

CHORUS



CYTOMEGALOVIRUS IgM

DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Via delle Rose, 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

REF 81011

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Cambios introducidos en la revisión actual Alterações introduzidas na revisão atual	9





ISTRUZIONI PER L'USO

CHORUS CYTOMEGALOVIRUS IgM

**Per la determinazione qualitativa degli anticorpi
IgM anti-Cytomegalovirus**

Solo per uso diagnostico in vitro

1. UTILIZZAZIONE

Metodo immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi di classe IgM anti-Cytomegalovirus nel siero umano con dispositivo monouso applicato agli strumenti Chorus e Chorus TRIO.

2. INTRODUZIONE

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

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

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

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il dispositivo Chorus Cytomegalovirus IgM è pronto all'uso per la determinazione degli anticorpi IgM anti-Cytomegalovirus, negli strumenti Chorus/Chorus TRIO.

Il test si basa sul principio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigene viene legato alla fase solida. Le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene in seguito ad incubazione con siero umano diluito. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti-IgM umane coniugati con perossidasi di rafano. Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

Per confermare la specificità della risposta, i campioni risultati positivi sono sottoposti al Confirmatory test: il siero in esame è preincubato con il reattivo "Confirmatory Test Reagent" (fibroblasti umani non infettati liofilizzati) in maniera da inibire, con il preassorbimento, eventuali reazioni aspecifiche del siero verso componenti cellulari contaminanti l'antigene CMV insolubilizzato sulla fase solida. Dopo il preassorbimento i

campioni sono nuovamente testati in ELISA con il metodo descritto precedentemente. La persistenza di positività conferma la presenza di anticorpi specifici.

I dispositivi monouso contengono tutti i reagenti per eseguire il test quando applicati agli strumenti Chorus/Chorus TRIO.

I risultati sono espressi in Index (OD campione/OD cut-off).

4. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

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

Smaltimento dei residui: i campioni di siero, i calibratori e le strip usate devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di leggi vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca.
 2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni.
 3. Lavare accuratamente le mani una volta inseriti i dispositivi nello strumento Chorus/Chorus TRIO.
 4. In merito alle caratteristiche di sicurezza dei reagenti contenuti nel kit consultare la Scheda di Sicurezza (disponibile su richiesta).
 5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
 6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata.
- Tutti i materiali utilizzati per decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti.
- Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

Prima dell'uso, portare i dispositivi da utilizzare a temperatura ambiente (18-30°C) ed impiegare entro 60 minuti.

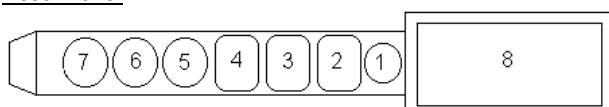
1. **Scartare i device con substrato (pozzetto 4) colorato di blu.**
2. Nell'aggiungere il campione al pozzetto verificare che sia perfettamente distribuito sul fondo.
3. Controllare l'effettiva presenza dei reagenti nel dispositivo e l'integrità del dispositivo stesso. Non utilizzare dispositivi che al controllo visivo presentano mancanza di qualche reagente e/o corpi estranei nel pozzetto di reazione.
4. I dispositivi devono essere utilizzati insieme allo strumento Chorus/Chorus TRIO, seguendo rigorosamente le Istruzioni per l'Uso ed il Manuale Utente dello strumento.
5. Controllare che lo strumento Chorus/Chorus TRIO sia impostato correttamente (vedi Manuale Utente).
6. Non alterare il codice a barre posto sull'impugnatura del device al fine di permetterne la corretta lettura da parte dello strumento.
7. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
8. Codici a barre difettosi possono essere inseriti manualmente nello strumento (vedi Manuale Utente).
9. Non esporre i dispositivi a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e l'uso.
10. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, lipemici, itterici, di siero non completamente coagulato o di campioni che presentano inquinamento microbico.
11. Non utilizzare il dispositivo dopo la data di scadenza
12. **Controllare che lo strumento abbia la connessione con la Washing Buffer (Ref. 83606)**

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Il kit è sufficiente per 36 determinazioni

DD DISPOSITIVI 6 confezioni da 6 dispositivi ciascuna

Descrizione:



Posizione 8: Spazio disponibile per etichetta con codice a barre

Posizione 7: Sede per pozzetto CONFIRMATORY TEST REAGENT

Posizione 6: POZZETTO DI MICROPIASTRA

Sensibilizzato con antigene del Cytomegalovirus ottenuto da colture di fibroblasti umani infettate con Cytomegalovirus parzialmente purificato ed inattivato

Posizione 5: POZZETTO DI MICROPIASTRA

Non sensibilizzato.

Posizione 4: SUBSTRATO TMB

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H₂O₂ 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

Posizione 3: DILUENTE PER I CAMPIONI

Contenuto: Soluzione proteica contenente anti IgG umane, contenente fenolo 0.05%, Bronidox 0.02% e un indicatore per rivelare la presenza di siero.

Posizione 2: CONIUGATO

Contenuto: anticorpi monoclonali anti-IgM umane marcati con perossidasi, in soluzione tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

Posizione 1: POZZETTO VUOTO

Dove l'utilizzatore deve dispensare il siero non diluito.

Uso: equilibrare una busta a temperatura ambiente, aprire la busta, prelevare i dispositivi occorrenti; riporre gli altri nella busta contenente il gel di silice, far uscire l'aria e **sigillare** premendo sulla chiusura. Conservare a 2/8°C.

CONFIRM TEST TEST DI CONFERMA

Contenuto: liofilo di antigene da colture di cellule non infettate

Uso: leggere il procedimento al punto 10.1.

CALIBRATOR CALIBRATORE 1 x 0.175 ml

Contenuto: Siero umano diluito contenente anticorpi IgM anti-Cytomegalovirus e conservante. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 0.425 ml

Contenuto: Siero umano diluito contenente anticorpi IgM anti-Cytomegalovirus e conservante. Liquido, pronto all'uso.

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO:

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Strumento Chorus/Chorus TRIO
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente volumi di 50-200 µl.
- Guanti monouso
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti

6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C. Nel caso di un'errata temperatura di conservazione deve essere ripetuta la calibrazione e controllata la correttezza del risultato tramite il siero di controllo (vedi capitolo 9: Validazione del test).

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

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

DISPOSITIVI	8 settimane a 2/8°C
CALIBRATORE	8 settimane a 2/8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane a 2/8°C
CONFIRMATORY TEST REAGENT	8 settimane a 2/8°C

7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio.

Non sono conosciute le conseguenze dell'utilizzo di altri liquidi biologici.

Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C.

Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinatori per la conservazione dei campioni. Dopo lo scongelamento agitare con cura il campione prima del dosaggio.

L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

8. PROCEDIMENTO

1. Aprire la busta (lato contenente la chiusura a pressione), prelevare il numero di dispositivi necessario per eseguire gli esami e conservare gli altri richiudendo la busta dopo aver fatto uscire l'aria.
2. Controllare visivamente lo stato del dispositivo secondo le indicazioni riportate nel capitolo 4 Avvertenze Analitiche.
3. Dispensare nel pozzetto n°1 di ciascun dispositivo 50 µl di siero non diluito da analizzare. Ad ogni cambio di lotto utilizzare un dispositivo per il calibratore.
4. Introdurre i dispositivi sullo strumento Chorus/Chorus TRIO. Eseguire la calibrazione (se richiesto) ed il test come riportato nel Manuale Utente dello strumento.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Utilizzare il siero di controllo positivo per verificare la correttezza del risultato ottenuto, processandolo come indicato nel Manuale Utente dello strumento. Se lo strumento segnala che il siero di controllo ha un valore fuori dal limite di accettabilità occorre effettuare nuovamente la calibrazione. I risultati precedenti verranno corretti automaticamente.

Se il risultato del siero di controllo continua ad essere fuori dall'intervallo di accettabilità, contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Lo strumento Chorus/Chorus TRIO fornisce il risultato in Index (OD campione/OD cut-off).

Il test sul siero in esame può essere interpretato come segue:

POSITIVO: quando il risultato è > 1.1

NEGATIVO: quando il risultato è < 0.9

DUBBIO/EQUIVOCO: quando il risultato è compreso fra 0.9 e 1.1

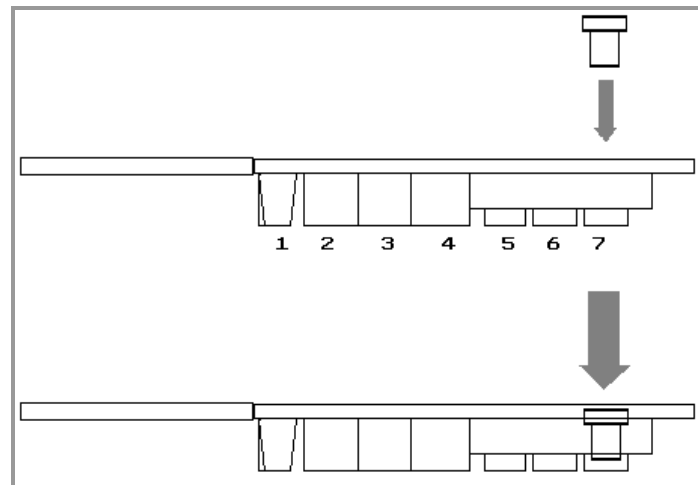
In caso di risultato dubbio/equivoco, ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio/equivoco, ripetere il prelievo.

In caso di risultato positivo effettuare il test di conferma utilizzando il **confirmatory test reagent**

10.1 PROCEDIMENTO TEST DI CONFERMA:

1. Aprire la busta contenente il confirmatory reagent, prendere il numero di pozzetti necessari per eseguire i test e conservare gli altri richiudendo la busta con del nastro adesivo.
2. Porre il pozzetto del liofilo nella posizione 7 del device bloccandolo premendo fino in fondo (vedi fig 1).
3. Effettuare sulla pellicola del liofilo due fori con un puntale di plastica.
4. Dispensare nel pozzetto liofilo 50 µl del campione da confermare.
5. Attendere 5 minuti senza agitare, successivamente miscelare 2 o 3 volte **molto lentamente** utilizzando una pipetta.
6. Dispensare i 50 µl nel pozzetto 1 del dispositivo.
7. Introdurre i dispositivi sullo strumento Chorus. Eseguire il test come riportato nel Manuale di Istruzione dello strumento.
8. Interpretare i risultati come riportato al punto 10.

Fig. 1



11. LIMITAZIONI DEL TEST

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

Il test non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica ed il risultato ottenuto deve sempre essere valutato insieme a

dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

12. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 36 campioni contenenti:

Fattore Reumatoide (20)
Bilirubina (2.9 mg/dl – 24.9 mg/dl) (7)
Trigliceridi (356 mg/dl) (1)
Emoglobina (8)

La presenza nel siero in esame delle sostanze interferenti sopra riportate non altera il risultato del test.

13. CROSS-REATTIVI

18 campioni, positivi a Epstein-Barr, Varicella e Herpes simplex sono stati testati.

Non sono state rilevate reazioni crociate significative.

14. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione sono stati analizzati 138 campioni con kit Diesse e con un altro kit del commercio.

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	20	2	22
	-	0	116	116
	Totale	20	118	138

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):

100% CI_{95%}: 83.9-99.8

Percent Negative Agreement: (~Specificità Diagnostica):

98.3% CI_{95%}: 94.0-99.5

Il grado di concordanza tra i due metodi risulta essere ottimo con un valore di K (Costante di Cohen) di 0.96.

15. PRECISIONE E RIPETIBILITA'

Campione	All'interno della seduta		Tra sedute	
	Media Index	CV%	Media Index	CV%
1	0.3	16.7	0.3	16.7
2	0.6	8.3	0.6	10.0
3	0.8	8.8	0.8	7.5
4	1.2	10.0	1.1	8.2
5	1.3	6.9	1.4	10.0
6	1.6	6.3	1.7	8.8
7	2.5	5.2	2.5	10.0
8	2.9	6.2	2.7	9.3

Campione	Tra lotti/Tra strumenti	
	Media Index	CV%
1	0.3	16.7
2	0.5	8.0
3	0.8	11.3
4	1.1	8.2
5	1.3	11.5
6	1.6	10.0
7	2.3	9.6
8	2.6	9.2

16. BIBLIOGRAFIA

- G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
- Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
- M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
- F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
- P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
- R. Zieglermaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





CHORUS CYTOMEGALOVIRUS IgM

**For the qualitative determination of IgM
antibodies anti-Cytomegalovirus**

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

Immunoenzymatic method for the qualitative determination of IgM class antibodies against Cytomegalovirus in human serum, using a disposable device applied on the Chorus and Chorus TRIO instruments.

2. INTRODUCTION

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

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

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Chorus Cytomegalovirus IgM device is ready to use for the detection of IgM antibodies against Cytomegalovirus, in the Chorus/ Chorus TRIO instruments.

The test is based on the ELISA principle (Enzyme linked ImmunoSorbent Assay). The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with diluted human serum.

After washing to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of anti-human IgM monoclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added. The blue colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

To confirm the specificity of the response, positive samples are subjected to the Confirmatory test: the test serum is preincubated with the Confirmatory Test Reagent (freeze-dried non infected human fibroblasts) in order to inhibit, by preabsorption, eventual non specific reactions of the serum towards cell components contaminating the CMV antigen coated on the solid phase. After preabsorption the samples are

retested in ELISA with the method described previously. A second positive result confirms the presence of specific antibodies.

The disposable devices contain all the reagents to perform the test when applied on the Chorus/Chorus TRIO instruments.

The results are expressed in Index (OD sample/OD cut-off).

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY

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

Waste disposal: serum samples, calibrators and strips once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth.
2. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens.
3. Wash hands thoroughly after placing the devices in the Chorus/Chorus TRIO instrument.
4. Consult the relative Material Safety Data Sheet (available on request) for all the information on safety concerning the reagents contained in the kit.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical Precautions

Bring the devices to room temperature (18-30°C) before use; use within 60 min.

1. **Discard devices which show the substrate (well 4) blue colored.**
2. Adding the sample into the well verify that it is perfectly distributed on the bottom.

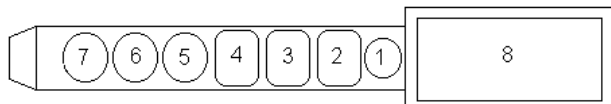
3. Check for the presence of the reagents in the device and that the device is not damaged; do not use devices which are lacking a reagent and/or present foreign bodies in the reaction well when visually inspected.
4. The devices are for use with the Chorus/Chorus TRIO instrument; the Instructions for Use must be carefully followed and the Instrument Operating Manual must be consulted.
5. Check that the Chorus/Chorus TRIO instrument is set up correctly (see Operating Manual).
6. Do not alter the bar code placed on the handle of the device in order to allow correct reading by the instrument.
7. Avoid using self-defrosting freezers for the storage of the samples.
8. Defective barcodes can be inserted manually in the instrument (see Operating Manual).
9. Do not expose the devices to strong light or to hypochlorite vapors during storage and use.
10. The use of strongly hemolyzed, lipemic, icteric samples, of serum not completely coagulated or of samples presenting microbial contamination may all constitute sources of error.
11. Do not use the device after the expiry date.
12. **Make sure that the instrument is connected to the Washing Buffer (Ref. 83606).**

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

The kit is sufficient for 36 tests.

DD DEVICES 6 packages each containing 6 devices

Description:



Position 8: Space for application of bar code label

Position 7: Well for CONFIRMATORY TEST REAGENT

Position 6: MICROPLATE WELL

coated with Cytomegalovirus antigen obtained from the culture of human fibroblasts infected with partially purified and inactivated Cytomegalovirus

Position 5: Uncoated MICROPLATE WELL

Position 4: TMB SUBSTRATE

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/ml and H₂O₂ 0.01% stabilized in 0.05 mol/L citrate buffer (pH 3.8)

Position 3: SAMPLE DILUENT

Contents: Proteic solution containing anti human IgG antibody, phenol 0,05%, Bronidox 0,02% and an indicator to reveal the presence of the serum.

Position 2: CONJUGATE

Contents: anti-human IgM monoclonal antibodies labelled with horseradish peroxidase, in phosphate buffer containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Position 1: EMPTY WELL

In which the operator must place the undiluted serum

Use: equilibrate a package at room temperature, open the package and remove the required devices; replace the others in the bag with the silica gel, expel the air and **seal** by pressing the closure. Store at 2-8°C.

CONFIRM TEST CONFIRMATORY TEST REAGENT

Contents: Freeze-dried antigen from the culture of non infected cells.

Use: read the procedure reported at paragraph 10.1.

CALIBRATOR CALIBRATOR 1 x 0.175 ml

Contents: Diluted human serum containing IgM antibodies anti-Cytomegalovirus and preservative. Liquid, ready for use.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 0.425 ml

Contents: Diluted human serum containing IgM antibodies anti-Cytomegalovirus and preservative. Liquid, ready for use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Chorus/Chorus TRIO Instrument
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 50-200 µl solution
- Disposable gloves
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C. In the case of storage at an incorrect temperature the calibration must be repeated and the run validated using the control serum (see section 9, Test validation).

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

Reagents have a limited stability after opening:

DEVICES	8 weeks at 2/8°C
CALIBRATOR	8 weeks at 2/8°C
POSITIVE CONTROL	8 weeks at 2/8°C
CONFIRMATORY TEST REAGENT	8 weeks at 2/8°C

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice.

Possible consequences, in case of use of other biological liquids, are not known.

The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times.

Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be shaken carefully before use.

Heat-inactivation can rise to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

8. ASSAY PROCEDURE

1. Open the package (on the side containing the pressure-closure), remove the number of devices required and seal the rest in the bag after expelling the air.
2. Check the state of the device according to the indications reported in chapter 4, Analytical Precautions.
3. Dispense 50 µl of undiluted test serum in well no. 1 of each device; at each change of batch, use a device for the calibrator.
4. Place the devices in the Chorus/Chorus TRIO instrument. Perform the calibration (if necessary) and the test as reported in the Instrument Operating Manual.

9. TEST VALIDATION

Use the control serum to check the validity of the results obtained. It should be used as reported in the Instrument Operating Manual. If the instrument signals that the control serum has a value outside the acceptable range, the calibration must be repeated. The previous results will be automatically corrected.

If the result of the control serum continues to be outside the acceptable range, contact the Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION OF THE RESULTS

The Chorus/Chorus TRIO instrument expresses the result in Index (OD sample/OD cut-off).

The test on the examined serum can be interpreted as follows:

POSITIVE: when the result is > 1.1

NEGATIVE: when the result is < 0.9

DOUBTFUL/EQUIVOCAL: for all values between 0.9 and 1.1

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

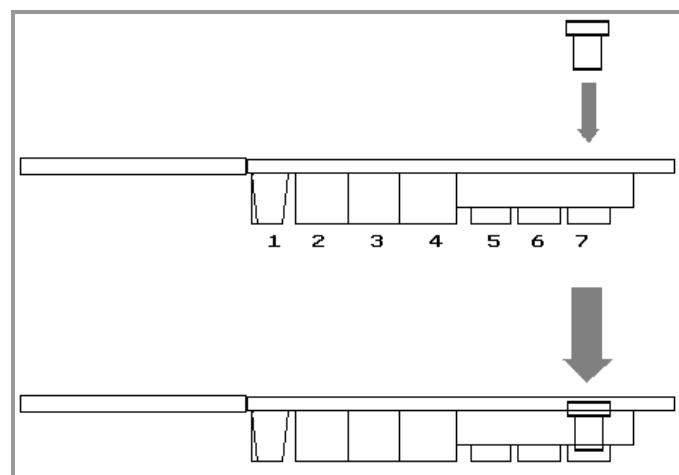
In the case of a positive result, perform the confirmatory test using **the confirmatory test reagent**.

10.1. CONFIRMATORY TEST PROCEDURE

1. Open the packet containing the confirmatory reagent, remove the number of wells required to perform the test, store the remaining wells in the packet and seal with adhesive tape.

2. Place the well of freeze-dried reagent in position 7 of the device, pressing it well down to the bottom (see fig.1).
3. Using a plastic pick, make two holes in the film covering the reagent.
4. Dispense 50 µl of the test sample to be confirmed, in the well containing the lyophilized reagent.
5. Wait 5 minutes before mixing, then mix **very slowly** 2-3 times using a pipette.
6. Dispense the 50 µl in well 1 of the device.
7. Place the devices in the Chorus instrument. Perform the test as reported in the Chorus Instructions Manual.
8. Interpret the results as reported in paragraph 10.

Fig. 1



11. LIMITATIONS

All the values obtained require a careful interpretation that must consider other indicators relative to the patient.

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

The test can not be used alone for a clinical diagnosis and the test result should be evaluated together with the patient history and other clinical diagnostic evaluation.

12. ANALYTICAL SPECIFICITY

36 samples containing:

Rheumatoid Factor (20)
Bilirubin (2.9 mg/dl – 24.9 mg/dl) (7)
Triglycerides (356 mg/dl) (1)
Hemoglobin (8)

were tested.

The presence in the serum sample of the interfering substances described above does not affect the test result.

13. CROSS-REACTIONS

18 samples, positive to Epstein-Barr, Varicella e Herpes simplex were tested.

No significant cross-reactions were found.

14. METHOD COMPARISON

In an experimentation 138 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit.

Data are summarized in the following table:

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	20	2	22
	-	0	116	116
	Total	20	118	138

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):

100% CI_{95%}: 83.9-99.8

Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity):

98.3% CI_{95%}: 94.0-99.5

The agreement between the two methods is excellent with a Cohen's Kappa of 0.96.

15. PRECISION AND REPEATABILITY

Sample	Within-run Precision		Between-run precision	
	Mean Index	CV%	Mean Index	CV%
1	0.3	16.7	0.3	16.7
2	0.6	8.3	0.6	10.0
3	0.8	8.8	0.8	7.5
4	1.2	10.0	1.1	8.2
5	1.3	6.9	1.4	10.0
6	1.6	6.3	1.7	8.8
7	2.5	5.2	2.5	10.0
8	2.9	6.2	2.7	9.3

Sample	Precision between batches/between instruments	
	Mean Index	CV%
1	0.3	16.7
2	0.5	8.0
3	0.8	11.3
4	1.1	8.2
5	1.3	11.5
6	1.6	10.0
7	2.3	9.6
8	2.6	9.2

16. REFERENCES

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early

antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).

5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Zieglermaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



DIESE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





INSTRUCCIONES DE USO

CHORUS CYTOMEGALOVIRUS IgM

Para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM anti-Cytomegalovirus

Sólo para el uso diagnóstico *in vitro*

1. INDICACIONES

Método inmunoenzimático para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM anti-Cytomegalovirus en suero humano con dispositivo desechable aplicado a los equipos Chorus y Chorus TRIO.

2. INTRODUCCIÓN

El Citomegalovirus es un virus herpes que se transmite por contacto humano. La mayoría de casos no presentan síntomas de infección aparentes. Sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos el virus es particularmente grave, pudiendo causar la muerte. Las mujeres seronegativas que contraen esta enfermedad durante el embarazo la pueden transmitir al feto. En el 95% de los casos esto sucede sin consecuencias pero en ocasiones algunos neonatos pueden presentar ictericia, hepato-esplenomegalia y retraso psicomotriz. Por esta razón es importante determinar el título de anticuerpo de la paciente y observar la eventual seroconversión. El título de las IgM específicas es muy importante para el diagnóstico de infección primaria.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El dispositivo Chorus Cytomegalovirus IgM está listo para su uso para la detección de anticuerpos IgM anti-Cytomegalovirus, en los equipos Chorus /Chorus TRIO.

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El antígeno está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno. Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no hayan reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto por anticuerpos monoclonales anti-IgM humanos conjugados con peroxidasa de rábano.

El conjugado que no se haya unido se elimina y se añade el sustrato cromogénico de la peroxidasa. El color azul que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

Para confirmar la especificidad de la respuesta, las muestras que resultaron positivas se subordinan a la prueba confirmatoria: se preincuba el suero examinado con el reactivo "Confirmatory Test Reagent" (fibroblastos humanos no infectados liofilizados) de manera de inhibir por medio de preabsorción, eventuales reacciones no específicas del suero

hacia componentes celulares que contaminan el antígeno CMV no solubilizado en la fase sólida. Después de la preabsorción, las muestras se prueban de nuevo en ELISA con el método descrito previamente. La persistencia de la positividad confirma la presencia de anticuerpos específicos.

Los dispositivos desechables contienen todos los reactivos para realizar la prueba cuando se utilizan con los equipos Chorus/Chorus TRIO.

El resultado se expresa en Index (relación entre el valor en D.O. de la muestra y lo del Cut-Off).

4. PRECAUCIONES

PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

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

Desecho de los residuos: las muestras de suero, los calibradores y las tiras utilizadas se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, de acuerdo con las disposiciones normativas vigentes.

Advertencias para la seguridad personal

1. No pipetear por vía oral.
2. Usar guantes desechables y protección para los ojos al manipular muestras.
3. Lavarse bien las manos una vez introducidos los dispositivos en el instrumento Chorus/Chorus TRIO.
4. Sobre las características de seguridad de los reactivos contenidos en el kit, consultar la Ficha de Seguridad (disponible bajo solicitud).
5. Los ácidos neutralizados y otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1.0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada debe ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1%, antes de continuar con el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que se limpie la zona. Todos los materiales utilizados para limpiar vertidos, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso; utilizar en 60 minutos.

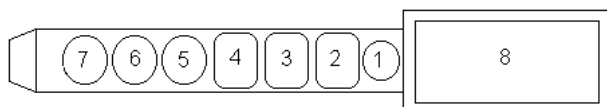
1. **Desechar los dispositivos con sustrato (pocillo 4) de color azul.**
2. Añadiendo la muestra al pocillo, comprobar que esté bien distribuida en el fondo.
3. Comprobar la presencia de los reactivos en el dispositivo y que éste no esté dañado. No utilizar dispositivos que, en el control visual, presenten falta de algún reactivo y/o cuerpos extraños en el pocillo de reacción.
4. Los dispositivos se deben utilizar junto con el equipo Chorus/Chorus TRIO, siguiendo rigurosamente las Instrucciones de Uso y el Manual del Usuario del equipo.
5. Comprobar que las opciones del equipo Chorus/Chorus TRIO sean correctas (ver Manual del Usuario).
6. No modificar el código de barras colocado en el asa del dispositivo a fin de garantizar la lectura correcta.
7. Evitar el uso de congeladores autodescongelantes para la conservación de las muestras.
8. Los códigos de barras dañados se pueden colocar en el equipo manualmente (ver Manual del Usuario).
9. No exponer los dispositivos a luz intensa ni a humos de hipoclorito durante su conservación y/o uso.
10. El uso de muestras altamente hemolizadas, lipémicas, ictericas, de suero no coagulado completamente o de muestras que presenten contaminación microbiana puede ser fuente de error.
11. No utilizar el suero después de la fecha de caducidad.
12. **Comprobar que el aparato esté conectado con la Washing Buffer (Ref. 83606).**

5. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reactivos suficientes para 36 determinaciones.

DD DISPOSITIVOS 6 envases con 6 dispositivos cada uno

Descripción:



Posición 8: Espacio para etiquetas con código de barras

Posición 7: Pocillo por el CONFIRMATORY TEST REAGENT

Posición 6: POCILLO DE MICROPLACA sensibilizado con antígeno del Cytomegalovirus obtenido de culturas de fibroblastos humanos infectadas por Cytomegalovirus parcialmente purificado e inactivo

Posición 5: POCILLO DE MICROPLACA

No sensibilizado.

Posición 4: SISTRATO TMB

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

Posición 3: DILUYENTE PARA MUESTRAS

Contenido: Solución de proteínas, con anti-IgG humanas, fenol al 0.05%, Bronidox 0.02% y un marcador para indicar la presencia de suero

Posición 2: CONJUGADO

Contenido: anticuerpos monoclonales anti-IgM humanos marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada con fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%.

Posición 1: POCILLO LIBRE

Donde el usuario dispensa el suero sin diluir.

Uso: equilibrar un envase a temperatura ambiente, abrir el envase y retirar los dispositivos necesarios; colocar los dispositivos no utilizados en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y **cerrar** presionando el cierre. Conservar a 2/8°C.

CONFIRM TEST TEST DE CONFIRMACION

Contenido: Liofilizado de antígeno de culturas de células no infectadas.

Uso: leer las instrucciones al punto 10.1

CALIBRATOR CALIBRADOR 1 x 0.175 ml

Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgM anti-Cytomegalovirus y conservante. Líquido, listo para su uso.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 0.425 ml

Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgM anti-Cytomegalovirus y conservante. Líquido, listo para su uso.

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS:

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Equipo Chorus/Chorus TRIO
- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 50-200 µl
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (5%)
- Envases para la recogida de materiales potencialmente infecciosos

6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. En caso de una errónea temperatura de conservación, la calibración debe ser repetida y la validez del resultado debe ser verificada por medio del suero de control (ver capítulo 9, "Validación de la prueba").

La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

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

DISPOSITIVOS	8 semanas a 2/8°C
CALBRADOR	8 semanas a 2/8°C
CONTROL POSITIVO	8 semanas a 2/8°C
CONFIRMATORY TEST	
REAGENT	8 semanas a 2/8°C

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio.

No se conocen las consecuencias del uso de otros líquidos biológicos.

El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a -20°C.

La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces.

No deben ser utilizados congeladores autodescongelantes para la conservación de la muestra. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso.

La inactivación por calor puede dar resultados erróneos. La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

8. PROCEDIMIENTO

1. Abrir el envase (por el lado del cierre a presión), retirar los dispositivos necesarios para ejecutar las pruebas y conservar los demás en el envase, extraer el aire y cerrar presionando el cierre.
2. Comprobar visualmente el estado del dispositivo según las indicaciones del capítulo 4, "Precauciones".
3. Dispensar 50 µl de suero no diluido en el pocillo n°1 de cada dispositivo. Por cada cambio de lote utilizar un dispositivo para el calibrador.
4. Colocar los dispositivos en el equipo Chorus/Chorus TRIO. Ejecutar la calibración (si fuera necesario) y el test según indicaciones del Manual del Usuario del equipo.

9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Utilizar el suero de control para verificar la validez del resultado obtenido, procesándolo según indicaciones del Manual del Usuario del equipo. Si el equipo indica que el suero de control tiene un valor fuera de los límites de aceptabilidad, es necesario realizar de nuevo la calibración. Los resultados previos se corregirán automáticamente.

Si el resultado del suero de control continúa estando fuera del rango de aceptabilidad, contactar con Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El equipo Chorus/Chorus TRIO proporciona un resultado en Index (relación entre el valor en D.O. de la muestra y el del Cut-Off).

La prueba del suero examinado se puede interpretar de la manera siguiente:

POSITIVO cuando el resultado es > 1.1

NEGATIVO cuando el resultado es < 0.9

DUDOSO/EQUIVOCO cuando el resultado está entre 0.9 y 1.1

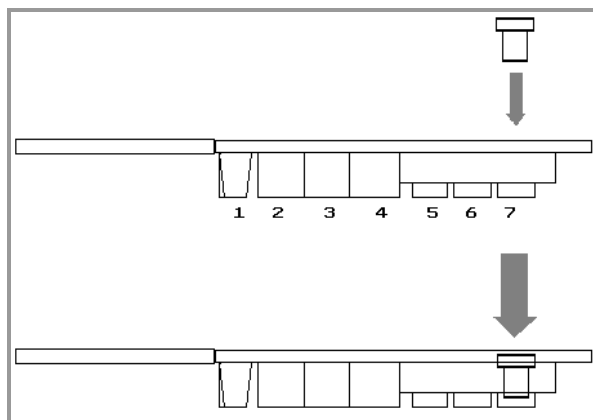
En caso de un resultado dudoso/equívoco se aconseja repetir la prueba. Si el resultado continúa siendo dudoso/equívoco, tomar una nueva muestra.

En caso de resultado positivo, ejecutar el test de confirmación utilizando el **confirmatory test reagent**.

10.1.1 PROCEDIMIENTO TEST DE CONFIRMACIÓN

1. Abrir el envase que contiene el reactivo de confirmación, retirar los dispositivos necesarios para ejecutar las pruebas y conservar los otros en el envase, cerrándolo con cinta adhesiva.
2. Colocar el pocillo del liofilizado en la posición 7 del dispositivo bloqueándolo presionando hasta el fondo (ver fig. 1).
3. Con un palito de plástico, hacer dos agujeros sobre la película del liofilizado.
4. Dispensar 50 µl de la muestra a confirmar en el pocillo de liofilizado.
5. Esperar 5 minutos sin agitar, luego mezclar 2 o 3 veces **muy despacio** utilizando una pipeta.
6. Dispensar 50 µl en el pocillo 1 del dispositivo.
7. Colocar los dispositivos en el equipo Chorus. Ejecutar la prueba según las indicaciones del Manual del Usuario Chorus.
8. Interpretar los resultados como reportado en el punto 10.

Fig.1



11. LIMITACIONES

Todos los valores obtenidos precisan una atenta interpretación que no prescinda de otros indicadores relativos al mismo paciente.

Debido a todas las complicaciones del diagnóstico serológico de la infección congénita, el aislamiento del virus de la orina durante la primera semana de vida sigue siendo la mejor manera de diagnosticar la infección intrauterina. La ausencia de IgM específica anti-CMV no excluye la presencia de una infección provocada por CMV. Se ha comprobado que el 10-30% de niños no desarrollan una respuesta de anticuerpos anticorporal anti-CMV de tipo IgM, a pesar de la presencia de la infección congénita.

Este test no debe ser la única prueba utilizada para el diagnóstico clínico. El resultado de la prueba se debe evaluar junto con los datos clínicos y otros procedimientos de diagnóstico.

12. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 36 muestras contenentes:

Factor reumatoide (20)

Bilirrubina (2.9 mg/dl – 24.9 mg/dl) (7)

Triglicéridos (356 mg/dl) (1)

Hemoglobina (8)

La presencia en el suero de las sustancias interferentes antes mencionadas no afecta el resultado del test.

13. REACCIONES CRUZADAS

18 muestras, positivas en Epstein-Barr, Varicella e Herpes simplex fueron testadas.

No se detectaron reacciones cruzadas significativas.

14. ESTUDIOS DE COMPARACIÓN

En una prueba, se analizaron 138 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.

A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	20	2	22
	-	0	116	116
	Total	20	118	138

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de Diagnóstico):

100% CI_{95%}: 83.9-99.8

Percent Negative Agreement: (~Especificidad de Diagnóstico):

98.3% CI_{95%}: 94.0-99.5

El grado de concordancia entre los dos métodos resulta excelente y, con un valor de K (constante de Cohen) de 0.96.

15. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

Muestra	INTRA-ENSAYO		ENTRE ENSAYOS	
	Media Index	CV%	Media Index	CV%
1	0.3	16.7	0.3	16.7
2	0.6	8.3	0.6	10.0
3	0.8	8.8	0.8	7.5
4	1.2	10.0	1.1	8.2
5	1.3	6.9	1.4	10.0
6	1.6	6.3	1.7	8.8
7	2.5	5.2	2.5	10.0
8	2.9	6.2	2.7	9.3

Muestra	ENTRE LOTES/ ENTRE EQUIPOS	
	Media Index	CV%
1	0.3	16.7
2	0.5	8.0
3	0.8	11.3
4	1.1	8.2
5	1.3	11.5
6	1.6	10.0
7	2.3	9.6
8	2.6	9.2

16. BIBLIOGRAFÍA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmair et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





INSTRUÇÕES PARA O USO

CHORUS CYTOMEGALOVIRUS IgM

Para a determinação qualitativa dos anticorpos IgM anti-Cytomegalovirus

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

1. UTILIZAÇÃO

Método imunoenzimático para a determinação qualitativa dos anticorpos IgM anti-Cytomegalovirus no soro humano com um dispositivo descartável aplicado nos instrumentos Chorus e Chorus TRIO.

2. INTRODUÇÃO

O citomegalovírus (CMV) é um vírus herpético transmitido por meio de contato direto entre os seres humanos. Na maioria dos casos os pacientes são infectados em forma assintomática. O vírus, pelo contrário, é muito perigoso em pacientes imunodeficientes, que podem morrer. Mulheres soronegativas, infectadas durante a gravidez podem transmiti-la ao feto. No 95% dos casos este acontece sem consequências, mas nos recém nascidos sintomáticos pode ocorrer itero, hepato-splenomegalia e retardo psíquico motorio. Por este motivo é muito importante conhecer a situação imunitária da paciente e observar a eventual soroconversão. A detecção das IgM específicas é de grande importância na diagnose de infecção primaria.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O dispositivo Chorus Cytomegalovirus IgM está pronto para ser utilizado na determinação dos anticorpos IgM anti-Cytomegalovirus, nos instrumentos Chorus/Chorus TRIO.

O teste baseia-se no princípio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). O antígeno é ligado à fase sólida. As imunoglobulinas específicas ligam-se ao antígeno por incubação com soro humano diluído. Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, efetua-se a incubação com o conjugado constituído por anticorpos monoclonais anti IgM humanos conjugados com peroxidase de rábano. Elimina-se o conjugado que não se ligou e acrescenta-se o substrato para a peroxidase. A cor azul que se forma é proporcional à concentração dos anticorpos específicos presentes no soro analisado.

Para confirmar a especificidade da resposta, as amostras com resultado positivo são submetidas ao Confirmatory test: o soro em exame é pré-incubado com o reactivo "Confirmatory Test Reagent" (fibroblastos humanos não infectados liofilizados) de modo a inibir, com o pré-absorvimento, possíveis reacções inespecíficas do soro contra componentes celulares contaminantes o antígeno CMV insolubilizado na fase sólida.

Após o pré-absorvimento, as amostras são testadas novamente em ELISA com o método descrito anteriormente. A persistência de positividade confirma a presença de anticorpos específicos.

Os dispositivos descartáveis contêm todos os reagentes para executar o teste, quando aplicados aos instrumentos Chorus/Chorus TRIO.

O resultado é expresso em Índice (razão entre o valor em OD da amostra e o do Cut-Off).

4. PRECAUÇÕES

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Este kit contém materiais de origem humana com os quais foram testados com os testes aprovados pela FDA e os resultados foram negativos para a presença de HBsAg, anticorpos anti-HIV-1, anti HIV-2 e anti-HCV. Visto que nenhum teste de diagnóstico pode oferecer uma garantia completa em relação à ausência de agentes infecciosos, todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infectados. Todos os reagentes e as amostras devem ser manuseados conforme as regras de segurança definidas em cada laboratório.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro, os calibradores e as tiras usadas devem ser tratadas como resíduos infectados e, portanto, devem ser eliminados de acordo com as disposições de lei em vigor.

Advertências para a segurança individual

1. Não pipetar com a boca.
 2. Usar luvas descartáveis e uma protecção para os olhos quando manusear as amostras.
 3. Lavar muito bem as mãos ao inserir os dispositivos no instrumento Chorus/Chorus TRIO.
 4. Em mérito às características de segurança dos reagentes contidos no kit, consultar a Ficha de Segurança (Disponível a pedido).
 5. Os ácidos neutralizados e os outros resíduos líquidos devem ser desinfectados adicionando um volume de hipoclorito de sódio suficiente para obter uma concentração final pelo menos de 1%. A exposição ao hipoclorito de sódio a 1% durante 30 minutos deverá ser suficiente para garantir uma desinfeção eficaz.
 6. Eventuais derramamentos de materiais potencialmente infecciosos devem ser absorvidos imediatamente com papel absorvente e a área afectada deverá ser descontaminada, por exemplo com hipoclorito de sódio a 1%, antes de continuar o trabalho. Se estiver presente um ácido, o hipoclorito de sódio não pode ser usado antes de enxugar a área.
- Todos os materiais usados para descontaminar eventuais derramamentos acidentais, incluindo as luvas, devem ser eliminados como lixo potencialmente infectado.
- Não esterilizar na autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

Advertências analíticas

Antes do uso, deixar que os dispositivos a utilizar se estabilizem em temperatura ambiente (18-30°C) e utilizar no prazo de 60 minutos.

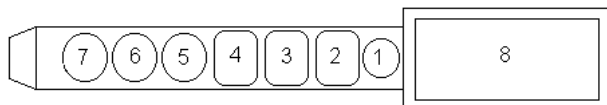
1. **Deitar fora os dispositivos com substrato (poço 4) azul.**
2. Adicionando a amostra ao poço, verificar se está distribuído perfeitamente no fundo.
3. Verificar a presença efetiva dos reagentes no dispositivo e a integridade do mesmo. Não usar dispositivos que, ao efetuar a verificação visual, demonstrem a falta de alguns reagentes e/ou apresentam corpos estranhos no poço de reação.
4. Os dispositivos devem ser utilizados exclusivamente com o instrumento Chorus/Chorus TRIO, seguindo rigorosamente as Instruções de Utilização e o Manual de Utilização do instrumento.
5. Verificar se o instrumento Chorus/Chorus TRIO foi programado corretamente (ver o Manual de Utilização).
6. Não alterar o código de barras no punho do dispositivo, para permitir uma correta leitura por parte do instrumento.
7. Evitar o uso de congeladores no frost para a conservação das amostras.
8. Códigos de barras com defeitos podem ser inseridos manualmente no instrumento (ver o Manual de Utilização).
9. Durante o uso e a conservação, não expor os dispositivos a forte luz ou a vapores de hipoclorito.
10. Amostras fortemente hemolisadas, lipêmicas, ictericas, de soro não coagulado completamente ou amostras com contaminação bacteriana podem gerar resultados errados.
11. Não usar o dispositivo depois da data de validade.
12. **Verificar se o instrumento possui a conexão ao Washing Buffer (Ref. 83606).**

5. COMPOSIÇÃO DO KIT E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

O kit é suficiente para 36 determinações

DD DISPOSITIVOS 6 embalagens de 6 dispositivos cada

Descrição:



Posição 8: Espaço livre para rótulo com código de barras

Posição 7: POÇO para CONFIRMATORY TEST REAGENT

Posição 6: POÇO DE MICROPLACA

Sensibilizada com antígeno de Citomegalovírus proveniente de cultura de fibroblastos humanos infectados com Citomegalovírus parcialmente purificado e tornado inativo

Posição 5: POÇO DE MICROPLACA

Não sensibilizado.

Posição 4: SUBSTRATO TMB

Conteúdo: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL e H₂O₂ 0.01% estabilizados em tampão citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

Posição 3: DILUENTE PARA AS AMOSTRAS

Conteúdo: Solução protéica, contendo anti-IgG humanas, fenol 0.05%, Bronidox 0.02% e um indicador para revelar a presença de soro.

Posição 2: CONJUGADO

Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-IgM humanas marcados com peroxidase, em solução tampão de fosfato com fenol 0.05% e Bronidox 0.02%.

Posição 1: POÇO VAZIO

No qual o utilizador deve dispensar o soro não diluído.

Uso: estabilizar um pacote em temperatura ambiente, abrir o pacote, retirar os dispositivos necessários; colocar os restantes no pacote com o gel de sílica, esvaziar o ar e **fechar** o pacote premindo o fecho. Conservar entre 2 e 8°C.

CONFIRM TEST TESTE DE CONFIRMAÇÃO

Conteúdo: liófilo de antígeno proveniente de culturas de células não infectadas.

Modo de usar: ler o procedimento do ponto 10.1

CALIBRATOR CALIBRADOR 1 x 0.175 mL

Conteúdo: Soro humano diluído que contém anticorpos IgM anti-Cytomegalovirus e conservante. Líquido, pronto a usar.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 0.425 ml

Conteúdo: Soro humano diluído que contém anticorpos IgM anti-Cytomegalovirus e conservante. Líquido, pronto a usar.

OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS:

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Instrumento Chorus/Chorus TRIO
- Água destilada ou deionizada
- Vidros normais de laboratório: cilindros, provetas, etc.
- Micropipetas com capacidade para recolher com precisão volumes de 50 a 200 µl
- Luvas descartáveis
- Solução de hipoclorito de sódio 5%
- Recipientes para a recolha de materiais potencialmente infectados

6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes devem ser conservados entre 2 e 8°C. Em caso de temperatura de conservação errada, é necessário repetir a calibração e verificar a exatidão do resultado por meio do soro de controlo (consultar o capítulo 9 - Validação do teste).

A data de validade está impressa em cada componente e no rótulo externo da embalagem.

Os reagentes têm uma estabilidade limitada depois da abertura e/ou da preparação:

DISPOSITIVOS	8 semanas entre 2 e 8°C
CALIBRADOR	8 semanas entre 2 e 8°C
CONTROLO POSITIVO	8 semanas entre 2 e 8°C
CONFIRMATORY	
TEST REAGENT	8 semanas a 2/8°C

7. TIPO DE AMOSTRAS E CONSERVAÇÃO

O tipo de amostra é representado por soro, obtido de sangue recolhido das veias e manuseado de acordo com os procedimentos standard de laboratório.

Não são conhecidas as consequências provocadas pelo uso de outros líquidos biológicos.

O soro fresco pode ser conservado durante 4 dias entre 2 e 8°C; para períodos de conservação mais prolongados, congelar a -20°C.

A amostra pode ser descongelada até um máximo de 3 vezes. Evitar o uso de congeladores no frost para a conservação das amostras. Depois de descongelar, misturar cuidadosamente antes da dosagem.

A inativação de calor pode levar a resultados errados. A qualidade das amostras pode ser gravemente influenciada pela contaminação bacteriana, que pode gerar resultados errados.

8. PROCEDIMENTO DO TESTE

1. Abrir o pacote (do lado da fechadura por pressão), retirar o número de dispositivos necessários para os testes e conservar os restantes no pacote, esvaziar o ar e fechar o pacote.
2. Verificar visualmente as condições do dispositivo de acordo com as indicações do capítulo 4, "Precauções Analíticas".
3. Distribuir no poço 1 de cada dispositivo 50 µl de soro não diluído a testar; em cada mudança de lote utilizar um dispositivo para o calibrador.
4. Inserir o dispositivo no instrumento Chorus/Chorus TRIO. Efetuar a calibração (se necessário) e o teste como definido no Manual do Instruções do instrumento.

9. VALIDAÇÃO DO TESTE

Utilizar o soro de controlo positivo para verificar a exatidão do resultado obtido, testando-o de acordo com as indicações no Manual de Utilização do instrumento. Se o equipamento assinalar que o soro de controlo está fora do limite de aceitação, é necessário efetuar novamente a calibração. Os resultados anteriores serão corrigidos automaticamente.

Se o resultado do soro de controlo continuar fora do intervalo de aceitação, contatar o Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAÇÃO DO TESTE

O instrumento Chorus/Chorus TRIO fornece um resultado em Índice (razão entre o valor em OD da amostra e o do Cut-Off).

O teste do soro analisado pode ser interpretado como segue:

POSITIVO quando o resultado for > 1.1

NEGATIVO quando o resultado for < 0.9

INCERTO/EQUIVOCADO quando o resultado estiver entre 0.9 e 1.1

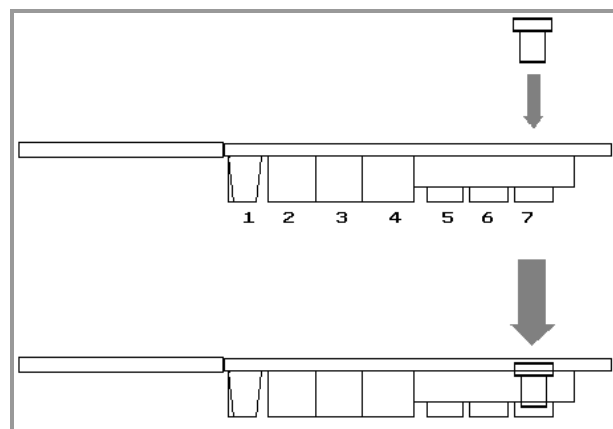
Repetir o teste em caso de resultado incerto/equivocado. Se o resultado continuar incerto/equivocado, repetir a recolha.

Em caso de resultado positivo, realize a análise de confirmação com o **reagente para o teste de confirmação**.

10.1 PROCEDIMENTO DA ANÁLISE DE CONFIRMAÇÃO

1. Abra o envelope que contém o reagente para a confirmação, pegue o número necessário de microcavidades para realizar as análises e conserve as outras, fechando o envelope com fita adesiva.
2. Coloque a microcavidade do líofilo na posição 7 do dispositivo e prima até o fundo (veja fig. 1).
3. Efectue dois furos na película do líofilo com uma ponta de plástico.
4. Introduza na microcavidade 50µl da amostra a ser confirmada.
5. Espere 5 minutos sem agitar; em seguida, misture 2 ou 3 vezes **muito lentamente**, utilizando uma pipeta.
6. Introduza agora os 50µl na microcavidade 1 do dispositivo.
7. Insira os dispositivos no instrumento Chorus. Realize o teste conforme as indicações do Manual de Instruções do instrumento.
8. Interpretação dos Resultados de acordo com o ponto 10.

Fig. 1



11. LIMITAÇÕES DO TESTE

Todos os valores obtidos necessitam de uma interpretação atenta independentemente dos outros indicadores relativos ao mesmo paciente.

A diagnose sorológica da infecção congênita é muito difícil, portanto o isolamento viral das urinas, durante a primeira semana de vida, continua sendo a técnica mais certa para diagnosticar uma infecção intra-uterina. A ausência das IgM específicas anti-CMV, não exclui a presença de uma infecção de CMV. Foi reportado que 10-30% dos recém nascidos não desenvolvem uma resposta anticorpal anti-CMV de tipo IgM, apesar da presença de infecção congênita.

O teste por si só não pode ser utilizado para um diagnóstico clínico definitivo e o resultado do teste deve ser sempre avaliado juntamente com os dados provenientes da anamnese do paciente e/ou com outros procedimentos diagnósticos.

12. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 36 amostras contendo:

Fator Reumatoide (20)
Bilirrubina (2.9 mg/dl – 24.9 mg/dl) (7)
Triglicéridos (356 mg/dl) (1)
Hemoglobina (8)

A presença, no soro em análise, das substâncias interferentes acima referidas não altera o resultado do teste.

13. REAÇÕES CRUZADAS

Foram testadas 18 amostras, positivas em Epstein-Barr, Varicella e Herpes simplex.

Não foram detectadas reações cruzadas significativas.

14. ESTUDOS DE COMPARAÇÃO

Numa experimentação, foram analisadas 138 amostras foram analisadas com o kit Diesse e com um outro kit do mercado.

Esquematizam-se, de seguida, os dados da experimentação:

		Referência		
		+	-	Total
Diesse	+	20	2	22
	-	0	116	116
	Total	20	118	138

Percent Positive Agreement (~Sensibilidade Diagnóstica):

100% CI_{95%}: 83.9-99.8

Percent Negative Agreement: (~Especificidade Diagnóstica):

98.3% CI_{95%}: 94.0-99.5

15. PRECISÃO E REPETIBILIDADE

Amostra	No Ensaio		Entre Ensaios	
	Média Index	CV%	Média Index	CV%
1	0.3	16.7	0.3	16.7
2	0.6	8.3	0.6	10.0
3	0.8	8.8	0.8	7.5
4	1.2	10.0	1.1	8.2
5	1.3	6.9	1.4	10.0
6	1.6	6.3	1.7	8.8
7	2.5	5.2	2.5	10.0
8	2.9	6.2	2.7	9.3

Amostra	Entre Lotes/ Entre Equipamentos	
	Média Index	CV%
1	0.3	16.7
2	0.5	8.0
3	0.8	11.3
4	1.1	8.2
5	1.3	11.5
6	1.6	10.0
7	2.3	9.6
8	2.6	9.2

16. BIBLIOGRAFIA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Zieglermaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy



	EN Date of manufacture ES Fecha de fabricación IT Data di fabbricazione	FR Date de fabrication GR Ημερομηνία Παραγωγής PT Data de fabrico
	EN Use By ES Fecha de caducidad IT Utilizzare entro	FR Utiliser jusqu'e GR Ημερομηνία λήξης PT Prazo de validade
	EN Do not reuse ES No reutilizar IT Non riutilizzare	FR Ne pas réutiliser GR Μην κάνετε επαναληπτική χρήση PT Não reutilizar
	EN Caution, consult accompanying documents ES Atención, ver instrucciones de uso IT Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR Attention voir notice d'instructions GR Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα PT Atenção, consulte a documentação incluída
	EN Manufacturer ES Fabricante IT Fabbicante	FR Fabricant GR Κατασκευαστής PT Fabricante
	EN Contains sufficient for <n> tests ES Contenido suficiente para <n> ensayos IT Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR Contenu suffisant pour "n" tests GR Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις PT Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN Temperature limitation ES Límite de temperatura IT Limiti di temperatura	FR Limites de température GR Περιορισμοί θερμοκρασίας PT Limites de temperatura
	EN Consult Instructions for Use ES Consulte las instrucciones de uso IT Consultare le istruzioni per l'uso	FR Consulter les instructions d'utilisation GR Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης PT Consulte as instruções de utilização
	EN Biological risks ES Riesgo biológico IT Rischio biologico	FR Risques biologiques GR Βιολογικοί κίνδυνοι PT Risco biológico
	EN Catalogue number ES Número de catálogo IT Numero di catalogo	FR Référence du catalogue GR Αριθμός καταλόγου PT Referência de catálogo
	EN In Vitro Diagnostic Medical Device ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR Dispositif médical de diagnostic in vitro GR In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν PT Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN Batch code ES Código de lote IT Codice del lotto	FR Code du lot GR Αριθμός Παρτίδας PT Código do lote