

CMV-IgM-ELA Test PKS medac

Français



FABRICANT

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

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

ADRESSE DE COMMANDE

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

CMV-IgM-ELA Test PKS medac

Test immuno-enzymatique avec Système de Contrôle de Pipettage,
destiné à la détection qualitative des anticorps IgM anti -
cytomégalovirus (CMV)
dans le sérum et le plasma-EDTA

Réf. : 110-PKS

USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO

INTRODUCTION

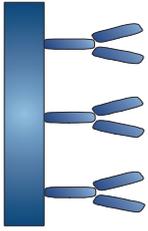
Le cytomégalovirus human pathogène (CMV) est un virus à ADN double brin qui appartient à la famille des *Herpesviridae*. Le CMV peut rester latent dans l'organisme après une primo-infection et des réactivations peuvent être à l'origine de symptômes cliniques très variés chez l'homme dont la gravité de l'affection dépend du statut immunitaire de l'hôte.

Chez les individus immunocompétents, le tableau clinique des infections à CMV est en général bénin ou asymptomatique. Au contraire, chez les patients immunodéprimés (sujets transplantés, patients infectés par le VIH, atteints de cancers, nouveaux nés), les symptômes peuvent être graves.

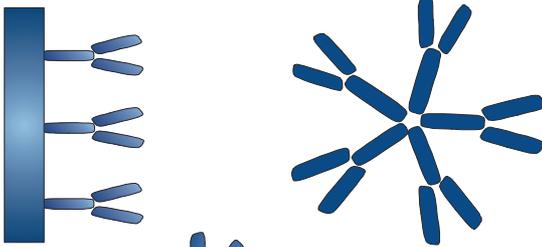
L'infection à CMV est l'infection congénitale la plus fréquente. Une telle infection peut entraîner des lésions graves chez l'enfant. Même chez des enfants nés sans symptômes apparents, des lésions tardives ne sont pas exclues.

Le coffret CMV-IgM-ELA Test PKS medac, est destiné à la recherche des anticorps IgM spécifiques dirigés contre le Cytomégalovirus. La présence d'anticorps spécifiques IgM est généralement indicative d'une primo-infection à CMV ou d'une infection active. Cependant il faut prendre en considération que les anticorps anti-CMV IgM peuvent être absents. Chez les immunodéprimés, par exemple, les anticorps IgM sont rarement décelables lors de réactivations ou de réinfections.

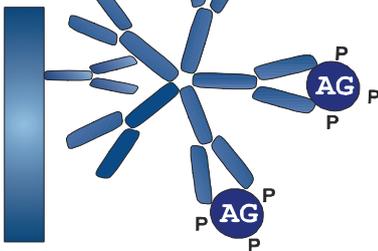
PRINCIPE DU DOSAGE



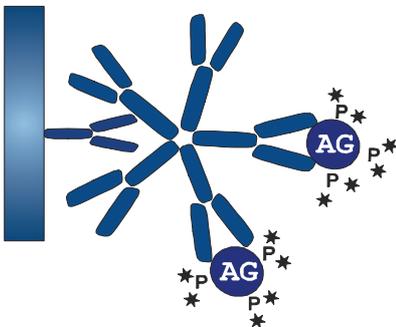
La plaque est recouverte d'immunoglobuline anti-IgM humaines.



Les IgM des échantillons se lient spécifiquement aux anticorps fixés dans les cupules.



L'antigène CMV marqué à la peroxydase se fixe sur les IgM spécifiques du CMV (AG = antigène, P = peroxydase).



Incubation avec le TMB-substrat. La réaction est arrêtée par addition d'acide sulfurique. Lecture de l'absorbance.

Avantages du dosage

- ☞ Aucune réaction non spécifiques due aux facteurs rhumatoïdes, évitant ainsi des résultats faussement positifs.
- ☞ Aucune interférence due à de fort taux d'IgG anti-CMV (évitant les faux négatifs).
- ☞ Le système de contrôle de la distribution des réactifs (PCS) permet un contrôle visuel de toutes les étapes de dépôts des réactifs et d'échantillons, par un changement de couleur.
- ☞ La microplaque, sécable puits à puits, permet une utilisation optimisée du réactif.
- ☞ Automatisation possible sur systèmes EIA ouverts.

CONTENU DE LA TROUSSE

Réf.: 110-PKS

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits en U (marqués **CMM**, avec support et dessiccateur, dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, recouverts d'immunoglobuline anti-IgM humaine et du BSA, présence d'un indicateur coloré dans les puits de réaction, prêts à l'emploi.

2.

CONTROL	-
----------------	----------

Contrôle négatif: 1 flacon de 1,5 ml, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient du BSA, du phénol (0,09 %) , du ProClin™ 300 (< 0,0015 % CMIT/MIT)^{1,2} et du sulfate de gentamicine (0,005 %).

3.

CONTROL	+
----------------	----------

Contrôle positif: 1 flacon de 1,5 ml, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient du BSA, du phénol (0,09 %), du ProClin™ 300 (< 0,0015 % CMIT/MIT)^{1,2} et du sulfate de gentamicine (0,005 %).

4.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, contenant un tampon 0,1 M PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, contient du ProClin™ 300 (0,017 % CMIT/MIT)¹.

5.

VIR-DIL

Diluant pour échantillons: 1 flacon de 110 ml, contenant une solution tamponnée 0,01 M PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, contient du ProClin™ 300 (0,008 % CMIT/MIT)¹, prêt à l'emploi.

6.

ANTIGEN

CMV-IgM-ELA (antigène marqué par enzyme): 2 flacons de 5,0 ml chacun, contenant d'antigène conjugué à de la peroxydase du raifort (HRP), lyophilisé, coloré en rouge.

7.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.

8.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 11 ml chacun, contenant du acide sulfurique 0,5 M (H₂SO₄), prête à l'emploi.
Peut être corrosif pour les métaux.



¹ Mélange de: 5-chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one (3:1).

² Peut produire une réaction allergique. Fiche de données de sécurité disponible sur demande (voir CD-ROM).

1. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Réactif	Etat	Conservation	Stabilité
Coffret	non ouvert	2...8 °C	date de péremption inscrite sur le coffret
Microplaque	ouverte	2...8 °C dans le sachet, avec dessicant	6 semaines
Contrôles	ouvert	2...8 °C	6 semaines
Tampon de lavage	dilué	2...8 °C	6 semaines
Diluant pour échantillons	ouvert	2...8 °C	6 semaines
CMV-IgM-ELA	reconstitué	2...8 °C	26 heures
		≤ -18 °C *	2 semaines
TMB-substrat	ouvert	2...8 °C	6 semaines
Solution d'arrêt	ouvert	2...8 °C	date de péremption inscrite sur le coffret

* Ne pas effectuer des congélations et décongélations successives pour un même aliquot.

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption inscrite sur le coffret.

2. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- 2.1. Eau distillée ou désionisée.
- 2.2. Pipettes à volume variable.
- 2.3. Récipients propres en verre ou plastique pour la solution de lavage et les échantillons.
- 2.4. Dispositif de lavage des microplaques (p. ex. multistepper ou ELISA washer).
- 2.5. Incubateur à 37 °C.
- 2.6. Lecteur de microplaque avec filtres de 450 nm et de 620 - 650 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

Amener tous les réactifs et les échantillons cliniques à analyser à température ambiante.

Déterminer le nombre de puits nécessaire à la réalisation du test.

3.1. Microplaque

Conservation: les puits non utilisés doivent être replacés dans le sachet aluminium avec le dessicant, puis sceller le sachet. La conservation et la stabilité des puits sont indiqués au point 1.

Remarque: Les puits de la microplaque possèdent des reflets verts. Des aspects de couleur marrons verts peuvent être présents dans les puits. Ceci est tout à fait normal et ne perturbe pas les performances du test.

3.2. Tampon de lavage

Mélanger un volume de tampon de lavage (10x) avec neuf volumes d'eau distillée ou désionisée [p.ex. 50 ml de tampon de lavage (10x) avec 450 ml d'eau]. 10 ml de tampon dilué sont nécessaires pour 8 puits.

Remarque: Des cristaux éventuellement présents dans la solution concentrée doivent être dissous par chauffage à 37 °C avant dilution.

3.3 CMV-IgM-ELA

Reconstituer avec 5 ml de **diluant pour échantillon**. Mélanger soigneusement en éliminant toutes les particules en suspension.

Une fois reconstitué le réactif est de couleur rouge et prêt à l'emploi.

Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôles, CMV-IgM-ELA) de différents lots. Par contre, le diluant pour échantillons, le tampon de lavage, TMB-substrat et la solution d'arrêt sont interchangeables dans tous les tests virologiques de medac.

Des réactifs d'autres fabricants ne peuvent pas être utilisés.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi.

4. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

4.1. Le dosage doit être effectué sur du sérum et du plasma-EDTA. Les échantillons de patients peuvent être conservés pendant 7 jours à 2-8 °C. Un stockage à long terme doit être fait à ≤ -20 °C. Des décongélation et congélation des échantillons doivent être évitées.

4.2. Un prétraitement des échantillons, p. ex. inactivation, n'est pas nécessaire. Les échantillons contaminés par des microorganismes ou contenant des hématies ne doivent pas être utilisés.

4.3. Le sérum ou le plasma sont à utiliser dilué au 1/100 avec le diluant échantillons. Ils peuvent être dilués davantage pour une éventuelle quantification.

5.A. MODE OPERATOIRE

5.1. Retirer la microplaque de son sachet d'aluminium en coupant l'extrémité du sachet près de la partie scellée. Laisser le nombre de barrettes voulues sur le portoir de 96 puits (voir 3.1.). Les puits de la plaque sont prêts à l'emploi, un prélavage n'est pas nécessaire.

5.2. Laisser la cupule A1 vide pour le blanc (voir 6.A.). Ajouter 50 µl de chaque échantillon dilué ainsi que 50 µl de contrôle négatif, 50 µl de contrôle positif en double dans les cupules.

Une couleur bleue doit apparaître dans tous les puits (sauf pour le puits A1) après la distribution des échantillons (pH neutre ou basique). L'absence de couleur peut indiquer une erreur dans les dépôts des sérums ou contrôles.

La plaque peut, à ce stade de la technique, être conservée dans une chambre humide 60 min. à 2 - 8 °C.

5.3. Incuber la plaque 60 min. (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C), dans une chambre humide ou couvrir la plaque hermétiquement à l'aide d'une feuille adhésive.

5.4. Reconstituer le CMV-IgM-ELA (voir 3.3.).

5.5. Après l'incubation, laver 3 fois la microplaque avec 200 µl de tampon de lavage par cupule. Faire attention que toutes les cupules soient bien remplies. Après le lavage, taper la plaque sur du papier absorbant.

Ne pas laisser sécher les puits ! Passer immédiatement à l'étape suivante!

5.6. Ajouter le CMV-IgM-ELA (couleur rouge) dans chaque puits (sauf A1).

50 µl de CMV-IgM-ELA sont à distribuer dans les cupules si le test est réalisé manuellement.

Remarque:

Quand le test est réalisé avec un automate de microplaque, 60 µl de conjugué doit-être distribué dans chaque puits à cause de l'évaporation amplifiée obtenue dans les chambres d'incubation d'un automate.

L'utilisation du test sur les appareils automatiques a été validée pendant l'évaluation du test. Néanmoins nous recommandons de vérifier la compatibilité du test avec les appareils utilisés dans le laboratoire.

- 5.7. Incuber la plaque 60 min. (± 5 min) à 37 °C (± 1 °C), dans une chambre humide ou couvrir la plaque hermétiquement à l'aide d'une feuille adhésive.
- 5.8. Après l'incubation, laver 3 fois la microplaque (voir 5.5.).
- 5.9. Ajouter 50 μ l de TMB-substrat dans chaque puits (aussi A1) et incuber 30 min (± 2 min) à 37 °C (± 1 °C) dans une chambre humide (ou couvrir la plaque hermétiquement à l'aide d'une feuille adhésive) à l'obscurité. Les échantillons positifs virent au bleu.
- 5.10. Arrêter la réaction en introduisant 100 μ l de solution d'arrêt dans chaque puits. Remarque : les échantillons positifs virent au jaune.

Essuyer soigneusement le dessous de la plaque et vérifier l'absence de bulles d'air dans les puits.

Lire à 450 nm (filtre de référence de 620 à 650 nm) dans les 15 min qui suivent l'arrêt de la réaction.

5.B. TABLEAU DE LA PROCEDURE TECHNIQUE

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon
Contrôle négatif	-	50 μ l	-	-
Contrôle positif	-	-	50 μ l	-
Echantillon	-	-	-	50 μ l
Incuber 60 min à 37 °C, lavage 3 x avec 200 μ l tampon de lavage				
CMV-IgM-ELA	-	50/60 μ l*)	50/60 μ l*)	50/60 μ l*)
Incuber 60 min à 37 °C, lavage 3 x avec 200 μ l tampon de lavage				
TMB-substrat	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Incuber 30 min à 37 °C à l'obscurité				
Solution d'arrêt	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Lecture photométrique à 450 nm (ref. 620 - 650 nm)				

*) procédure manuel/automatique (voir 5.6.)

6.A. VALIDATION DE LA TECHNIQUE

- * La lecture au spectrophotomètre est effectuée à une longueur d'onde de 450 nm (filtre de référence de 620 à 650 nm).
- * La valeur en DO du puit blanc réactif (puit A1) doit être soustraite de toutes les autres valeurs de DO.
- * La moyenne des DO du **contrôle négatif** doit être **< 0,100**.
La moyenne des DO du **contrôle positif** doit être **> 0,800**.
- * **Valeur seuil (cut-off) = Moyenne de la valeur de DO du contrôle négatif + 0,140**
- * **Zone grise : Cut-off \pm 10%**

Refaire la manipulation si les critères de validité ne sont pas respectés.

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS

- * Les échantillons trouvés au dessous de la zone grise sont rendus **NEGATIF**.
- * Les échantillons trouvés dans la zone grise sont rendus **LIMITE DU SEUIL**. Ces échantillons sont à retester ensemble avec un deuxième prélèvement effectué 14 à 21 jours plus tard.
- * Les échantillons trouvés au dessus de la zone grise sont rendus **POSITIF**.
- * Les résultats seront toujours interprétés en fonction du contexte clinique et l'addition d'analyses complémentaires.
- * Des réactions croisées, causées par des anticorps contre d'autres herpès virus, ne peuvent être exclues dans de rare cas.
- * Une très grande concentration de lipide peut influencer la concentration des anticorps d'un échantillon positif.
Une grande concentration en hémoglobine ou en bilirubine n'influence pas les résultats.

7. CARACTERISTIQUES PERFORMANCES

Les caractéristiques des performances ont été déterminées pendant l'évaluation diagnostique.

7.A. SENSIBILITE ET SPECIFICITE

482 sérums de donneurs de sang et de patients ont été testés avec le coffret CMV IgM ELA Test PKS medac et comparés à une autre technique ELISA utilisée en routine en laboratoire.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant:

	Test de référence	
	négatif	positif
CMV-IgM-ELA Test PKS négatif	314	1
CMV-IgM-ELA Test PKS positif	1	166

Sensibilité: 99,40 %

Spécificité: 99,68 %

Valeur prédictive positive: 99,40 %

Valeur prédictive négative: 99,68 %

7.B. PRECISION

Echantillon	Variation Intra-essai				Echantillon	Variation Inter-essais (n = 11)		
	moyenne DO	SD	CV (%)	n		moyenne DO	SD	CV (%)
NC	0,034	0,005	15	24	NC	0,050	0,100	20
BC	0,314	0,013	4	24	BC	0,230	0,021	9
PC	2,269	0,048	2	24	PC	1,456	0,064	4
N°1	0,049	0,008	16	27	N°4	0,058	0,007	12
N°2	0,317	0,023	7	27	N°5	0,264	0,037	14
N°3	2,673	0,086	3	27	N°6	0,271	0,039	14
					N°7	1,788	0,073	4

NC: contrôle négatif; BC: contrôle positif faible (non fourni); PC: contrôle positif

INDICATIONS GENERALES

- * Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter les contaminations croisées.
- * Les flacons des réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- * Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur durée de vie.
- * Après leur utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter le mélange des réactifs concernant d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- * Il faut appliquer la réglementation en vigueur en matière de sécurité et de santé.
- * Les réactifs d'origine humaine ont été dosés et trouvés négatifs en AgHBs, en anticorps anti-HIV-1/2 et anti-VHC. Néanmoins, il est fortement conseillé de manipuler ces produits, ainsi que ceux d'origine animale (voir contenu de la trousse), comme étant potentiellement infectieux et de les utiliser avec les précautions nécessaires.

CONSEIL D'EVACUATION

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser des déchets dangereux.

Date de parution: 01.04.2018

LITTÉRATURE

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).