

NovaLisa[®]

Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG

ELISA

Supplementary Instructions

CE 0483

Only for in-vitro diagnostic use

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung / Notice d'utilisation / Istruzioni per l'uso /
Instrucciones de uso / Instruções de utilização**

English	2
Deutsch	6
Français	10
Italiano	14
Español	18
Português	22
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	26
Packaging materials / Verpackungsmaterialien / Matériels d'emballage / Materiali d'imballaggio / Materiales de embalaje / Materiais de embalagem	26
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	27
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procédure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	28

REF

ACMV7110 (48 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA is intended to indicate the CMV-specific IgG avidity in human serum or plasma (citrate, heparin) to differentiate between acute and past infection.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample (dual pipetting). After washing the wells to remove all unbound sample material, one well is incubated with avidity reagent and the corresponding well with washing buffer. The avidity reagent removes the low-avidity antibodies from the antigens whereas the high-avidity ones are still bound to the specific antigens. After second washing step to remove the rest of avidity reagent and low-avidity antibodies, a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a third washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- **Avidity Reagent:** 1 bottle containing 15 mL of an urea solution; coloured blue; ready to use; black cap.
- **Control Low:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Control High:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.

For hazard and precautionary statements see 11.1

3.2. Materials supplied

- 1 Instructions for use Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG-ELISA (**REF** ACMV7110)
- 1 empty labelled bottle (white with white cap) for **WASH BUF 1x**

4. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

5. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

5.1. Avidity Reagent

If crystals have formed in the reagent warm up to 37 °C e.g. in a water bath and mix gently until they disappear.

5.2. **WASH BUF 1x**

It is recommended to fill 15 mL **WASH BUF 1x** into supplied bottle (s. 3.2) to use it in step 5 of the test preparation.

Note: **WASH BUF 1x** is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C).

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) **CMV IgG positive** samples with this assay.

Note: For samples with high absorbance values (OD > 2.000) appropriate higher dilutions should be used.

6.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with **DIL**. Dispense 10 µL sample and 1 mL **DIL** into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of **WASH|BUF|1x** from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

For avidity determination dual pipetting of standards/controls and diluted samples is needed.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave wells A1/A2 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of **WASH|BUF|1x**. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL of Avidity Reagent in wells B1, C1, D1, E1 etc., except for the Substrate Blank well A1. Dispense 100 µL of **WASH|BUF|1x** in wells B2, C2, D2, E2 etc, except for the Substrate Blank well A2.
6. **Incubate for exactly 10 min at 37 ± 1 °C.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the blank wells (A1/A2).
9. **Incubate for 30 min at room temperature ($20...25$ °C).** Do not expose to direct sunlight.
10. Repeat step 4.
11. Dispense 100 µL **SUB|TMB** into all wells.
12. **Incubate for exactly 15 min at room temperature ($20...25$ °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
13. Dispense 100 µL **SOLN|STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for **SUB|TMB**, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
14. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of **SOLN|STOP**.

7.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these instructions for use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank** Absorbance value **< 0.100**
- **Control Low** Avidity (%): **< 45 %**
- **Control High** Avidity (%): **> 55 %**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

8.2. Calculation of Results

For each patient sample or control calculate the ratio between the absorbance of the well dispensed with Avidity Reagent and the absorbance of the well dispensed with **WASH|BUF|1x** multiplied by 100:

$$\frac{\text{Absorbance (sample or control) Avidity Reagent}}{\text{Absorbance (sample or control) } \mathbf{WASH|BUF|1x}} \times 100 = \text{Avidity (\%)}$$

Note: For samples with high absorbance values (OD > 2.000) appropriate higher dilutions should be used.

8.3. Interpretation of Results

Result	Avidity	Interpretation
Low-avidity IgG	< 45 %	An avidity index of less than 45 % indicates a primary infection acquired within the past 2 months.
Equivocal	45 – 55 %	No clinical interpretation can be deduced from an equivocal result. It is recommended to take a second sample within an appropriate period of time (e.g. 2 weeks) and repeat testing. If the result of the repeated test is still equivocal, precise statements regarding the time of infection cannot be made.
High-avidity IgG	> 55 %	The presence of high-avidity IgG indicates a past infection or reinfection.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value. A result of high avidity cannot exclude the possibility of a recent infection.

8.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

IgG	IgM	IgG-Avidity	Probable result
+	-	low	Vague, further investigation necessary
+	-	high	Indicative of a past infection
+	+	low	Suggests a current or very recent infection
+	+	high	Suggests a past infection with persisting IgM or reactivation of infection

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

9.1. Diagnostic Performance

The evaluation of the diagnostic performance of the Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG assay was performed in comparison to well defined samples. The resulting relative agreement was 99.1 %.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

12. ORDERING INFORMATION

REF

ACMV7110

Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG (48 Determinations)

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA ist für die Aviditätsbestimmung der spezifischen IgG-Antikörper gegen Cytomegalievirus in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin), und zur Differenzierung zwischen akuten und zurückliegenden Infektionen bestimmt.

2. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe (zweifaches Pipettieren) binden. Nach dem Waschen, wodurch das ungebundene Probenmaterial entfernt wird, wird eine Vertiefung mit dem Aviditätsreagenz und die andere dazugehörige Vertiefung mit dem Waschpuffer inkubiert. Durch das Aviditätsreagenz wird die Bindung zwischen den niedrig-aviden Antikörpern und den Antigenen gelöst, während die hoch-aviden Antikörper noch an den spezifischen Antigenen gebunden bleiben. Nach dem zweiten Waschschrift werden die Reste des Aviditätsreagenzes sowie niedrig-avide Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem dritten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Aviditätsreagenz:** 1 Flasche mit 15 mL Harnstofflösung; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe
- **Kontrolle Niedrig:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; blaue Verschlusskappe; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Kontrolle Hoch:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe; ≤ 0,02% (v/v) MIT.

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 11.1.

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 Gebrauchsanweisung Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA (REF ACMV7110)
- 1 leere, etikettierte Flasche (weiß mit weißem Deckel) für WASH BUF 1x

4. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

5.1. Aviditätsreagenz

Sollte eine Kristallisation im Aviditätsreagenz auftreten, das Reagenz z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor der Verwendung gut mischen.

5.2. WASH BUF 1x

Es wird empfohlen, 15 mL des WASH BUF 1x in die mitgelieferte Flasche (s.3.2) zu überführen, um diese in Schritt 5 der Testdurchführung zu verwenden.

Beachte: WASH BUF 1x ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar.

6. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden, die **CMV IgG positiv** sind.

Beachte: Bei Proben mit sehr hohen Absorptionswerten (OD > 2,000) sollen entsprechend höhere Verdünnungen verwendet werden.

6.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit DIL verdünnen, z. B. 10 µL Probe und 1 mL DIL in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf bis zu fünf und das [WASH|BUF|1x] -Volumen von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

Für die Aviditätsbestimmung ist ein zweifaches Pipettieren der Standards/Kontrollen und Patientenproben erforderlich.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Die Vertiefungen A1/A2 sind für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL [WASH|BUF|1x] waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Aviditätsreagenz in die Vertiefungen B1, C1, D1, E1 usw., mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
100 µL [WASH|BUF|1x] in die Vertiefungen B2, C2, D2, E2 usw, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A2 vorgesehenen, pipettieren.
6. **Genau 10 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1/A2 vorgesehenen, pipettieren.
9. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
10. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
11. 100 µL [SUB|TMB] in alle Vertiefungen pipettieren.
12. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
13. In alle Vertiefungen 100 µL [SOLN|STOP] in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe von [SUB|TMB] pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
14. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe von [SOLN|STOP] messen.

7.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben notieren.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert** Absorption < **0,100**
- **Kontrolle Niedrig** Avidität (%): < **45 %**
- **Kontrolle Hoch** Avidität (%): > **55 %**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

8.2. Messwertberechnung

Für jede Probe bzw. Kontrolle wird das Verhältnis zwischen dem Absorptionswert der Vertiefung, die mit dem Aviditätsreagenz inkubiert wurde, und dem Absorptionswert der entsprechenden Vertiefung, die mit **WASH | BUF | 1x** inkubiert wurde, bestimmt und mit 100 multipliziert.

$$\frac{\text{Absorptionswert (Probe oder Kontrolle) Aviditätsreagenz}}{\text{Absorptionswert (Probe oder Kontrolle) WASH | BUF | 1x}} \times 100 = \text{Avidität (\%)}$$

Beachte: Bei Proben mit sehr hohen Absorptionswerten (OD > 2,000) sollen entsprechend höhere Verdünnungen verwendet werden.

8.3. Interpretation der Ergebnisse

Ergebnis	Avidität	Interpretation
Niedrig-avide IgG	< 45 %	Ein Aviditätsindex unter 45 % weist auf eine primäre Infektion, die innerhalb der letzten 2 Monate erworben wurde, hin.
Grenzwertig	45 – 55 %	Wenn die Ergebnisse innerhalb der Grauzone liegen, kann keine klinische Interpretation daraus abgeleitet werden. Es wird empfohlen den Test zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. in 2 Wochen) mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, ist die Ermittlung des Infektionszeitpunktes nicht möglich.
Hoch-avide IgG	> 55 %	Die Präsenz hoch-avider IgG deutet auf einen länger zurückliegenden Infektionszeitpunkt oder eine Reinfektion hin.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.
Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert. Die Präsenz hoch-avider Antikörper schließt die Möglichkeit einer frischen Infektion nicht aus.

8.3.1. Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

IgG	IgM	IgG-Avidität	Wahrscheinliches Ergebnis
+	-	niedrig	Unklar, weitere Untersuchungen erforderlich
+	-	hoch	Deutet auf eine abgelaufene Infektion hin
+	+	niedrig	Deutet auf eine frische oder gerade abgelaufene Primärinfektion hin
+	+	hoch	Deutet auf eine abgelaufene Infektion mit persistierendem IgM oder eine Reaktivierung der Infektion hin

9. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

9.1. Diagnostische Leistung

Die Evaluierung der diagnostischen Leistung des Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG Tests wurde im Vergleich zu gut definierten Proben durchgeführt. Die daraus resultierende relative Übereinstimmung war 99,1%.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (3.1).
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

12. BESTELLINFORMATIONEN

REF	ACMV7110	Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG	(48 Bestimmungen)
------------	----------	-----------------------------------	-------------------

FRANÇAIS

1. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA est destinée à indiquer l'avidité des IgG spécifiques du CMV dans le sérum ou le plasma humain (citrate, héparine) pour différencier les infections aiguës et passées.

2. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps spécifiques est basée sur la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Microplaques sont recouvertes d'antigènes spécifiques pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon (Double pipetage). Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, dans un puits est incubé avec le réactif d'avidité et le puits correspondant avec le tampon de lavage. Le réactif d'avidité élimine les anticorps à bas avidité des antigènes tandis que les anticorps à forte avidité sont encore liés aux antigènes spécifiques. Après la deuxième étape de lavage pour éliminer le reste du réactif d'avidité et des anticorps à bas avidité, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés. Dans une troisième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

3. MATERIEL

3.1. Réactifs fournis

- **Avidité Réactifs:** 1 flacon contenant 15 mL d'une solution d'urée; couleur bleue, prêt à l'emploi; bouchon noir.
- **Contrôle Bas:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Contrôle Haut:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge; ≤ 0,02% (v/v) MIT.

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 11.1.

3.2. Matériel fourni

- 1 Notice d'utilisation Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA (**REF** ACMV7110)
- 1 flacon vide étiqueté (blanc avec bouchon blanc) à l'emploi pour **WASH** **BUF** **1x**

4. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C.

5. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20...25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

5.1. Avidité Réactifs

Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie et mélanger doucement jusqu'à ce qu'ils disparaissent.

5.2. **WASH** **BUF** **1x**

Il est recommandé de remplir 15 mL **WASH** **BUF** **1x** dans la bouteille fournie (point 3.2) pour l'utiliser à l'étape 5 de la préparation d'test.

Note: Le **WASH** **BUF** **1x** est stable pendant 5 jours à température ambiante (20...25 °C).

6. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) **CMV IgG positif** pour ce test.

Note: Pour les échantillons avec des valeurs d'absorbance élevées (DO > 2.000), des dilutions appropriées doivent être utilisées.

6.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec **DIL**. Diluer 10 µL d'échantillon avec 1 mL **DIL** dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

7. PROCÉDE DE TEST

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un système automatique pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de **WASH|BUF|1x** de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 11. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

Pour la détermination de l'avidité, il est nécessaire de pipeter deux fois les étalons/contrôles et dilué les échantillons.

1. Pipeter 100 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder les puits A1/A2 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure \pm 5 minutes à 37 ± 1 °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL **WASH|BUF|1x**. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape!

Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats.

5. Pipeter 100 µL de l'Avidité Réactifs dans les puits B1, C1, D1, E1, etc, sauf le puits Blanc A1.
Pipeter 100 µL **WASH|BUF|1x** dans les puits B2, C2, D2, E2, etc, sauf le puits Blanc A2.
6. **Incuber pour exactement 10 minutes à 37 ± 1 °C.**
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µL du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1/A2.
9. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante ($20...25$ °C).** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
10. Répéter l'étape numéro 4.
11. Pipeter 100 µL de **SUB|TMB** dans tous les puits.
12. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante ($20...25$ °C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
13. Pipeter 100 µL **SOLN|STOP** dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la **SUB|TMB**, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
14. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de **SOLN|STOP**.

7.1. Mesure

Réglez le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA à **zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

8. RESULTATS

8.1. Critères de validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ce notice d'utilisation doivent être strictement suivies, et les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat:** Valeur d'absorbance $< 0,100$
- **Contrôle Bas:** Avidité (%): < 45 %
- **Contrôle Haut:** Avidité (%): > 55 %

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

8.2. Calcul des résultats

Pour chaque échantillon de patient ou contrôle, calculer le rapport entre l'absorbance du puits été pipeté le Réactif d'Avidité et l'absorbance du puits été pipeté le **WASH BUF 1x** multiplié par 100:

$$\frac{\text{Valeur d'absorbance (échantillon ou contrôle) Avidité Réactifs}}{\text{Valeur d'absorbance (échantillon ou contrôle) **WASH BUF 1x**}} \times 100 = \text{Avidité (\%)}$$

Note: Pour les échantillons avec des valeurs d'absorbance élevées (DO > 2.000), des dilutions appropriées doivent être utilisées.

8.3. Interprétation des résultats

Résultat	Avidité	Interprétation
Avidité-bas IgG	< 45 %	Un indice d'avidité inférieur à 45% indique une infection primaire acquise au cours des 2 derniers mois.
Zone grise	45 – 55 %	Aucune interprétation clinique ne peut pas être déduite d'un résultat équivoque. Il est recommandé de prélever un second échantillon dans un laps de temps approprié (par exemple 2 semaines) et de répéter les tests. Si le résultat du test répété est toujours dans la zone grise, des indications précises concernant le moment de l'infection ne peuvent pas être faites.
Avidité- Haute IgG	> 55 %	La présence avidité haute des IgG indique une infection ou une réinfection passée.

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés. Un résultat d'une haute avidité ne peut exclure la possibilité d'une infection récente.

8.3.1. Isotypes d'anticorps et l'Etat de l'infection

IgG	IgM	IgG- Avidité	Résultat probable
+	-	Bas	Vague, être nécessaire enquête supplémentaire
+	-	Haute	Indications d'une infection passée
+	+	Bas	Suggère une infection courante ou très récente
+	+	Haute	Suggère une infection passée avec une IgM persistante ou une réactivation de l'infection

9. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

9.1. Performances diagnostique

L'évaluation de la performance diagnostique du test d'avidité cytomégalovirus (CMV) IgG a été effectuée en comparaison avec des échantillons bien définis. L'accord relatif qui en a résulté était de 99,1%.

10. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

11. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'utilisation, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les Plaque de Microtitrage provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

11.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 3.1).

Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention



H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les aérosols.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

11.2. Elimination des déchets

Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et règlements nationaux et régionaux. Contactez les autorités locales ou les entreprises de gestion des déchets qui vous donneront des conseils sur la manière d'éliminer les déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

12. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF	ACMV7110	Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG	(48 Déterminations)
-----	----------	-----------------------------------	---------------------

ITALIANO

1. USO PREVISTO

Il Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA è un kit che ha lo scopo di indicare l'avidità delle IgG specifici per CMV nel siero o plasma umano (citrato, eparina) per distinguere tra infezione acuta e del passato.

2. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Micropiastre sono rivestiti con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione (pipettare due volte). Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, in un pozzetto è incubato con il reagente di avidità e la corrispondente bene con tampone di lavaggio. Il reagente di avidità rimuove gli anticorpi a bassa avidità dagli antigeni mentre quelli ad alta avidità sono ancora legati agli antigeni specifici. Dopo il secondo lavaggio per rimuovere il resto delle avidità reagenti e bassa avidità anticorpi, dopo il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una terza fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu.

L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un lettore di micropiastre ELISA.

3. MATERIALI

3.1. Reagenti forniti

- **Avidità Reagente:** 1 flacone da 15 mL di soluzione di urea; colore azzurro; tappo nero; pronto all'uso.
- **Controllo Basso:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Alto:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 11.1.

3.2. Accessori forniti

- 1 Istruzioni per l'uso Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA (REF ACMV7110)
- 1 flacone vuoto etichettato (bianco con il tappo bianco) per il WASH BUF 1x

4. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2...8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2...8 °C.

5. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20...25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

5.1. Reagente Avidità

Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

5.2. WASH BUF 1x

Si raccomanda di riempire con 15 mL WASH BUF 1x, il flacone (s. 3.2) da utilizzare nel passaggio 5 della preparazione del test. Nota: Il WASH BUF 1x è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C).

6. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni umani di un siero o plasma (citrato, eparina) **positivi per CMV IgG**.

Note: Per i campioni con alti valori di assorbanza (OD > 2,000), gli diluizioni appropriate devono essere utilizzati.

6.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con DIL. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL DIL e mescolare bene (Vortex).

7. PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi de 3 a 5 volte e il volume del **WASH|BUF|1x** da 300 a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 11. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato). Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eeguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 ± 1 °C.

Per la determinazione dell'avidità è necessario pipettare due volte di standard/controlli e campioni diluiti.

1. Pipettare 100 µL di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare i pozzetti A1/A2 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL **WASH|BUF|1x**. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo!
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi.
5. Pipettare 100 µL di Reagente Avidità nei pozzetti B1, C1, D1, E1, ecc, escludendo il pozzetto A1.
Pipettare 100 µL **WASH|BUF|1x** nei pozzetti B2, C2, D2, E2, ecc, escludendo il pozzetto A2.
6. **Incubare per esattamente 10 min a 37 ± 1 °C.**
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1/A2.
9. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente (20...25 °C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
10. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
11. Pipettare 100 µL **SUB|TMB** in tutti i pozzetti.
12. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20...25 °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
13. Pipettare 100 µL **SOLN|STOP** in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della **SUB|TMB**, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
14. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta **SOLN|STOP**.

7.1. Misurazione

Regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione ELISA **a zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e registra i valori di assorbanza per ogni standard/controllo e campione.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

8. RISULTATI

8.1. Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza **$< 0,100$**
- **Controllo Basso:** Avidità **< 45 %**
- **Controllo Alto:** Avidità **> 55 %**

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

8.2. Calcolo dei risultati

Per ogni campione o controllo paziente calcolare il rapporto tra l'assorbanza del pozzo in cui è stato pipettato il Reagente di avidità e l'assorbanza del pozzo in cui è stato pipettato il **WASH BUF 1x** moltiplicato per 100:

$$\frac{\text{Valore di assorbanza (campioni ou controllo) Reagente di Avidità}}{\text{Valore di assorbanza (campioni ou controllo) **WASH BUF 1x**}} \times 100 = \text{Avidità (\%)}$$

Note: Per i campioni con alti valori di assorbanza (OD > 2,000), gli diluizioni appropriate devono essere utilizzati.

8.3. Interpretazione dei risultati

Risultato	Avidità	Interprétation
Avidità-bassa IgG	< 45 %	Un indice di avidità inferiore al 45% indica un'infezione primaria acquisita negli ultimi 2 mesi
Zona grigia	45 – 55 %	Nessuna interpretazione clinica può essere dedotta da un risultato equivoco. Si consiglia di prendere un secondo campione entro un congruo periodo di tempo (ad esempio 2 settimane) e ripetere il test. Se il risultato del test ripetuto è ancora nella zona grigia, precisazioni riguardanti momento dell'infezione non possono essere fatte.
Avidità- alta IgG	> 55 %	La presenza di alta avidità delle IgG indica un'infezione passata o una reinfezione.

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente.
I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.
Un risultato di alta avidità non può escludere la possibilità di un'infezione recente.

8.3.1. Isotipi degli anticorpi e Stato dell'infezione

IgG	IgM	IgG- Avidità	Risultato probabile
+	-	Bassa	Vago, necessarie ulteriori indagini
+	-	Alta	Indicativi di un'infezione passata
+	+	Bassa	Suggerisce un'infezione in corso o molto recente.
+	+	Alta	Suggerisce un'infezione persistente passata con IgM o la riattivazione di infezione

9. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

9.1. Performance diagnostica

La valutazione della performance diagnostica del test Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG è stata eseguita in confronto ai campioni ben definiti. L'accordo relativo risultante era 99,1%.

10. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze.

11. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

11.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT(3:1) o MIT (vedi capitolo 3.1).
Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

Attenzione



H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261	Evitare di respirare gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

11.2. Smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

12. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

REF	ACMV7110	Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG	(48 determinazioni)
------------	----------	-----------------------------------	---------------------

ESPAÑOL

1. USO PREVISTO

El enzoinmunoensayo Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA se pretende indique la Avidéz de IgG específica de CMV en suero o plasma humano (citrato, heparina) para diferenciar entre infección aguda y pasada.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las microplacas están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra (pipeteo dos veces). Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, se incuba un pocillo con reactivo de avidéz y el pocillo correspondiente con tampón de lavado. El reactivo de avidéz elimina los anticuerpos de baja avidéz de los antígenos mientras que los de alta avidéz todavía están unidos a los antígenos específicos. Después de la segunda etapa de lavado para eliminar el resto del reactivo de avidéz y los anticuerpos de baja avidéz, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una tercera etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un lector de microplacas ELISA.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

- **Reactivo de Avidéz:** 1 botella que contiene 15 mL de una solución de urea; de color azul; listo para ser utilizado; tapa negra
- **Control Bajo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Alto:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa rojo; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 11.1.

3.2. Accesorios suministrados

- 1 Instrucciones de uso Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA (**REF** ACMV7110)
- 1 botella vacía etiquetada (blanca con tapa blanca) para **WASH BUF 1x**

4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

5.1. Reactivo de avidéz

Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

5.2. **WASH BUF 1x**

Se recomienda llenar con 15 mL **WASH BUF 1x**, la botella suministrada (punto 3.2) para usarla en el paso 5 de la preparación del ensayo.

Nota: El **WASH BUF 1x**, es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C).

6. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar com este ensaio, muestras humanas de suero o plasma (citrato, heparina) **positiva para CMV IgG**.

Note: Para muestras con altos valores de l'extinción (DO> 2.000), diluciones apropiadas deben ser utilizados.

6.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con **DIL**, por ejemplo 10 µL de la muestra con 1 mL **DIL**, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

7. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de **WASH|BUF|1x** de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 11. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado). Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para la determinación de la avidéz se necesita pipeteo dos veces de estándares/controles y muestras diluidas.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar los pocillos A1/A2 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h \pm 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL **WASH|BUF|1x**. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: ¡El lavado es muy importante! ¡Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Dispensar 100 µL de Reactivo de Avidéz en los pocillos B1, C1, D1, E1, etc., excepto para el pocillo A1.
Dispense 100 µL **WASH|BUF|1x** en los pocillos B2, C2, D2, E2, etc., excepto para el pocillo A2.
6. **Incubar exactamente por 10 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción de los blanco substrato A1/A2.
9. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25 °C).** Evitar la luz solar directa.
10. Repetir el lavado como en el paso número 4.
11. Pipetear 100 µL **SUB|TMB** en todos los pocillos.
12. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
13. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de **SOLN|STOP** en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con **SUB|TMB**, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
14. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir **SOLN|STOP**.

7.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA al cero utilizando el Blanco.

¡Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

8.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de l'extinción < **0,100**
- **Control Bajo:** Avidéz (%) < **45 %**
- **Control Alto:** Avidéz (%) > **55 %**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

8.2. Cálculo del valor de la medición

Para cada muestra de paciente o el control calcular la relación entre l'extinción del pocilo en el se pipeteó el Reactivo de Aidez y l'extinción del pocillo en el se pipeteó el **WASH|BUF|1x** multiplicado por 100:

$$\frac{\text{Valor de la extinción (muestra ou control) Reactivo de Aidez}}{\text{Valor de l'extinción (muestra ou control) **WASH|BUF|1x**}} \times 100 = \text{Aviditez (\%)}$$

Note: Para muestras con altos valores de l'extinción (DO > 2.000), diluciones apropiadas deben ser utilizados.

8.3. Interpretación de los resultados

Résultat	Avidité	Interprétation
Aidez-baja IgG	< 45 %	Un índice de avidez inferior al 45% indica una infección primaria adquirida en los últimos 2 meses
Zona intermedia	45 – 55 %	No se puede deducir una interpretación clínica de un resultado equívoco. Se recomienda tomar una segunda muestra dentro de un período de tiempo apropiado (por ejemplo, 2 semanas) y repetir las pruebas. Si el resultado de la prueba repetida es de nuevo en la zona intermedia, no se pueden hacer afirmaciones precisas con respecto al tiempo de infección.
Aidez- alta IgG	> 55 %	La presencia de IgG de alta avidez indica una infección o reinfección pasada.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos. Un resultado de alta avidez no puede excluir la posibilidad de una infección reciente.

8.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

IgG	IgM	IgG- Aidez	Résultat probable
+	-	Baja	Vague, necesaria investigación adicional
+	-	Alta	Indicativos de una infección pasada
+	+	Baja	Sugiere una infección actual o muy reciente
+	+	Alta	Sugiere una infección previa con IgM persistente o reactivación de la infección

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

9.1. Desempeño del Diagnóstico

La evaluación del desempeño diagnóstico del ensayo Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG fue realizada en comparación con muestras bien definidas. El acuerdo relativo resultante fue del 99,1%.

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

11.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 3.1).
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

11.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con las empresas de gestión de residuos, que le asesorarán sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

12. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

REF	ACMV7110	Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG	(48 determinaciones)
------------	----------	-----------------------------------	----------------------

PORTUGUÊS

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA destina-se à determinação da avididade de IgG específica para CMV em soro ou plasma humano (citrato, heparina) para diferenciar entre infecção aguda e passada.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática qualitativa de anticorpos específicos é baseada na técnica de ELISA (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

As microplacas são revestidas com antígenos específicos que se ligam aos anticorpos correspondentes da amostra (pipetar duas vezes). Após lavagem dos poços, para remover todo o material de amostra não ligado, em um poço é incubado com reagente de avididade e o poço correspondente com tampão de lavagem. O reagente de avididade remove os anticorpos de baixa avididade dos antígenos enquanto que os de alta avididade estão ainda ligados aos antígenos específicos. Após o segundo passo de lavagem para remover o resto do reagente de avididade e anticorpos de baixa avididade, depois o conjugado de peroxidase de rábano (HRP) é adicionado. Este conjugado se liga aos anticorpos capturados. Num terceiro passo de lavagem o conjugado não ligado é removido. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado por adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), o que dá um produto de reação azul.

A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos específicos da amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reação. Isso produz uma mudança de cor de azul para amarelo. Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um leitor de microplacas ELISA.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes fornecidos

- **Reagente de Avididade:** 1 frasco contendo 15 mL de uma solução de úrea; de cor azul; pronto a usar; tampa preta.
- **Controle Baixo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa azul; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Controle Alto:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa vermelha; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.

Para advertências de perigo e recomendações de prudência ver capítulo 11.1.

3.2. Materiais fornecidos

- 1 Instruções de utilização Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA (REF ACMV7110)
- 1 frasco vazio e etiquetado (blanco com tampa branca) para WASH|BUF|1x

4. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Armazene o kit a 2...8 °C. Os reagentes abertos são estáveis até o prazo de validade impresso no rótulo quando armazenado a 2...8 °C.

5. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante deixar todos os reagentes e amostras estabilizar à temperatura ambiente (20...25 °C) e misturá-los antes de iniciar o teste!

5.1. Reagente de Avididade

Caso apareça cristais no concentrado, aquecer a solução a 37 °C por exemplo, em banho Maria. Misture bem antes da diluição.

5.2. WASH|BUF|1x

Recomenda-se para preencher com 15 mL WASH|BUF|1x fornecido na garrafa (s. 3.2) para usá-lo na etapa 5 da preparação para o teste.

Nota: WASH|BUF|1x é estável durante 5 dias à temperatura ambiente (20...25 °C).

6. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este teste amostras humanas de soro ou plasma (citrato, heparina) **positivas para CMV IgG**.

Note: Para as amostras com valores de Absorvância (DO > 2,000), diluição apropriadas devem ser utilizadas.

6.1. Diluição das amostras

Antes de testar todas as amostras devem ser diluídas 1 + 100 com DIL. Dispensar 10 µL de amostra e 1 mL DIL em tubos para obter uma diluição 1 + 100 e misturar meticulosamente com um vortex.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Por favor, ler atentamente as instruções de utilização **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita às instruções de utilização, conforme descritas. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para teste ELISA é recomendável aumentar os passos de lavagem de três até cinco e o volume [WASH|BUF|1x] de 300 µL para 350 µL para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 11. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e calibradores/controles (é recomendado determinar em duplicidade) deve ser cuidadosamente estabelecido. Selecionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

Realizar todas as etapas do teste na ordem indicada e sem atrasos significativos.

Na pipetagem deve ser utilizada uma ponta limpa e descartável para dispensar cada controle e amostra.

Ajustar a incubadora para 37 ± 1 °C.

Para determinação de avidéz é necessário pipetagem dupla de calibradores/controles e amostras diluídas.

1. Dispensar 100 µL dos calibradores/controles e das amostras diluídas nos poços respectivos. Deixar os poços A1/A2 vazios para o branco substrato.
2. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incubar durante 1 hora \pm 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Quando terminar a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço três vezes com 300 µL de [WASH|BUF|1x]. Evitar que os poços de reacção transbordem. O intervalo entre a lavagem e a aspiração deve ser > 5 seg. No final, retirar cuidadosamente o fluido restante batendo delicadamente as tiras sobre papel absorvente, antes da próxima etapa!
Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e falsos resultados.
5. Dispensar 100 µL de Reagentes de Avidéz nos poços B1, C1, D1, E1, etc, excepto no poço do Branco substrato A1. Dispensar 100 µL [WASH|BUF|1x] nos poços B2, C2, D2, E2, etc, excepto no poço do Branco substrato A2.
6. **Incubar por exactamente 10 min a 37 ± 1 °C.**
7. Repetir a etapa 4.
8. Pipetar 100 µL de conjugado em cada poço, excepto nos poços do Branco substrato A1/A2.
9. **Incubar durante 30 min à temperatura ambiente (20...25°C).** Não expor directamente à luz solar.
10. Repetir a etapa 4.
11. Dispensar 100 µL [SUB|TMB] em todos os poços.
12. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente (20...25°C) e no escuro.** A cor azul devido a uma reacção enzimática.
13. Dispensar 100 µL [SOLN|STOP] em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a [SUB|TMB], desse modo uma mudança de cor de azul para amarelo ocorre.
14. Medir a absorvância a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição [SOLN|STOP].

7.1. Medição

Ajustar o fotómetro para Placa de Microtitulação ELISA a zero usando o **Branco substrato**.

Se - devido às razões técnicas - o fotómetro para Placa de Microtitulação ELISA não puder ser ajustado a zero usando o Branco substrato, valor da absorvância deste deve ser subtraído de todos os outros valores de absorvância medidos de forma a obter resultados fiáveis!

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada calibrador/controle e amostra.

É recomendado fazer a medição **dicromática** usando como referência um comprimento de onda de 620 nm.

Se determinações duplas foram realizadas, calcular **os valores médios de absorvância**.

8. RESULTADOS

8.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, estas instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidas, e os seguintes critérios devem ser cumpridos:

- **Branco substrato:** Valor de Absorvância < **0,100**
- **Controle Baixo:** Avidéz (%) < **45 %**
- **Controle Alto:** Avidéz (%) > **55 %**

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e deve ser repetido.

8.2. Cálculo dos Resultados

Para cada amostra de paciente ou controle, calcular a razão entre a absorvância do poço no qual foi dispensado Reagente de Avidex e a absorvância do poço no qual foi dispensado **WASH BUF 1x** multiplicado por 100:

$$\frac{\text{Valor de Absorvância (amostra ou controle) Reagente de Avidex}}{\text{Valor de Absorvância (amostra ou controle) **WASH BUF 1x**}} \times 100 = \text{Avidex (\%)}$$

Note: Para as amostras com valores de Absorvância (DO > 2,000), diluição apropriadas devem ser utilizadas.

8.3. Interpretação dos Resultados

Resultado	Avidex	Interpretação
Avidex-baixa IgG	< 45 %	Um índice de avidex inferior a 45% indica uma infecção primária adquirida nos últimos 2 meses
Zona cinzenta	45 – 55 %	Nenhuma interpretação clínica pode ser deduzida de um resultado equívoco. Recomenda-se tomar uma segunda amostra dentro de um período de tempo apropriado (por exemplo 2 semanas) e repetir o teste. Se o resultado do teste repetido estiver novamente dentro da zona cinzenta, não podem ser feitas declarações precisas sobre o tempo de infecção.
Avidex-alta IgG	> 55 %	A presença de IgG de alta avidex indica uma infecção ou reinfeção passada.

O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base num único resultado do teste. Um diagnóstico preciso deve ter em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos. Em pacientes imunossuprimidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito. Um resultado de alta avidex não pode excluir a possibilidade de uma infecção recente.

8.3.1. Isotipos de anticorpos e Estado da Infecção

IgG	IgM	IgG-Avidex	Resultado provável
+	-	Baixa	Vago, é necessário prosseguir a investigação
+	-	Alta	Indicativos de uma infecção passada
+	+	Baixa	Sugere uma infecção atual ou muito recente
+	+	Alta	Sugere uma infecção passada com IgM persistente ou reativação da infecção

9. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigados; estas não são especificações garantidas.

9.1. Performa Diagnóstica

A avaliação do desempenho diagnóstico do ensaio de IgG de Avidity Cytomegalovirus (CMV) foi realizada em comparação com amostras bem definidas. O acordo relativo resultante foi de 99,1%.

10. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Contaminação bacteriana ou a repetição de ciclos de congelação-descongelação do espécime podem afectar os valores da absorvância.

11. PRECAUÇÕES E AVISOS

- O procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções de utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos pacientes.
- Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
- Todos os materiais de origem humana ou animal devem ser considerados e tratados como potencialmente infectantes.
- Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos.
- Não trocar e/ou juntar reagentes ou Placa de Microtitulação de lotes de produção diferentes.
- nenhuns reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.
- Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos calibradores/controles antes de utiliza-los novamente.
- Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos pacientes e dispensar o reagentes precisamente nos poços sem salpicar.
- O ELISA é projetado apenas para pessoal qualificado seguindo os padrões de boas práticas de laboratório (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para um controle de qualidade interno adicional cada laboratório deve utilizar amostras conhecidas.

11.1. Nota de segurança para reagentes que contenham substâncias perigosas

Os reagentes podem conter CMIT/MIT (3:1) ou MIT (ver capítulo 3.1).

Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar os aerossóis.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água.
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Mais informações podem ser encontradas na ficha de dados de segurança.

11.2. Considerações de Eliminação

Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos é regulamentada através de leis e regulamentos nacionais e regionais. Contacte as suas autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos que darão conselhos sobre como eliminar os resíduos perigosos.

Para informações sobre os materiais de embalagem, consulte MATERIAIS DE EMBALAGEM.




12. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

REF	ACMV7110	Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG	(48 determinações)
------------	----------	-----------------------------------	--------------------






ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATÉRIELS D'EMBALLAGE / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE / MATERIAIS DE EMBALAGEM

REAG AVI	CONTROL H	CONTROL L	EMPTY VIAL	 <p>PAP 22</p>
 <p>HDPE 2</p>	 <p>PP 5</p>			

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE marking / CE-Kennzeichnung / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
UDI	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / Identification unique des dispositifs / Identificazione unica del dispositivo / Identificación única del producto / Identificação única dos dispositivos
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
REAG AVI	Avidity Reagent / Aviditätsreagenz / Réactif d'Avidité / Reagente di Avidità / Reactivo de Avidéz / Reagente de Avidéz
CONTROL L	Control Low / Kontrolle Niedrig / Contrôle Bas / Controllo Basso / Control Bajo/ Controle Baixo
CONTROL H	Control High/ Kontrolle Hoch / Contrôle Haut / Controllo Alto / Control Alto / Controle Alto
WASH BUF 1x	20-fold dilution of WASH BUF 20x / 20-fach Verdünnung von WASH BUF 20x / Dilution 20 fois du WASH BUF 20x / Diluizione 20 volte del WASH BUF 20x / Dilución de 20 veces del WASH BUF 20x / Diluição de 20 dobras do WASH BUF 20x
EMPTY VIAL	empty labelled bottle / leere, etikettierte Flasche / flacon vide étiqueté / flacone vuoto etichettato / botella vacía etiquetada / frasco vazio e etiquetado
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank A1/A2	Avidity Control Low B1	Avidity Control Low B2	Avidity Control High C1	Avidity Control High C2	Sample (diluted 1+100) e. g. D1	Sample (diluted 1+100) e. g. D2
Avidity Control Low	-	100 µL	100 µL	-	-	-	-
Avidity Control High	-	-	-	100 µL	100 µL	-	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	-	100 µL	100 µL
Cover wells with foil Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x							
Avidity Reagent	-	100 µL	-	100 µL	-	100 µL	-
WASH BUF 1x	-	-	100 µL	-	100 µL	-	100 µL
Incubate for exactly 10 min at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x							
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x							
SUB TMB	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark							
SOLN STOP	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)							



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

ACMV7110_IFU_rev01_fromLot_130N