

CMV IgM

"Capture" ELISA test pro stanovení protilátek IgM
proti Cytomegaloviru nebo-li CMV IgM

- Pouze k diagnostickému použití *in vitro* -

96 testů

Cod. CMVM.CE

A. ÚVOD

Cytomegalovirus neboli CMV je všudypřítomný lidský patogen, jehož infekce je převládá mezi dětmi a mladými dospělými jedinci. Infekce CMV je závažným zdravotním problémem v určitých skupinách pacientů, jako jsou novorozenci, pacienti po transplantaci orgánů či kostní dřeně a pacienti s AIDS. V těchto skupinách je CMV hlavní příčinou chorobnosti a úmrtnosti.

Detekce virově specifických IgG a IgM protilátek má velký význam při diagnostice akutních/primárních virových infekcí nebo reaktivaci dřívější infekce, při absenci typických klinických příznaků. Asymptomatické infekce CMV zpravidla probíhají u zdánlivě zdravých jedinců, v průběhu těhotenství a u mnoha chorob jako koinfekční agens.

V současnosti vyvinutá IgM capture ELISA pro CMV poskytuje klinikům spolehlivý diagnostický test, neovlivněný revmatoidním faktorem, pro monitorování rizikové populace.

B. PRINCIP TESTU

Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy monoklonální protilátkou proti IgM, která při první inkubaci naváže specificky tuto skupinu protilátek.

Po promytí ostatních složek vzorku se během druhé inkubace, přidáním komplexu z purifikovaných biotinylovaných syntetických CMV antigenů a Streptavidinu značeného křenuvou peroxidázou (HRP), detekují navázané protilátky anti-CMV IgM.

Enzym zachycený na pevné fázi, působící na směs substrát/chromogen, vytváří optický signál, který je úměrný množství protilátek anti-CMV IgM přítomných ve vzorku a může být detekován ELSIA readerem.

C. PODMÍNKY TESTU A UPOZORNĚNÍ

1. Všechna činidla obsažená v soupravě jsou určena pouze pro "in vitro" diagnostiku.
2. Nepoužívejte soupravu ani činidla po datu expirace uvedeném na nálepkách. Nemíchejte komponenty různých souprav mezi sebou.
3. Máte-li dosáhnout spolehlivé výsledky pro klinické interpretace, je nutné provádět procesy pečlivě.
4. Před začátkem testů ponechte všechny reagentie stát alespoň 60 minut při pokojové teplotě.
5. Zabraňte vzájemné kontaminaci reagentií. Doporučujeme používat automatické pipety s jednorázovými špičkami. Při pipetování se nedotýkejte hroty špiček stěn jamek na mikrotitrační destičce.
6. K promývání používejte pouze promývací roztok, který je součástí soupravy, a pečlivě dodržujte pokyny uvedené

v kapitole „POKYNY K PROMÝVÁNÍ“ tohoto příbalového letáku.

7. Dbejte na to, aby směs substrát/chromogen nepřišla do styku s oxidačními činidly nebo kovovými povrchy; při inkubaci a přípravě činidel se vyvarujte vystavení prudkému světlu.

Při přípravě směsi substrát/chromogen pro analýzu používejte pouze sterilní nebo čisté plastové nádoby na jedno použití.

8. Se vzorky a materiály zacházejte jako s infekčními, mohou přenášet infekci.

Se všemi předměty, které přijdou do přímého styku se vzorky a se zbytky po rozboru, je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními a jako takové je tyto předměty potřeba i likvidovat. Nejlepším způsobem deaktivace infekce je sterilizace v autoklávu při 121°C po dobu 30 minut nebo sterilizace chlornanem sodným při konečné koncentraci 2,5 % po dobu 24 hodin. Tuto druhou metodu lze použít k likvidaci tekutého odpadu poté, co byl zneutralizován hydroxidem sodným (NaOH).

9. Vyhněte se kontaktu reagentií s pokožkou a sliznicemi. Vždy používejte bezpudrové rukavice, ochranné brýle a laboratorní plášť, dle bezpečnostních předpisů.

D. OBSAH SOUPRAVY

a – Stripová mikrotitrační destička 1 ks

Dvanáct 8-jamkových stripů potažených monoklonální protilátkou proti IgM CMV. Destička je zatavena v sáčku s vysoušedlem. Před použitím destičku ponechte při pokojové teplotě, abyste zabránili kondenzaci vlhkosti v sáčku.

b – Enzymatický konjugát 1 lahvička o objemu 0,8 ml

Streptavidinový roztok, značený HRP, 20x koncentrovaný. Obsahuje proteinový pufr, 0,2 mg/ml gentamycin sulfátu a 0,1% Kathon GC jako konzervační látky.

c – Ředící roztok pro konjugát /antigen 1 lahvička o 16 ml

Proteinový pufr pro přípravu komplexu antigen/konjugát. Obsahuje 0,2 mg/ml gentamycin sulfátu a 0,1% Kathon GC jako konzervační látky.

d – Lyofilizovaný CMV antigen 6 zatavených ampulek

Ampulky obsahují lyofilizovaný biotinylovaný syntetický CMV antigen v proteinovém pufru. Ředí se 1,9 ml ředícím roztokem pro konjugát/antigen.

e – Promývací roztok 1 lahvička o objemu 60 ml

20x koncentrovaný roztok fosfátového pufru. Ředí se na objem 1200 ml deionizovanou vodou. Obsahuje konzervační přísady Tween 20 a Kathon GC.

Naředěný roztok je při pokojové teplotě stabilní po dobu 1 týdne.

f – Chromogen (SOLN TMB) 1 lahvička o objemu 8 ml

Roztok obsahuje tetramethylbenzidin (TMB) s aktivátory a stabilizátory, rozpuštěné ve fosfát/citrátovém pufru.

Upozornění: Chraňte před světlem.

g – Substrát (SOLN H₂O₂) 1 lahvička o objemu 8 ml

Roztok obsahuje stabilizovaný peroxid vodíku rozpuštěný ve fosfát/citrátovém pufru.

h – Roztok na zastavení reakce 1 lahvička o objemu 15 ml
Obsahuje 0,3M roztok kyseliny sírové.

Upozornění: Dráždivo! (Xi. R36/38 S2,26,30)

i – Negativní kontrola 1 lahvička o objemu 2ml

Lidské sérum nereaktivní na IgM CMV, k přímému užití. Obsahuje 0,2 mg/ml gentamycin sulfátu a 0,1% Kahtonu

GC jako konzervační přísady. Negativní kontrola je označena světle žlutou barvou.

I - Pozitivní kontrola

1 lahvička o objemu 2ml

Lidské sérum reaktivní na CMV IgM, k přímému užití. Obsahuje 0,2 mg/ml gentamycin sulfátu a 0,1% Kathon GC jako konzervační přísady. Pozitivní kontrola je označena zeleno modrou barvou.

m – Ředící roztok na vzorky (DILSPE) 2 lahv. o objemu 60ml
Proteinový roztok k ředění vzorků. Obsahuje detergent, proteinové stabilizátory, 0,1% azid sodný a 0,1% Kathon GC jako konzervační látky.

I – Plastová fólie

2 ks

Průhledné plastové fólie určené pro zakrytí mikrotitračních destiček při inkubaci při +37°C.

Poznámka: Všechny materiály získané z lidského séra byly otestovány jako negativní na přítomnost protilátek proti HBsAg, HCV Ab a HIV Ab testovacími sadami schválenými institutem FDA.

E. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

1. Soupravu je třeba skladovat při 2-8°C a použít před datem expirace uvedeným na obalu soupravy.
2. Nepoužité stripy je potřeba vrátit do sáčku s vysoušedlem, pevně zalepit lepicí páskou a znovu uložit při teplotě 2-8°C. Po otevření sáčku jsou zbylé stripy použitelné, dokud se vysoušedlo nezbarví růžově.
3. Naředěný promývací roztok je stabilní 1 týden při 2-8°C.
4. Směs chromogen/substrát je stabilní 4 hodiny při pokojové teplotě. Nevystavujte ji světlu.
5. Naředěný konjugát je stabilní 1 týden při 2-8°C pokud je skladován ve sterilní nádobě na jedno použití.
6. Všechny ostatní kapalné reagenty jsou stabilní při 2-8°C do expirace, pokud se s nimi zachází tak, aby nedošlo k jejich kontaminaci.

F. NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

1. Mikropipety po 10, 100 a 1000 µl.
2. Vortex a savé papíry.
3. Deionizovaná voda.
4. Stopky.
5. ELISA reader s alespoň 2OD s filtry o optické hustotě 450nm a 620-630 nm.
6. Inkubátor nastavený na +37°C.
7. Automatická promývačka mikrodestiček nebo manuální zařízení schopné dávkovat 300 µl a odsávat.

G. VZORKY

K testu lze použít čerstvé sérum, nebo plazmu.

Pokud se vzorky nepoužijí okamžitě, lze je skladovat při teplotě 2-8°C po dobu 1 týdne.

V případě delšího skladování vzorky zmrazte na -30°C.

Vzorky séra nebo plazmy by měly být čiré a nesmí být kontaminované žádnými mikroorganismy.

Vzorky nezmrazujte a nerozmrazujte více než jednou, mohlo by dojít ke zničení IgM.

V případě potřeby odstraňte znečišťující částice odstředěním při 2000 g × 20 min při pokojové teplotě nebo filtrací přes filtr 0,22µm.

Vysoce lipemické, ikterické nebo hemolyzované vzorky by se neměly používat, neboť mohou vést k falešným výsledkům.

H. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

a – Promývací roztok: Koncentrovaný roztok je zapotřebí před použitím 20× zředit deionizovanou vodou.

b - Antigen/Konjugát komplex: Těsně před pipetováním vzorků, rozřeďte obsah zatavené ampulky 1,9 ml roztoku pro ředění konjugát/antigenu. Přidejte 0,1 ml koncentrovaného konjugátu a promíchejte jemně na vortexu. Připravte pouze množství nutné k testu.

c - Chromogen/Substrát: Asi 5 minut před použitím připravte tuto reagentii v plastové nádobě na jedno použití. Podle potřeby smíchejte 1 díl objemu Chromogenu s jedním dílem objemu Substrátu. Připravte pouze množství nutné k testu.

I. POKYNY K PROMÝVÁNÍ

Správný postup promývání je nezbytným předpokladem správnosti a přesnosti získaných analytických údajů. Proto doporučujeme používat kvalitní promývačku mikrotitračních destiček ELISA udržovanou v perfektním provozním stavu.

Obecně k tomu, aby se zabránilo falešně pozitivním reakcím, stačí 4-5 automatických promývacích cyklů po 300 µl/jamku.

V každém případě doporučujeme kalibrovat promývací systém přímo na soupravě, aby se dosáhlo žádoucího analytického výsledku.

V případě ručního promývání doporučujeme provést 5 cyklů, během kterých bude do každé jamky 5krát vstříknuto a následně odsáto vždy po 300 µl tekutiny.

V každém případě musí být tekutina odsátá ze stripů zlikvidována jako odpad teprve poté, co byla ošetřena roztokem chlomanu o konečné koncentraci 2,5% po dobu 24 hodin.

L. PRACOVNÍ POSTUP

Důležité poznámky:

Nejméně 1 hodinu před použitím nechte vytemperovat všechny součásti soupravy na pokojovou teplotu a pečlivě promíchejte tekuté reagentie na vortexu. Nemíchejte reagentie z různých výrobních šarží.

Kalibrační roztoky doporučujeme dávkovat v duplikátu. Doby aplikace a inkubace by měly být pro všechny jamky stejné. Vyhněte se delším přestávkám mezi jednotlivými kroky testu.

Předcházejte kontaminaci promývacím roztokem tím, že stripy při ručním promývání opatrně oklepnete na podložku ze savého papíru.

Barva vyvolaná při poslední inkubaci je stabilní maximálně 1 hodinu ve tmě. Odečet mikrodestiček doporučujeme provést při vlnové délce 450 nm (čtecí filtr); a blankovat při vlnové délce 620-630 nm. Jamku A1 ponechte prázdnou jako BLANK.

1 - Předřed'te vzorky ředícím roztokem na vzorky v poměru 1:101 (10 µl vzorku + 1000 µl ředidla).
Kontroly neřed'te, ty jsou naředené předem a připravené k přímému použití.
Kontroly a vzorky doporučujeme aplikovat do jamek podle následující tabulky:

A1	Prázdné jamky ke srovnávání
B1+ C1	100 µl Negativní kontroly
D1+E1	100 µl Pozitivní kontroly
F1 ...H12	100 µl vzorků

Zakryjte mikrodestičku fólií a inkubujte po dobu **60 minut při teplotě +37°C**.

2 – Sejměte fólii a promyjte mikrodestičku podle pokynů k promývání (kap.I).

3 – Přidejte do všech jamek kromě A1 po 100 µl komplexu Antigen/konjugát, připraveného podle postupu, viz výše. Inkubujte destičku zakrytou fólií po dobu **60 minut při teplotě +37°C**.

4 – Sejměte fólii a promyjte mikrodestičku podle pokynů k promývání (kap. I).

5 – Přidejte do všech jamek včetně A1 po 100 µl směsi chromogen/substrát. Inkubujte mikrodestičku po dobu **20 minut při pokojové teplotě**, chráněnou před světlem.

6 – Zastavte enzymatickou reakci přidáním 100 µl roztoku na zastavení reakce do všech jamek včetně A1. Změřte destičku ELISA readem při 450 nm a 620-630 nm, jamku A1 použijte jako BLANK.

M. PLATNOST TESTU

Test je považován za platný, pokud:

- Hodnota OD450nm jamky A1 (BLANKU) je $< 0,100$.
- Po odečtení blanku je průměrná hodnota OD450nm negativní kontroly (NC) $< 0,200$.
- Průměrná hodnota OD450nm pozitivní kontroly (PC) je $> 0,800$.

Důležitá poznámka: Nebudou-li zjištěné hodnoty odpovídat těmto kritériím, před opakováním testu pečlivě zkontrolujte dobu expirace na soupravě, funkčnost nástrojů používaných při testu a postup pipetování reagentů a vzorků do jamek.

N. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Kvalitativní stanovení

Pokud je test platný, vypočítejte hodnotu cut-off podle následujícího vzorce:

$$NC + 0,250 = \text{cut-off}$$

Vzorky s hodnotou OD450nm nižší než cut-off jsou považovány za negativní na CMV IgM.
Vzorky s hodnotou OD450nm mezi cut-off + 20% jsou považovány za šedou zónu.

Vzorky s hodnotou OD450nm vyšší než horní hranice šedé zóny jsou považovány za pozitivní na CMV IgM.

Důležité poznámky:

- Při monitorování těhotenství na CMV - primární infekci, by měl být každý pozitivní IgM výsledek potvrzován testováním pacienta na další vzrůst IgM, absenci IgG, testováním vzorku konfirmačním testem doporučeným v bodě P. a provedením konfirmačního testu IgM (souprava k dispozici na vyžádání).
- V případě, že má pacient přítomny IgG i igM protilátky, doporučuje se provést test avidity IgG protilátek (souprava k dispozici na vyžádání). Samostatná přítomnost IgM protilátek není markrem probíhající infekce.
- I když je "capture" metoda specifitější než sednvičová, mohou se v 1-2% případů vyskytnout falešně pozitivní výsledky.

Příklad výpočtu

Průměrná hodnota OD450 negativní kontroly	0,050
Průměrná hodnota OD450 pozitivní kontroly	1,200
Cut-off = NC + 0,250 =	0,300
šedá zóna = 0,300 + 20% = 0,360	
Vzorek č. 1 OD450nm = 0,080	negativní
Vzorek č.2 OD450nm = 1,200	pozitivní

O. PARAMETRY TESTU

SENZITIVITA: Senzitivita testu byla stanovena na panelu serokonverzních a pozitivních vzorků porovnáním se soupravou schválenou FDA. Test vykazuje senzitivitu $> 98\%$.

SPECIFITA: Specifita testu byla stanovena na panelu negativních vzorků, vyšetřených soupravou schválenou FDA. Test vykazuje specifitu $> 98\%$ pro plazmu i sérum.

REPRODUKOVATELNOST: Reprodukovatelnost byla stanovena na základě negativních a pozitivních kontrol testovaných opakovaně v různé dny. Byly obdrženy kontrolní hodnoty mezi 4-12%.

P. KONFIRMAČNÍ TEST

Všechny IgM pozitivní vzorky by měly být potvrzovány dříve než je diagnóza sdělena pacientovi či jsou provedeny další testy. Pro konfirmaci postupujte následovně:

- Pozitivní vzorek je naředen v poměru 1:101 a napipetován podruhé, jak je výše popsáno, spolu s negativní kontrolou v duplikátu.
- Koncentrovaný enzymatický konjugát je naředen v poměru 1:20 ředícím roztokem na komplex Antigen/konjugát. Pro tuto proceduru nepoužívejte žádnou zatavenou ampulku!
- Naředený konjugát je poté dávkován na destičku jak je popsáno výše. Pak postupujte nadále jak je výše popsáno.
- Pokud vyjde hodnota OD450 pozitivního vzorku nižší než cut-off, pozitivita vzorku je virově specifická a proto je pozitivita na IgM CMV potvrzena.

5. Pokud vyjde hodnota OD450 pozitivního vzorku vyšší než cut-off i při absenci lyofilyzovaného CMV, reaktivita vzorku je virově nespecifická a proto není pozitivita vzorku na IgM CMV potvrzena.

P. LITERATURA

1. Engvall E. a Perlmann P. J.: Immunochemistry (Imunochemie) 1971: 8, 871-874.
2. Engvall E. a Perlmann P. J. Immunol. 1971: 109, 129-135.
3. Remington J.S. a Klein J.O. v publikaci „Infectious diseases of the fetus and newborn infant“ (Infekční choroby plodu a novorozence). (1996) Sanders, Filadelfie, Londýn, Toronto.
4. Volk W.A. v publikaci „Essential of Medical Microbiology“ (Základy lékařské mikrobiologie). (1982) Druhé vydání s. 729. G.B.Lippincott Co., Filadelfie, New York, S.Josè, Toronto.
5. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Disease, 143:821-826, 1981.
6. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163.628-630, 1991.
7. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145.647-653, 1982
8. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin. Microbiol.. 30:522-524, 1992.
9. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin. Microbiol.. 8: 159-163, 1989.

Tento výrobek byl vyroben firmou Dia. Pro s.r.l. pod dohledem zřízeným systémem řízení jakosti a prostředí, který splňuje požadavky norem UNI EN ISO 9001:1994-UNI CEI EN 46001:1996, a který byl certifikován TUV pod registračním číslem 501002033/A a 501002033/B

Výrobce			
Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl. via Columella n° 31 – Milano – Itálie			
Dok.:	INS CMVM.CE	Rev.:	03/03
Za kontrolu jakosti:		M. Marchisio	

Distributor:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 78b, 612 00 Brno

Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114

e-mail: laboserv@laboserv.cz