração de anti-citomegalovírus IgG na amostra for > 12 EU/mL ou 1.2 UI/ml

NÃO IMUNE: quando a concentração de anti-citomegalovírus IgG na amostra for < 8 EU/mL or < 0.8 UI/ml

DUVIDOSO: se o resultado estiver entre os dois valores. Neste caso aconselha-se a repetir o teste em duplicado.

CÁLCULOS QUALITATIVOS

Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor directo (Calibrador 2). A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.2 .

Duvidoso: ≥ 0.8 - ≤ 1.2

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

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda de infecção, quando apenas anticorpos IgM estão presentes, pode revelar-se negativa por este procedimento.

Inactivação por calor do soro de teste não provoca resultados errados na determinação de anti-CMV IgG, como no caso de anti-CMV IgM.

O nível de citomegalovírus IgM deve ser determinado usando o kit Enzywell Cytomegalovirus IgM. Como alternativa, uma segunda amostra de soro obtida 8-14 dias mais tarde, deve ser tratada em paralelo para determinar um aumento de nível de anticorpos IgG.

O resultado de teste deve ser usado em conjunção com a informação disponível na avaliação DO historial do caso ou em procedimentos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 34 amostras de soro contendo substâncias potencialmente interferentes:

- Factor reumatóide (n=4) < 800 UI/ml
- Anticorpos heterófilos (n=6)
- Bilirrubina (n=10) < 11 mg/dl
- Triglicéridos (n=10) < 1100 mg/dl
- Hemolise (n=4) > 10 mg/dl

Nenhuma interferência foi notada em qualquer caso.

14. REACÇÕES CRUZADAS

Foram testadas 23 amostras que estavam negativas para CMV, mas que continham anticorpos IgG para vírus como os da Rubéola, Epstein Barr, Herpes Simplex e Papeira. Em caso algum a presença destes anticorpos influenciou o teste.

15. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Num teste clínico executado num laboratório de hospital, 264 amostras foram analisadas, onde 47 provaram ser negativas e 217 positivas. As amostras foram analisadas por outro método imuno-enzimático comercial: Uma concordância de 100% foi feita entre os dois métodos, tanto nas amostras positivas como nas negativas.

O kit Enzywell tem uma sensibilidade e especificidade de 100%.

16. PRECISÃO

Tabela 1. Precisão intrínseca efectuada em 3 lotes diferentes.

Valor directo n=21.	Lote N°104	Lote N° 105	Lote N° 106
D.O.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Tabela 2. Precisão “Intra-Teste”

Amostra n° 1	EU/mL			CV%
	1 passagem	II passagem	III passagem	
n° 1	12.6	17.5	17.6	18
n° 2	78.5	87.5	96.3	10

17. 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	Verifique o 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). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação DO substrato	Obtenha nova aliquota de substrato.
	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 o fundo 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 inadequada DO substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

18. REFERÊNCIAS

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay.
2. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).

3. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? *Serodiagnosis and Immunotherapy* 1: 91 (1987).
4. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. *J. Clin. Pathol.* 38: 1059 (1985).
5. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked 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. 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 jusqu'e 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



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