



*ENZYWELL*

**CYTOMEGALOVIRUS IgM**

**REF** 91011 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/Fabricado por:  
DIESSE Diagnostica Senese  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



**INDICE / INDEX / INDICE / CONTEÚDO**

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / INDICACIONES DE USO/ UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / PROCEDIMIENTO DEL TEST
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITACIONES DEL TEST /LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRECISIÓN / PRECISÃO
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / REFERÊNCIAS

**RIECCO**  
**WIESS**  
**ISTRUZIONI PER L'USO**

**ENZYWELL**  
**CYTOMEGALOVIRUS IgM**

**REF** 91011

(Italiano)

**1. UTILIZZAZIONE**

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

**2. INTRODUZIONE**

Il cytomegalovirus è un herpes virus che si trasmette in stretto contatto interumano.

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

Il dosaggio delle IgM specifiche è di grande importanza per la diagnosi di infezione primaria.

**3. PRINCIPIO DEL METODO**

Il test per il dosaggio delle IgM anti cytomegalovirus si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline da parte di anticorpi monoclonali anti IgM umane presenti sulla fase solida. Una successiva incubazione con l'antigene del cytomegalovirus complessato con monoclonale coniugato a perossidasi, di rafano selezionerà gli anticorpi IgM specifici per l'antigene e rivelabili per aggiunta del substrato per la perossidasi

Quando la reazione enzimatica è interrotta dall'aggiunta di una soluzione di acido solforico la colorazione diventa gialla. Il colore, proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel siero, può essere letto in un lettore per micropiastre ELISA

**4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

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

**MT PLATE** MICROPIASTRA. 12 x 8 pozzetti sensibilizzate con anticorpi monoclonali anti-IgM umane.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (M seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

**CONTROL +** CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLLO CUT OFF 1x2.5 mL

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

**Ag** ANTIGENE. Liofilo x 6 fiale

Contenuto: Cytomegalovirus, parzialmente purificato e reso non infettivo tramite trattamento con Beta-propiolattone, in tampone fosfato contenente liquido ascitico di topo e lattosio.

Preparazione: Ricostituire con il volume di coniugato indicato in etichetta, agitando per inversione.

**CONJ** CONIUGATO 1 x 18 mL

**Contenuto:** anticorpi monoclonali marcati con perossidasi, in soluzione di tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%.

**Preparazione:** pronto all'uso.

L'immunocomplesso deve essere preparato 45 minuti circa prima dell'uso.

**CONTROL IgM -** IgM CONTROLLO NEGATIVO (PF93900) 1x1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

**Contenuto:** Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

**WASH BUF 10x** TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

**Contenuto:** Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .

**Preparazione:** Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M** SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

## ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

**5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI**

**I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.**

**La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.**

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

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

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

**Attenzione:**

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

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

#### Avvertenze per la sicurezza personale

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

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

#### Avvertenze analitiche

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

13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:

- installazione e requisiti particolari
- principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
- specifiche del produttore e performance dello strumento
- manutenzione e assistenza tecnica.

## **7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE**

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

Campioni fortemente lipemici, iterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati. **Il test non è applicabile al plasma umano.**

## **8. PROCEDIMENTO**

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Preparare l'antigene ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli NON DILUITI (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è 1 negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL di immunocomplesso (antigene/anticorpi monoclonali marcati con Perossidasi) per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (D.O..) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min.

<b>9. Schema del saggio</b>
-----------------------------

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

## **10. VALIDAZIONE DEL TEST**

Togliere il valore del bianco ( $\leq 0.150$ ) a tutte le altre letture. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off quando analizzato in triplicato devono essere entro il 25% del valore medio. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere  $\leq 0.6$ . La D.O. del cut-off deve essere  $\geq 0,2$  a 450 nm e  $\geq 0,16$  a 450/620 nm.

## **11. INTERPRETAZIONE DEL TEST**

### **Risultati qualitativi**

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.

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

Positivo: quando il rapporto è  $> 1.2$ .

Dubbio:  $= \pm 20\%$  del Cut-off.

Negativo: quando il rapporto è  $< 0.8$ .

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

## **12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

Tutti i risultati positivi necessitano di una attenta interpretazione, in quanto si possono avere dei risultati falso-positivi o delle risposte eterotipiche delle IgM nei sieri di pazienti affetti da mononucleosi eterofilo-positiva, o Varicella Zoster.

Una risposta specifica della classe IgM si può avere nella riattivazione e la reinfezione, come pure nelle infezioni primarie da CMV.

Poiché la diagnosi sierologica dell'infezione congenita comporta notevoli difficoltà, l'isolamento virale dalle urine durante la prima settimana di vita rimane la tecnica più sicura per diagnosticare un'infezione intrauterina. L'assenza delle IgM specifiche anti-CMV non esclude la presenza di un'infezione da CMV. E' stato riferito che il 10-30% di neonati non sviluppa una risposta anticorpale anti-CMV di tipo IgM, malgrado la presenza dell'infezione congenita.

I risultati devono essere sempre interpretati insieme ad altri dati provenienti dalla valutazione clinica e da altre indagini diagnostiche. Campioni fortemente positivi per la presenza di IgM anti-Varicella Zoster (VZV) ed Epstein Barr possono dare risultati falsamente positivi.

## **13. SPECIFICITA' ANALITICA**

Sono stati testati 44 campioni di sieri contenuti potenziali interferenti:

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

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

## **14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ' DIAGNOSTICA**

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

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

I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

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

**15. PRECISIONE**

Precisione nella prova (n=6):

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

Precisione tra prove (n=6):

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

**16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO**

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



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

## **17. BIBLIOGRAFIA**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for determination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
5. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme 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. Ziegelmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

**RIEDEL  
PHARMACIA**  
**INSTRUCTIONS FOR USE**

**ENZYWELL  
CYTOMEGALOVIRUS IgM**

REF 91011

(English)

**1. INTENDED USE**

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

**2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST**

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

The assay of specific IgM is of great importance in the diagnosis of primary infection.

**3. PRINCIPLE OF THE TEST**

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

**4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION**

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

**Bring to room temperature before use.**

**MT PLATE** MICROPLATE 12 x 8 wells coated with anti-human IgM monoclonal antibodies.

Use: open the package on the opposite side from the code (M followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

**CONTROL +** POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

**CONTROL CUT-OFF** CUT OFF CONTROL 1 x 2.5 mL

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

**Ag** ANTIGEN Freeze-dried powder x 6 vials

Contents: Partially purified Cytomegalovirus, inactivated by treatment with Beta-propiolactone, in Phosphate buffer containing mouse ascitic fluid and lactose.

Preparation: reconstitute with the conjugate volume shown on the label, mixing by inversion.

**CONJ** CONJUGATE 1 x 18 mL

**Contents:** monoclonal antibodies labelled with peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

**Preparation:** ready for use.

The immunocomplex should be prepared about 45 min. before use.

**CONTROL IgM** – IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

**Contents:** Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

**WASH BUF 10x** WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

**Contents:** Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .

**Preparation:** dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

**SAMP DIL 2** DILUENT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to 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% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.**

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

**5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS**

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

**Reagents have a limited stability after opening and/or preparation**

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

**6. PRECAUTIONS**

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

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

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

#### Health and Safety Information

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

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop 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. Avoid the use of self-defrosting freezers for the storage of samples.
6. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
7. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
8. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
9. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
10. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO<sub>2</sub> incubators must not be used.
11. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
12. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
13. The use of the kit on automatic instruments must be validated by the user.
14. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:

- installation and particular requisites
- operating principles, instructions, precautions and risks
- manufacturer's specifications and instrument performance
- servicing and maintenance.

## **7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE**

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

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

**The test is not applicable to human plasma.**

## **8. TEST PROCEDURE**

### **Manual Technique**

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Prepare the antigen by reconstituting the freeze-dried product with the conjugate (volume reported on the label).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED calibrators (if possible, in duplicate) in a strip (100 µL in each well). Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl ± 75 µl), add 100 µL of immunocomplex (antigen/monoclonal antibodies labelled with peroxidase) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.

After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min.

<b>9. SCHEME OF TEST PROCEDURE</b>
------------------------------------

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

## **10. TEST VALIDATION**

Subtract the value of the blank ( $\leq 0.150$ ) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum when tested in triplicate must be within 25% of the mean value. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-Off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be  $\leq 0.6$ . The O.D. of the cut-off must be  $\geq 0.2$  at 450 nm and  $\geq 0.16$  at 450/620 nm.

## **11. INTERPRETATION OF THE RESULTS**

### **Qualitative results**

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-Off, the sample is positive for the presence of specific IgM.

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX).

The sample is considered:

Positive: if the ratio is  $> 1.2$ .

Doubtful:  $\pm 20\%$  of the Cut-Off.

Negative: if the ratio is  $< 0.8$ .

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

## **12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

All positive test results require careful interpretation since false positive reactions or heterotypic IgM responses may occur with sera from patients with heterophile-positive mononucleosis, or Varicella Zoster.

A specific IgM response may be observed in reactivation and reinfection as well as with primary infections with CMV. Because of all the complications of serologic diagnosis of congenital infection, virus isolation from urine in the first week of life remains the best way to diagnose intrauterine involvement. Absence of CMV specific IgM does not exclude the possibility of CMV infection. It has been reported that 10-30% of infants may fail to develop CMV IgM antibody response despite congenital infection with CMV.

The test results should be used in conjunction with information available from the clinical evaluation and other diagnostic procedures.

Samples which are strongly positive for the presence of anti-Varicella Zoster (VZV) and Epstein Barr IgM antibodies can give false positive results.

## **13. ANALYTICAL SPECIFICITY**

44 serum samples containing potential interfering substances were tested:

- Rheumatoid factor (n=8)
- Heterophile antibodies (n=4)
- Bilirubin (n=8)
- Triglycerides (n=9)
- Varicella Zoster IgM positive (n=2)
- Hypergammaglobulinemia (n=13).

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

## **14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY**

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

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

The results are reported in the following table.

		REFERENCE METHOD	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

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

**15. PRECISION****In-run Precision (n=6):**

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

**Between-run Precision (n=6):**

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

**16. TROUBLE SHOOTING GUIDE**

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

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

## **17. REFERENCES**

- 1.G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- 2.H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
- 3.Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
- 4.Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for determination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
- 5.M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme 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. Ziegelmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).





## INSTRUCCIONES DE USO

### ENZYWELL CYTOMEGALOVIRUS IgM

**REF** 91011

(Español)

#### **1. INDICACIONES**

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

#### **2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST**

El citomegalovirus es un herpes virus que se transmite por estrecho contacto humano.

La mayoría de los sujetos resulta infectada de manera asintomática. El virus, al revés, 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 psico-motor. Por esta razón es importante determinar el título del anticuerpo de la paciente y observar la eventual sueroconversión. El título de las IgM específicas es muy importante para la diagnóstico de infección primaria.

#### **3. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

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

**Uso:** Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (M seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice; con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

**CONTROL +** CONTROL POSITIVO 1x1.6 mL

**Contenido:** Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% % y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**Color:** el color es proporcional al título del anticuerpo.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROL CUT-OFF 1x2.5 mL

**Contenido:** Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% % y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**Color:** el color es proporcional al título del anticuerpo.

**Ag** ANTÍGENO. Polvo liofilizado x 6 frascos.

**Contenido:** Citomegalovirus parcialmente purificado e inactivado por medio del el tratamiento con el Beta-beta-propiolactone, en tampón fosfato conteniendo líquido ascítico de ratón y lactosa

**Preparación:** Reconstituir con el volumen de conjugado indicado en etiqueta, mezclando por inversión.

**CONJ** CONJUGADO 1 x 18 mL

**Contenido:** anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0,05% Y Bronidox 0,02%.

**Preparación:** Listo para su uso

El Inmunocomplejo debe prepararse 45 minutos antes de ser utilizado.

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

**Contenido:** Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

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

**Contenido:** Solución salina tamponada (PBS) concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

**Preparación:** Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

**SAMP DIL 2** DILUYENTE 2 (PF93611). 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Para la dilución de las muestras de suero.

**Contenido:** Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

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

**Contenido:** Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% estabilizados en tampón citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente.

## **5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS**

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

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

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

## **6. PRECAUCIONES DE USO**

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

**Cuidado:**

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

**Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, 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 la 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 hidroclicórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO<sub>2</sub>.
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 microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.

13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:

- instalación y requisitos específicos
- principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
- especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
- mantenimiento y servicio técnico.

## **7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN**

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictericas, hemolizadas o contaminadas. **El test no se puede aplicar a plasma humano.**

## **8 PROCEDIMIENTO**

### **Método Manual**

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Rinsing Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Preparar el antígeno reconstituyendo el líofilo con el conjugado (volumen indicado en etiqueta).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira, preferiblemente por duplicado (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla 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 inmunocomplejo a cada pocillo (antígeno/anticuerpos monoclonales marcados con Peroxidasa) e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora.. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Sustrato, 100 µL/pozo. Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.

Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

<b>9. Esquema del procedimiento del test</b>
--

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

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µl)

-

STEP 2 Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µl)

-

STEP 3 Añadir 100 µL de Sustrato a cada pocillo

-

Incubar 15 min. a T.A.

-

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-

Leer la D.O.a 450 nm dentro de 30 min

## **10. VALIDACIÓN DEL TEST**

Restar el valor del blanco (<= 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media.

El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser  $\leq 0.6$ . La D.O. del cut-off debe ser  $\geq 0,2$  a 450 nm e  $\geq 0,16$  a 450/620 nm.

## **11. INTERPRETACIÓN DEL TEST**

### **Resultados cualitativos**

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgM específicas para el antígeno.

Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off (INDEX).

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es  $> 1.2$ .

Dudoso:  $\pm 20\%$  del cut-off.

No-inmune: si la concentración es  $< 0.8$ .

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

## **12. LIMITACIONES**

Todos los resultados positivos de la prueba necesitan ser cuidadosamente interpretados, en cuanto pueden ocurrir resultados falsos-positivos u respuestas heterotípico de las IgM en los sueros de pacientes afectados por mononucleosis heterófilo-positiva, u Varicela Zoster.

Una respuesta específica de la clase IgM se puede observar en la reactivación y reinfección, así como en las infecciones primarias provocadas por CMV.

La ausencia de IgM específicas anti-CMV no excluye la presencia de una infección provocada por CMV. Se ha reportado que el 10-30% de infantes no desarrolla una respuesta de anticuerpos anticorporal anti-CMV de tipo IgM, a pesar de la presencia de la infección congénita. Los resultados de la prueba se deben utilizar conjuntamente con la información procedente de la evaluación clínica y de otros procedimientos de diagnóstico. Muestras muy positivas por presencia de IgM anti-Varicella Zoster (VZV) y Epstein Barr pueden proporcionar resultados falsos-positivos.

## **13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA**

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

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

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

## **14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO**

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

Los resultados están resumidos en la tabla siguiente:

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

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

**15. PRECISIÓN**

Precisión intra-ensayo (n=6):

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

Precisión en ensayos (n=6):

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

**16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS**

<b>PROBLEMA</b>	<b>POSSIBLES FUENTES DE ERROR</b>	<b>PRUEBA U ACCIONES</b>
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. BIBLIOGRAFIA**

- 1.G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- 2.H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
- 3.Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
- 4.Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for determination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
- 5.M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme 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. Diagnosi 2: 67 (1990).
- 8.R. Ziegelmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### ENZYWELL CITOMEGALOVÍRUS IgM

**REF** 91011

(Português)

#### 1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

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

#### 2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

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

#### 3. PRINCÍPIO DO TESTE

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

#### 4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

**Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

**MT PLATE** MICROPLACA. 12x8 poços cobertos com anticorpos monoclonais IgM anti-humanos.

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

**CONTROL +** CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

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

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLO DIRECTO 1 x 2.5 mL

Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

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

**Ag** ANTIGÉNIO. Pó seco-congelado x 6 frascos.

Conteúdo: Citomegalovirus parcialmente purificados, inactivados por tratamento com Beta-propiolactona, num tampão fosfatado contendo fluido ascítico de rato e lactose.

Preparação: reconstitua com volume conjugado mostrado na etiqueta, misturando por inversão.



**CONJ** CONJUGADO 1 x 18 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0,05% e Bronidox 0.02%.

Preparação: Prontos a usar.

O imunocomplexo deve ser preparado uns 45 min. antes de utilização.

**CONTROL IgM -** CONTROLO NEGATIVO IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

**WASH BUF 10x** TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij 0.5% .

Preparação: diluir o volume requerido 1:10 com água destilada para obtenção do tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, devem ser dissolvidos a 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 Prontos a usar. **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0.26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0.05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

#### **MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS.**

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

#### **5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES**

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.

A data de validade está impressa em cada componente e na etiqueta da embalagem

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

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

## **6. PRECAUÇÕES** **PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO APENAS.**

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

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

### 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 ou irritantes.

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

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

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

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

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

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

### 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 CO<sub>2</sub> 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 hemolizadas, soros incompletamente coagulados, ou amostras com contaminação microbiana pode dar resultados erróneos.

12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.

13. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.

14. Para cada instrumento utilizado, leia o manual de instruções do fabricante cuidadosamente para obter informação adicional sobre os seguintes pontos:

- instalação e requisitos particulares
- princípios de operação, instruções, precauções e riscos
- especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
- manutenção e reparação.

## **7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS**

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

Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictericas devem ser evitadas. **O teste não é aplicável ao plasma humano.**

## **8. PROCEDIMENTO DE TESTE**

### **Técnica manual**

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Prepare o antigénio reconstituindo o produto seco e congelado com o conjugado (volume relatado na etiqueta).

Amostras diluídas 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (testes duplicados são recomendados). Coloque calibradores NÃO DILUÍDOS (se for possível, em duplicado) numa tira (100 µL em cada poço). Deixe um poço para a nula, executando com a utilização de 100 µL de mistura de substrato.

Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes durante 30 segundos (300 µl), junte 100 µL de conjugado a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais quatro vezes, como está descrito acima. Finalmente, o 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 (O.D.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

<b>9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE</b>
--

PASSO 1 Coloque 100 µL de amostra diluída/controlos nos poços das tiras.

-

Incube durante 45 minutos a 37°C

-

Lave quatro vezes. (300 µl ± 75 µl)

-

PASSO 2 Junte 100 µL de imunocomplexo a cada poço

-

Incube durante 45 minutos a 37°C

-

Lave quatro vezes. (300 µl ± 75 µl)

-

PASSO 3 Junte 100 µL de 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. CONTROLO DE QUALIDADE**

Subtraia o valor do nulo ( $\leq 0.150$ ) de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo directo quando forem testados em triplicado devem estar dentro do valor médio de 25%. Ignore qualquer valor anormal e recalcule o médio. O controlo positivo deve ter um D.O. de pelo menos 1.5 vezes a DO soro directo. A relação entre Controlo Negativo e Directo deve ser  $\leq 0.6$ . O valor de D.O. do directo deve ser  $\geq 0.2$  a 450 nm e  $\geq 0.16$  a 450/620 nm.

### **11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

#### **Resultados qualitativos**

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

A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for  $> 1.2$ .

Duvidosa:  $\pm 20\%$  do valor directo.

Negativa: se a relação for  $< 0.8$ .

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

### **12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

Todos os resultados d teste necessitam de uma interpretação cuidadosa, já que reacções de falsos positivos ou respostas heterotípicas IgM podem ocorrer com soros de pacientes com mononucleose heterófila-positiva, ou Varicela Zoster.

Uma reacção específica IgM pode ser observada na reactivação e reinfeccção assim como com infecções a CMV.

Porque todas as complicações do diagnóstico serológico de infecção congénita, o isolamento do vírus da urina na primeira semana de vida continua a ser a melhor maneira de diagnosticar envolvimento intra-uterino. A ausência de IgM específico para CMV não exclui a possibilidade de infecção a CMV. Foi relatado que 10-30% de crianças podem não desenvolver resposta a anticorpos CMV IgM, apesar da infecção congénita a CMV.

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

Amostras fortemente positivas pela presença de IgM anti-Varicela Zoster e Epstein Barr EBV podem dar resultados falsamente positivos.

### **13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA**

Foram ensaiadas 44 amostras de soros com potenciais interferentes:

- Factor reumatóide (n=8)
- Anticorpos heterófilos (n=4)
- Bilirrubina (n=8)
- Triglicéridos (n=7).
- Varicela Zoster IgM positivos (n=2)
- Hipergamaglobulinemia (n=13)

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

### **14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO**

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

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

Os resultados estão resumidos na seguinte tabela:

		REFERÊNCIA	
		+	-
DIESSE	+	61	5
	-	1	217

O kit Enzywell tem uma sensibilidade de 98,4% e uma especificidade de 97,8%.

**15. PRECISÃO**

Precisão intrínseca (n=6):

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

Precisão entre passagens (n=6):

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












**16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS**

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

		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dissecante de gel de sílica deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de 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 a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções recomendadas de utilização.
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

## **17. REFERÊNCIAS**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. Van Loon A.M. et al.: Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labelled antigen for determination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 13: 416
5. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme 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 jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbricante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote

**CE**  
**0123**

**DIESSE Diagnostica Senese**  
**Via delle Rose 10**  
**53035 Monteriggioni (Siena) Italy**  
**Tel. 0577-587111**