

CMV-IgM-ELA Test PKS medac

Deutsch



HERSTELLER

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

www.medac-diagnostika.de
E-Mail: diagnostics@medac.de
Tel.: ++49/4103/8006-0
Fax: ++49/4103/8006-359

BESTELLADRESSE

E-Mail: auftrag@medac.de
Tel.: ++49/4103/8006-111
Fax: ++49/4103/8006-113

CMV-IgM-ELA Test PKS medac

Enzymimmunoassay mit Pipettier-Kontroll-System zur qualitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das Cytomegalie-Virus (CMV) in Serum und EDTA-Plasma

Katalog-Nr.: 110-PKS

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

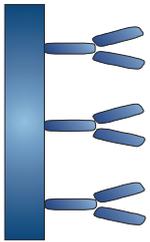
Das humanpathogene Cytomegalie-Virus (CMV) wird der Familie der *Herpesviridae* zugeordnet, welche sich durch ein doppelsträngiges DNA-Genom auszeichnen. Typisch für diese Viren ist, daß sie nach einer Primärinfektion latent im Organismus verbleiben. Daher kann es unter bestimmten Umständen zu einer Reaktivierung des Virus kommen.

CMV-Infektionen verlaufen bei immunkompetenten Personen in der Regel unauffällig. Bei Personen mit eingeschränkter Immunität (z.B. Transplantationspatienten, HIV-Infizierte, Tumorpatienten, Neugeborene) werden jedoch schwerwiegende Symptome vielfältiger Art beobachtet.

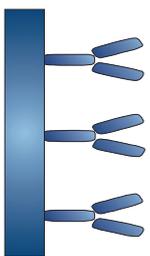
Besondere Bedeutung kommt dem CMV als häufiger Erreger pränataler Infektionen zu. Eine derartige Infektion kann zu schweren Schädigungen des Kindes führen, wobei auch bei symptomlos geborenen Kindern Spätschäden nicht ausgeschlossen sind.

Der CMV-IgM-ELA Test PKS medac ist zum Nachweis spezifischer CMV-IgM-Antikörper geeignet. Eine akute CMV-Infektion kann durch den Nachweis von IgM-Antikörpern diagnostiziert werden. Dabei ist zu beachten, daß nicht immer IgM-Antikörper gebildet werden. So sind bei Reaktivierungen und Reinfektionen bei immunsupprimierten Patienten nur selten CMV-IgM-Antikörper nachweisbar.

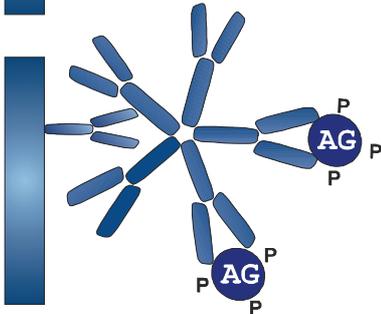
TESTPRINZIP



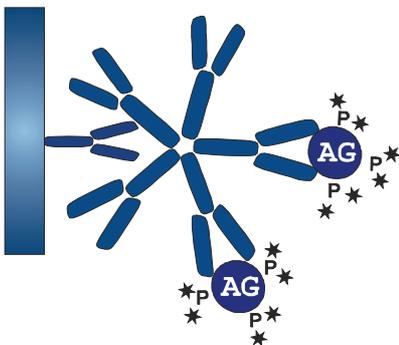
Mit Anti-Human-IgM beschichtete Mikrotiterplatte.



Die IgM-Fraktion aus der Patientenprobe wird auf der Mikrotiterplatte gebunden.



Die Anti-CMV-IgM-Antikörper binden das Peroxidase-konjugierte CMV-IgM-ELA (AG = Antigen, P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

Testvorteile

- ☞ Keine unspezifischen Reaktionen und falsch positiven Ergebnisse durch Rheumafaktoren.
- ☞ Keine Blockade der IgM-Antikörper durch hohe IgG-Titer.
- ☞ Durch das Pipettier-Kontroll-System kann jeder einzelne Pipettierschritt durch Farbumschlag visuell überprüft werden.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.

PACKUNGSINHALT

KAT.- NR.: 110-PKS

1. **MTP**
Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen (bedruckt mit **CMM**, mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit Ziege-Anti-Human-IgM-Antikörpern, BSA und pH-Indikator, gebrauchsfertig.
2. **CONTROL -**
Negative Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol (0,09 %), ProClin™ 300 (< 0,0015 % CMIT/MIT)^{1,2} und Gentamycinsulfat (0,005 %).
3. **CONTROL +**
Positive Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol (0,09 %), ProClin™ 300 (< 0,0015 % CMIT/MIT)^{1,2} und Gentamycinsulfat (0,005 %).
4. **WB**
Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, 0,1 M PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300 (0,017 % CMIT/MIT)¹.
5. **VIR-DIL**
Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, 0,01 M PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300 (0,008 % CMIT/MIT)¹.
6. **ANTIGEN**
CMV-IgM-ELA (Enzyme Labelled Antigen): 2 Fläschchen à 5,0 ml, lyophilisiert, enthält FKS, rot gefärbt, HRP-konjugiert.
7. **TMB**
TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
8. **STOP**
Stopplösung: 2 Fläschchen à 11 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.
Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.



¹ Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).

² Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich (s. CD-ROM).

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Testkit	ungeöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2...8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	6 Wochen
Kontrollen	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
CMV-IgM-ELA	gelöst	2...8 °C	26 Stunden
		≤ -18 °C *	2 Wochen
TMB-Substrat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum

* Aliquotieren und nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren.

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 - 650 nm.

3. ANSETZEN DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden, um z. B. eine Kondenswasserbildung zu vermeiden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen s. Punkt 1.

Hinweis: Die Mikrotitervertiefungen weisen einen leicht grünlichen Farbton auf. Ggf. auftretende grünlich-braune Flecken in den Vertiefungen sind produktionsbedingt und stören den Test nicht.

3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10x) wird mit 9 Teilen destilliertem/deionisiertem Wasser angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10x) mit 450 ml Wasser). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

Evtl. im Waschpuffer (10x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.

3.3. CMV-IgM-ELA

Das Lyophilisat wird mit jeweils 5,0 ml **Probenverdünnungspuffer** aufgelöst. Die verschlossenen Fläschchen werden leicht geschwenkt, so daß auch am Verschuß haftende Partikel in Lösung gebracht werden.

Nach dem Auflösen ist das CMV-IgM-ELA rot gefärbt und gebrauchsfertig.

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, CMV-IgM-ELA) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen. Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung für alle virologischen Tests von medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum und EDTA-Plasma. Die Patientenproben können für 7 Tage bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung sollte bei ≤ -20 °C erfolgen. Mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren der Proben ist zu vermeiden.

4.2. Eine Vorbehandlung der Proben, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.

4.3. Die Proben werden 1 : 100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Zur Titerbestimmung können die Proben beliebig weiterverdünnt werden.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

- 5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

- 5.2. Die Vertiefung A1 bleibt frei für die Ermittlung des Leerwertes (s. 6.A.). Jeweils 50 µl der Proben sowie in Doppelbestimmung negative Kontrolle und positive Kontrolle in die Vertiefungen der Platte pipettieren.

Nach dem Pipettieren der Proben (pH-neutrale bzw. basische Flüssigkeiten) kommt es zu einer Blaufärbung. Erfolgt in einer Vertiefung kein Farbumschlag, so ist dies ein Hinweis darauf, daß keine Probe bzw. keine Kontrolle pipettiert wurde.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer für maximal 30 min bei RT oder für 60 min bei 2 - 8 °C gelagert werden.

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).

- 5.4. Auflösen des CMV-IgM-ELA (s. 3.3.).

- 5.5. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

- 5.6. CMV-IgM-ELA (rot gefärbt) in alle Vertiefungen (außer A1) pipettieren.

Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 µl ELA pro Vertiefung pipettiert.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl ELA pro Vertiefung zu programmieren.

Die grundsätzliche Eignung des Testes für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystem zu verifizieren.

- 5.7. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.8. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.5.).
- 5.9. 50 μ l TMB-Substrat in jede Vertiefung (auch A1) pipettieren und 30 min (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.10. Durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung in jede Vertiefung (auch A1) wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind.

Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen.

5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Probe
Negative Kontrolle	-	50 μ l	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 μ l	-
Probe	-	-	-	50 μ l
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 μ l Waschpuffer waschen				
CMV-IgM-ELA	-	50/60 μ l*)	50/60 μ l*)	50/60 μ l*)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 μ l Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren				
Stopplösung	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620 - 650 nm)				

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.6.)

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 - 650 nm).
 - * Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.
 - * Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß **< 0,100** betragen. Der OD-Mittelwert der **positiven Kontrolle** muß **> 0,800** betragen.
 - * **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,140**
 - * **Grenzbereich = Cut-off ± 10 %**
- Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden.**

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- * Proben mit OD-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.
- * Proben mit OD-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet. Werte im Grenzbereich sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.
- * Proben mit OD-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** bewertet.
- * Die Testergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.
- * Kreuzreaktivitäten, die durch Antikörper gegen andere Herpesviren hervorgerufen werden, können in Einzelfällen nicht ausgeschlossen werden.
- * Sehr stark erhöhte Lipidwerte können bei negativen Proben zu falsch positiven Ergebnissen führen. Hohe Hämoglobin- und Bilirubinkonzentrationen beeinflussen die Testergebnisse nicht.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

7.A. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

482 Seren von Blutspendern und Patienten wurden mit Hilfe des CMV-IgM-ELA Tests PKS medac im Vergleich zu einem hoch-spezifischen ELISA als Referenztest, welcher in der Laborroutine eingesetzt wird, getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Vier-Felder-Tafel dargestellt.

		Referenztest	
		negativ	positiv
CMV-IgM-ELA Test PKS	negativ	314	1
	positiv	1	166

Sensitivität = 99,40 %

Spezifität = 99,68 %

Positiver Vorhersagewert: 99,40 %

Negativer Vorhersagewert: 99,68 %

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	Ø OD	S	VK (%)	n		Ø OD	S	VK (%)
NK	0,034	0,005	15	24	NK	0,050	0,010	20
GW	0,314	0,013	4	24	GW	0,230	0,021	9
PK	2,269	0,048	2	24	PK	1,456	0,064	4
Nr. 1	0,049	0,008	16	27	Nr. 4	0,058	0,007	12
Nr. 2	0,317	0,023	7	27	Nr. 5	0,264	0,037	14
Nr. 3	2,673	0,086	3	27	Nr. 6	0,271	0,039	14
					Nr. 7	1,788	0,073	4

NK = Negative Kontrolle; GW = Schwach Positive Kontrolle (im Kit nicht enthalten); PK = Positive Kontrolle

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- * Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- * Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

Ausgabedatum: 01.04.2018

LITERATUR

Enders, G.: Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft. Urban und Schwarzenberg, München, 9-30 (1990).

Flik, J.: A comparison of 2 quantitative ELISAs used to detect IgG antibodies against HCMV in transplant recipients. Poster presented at the 5th Int. Cytomegalovirus Conference (1995).

Jethon, C., Doerr, H. W., Weber, B.: Serologische Diagnose der *Cytomegalievirus*-Infektion: Evaluierung von drei Enzymimmunoassays zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern in Serumproben von immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten. Lab. Med. 20 (9), 480-484 (1996).

Reimer, K. und Meisel, H.: Humanes Zytomegalievirus, in: Diagnostische Bibliothek Bd.1, Porstmann, T. (Hrsg.), Blackwell Wissenschaftsverlag, 279-290 (1996).

Schmitz, H., Doerr, H. W., Kampa, D. and Vogt, A.: Solid-phase enzyme immunoassay for IgM antibodies to *Cytomegalovirus*. J. Clin. Microbiol. 5, 629-634 (1977).

Schmitz, H., Kampa, D., Doerr, H. W., Luthardt, T., Hillemanns, H. G. and Würtele, A.: IgM antibodies to *Cytomegalovirus* during pregnancy. Arch. Virol. 53, 177-184 (1977).

Schmitz, H., von Deimling, U. and Flehmig, B.: Detection of IgM antibodies to *Cytomegalovirus* (CMV) using an Enzyme-Labelled Antigen (ELA). J. Gen. Virol. 50, 59-68 (1980).

Steinmann, J. and Bischoff, J.: Comparison of serological methods for the detection of *Cytomegalovirus* infection. Lab. Med. 15, 585-589 (1991).

Tönnies, R., Flik, J., Franke, D., Metzger, C., Daiminger, A., Bäder, U. and Enders, G.: Comparison of three methods used to differentiate between primary and recurrent or long-term human *Cytomegalovirus* infections in pregnant women. Poster presented at the 6th International Cytomegalovirus Workshop, Orange Beach, AL, USA (1997).

Weber, B., Prosser, F., Munkwitz, A. and Doerr, H. W.: Serological diagnosis of *Cytomegalovirus* infection: comparison of 8 enzyme immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM antibody. Clin. Diagn. Virol. 2, 245-259 (1994).