

Kit ELISA per IgG / IgM anti-CMV

N° articolo: EC113.00

N° articolo: EC113L60 (standard IgG per liquor)

Codice colore: giallo / trasparente

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

**Sekisui Virotech GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.sekisuivirotech.com>**



mdc – Ente notificato **0483**

Druckdatum 13.11.2014

REV 3 / CMV ELISA IgG/IgM IT

Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Kit test per IgG/IgM	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso.....	3
5. Precauzioni e avvertenze	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito).....	4
7. Esecuzione del test DIAGNOSTICA SIEROLOGICA	4
7.1 Materiale di analisi	4
7.2 Preparazione dei reattivi	4
7.3 Esecuzione del test Virotech ELISA	5
7.4 Impiego di strumenti ELISA.....	5
8. Valutazione del test DIAGNOSTICA SIEROLOGICA.....	5
8.1 Controlli funzionali del test:	5
8.2 Calcolo delle unità Virotech (VE).....	6
8.3 Schema di valutazione degli anticorpi IgG e IgM.....	6
8.4 Limiti del test.....	6
9. Bibliografia	6
10. Schema di svolgimento del test	7

1. Finalità d'uso

Il kit ELISA per CMV è studiato per l'individuazione semiquantitativa e qualitativa degli anticorpi IgG e IgM contro il citomegalovirus (CMV) nel siero umano ed è idoneo per eseguire contemporaneamente l'individuazione quantitativa di sintesi di anticorpi IgG proprie del sistema nervoso centrale mediante un'analisi in parallelo di valori siero-liquor.

2. Principio del test

L'anticorpo ricercato nel siero umano forma un complesso immunitario con l'antigene fissato sulla micropiastra. Le immunoglobuline non legate sono rimosse mediante processi di lavaggio. Il coniugato enzimatico si lega a questo complesso. Il coniugato non legato è rimosso anch'esso a sua volta mediante processi di lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione di substrato (TMB), l'attività enzimatica (perossidasi) causa la comparsa di una colorazione blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit test per IgG/IgM

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti singoli in strip frazionabili, rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **soluzione PBS per lavaggio** (concentrata 20 volte), 50ml, pH 7,2, con conservante e Tween 20
4. **controllo IgG negativo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
5. **controllo IgG cut-off, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
6. **controllo IgG positivo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
7. **controllo IgM negativo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
8. **controllo IgM cut-off, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
9. **controllo IgM positivo, 1300µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
10. **coniugato IgG (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con stabilizzante proteico e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
11. **coniugato IgM (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con FCS e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
12. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 11ml**, pronta per l'uso
13. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Dopo aver staccato i pozzetti individuali occorrenti, conservare le rimanenti strisce di pozzetti in sacchetto chiuso con essiccante a 2-8°C. Subito dopo l'uso, riporre i reattivi in ambiente a 2-8°C.
2. Il coniugato pronto per l'uso e la soluzione per substrato TMB sono sensibili alla luce e devono essere conservati al riparo dalla luce. Se per l'azione della luce si sviluppa nella soluzione per substrato un'alterazione del colore, la soluzione deve essere eliminata.
3. Prelevare soltanto la quantità di coniugato o di TMB necessaria per il test da eseguire. L'eventuale quantità di coniugato o TMB in eccesso non può essere rimessa nel recipiente originale, ma deve essere eliminata.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	diluiti	da +2 a +8°C	max. 6 ore
	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Micropiastra	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (conservazione nella busta in dotazione con sacchetto di essiccante)	3 mesi
Assorbente di fattore reumatoide	non diluiti, dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	1 settimana
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi

Tetrametilbenzidina	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione bloccante	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +25°C	4 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

1. Come sieri di controllo si impiegano esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per gli anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV e l'antigene di superficie dell'epatite B. Tutti i campioni, i campioni diluiti, i controlli, i coniugati e gli strip della micropiastre devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e, quindi, manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. I componenti contenenti conservanti, come pure la soluzione bloccante di citrato e il TMB, sono irritanti per la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questi materiali, lavare immediatamente la parte interessata sotto acqua corrente e consultare eventualmente un medico.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Acqua distillata/demineralizzata
2. Pipetta a 8 canali 50µl, 100µl
3. Micropipette: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Provette per i campioni
5. Salviette di carta o carta assorbente
6. Pellicola protettiva per piastre ELISA
7. Contenitore per rifiuti infetti
8. Lavatore a mano ELISA o lavatore automatico per micropiastre
9. Spettrofotometro per micropiastre con filtro 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)
10. Incubatore

7. Esecuzione del test DIAGNOSTICA SIEROLOGICA

Seguire scrupolosamente il metodo prescritto da Sekisui Virotech è il requisito indispensabile per ottenere i risultati corretti.

7.1 Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

Preparare le diluizioni per i pazienti sempre fresche.

Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente il siero.

1. Utilizzare solo siero fresco e non inattivato.
2. Non impiegare campioni iperlipemici, emolitici e contaminati da batteri, né sieri torbidi (falsi positivi/negativi).

7.2 Preparazione dei reattivi

La Sekisui Virotech System Diagnostica consente una grande flessibilità grazie alla possibilità offerta di impiegare tamponi di diluizione e lavaggio, TMB, soluzione bloccante di citrato e coniugato che soddisfano una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli pronti per l'uso (controlli positivi, controlli cut-off, controlli negativi) sono specifici dei parametri e da impiegare esclusivamente con le piastre indicate dal certificato del controllo qualità.

1. Regolare l'incubatore su 37°C e verificare che questa temperatura sia stata raggiunta prima dell'inizio dell'incubazione.
2. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente; aprire la confezione delle strisce di reazione solo una volta raggiunta questa temperatura.
3. Agitare bene tutti i componenti liquidi prima dell'uso.
4. Diluire la soluzione concentrata per lavaggio con acqua distillata/demineralizzata fino a ottenere 1 litro (in caso di formazione di cristalli del concentrato, portarlo a temperatura ambiente prima della diluizione e agitare bene prima dell'uso).

5. Un titolo elevato di IgG o fattori reumatici possono interferire con l'individuazione specifica di anticorpi IgM e dare origine a risultati falsamente positivi o falsamente negativi. **Trattare preventivamente i sieri con RF-SorboTech** (materiale adsorbente VIROTECH). Per i controlli IgM si può omettere l'assorbimento preventivo.

7.3 Esecuzione del test Virotech ELISA

1. Per ogni serie di test dispensare 100µl del tampone di diluizione pronto per l'uso (valore bianco), del controllo IgG e IgM negativo, cutoff e positivo, nonché dei sieri diluiti dei pazienti. Raccomandiamo sempre una doppia serie (bianco, controlli e sieri pazienti); per i controlli cut-off la doppia serie è obbligatoria. Diluizione operativa dei sieri dei pazienti: 1+100; per es. 10µl di siero + 1ml di tampone di diluizione.
2. La dispensazione è seguita da un'incubazione per 30 min a 37 °C (con pellicola protettiva).
3. Il periodo d'incubazione viene concluso da 4 lavaggi, ciascuno eseguito con 350-400µl di soluzione di lavaggio per ogni pozzetto. Non lasciare la soluzione di lavaggio nei pozzetti. Gli ultimi residui di liquido devono essere eliminati rovesciando e battendo la piastra su un foglio di carta assorbente.
4. Dispensare 100µl del coniugato pronto per l'uso in tutti i pozzetti.
5. Incubazione del coniugato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva).
6. Terminare l'incubazione del coniugato mediante 4 lavaggi (vedere punto 3).
7. Dispensare in ogni pozzetto 100µl della soluzione per substrato TMB pronta per l'uso.
8. Incubazione della soluzione per substrato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva, tenere al buio).
9. Bloccaggio della reazione del substrato: dispensare 50µl della soluzione bloccante di citrato in ciascun pozzetto. Agitare con cautela e accuratamente la piastra fino alla completa miscelazione dei liquidi e alla comparsa di una colorazione gialla uniforme.
10. Misurare le estinzioni (DO) a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm). Regolare il fotometro in modo da poter sottrarre da tutte le altre estinzioni il valore del bianco misurato. La misurazione fotometrica dovrebbe essere effettuata entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

7.4 Impiego di strumenti ELISA

Tutti i test ELISA Sekisui Virotech possono essere elaborati con strumenti ELISA. L'utilizzatore è tenuto ad eseguire regolari convalide dell'apparecchiatura.

I prodotti ELISA della G.V. sono stati validati sui seguenti analizzatori ELISA (quali Immunozone, Plato 1300GSG, Plato 3300 GSG, e Monet TKA). L'utilizzatore dovrà regolarmente verificare la costante affidabilità del sistema con la seguente procedura:

1. In caso di installazione o di importanti riparazioni del processore ELISA, Sekisui Virotech raccomanda di eseguire la convalida dell'apparecchio secondo le indicazioni del costruttore.
2. Si raccomanda di controllare poi il processore ELISA con il kit di convalida (EC250.00). Questo regolare controllo con il kit di convalida dovrebbe essere eseguito almeno una volta ogni tre mesi.
3. Ogni ciclo di test eseguito deve rispondere ai criteri di idoneità del certificato di controllo qualità allegato al prodotto.

Questa procedura garantisce il perfetto funzionamento del processore ELISA e serve inoltre anche alla garanzia di qualità del laboratorio.

8. Valutazione del test DIAGNOSTICA SIEROLOGICA

I controlli pronti per l'uso servono ad una determinazione semiquantitativa di specifici anticorpi IgG, IgM ed IgA la cui concentrazione è indicata in unità Virotech (= VE). Le variazioni causate dall'esecuzione del test sono compensate dal metodo di calcolo, ottenendo quindi un'elevata riproducibilità. Per il calcolo delle VE si utilizzano i valori DO medi.

8.1 Controlli funzionali del test:

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15.

I valori DO dei controlli negativi dovrebbero essere inferiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità, i valori DO dei controlli positivi e dei controlli cut-off dovrebbero essere superiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità.

b) Unità Virotech (VE)

Le unità Virotech (VE) dei controlli cut-off sono definite pari a 10 VE. Le unità VE calcolate dei controlli positivi devono rientrare nei range indicati dal certificato di controllo qualità.

Se tali requisiti (valori DO, VE) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

8.2 Calcolo delle unità Virotech (VE)

L'estinzione del valore bianco (450/620nm) deve essere sottratta da tutte le estinzioni.

$$VE_{\text{(controlli positivi)}} = \frac{DO_{\text{(controlli positivi)}}}{DO_{\text{(controlli cut - off)}}} \times 10$$
$$VE_{\text{(siero paziente)}} = \frac{DO_{\text{(siero paziente)}}}{DO_{\text{(controlli cut - off)}}} \times 10$$

8.3 Schema di valutazione degli anticorpi IgG e IgM

Risultato (VE)	Valutazione
< 9,0	negativo
9,0 - 11,0	zona grigia
> 11,0	positivo

1. Se le VE misurate del campione sono superiori alla zona limite, i campioni sono considerati positivi.
2. Se le VE misurate si trovano nella zona limite, ma in assenza di concentrazioni significative di anticorpi, i campioni sono considerati al limite. Per accertare con sicurezza la presenza di un'infezione, è necessario determinare il livello di anticorpi di due campioni di siero. Uno dei campioni deve essere testato subito dopo l'inizio dell'infezione, un secondo campione dopo 5-10 giorni (siero convalescente). La concentrazione di anticorpi dei due campioni deve essere determinata in parallelo, cioè nella stessa serie di test. Non è possibile ottenere una diagnosi corretta sulla base della valutazione di un singolo campione.
3. Se i valori misurati sono al di sotto della zona limite definita, il campione non contiene anticorpi specifici dell'antigene in misura rilevabile. I campioni sono quindi considerati negativi.

8.4 Limiti del test

1. L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio eventualmente disponibili.
2. Il kit ELISA non è studiato per diagnosticare un'infezione da CMV in pazienti compromessi nei quali si sospetta un'infezione acuta. Nei pazienti immunocompromessi e nelle donne in gravidanza in cui si sospetta un'infezione acuta occorre dare priorità a procedimenti di determinazione diretta. I neonati con infezione da CMV congenita possono dare risultati incerti, pertanto se si sospetta un'infezione occorre procedere all'isolamento del virus entro le prime settimane di vita.
3. La reazione crociata tra il CMV e altri virus erpetici può avere come conseguenza un falso risultato positivo. Ciò è dovuto ad una stimolazione policlonale dei linfociti B sempre con reattività crociata fra il CMV e altri virus erpetici, come l'EBV o l'HHV 6. Inoltre, non sono da escludersi reazioni crociate fra il CMV e il Parvovirus.
4. Per ridurre il rischio si consigliano diagnosi differenziali molto diversificate in funzione delle situazioni cliniche e dei sintomi presenti, nel caso di rinite in pazienti HIV ad es. toxoplasmosi, nel caso di mononucleosi in pazienti immunocompetenti ad es. virus di Epstein-Barr.

9. Bibliografia

1. Darai, G., M. Handermann, and E. Hinz. 2003. Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen, 2 ed. Springer, Berlin.
2. Gold, E., Nankervis, G. 1989. Cytomegalovirus, p. 169189. In A. Evans (ed.), Viral Infections of Humans, 3 ed. Plenum Medical Book Company, New York, London.
3. Mocarski, E. 1999. Cytomegaloviruses, p. 344357. In A. W. Granoff, R. (ed.), Encyclopedia of Virology, 2 ed, vol. 1. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokio.
4. Revello, M. G., and G. Gerna. 2002. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. Clin Microbiol Rev 15:680715.
5. Froberg, M. K. 2004. Review: CMV escapes! Ann Clin Lab Sci 34:12330.
6. Lazzarotto, T., L. Gabrielli, M. Lanari, B. Guerra, T. Bellucci, M. Sassi, and M. P. Landini. 2004. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. Hum Immunol 65:4105.

Preparazione dei campioni dei pazienti e soluzione di lavaggio

▼ **Soluzione di lavaggio:** diluire il concentrato con acqua distillata/demineralizzata fino ad ottenere 1 litro

▼ **Campioni di IgG – diluizione 1:101**

per es.:
10 µl di siero/plasma + 1000 µl di tampone di diluizione
(il tampone per diluizione del siero è pronto per l'uso)

▼ **Campioni di IgM – diluizione 1:101**
assorbimento fattore reumatico con RF-SorboTech

per es.:
5 µl di siero/plasma + 450 µl di tampone di diluizione + 1
goccia die RF-SorboTech per RT, incubare per 15 min

Esecuzione del test

Preincubazione	30 minuti a 37°C	100 µl campioni pazienti Bianco (tampone di diluizione) e controlli
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione coniugato	30 minuti a 37°C	100 µl coniugato IgG, IgM, IgA
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione substrato	30 minuti a 37°C	100 µl substrato
↓		
Bloccaggio		50 µl soluzione bloccante agitare con cautela
↓		
Misurare estinzione		Fotometro a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)