

CMV-IgA-ELA Test PKS medac

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System** (PKS)
zur Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen das
Cytomegalie-Virus (CMV)

Deutsch/English



HERSTELLER/MANUFACTURER

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandstraße 3
D-20354 Hamburg

VERTRIEB/MARKETING

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-351
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-359

BESTELLADRESSE/ORDERING ADDRESS

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-111
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-113

Deutsch: S. 1
English: p. 13

Literatur/References: S./p. 24

CMV-IgA-ELA Test PKS medac

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System** (PKS) zur Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen das Cytomegalie-Virus (CMV)

Katalog-Nr.: 112/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.

CMV-spezifische IgA-Antikörper wurden z. B. in Serumproben von organtransplantierten Patienten mit dem Auftreten von Anti-CMV-IgM-Antikörpern korreliert gefunden und können daher als Marker einer akuten Infektion gelten. In Kombination von CMV-spezifischem IgA mit dem Nachweis des Virus-Antigens und des CMV-spezifischen IgM wurde in dieser Patientengruppe eine erhöhte Spezifität der Diagnose einer CMV-Erkrankung erzielt.

Außer dem

CMV-IgA-ELA Test PKS medac

Kat.-Nr.: **112/PKS** für 96 Bestimmungen

führen wir unter anderem die folgenden Produkte:

CMV-IgM-ELA Test PKS medac

Kat.-Nr.: **110/PKS** für 96 Bestimmungen,

CMV-IgG-ELISA PKS medac

Kat.-Nr.: **115/Q/PKS** für 96 Bestimmungen,

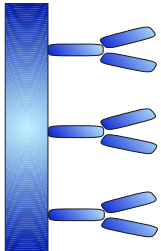
CMV-IgG-ELA Test PKS medac

Kat.-Nr.: **115/PKS** für 96 Bestimmungen,

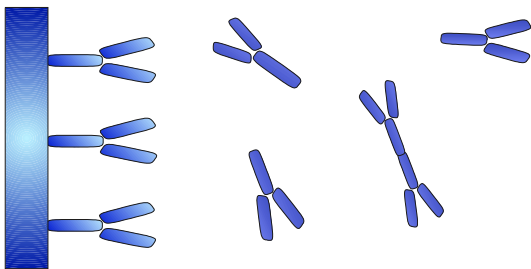
CMV-IgG-ELA Test PKS medac

Kat.-Nr.: **116/PKS** für 5 x 96 Bestimmungen.

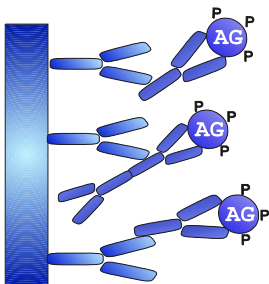
TESTPRINZIP



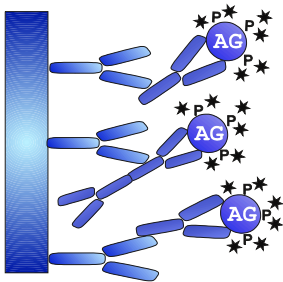
Mit Anti-Human-IgA beschichtete Mikrotiterplatte.



Die IgA-Fraktion aus dem Patientenserum wird auf der Mikrotiterplatte gebunden.



Die Anti-CMV-IgA-Antikörper binden das Peroxidase-konjugierte CMV-IgA-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 IgA-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.: 112/PKS

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit Ziege-Anti-Human-IgA-Antikörpern, BSA und pH-Indikator, gebrauchsfertig.
2.

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

Negative Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

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

Positive Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
5.

VIR-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
6.

ANTIGEN

CMV-IgA-ELA (Enzyme Labelled Antigen): 4 Fläschchen à 5,0 ml, lyophilisiert, enthält FKS, gelb gefärbt, HRP-konjugiert.
7.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
8.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 14 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.

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-IgA-ELA	gelöst	2...8 °C	5 Tage
TMB-Substrat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum

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

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H₂O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 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. Tabelle 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 (10 x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10 x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

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

3.3. CMV-IgA-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-IgA-ELA gelb gefärbt und gebrauchsfertig.

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, CMV-IgA-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.

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

4.3. Die Seren 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-IgA-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-IgA-ELA (gelb 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 Tests 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 µl 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 µl 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 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
Probe	-	-	-	50 µl
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
CMV-IgA-ELA	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren				
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
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.

* Validitätskriterien

- Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß **< 0,150** betragen.
- Der OD-Mittelwert der **positiven Kontrolle** muß **> 0,600** betragen.

Sind die oben genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!

* **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,140**

* **Grenzbereich = Cut-off ± 10 %**

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

- * 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.
- * 59 potentiell kreuzreaktive Seren wurden untersucht. Davon war keine der Proben im IgA-Test reaktiv.
- * 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. SPEZIFITÄT

Von 300 Blutspenderseren wurden im CMV-IgA-ELA Test PKS medac 296 Seren als negativ bewertet. Die übrigen vier Seren - drei davon grenzwertig und eines schwach positiv bezogen auf IgA - wiesen alle hohe CMV-IgG-Titer auf, eines sogar einen positiven CMV-IgM-Befund.

In einem zum Vergleich eingesetzten Referenztest wurden mit denselben 300 Blutspenderseren 284 negative, 2 grenzwertige und 14 positive Bewertungen erhalten.

7.B. SENSITIVITÄT

Von 105 Seren, die mit dem o. g. Referenztest als CMV-IgA-positiv bestimmt wurden, bewertete der CMV-IgA-ELA Test PKS medac 101 Seren als positiv, 2 als grenzwertig und 2 als negativ. Dies entspricht einer relativen Sensitivität von 96,2 %.

7.C. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz (n = 24)			Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	Ø OD	S	VK (%)		Ø OD	S	VK (%)
NK	0,047	0,007	14	NK	0,044	0,005	12
GW	0,341	0,014	4	GW	0,276	0,034	12
PK	1,601	0,047	3	PK	1,391	0,119	9
Nr. 1	0,047	0,009	12	Nr. 1	0,052	0,008	16
Nr. 2	0,223	0,010	5	Nr. 2	0,201	0,020	10
Nr. 3	2,473	0,052	2	Nr. 3	2,184	0,187	9

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 Abfallentsorgungsunternehmen informieren über die Entsorgungsmöglichkeiten.

LITERATURHINWEISE

s. S. 23

Ausgabedatum: 17.11.2004

CMV-IgA-ELA test PCS medac

Enzyme immunoassay with **Pipetting Control System** (PCS) for the detection of IgA antibodies to Cytomegalovirus (CMV)

Cat. no.: 112/PKS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) belongs to the family of human pathogenic Herpesviridae which is characterised by a double-stranded DNA genome. It is characteristic for these viruses to persist latently in the organism after primary infection. Reactivations of the virus can therefore occur under certain circumstances.

The course, CMV infections take in immunocompetent individuals, is normally without any symptoms. In individuals who suffer from immunosuppression (e.g. transplantation patients, HIV infected individuals, tumor patients, newborns) a variety of serious symptoms are observed.

CMV is one of the most frequent pathogens in prenatal infection which can cause a variety of serious disorders, also including late damages in children born without symptoms.

Specific CMV IgA antibodies were detected in serum samples of transplantation patients and were correlated to specific CMV IgM antibodies. Therefore, CMV IgA antibodies represent a marker for acute infections. The detection of CMV-specific IgA in combination with CMV antigen and CMV-specific IgM leads to an enhanced specificity of the diagnosis of CMV disease in transplantation patients.

In addition to the **CMV-IgA-ELA test PCS medac**
Cat. no.: 112/PKS for 96 determinations,

we also distribute the following products:

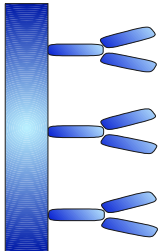
CMV-IgM-ELA test PCS medac
Cat. no.: 110/PKS for 96 determinations,

CMV-IgG-ELISA PCS medac
Cat. no.: **115/Q/PKS** for 96 Bestimmungen,

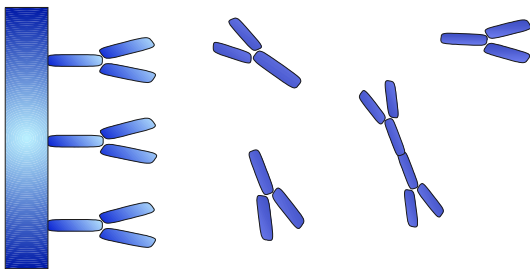
CMV-IgG-ELA test PCS medac
Cat. no.: 115/PKS for 96 determinations,

CMV-IgG-ELA test PCS medac
Cat. no.: 116/PKS for 5 x 96 determinations.

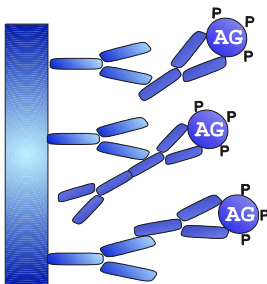
TEST PRINCIPLE



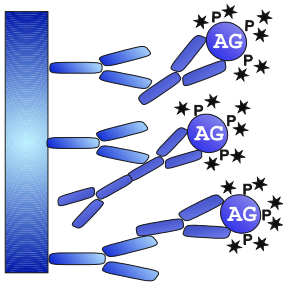
The plate is coated with anti-human IgA immunoglobulin.



IgA of the specimen is selectively bound to the wells.



The CMV-specific IgA antibodies bind to the peroxidase-labelled CMV antigen (AG = antigen, P = peroxidase).



Incubation with TMB-substrate (*). The reaction is stopped by the addition of sulfuric acid. The absorption is read photometrically.

Advantages of the test

- ☞ No unspecific reactions and no false positive results caused by rheumatoid factors.
- ☞ No blocking of IgA antibodies by high IgG titer.
- ☞ The Pipetting Control System allows to monitor visually each pipetting step through colour changes.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.
- ☞ Suitable for automation on open ELISA devices.

KIT CONTENTS

Cat. no. : 112/PKS

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with goat anti-human IgA immunoglobulin, BSA and pH indicator, ready to use.
2.

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

Negative control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
3.

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

Positive control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
4.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
5.

VIR-DIL

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7.2 - 7.4, ready to use, contains ProClin™ 300.
6.

ANTIGEN

CMV-IgA-ELA (Enzyme Labelled Antigen): 4 vials with 5.0 ml each, lyophilised, contains FCS, stained yellow, HRP-conjugated.
7.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
8.

STOP

Stop solution: 2 vials with 14 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.

1. STORAGE AND STABILITY

MATERIAL/REAGENT	STATE	STORAGE	STABILITY
Test kit	unopened	2...8°C	until expiry date
Microplate	opened	2...8°C in bag with desiccant	6 weeks
Controls	opened	2...8°C	6 weeks
Wash buffer	diluted	2...8°C	6 weeks
Sample diluent	opened	2...8°C	6 weeks
CMV-IgA-ELA	reconstituted	2...8°C	5 days
TMB substrate	opened	2...8°C	6 weeks
Stop solution	opened	2...8°C	until expiry date

Do not use the reagents after the expiry date.

2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 2.1. Water for injection (H₂O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of wash buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37°C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

3. PREPARATION OF THE REAGENTS

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature to prevent condensation.

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. Storage and stability of the wells are indicated in table 1.

Note: The microplate wells have a light green colour. Eventually occurring greenish brown stains inside the wells are due to the production process and do not influence the test performance.

3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (10 x) with nine volumes of water for injection (e.g. 50 ml wash buffer (10 x) with 450 ml water). 10 ml of diluted wash buffer are needed for eight wells.

Crystals in the wash buffer (10 x) have to be dissolved by warming (max. 37 °C) and/or stirring at RT.

3.3. CMV-IgA-ELA

Reconstitute the lyophilised CMV-IgA-ELA with 5.0 ml **sample diluent** each. Mix gently and take care that particles sticking to the closure are also dissolved.

After reconstitution, the CMV-IgA-ELA has a yellow colour and is ready to use.

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, CMV-IgA-ELA) from different kit lots.

In contrast to that, sample diluent, wash buffer, TMB-substrate and stop solution are generally exchangeable in all virological ELISA medac.

Reagents from other manufacturers must not be used in general.

Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed .

4. SPECIMEN

4.1. The test is suitable for serum samples.

4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.

4.3. Sera have to be diluted 1 : 100 with sample diluent. They can be diluted further for titer determination.

5.A. TEST PROCEDURE

- 5.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

Microplate wells are ready to use and do not have to be pre-washed.

- 5.2. Leave well A1 empty as blank (see 6.A.). Add 50 µl each of the diluted sample as well as negative control and positive control in duplicates to the wells.

After pipetting the samples (pH neutral or basic fluid) the wells turn blue. A missing colour change in one well indicates that no sample or control has been added.

If necessary the microplate wells can be kept at RT in a humid chamber up to 30 min or at 2 - 8°C up to 60 min before proceeding.

- 5.3. Incubate the microplate wells for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.
- 5.4. Reconstitute the CMV-IgA-ELA (see 3.3.).
- 5.5. After incubation wash the microplate wells three times with 200 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing, tap microplate wells on filter paper.

Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!

- 5.6. Add CMV-IgA-ELA (coloured yellow) to each well (except A1).

50 µl of ELA have to be pipetted into the wells if the test is done manually.

Please note:

When working with automated devices, 60 µl of ELA have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the devices.

The suitability of the test for automated devices was confirmed during the evaluation of the test. Nevertheless we recommend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.

- 5.7. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

- 5.8. After incubation wash microplate wells again (see 5.5.).
- 5.9. Add 50 µl of TMB-substrate to each well (also A1) and incubate for 30 min (± 2 min) at 37 °C (± 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.
- 5.10. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well (also A1). Positive samples turn yellow.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading should be done within 15 min after adding the Stop Solution!

5.B. TABLE FOR TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Sample
Negative control	-	50 µl	-	-
Positive control	-	-	50 µl	-
Sample	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer.				
CMV-IgA-ELA	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer.				
TMB-substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark.				
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)				

*) manual/automatic procedure (see 5.6.)

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- * Read OD values at 450 nm (reference wavelength 620 - 650 nm).
- * Subtract the OD value of the blank (well A1) from all other OD values.

* Validity Criteria

- The mean OD value of the **negative control** has to be **< 0.150**.
- The mean OD value of the **positive control** has to be **> 0.600**.

Repeat the run if the results do not meet the specification!

* **Cut-off = mean OD value of the negative control + 0.140**

* **Grey zone = Cut-off \pm 10 %**

6.B. INTERPRETATION OF RESULTS/LIMITATIONS OF THE METHOD

- * Samples with OD values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE**.
- * Samples with OD values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.
These should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.
- * Samples with OD values exceeding the upper limit of the grey zone are reported as **POSITIVE**.
- * The results should always be interpreted in connection with clinical data and additional diagnostic parameters.
- * 59 potentially cross reactive serum specimen were tested. These samples were not reactive in the IgA test.
- * Very high concentrations of lipids in negative samples can cause false positive results.
High concentrations of Hemoglobin or Bilirubin do not influence the test results.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

7.A. SPECIFICITY

300 serum specimen from blood donors were tested with the CMV-IgA-ELA test PCS medac. 296 sera were detected as negative. The other four sera - three of them were found to be equivocal and one weakly positive for IgA - were all detected as highly positive for CMV IgG and one also for CMV IgM.

The same 300 serum specimen were detected in another CMV-IgA-ELISA from a competitor. In this assay, 284 sera were found to be negative, two were equivocal and 14 were detected as positive.

7.B. SENSITIVITY

105 serum specimen were detected as CMV-IgA-positive with the above mentioned reference test. 101 sera were found to be positive, 2 were equivocal and 2 were detected as negative with the CMV-IgA-ELA test PCS medac. This results in a relative sensitivity of 96.2 %.

7.C. PRECISION

Sample	Intra-assay variation (n = 24)			Sample	Inter-assay variation (n = 11)		
	Ø OD	SD	CV (%)		Ø OD	SD	CV (%)
NC	0.047	0.007	14	NC	0.044	0.005	12
BC	0.341	0.014	4	BC	0.276	0.034	12
PC	1.601	0.047	3	PC	1.391	0.119	9
N° 1	0.047	0.009	12	N° 1	0.052	0.008	16
N° 2	0.223	0.010	5	N° 2	0.201	0.020	10
N° 3	2.473	0.052	2	N° 3	2.184	0.187	9

NC = Negative Control; BC = Weak Positive Control (not included in the kit);
PC = Positive Control

GENERAL HANDLING ADVICES

- * To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- * The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- * After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.

- * After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- * The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- * Reagents of human origin have been tested and found to be negative for HBsAg, for antibodies to HIV-1/2 and to HCV. Nevertheless, it is strongly recommended that these materials as well as those of animal origin (see kit contents), should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

DISPOSAL CONSIDERATIONS

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

REFERENCES

see p. 24

Date of issue: 17.11.2004

LITERATUR/REFERENCES

Braun, W., Hehr, B., Rabenau, H., Doerr, H. W.: Serologische Diagnostik der *Zytomegalie* bei immunsupprimierten Patienten. AIDS-Forschung (AIFO), Heft 11, 634-638, (1987).

Braun, W., Weber, B., Moell, U., Hamann, A. and Doerr, H. W.: Immunoglobulin A and M patterns to human *cytomegalovirus* during recurrent infection in patients with AIDS using a modified Western blot. J. Virol. Methods 43, 65-76, (1993).

Delacroix, D. L.: The human immunoglobulin A system, its vascular compartment. Thesis European Medical Press, (1985).

Doerr, H. W., Rentschler, M., Schleifer, G.: Serologic detection of active infections with human herpes viruses (*CMV*, *EBV*, *HSV*, *VZV*) diagnostic potential of IgA class and IgG subclass-specific antibodies. Infection 15, 93-98, (1987).

Engelhard, D., Weinberg, M., Or, R., Shaked, O., Naparstek, E., Haikin, H., Slavin, S., Sarov, I.: Immunoglobulins A, G and M to *cytomegalovirus* during recurrent infection in recipients of allogenic bone marrow transplantation. J. Infect. Dis. 163, 628-630, (1991).

Levy, E., Margalith, M., Sarov, B., Sarov, I., Rinaldo, C. R., Detels, R., Phair, J., Kaslow, R., Ginzburg, H. and Saah, A. J.: *Cytomegalovirus* IgG and IgA serum antibodies in a study of HIV infection and HIV related diseases in homosexual men. J. Med. Virol. 35, 174-179, (1991).

Linde, G. A., Hammarström, L., Persson, M. A. et al.: Virus-specific antibody activity of different subclasses of immunoglobulins G and A in *cytomegalovirus* infections. Infect. Immun. 42, 237-244, (1983).

Merlino, C., Angeretti, A., Segoloni, G. P., Giacchino, F., Rossetti, M. and Negro Ponzi, A.: *CMV*-specific polymeric and monomeric IgA antibodies in serum of renal transplant patients. Panminerva Med., Vol. 33, Nr. 4, 173-179, (1991).

Nielsen, L. N., Sorensen, I., Andersen, H. K.: Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A, and G in congenital primary, and secondary *cytomegalovirus* infection studied by antibody-captured enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 26, 654-661, (1988).

Porath, A., Hanuka, N., Keynan, A. and Sarov, I.: Virus-specific IgG, IgM, and IgA antibodies in *cytomegalovirus* mononucleosis patients as determined by immunoblotting technique. J. Med. Virol. 22, 223-230, (1987).

Rautenberg, P., Fischer, L., Tönnies, R., Franke, D.: Evaluation of a novel immunoglobulin A capture enzyme immunoassay for diagnosis of *cytomegalovirus* infection in renal and heart transplant recipients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 653-659, (1997).

Sarov, I., Siqueira-Linhares, M., Chardonnet, Y., Levy, E., Aymard, M., Bosshard, S., Nord, E., Revillard, JP: Detection of specific IgA antibodies in serum of kidney transplant patients with recurrent *cytomegalovirus* infection. *Intervirology* 15, 228-234, (1981).

Sarov, I., Haikin, H.: Human *cytomegalovirus* specific IgA antibodies detected by immunoperoxidase assay in serum of patients with *cytomegalovirus* infections. *J. Virol. Methods* 6, 161-169, (1983).

Strand, O. A., Hoddevick, G. M.: The diagnostic significance of specific serum IgA detection in *cytomegalovirus* infections. *Arch. Virol.* 82, 173-1980, (1984).

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).

Torfason, E. G., Källänder, C. and Halonen, P.: Solid-phase radioimmunoassay of serum IgG, IgM and IgA antibody to *cytomegalovirus*. *J. Med. Virol.* 7, 85-96, (1981).

Weber, B., Hamann, A., Ritt, B., Rabenau, H., Braun, W. and Doerr, H. W. : Comparison of shell viral culture and serology for the diagnosis of human *cytomegalovirus* infection in neonates and immunocompromised subjects. *Clin. Investig.* 70, 503-507, (1992).

Weber, B., Klinghardt, U., Lux, A., Braun, W., Rabenau, H. and Doerr, H. W.: Detection of neutralizing antibodies against human *cytomegalovirus*: influence of strain variation. *J. Med. Virol.* 40, 28-34, (1993).