



ENZYWELL

CYTOMEGALOVIRUS IgG

REF 91010 (96 tests)

Manufactured by: DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) – Italy



INDICE / INDEX*Section*

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

RIECCO
WIESS
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.

CALIBRATORS 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 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 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). 12 mL. Pronto all'uso. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

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

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

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

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

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 UL 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
WASH BUFFER	p. uso 2 settimane 2/8°C 5 giorni 15/30 °C
STOP SOLUTION	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.

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: diluire con molta acqua per la sua eliminazione

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.

3. Le apparecchiature non dispositive 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 seccino 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. 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. I campioni possono essere chiarificati mediante filtrazione (0,45 µm) o centrifugazione.

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 protocollo di prova per CYTOMEGALOVIRUS IgG

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

- CONTROL -** (Calibratore 0): la densità ottica (D.O.) del controllo negativo deve essere $\leq 0,6$ volte la D.O. del Calibratore 2.
- La D.O. del Calibratore 2 deve essere $\geq 0,2$ a 450 nm; $\geq 0,16$ a 450/620 nm
- 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 UI/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 23 campioni negativi al Cytomegalovirus, contenenti anticorpi IgG contro virus quali quello della Rubella, Epstein Barr., Herpes Simplex, Morbillo Parotite. In nessun caso la presenza di tali anticorpi influenzava il test.

14. 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%.

15. PRECISIONE

Tab.2 Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

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

Tab.3 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

16. **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	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. **BIBLIOGRAFIA**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. 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).



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



**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.

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 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 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 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). 12 mL. Ready for use. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

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

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

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

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

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.

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; dilute with large amounts of water to eliminate.

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. 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. If a new sample cannot be obtained, such samples should be clarified by filtration (0.45 µm) or centrifugation.

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 For CYTOMEGALOVIRUS IgG*

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-** (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

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

14. 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.

15. PRECISION

Table 2. Within-run Precision performed on 3 different lots

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

Table 3 “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

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. 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).

