

CMV-IgG-ELISA PKS medac

Deutsch/English/Français



HERSTELLER/MANUFACTURER/FABRICANT

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

VERTRIEB/MARKETING/DISTRIBUTION

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/
ADRESSE DE COMMANDE**

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

Deutsch: S. 1
English: p. 16
Français: p. 31

Literatur/References/Littérature: S./p./p. 47

CMV-IgG-ELISA PKS medac

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System** (PKS) zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das Cytomegalie-Virus (CMV) in Serum, Plasma und Liquor

Katalog-Nr.: 115-Q-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 häufigem Erreger pränataler Infektionen zu. Eine derartige Infektion kann zu schweren Schädigungen des Kindes führen, wobei auch bei symptomlos geborenen Kindern Spätschäden nicht ausgeschlossen sind.

Je nach geographischer Region und Durchseuchung sind bei 50 - 100 % der Erwachsenen IgG-Antikörper gegen CMV nachweisbar.

Der CMV-IgG-ELISA PKS medac findet Einsatz bei der Überprüfung der Immunitätslage von Patienten mit klinischem Verdacht auf eine CMV-Infektion.

Darüber hinaus kommt den Blutspendern bei der Untersuchung auf CMV-Antikörper eine besondere Bedeutung zu, da die Übertragung des Cytomegalie-Virus durch Bluttransfusion auf Patienten mit eingeschränkter Immunität, wie z.B. Transplantationspatienten, schwerwiegende Folgen haben kann, unter Umständen bis hin zur Abstoßung des Transplantates.

Der Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern mit dem quantitativen CMV-IgG-ELISA PKS medac ist schnell und einfach durchzuführen. Durch Verwendung von Testkontrollen, welche an dem Referenzpräparat des Nationalen Zentrums für Blutprodukte in Frankreich, der Blutbank Lille, kalibriert sind, ist es möglich, eine Bewertung des spezifischen Anti-CMV-IgG-Spiegels vorzunehmen.

Außer dem

CMV-IgG-ELISA PKS medac

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

führen wir unter anderem folgende Produkte:

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,

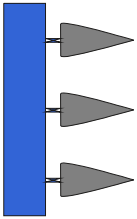
CMV-IgA-ELA Test PKS medac

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

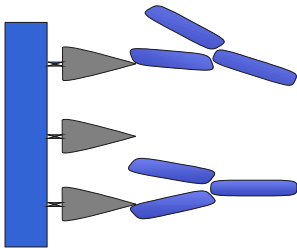
CMV-IgM-ELA Test PKS medac

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

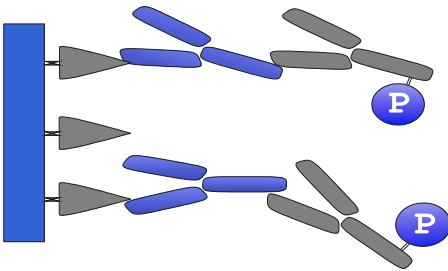
TESTPRINZIP



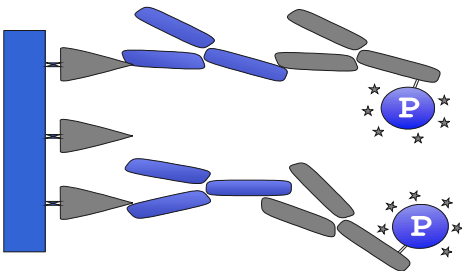
Mit CMV-Antigen beschichtete Mikrotiterplatte.



CMV-spezifische Antikörper aus der Patientenprobe binden an das Antigen.



Das Peroxidase-gekoppelte Anti-Human-IgG bindet an die IgG-Antikörper (P = Peroxidase).



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

Testvorteile

- ☞ Durch das Pipettier-Kontroll-System kann jeder einzelne Pipettierschritt durch Farbumschlag überprüft werden.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.
- ☞ Ein-Punkt-Quantifizierung, keine Standardkurve mehr nötig.
- ☞ Keine zusätzliche Kalibrationskurve für Liquordiagnostik erforderlich.

PACKUNGSINHALT

KAT.-NR.: 115/Q/PKS

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, orange-markiert (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit CMV-Antigen, 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 FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

CAL

Kalibrator: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
5.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
6.

VIR-DIL

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

CON

Konjugat: 3 Fläschchen à 5,0 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, grün gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
8.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
9.

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/ Kalibrator	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Konjugat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
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.

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. unter 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 (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.

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat, Kalibrator) 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, Plasma und Liquor (zur Untersuchung von Liquor unbedingt Punkt 8 beachten).

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

4.3. Die Seren und Plasmen werden 1 : 200 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Wir empfehlen, zunächst eine 1 : 50 Verdünnung herzustellen (z. B. 10 µl Serum + 490 µl Probenverdünnungspuffer) und nur die benötigte Menge 1 : 4 weiterzuverdünnen (z.B. 20 µl Serum + 60 µl Probenverdünnungspuffer). Proben außerhalb des Meßbereiches können beliebig weiterverdünnt werden.

4.4. Die Serum-Liquor-Diagnostik ist unter Punkt 8 ausführlich beschrieben.

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, positive Kontrolle und Kalibrator 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 60 min bei 2 - 8 °C gelagert werden.

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

5.4. 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!

5.5. Konjugat (grün gefärbt) in alle Vertiefungen (außer A1) pipettieren.

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

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl Konjugat 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.

- 5.6. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.4.).
- 5.8. 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.
- 5.9. 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	Kalibrator	Probe
Negative Kontrolle	-	50 μ l	-	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 μ l	-	-
Kalibrator	-	-	-	50 μ l	-
Probe	-	-	-	-	50 μ l
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 μ l Waschpuffer waschen					
Konjugat	-	50/60 μ l *)	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	50 μ l
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren					
Stopplösung	100 μ l	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. 5.5)

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.
- * Chargenspezifische Daten
Dem Test liegt ein chargenspezifisches Datenblatt bei. Diesem können folgende Angaben entnommen werden:
 - chargenspezifische Standardkurve
 - Kurvenparameter a, b und c
 - OD-Sollwert des Kalibrators
 - unterer Grenzwert für die OD des Kalibrators
 - Sollbereich in AU/ml für die positive Kontrolle
- * Validitätskriterien
 - Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß **< 0,150** betragen.
 - Der Unit-Wert der **positiven Kontrolle** muß innerhalb des Sollwertbereiches gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.
 - Der OD-Mittelwert des **Kalibrators** muß oberhalb des Grenzwertes gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.
 - Zusätzliche Validitätskriterien für Serum-Liquor-Bestimmungen s. 8.

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

- * Korrektur der Meßergebnisse
Die OD-Werte für die positive Kontrolle und die Patientenproben werden wie folgt korrigiert:

$$OD_{\text{korrigiert}} = \frac{\text{OD-Sollwert des Kalibrators}}{\text{OD-Meßwert des Kalibrators}} \times OD_{\text{gemessen}}$$

- * Quantifizierung der Meßergebnisse
Für die korrigierten OD-Werte sind die korrespondierenden Konzentrationen in AU/ml aus der Standardkurve auf dem chargenspezifischen Datenblatt zu ermitteln.

Alternativ lassen sich die Konzentrationen auch mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Konzentration [AU/ml]} = b / \left(\frac{a}{OD_{\text{korrigiert}} - c} - 1 \right)$$

Die meisten ELISA-Photometer neuerer Bauart gestatten die Eingabe dieser Formel, so daß eine direkte Auswertung mittels Photometer möglich ist.

Der Meßbereich erstreckt sich von 0,45 bis 15 AU/ml. Proben oberhalb des Meßbereiches sind als > 15 AU/ml zu bewerten. Diese dürfen nicht extrapoliert werden, sondern sollten in höherer Verdünnung wiederholt werden.

Der Cut-off liegt bei 0,55 AU/ml

Grenzbereich = 0,45 - 0,65 AU/ml

Achtung! Wichtiger Hinweis!

Bedingt durch den mathematischen Algorithmus der quantitativen Auswertung können in folgenden Fällen negative oder nicht definierte AU-Werte erhalten werden:

- Bei korrigierten OD-Werten $< c$ erhält man negative AU-Werte. Diese Proben sind als negativ zu bewerten.
- Ist der korrigierte OD-Wert = c (nicht erlaubte Division durch 0), sind die Proben ebenfalls als negativ zu bewerten.
- Bei stark positiven Proben mit korrigierten OD-Werten $\geq a + c$ erhält man negative oder nicht definierte AU-Werte (nicht erlaubte Division durch 0). Diese Proben sind in einer höheren Verdünnung nachzutesten oder als > 15 AU/ml zu bewerten.

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

- * Proben mit Unit-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.
- * Proben mit Unit-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet.

Diese Werte 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 Unit-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.
- * Schwache falsch positive Reaktionen, die durch Antikörper gegen andere Herpesviren oder durch heterophile Antikörper hervorgerufen werden, können in Einzelfällen nicht ausgeschlossen werden.

- * Sehr stark erhöhte Lipidwerte können bei positiven Proben die gemessene Antikörperkonzentration verfälschen. Hohe Hämoglobin- und Bilirubinkonzentrationen beeinflussen die Testergebnisse nicht.
- * Bei Verwendung von Citrat-Plasma muß aufgrund der zusätzlichen Verdünnung im Vergleich zum Serum mit niedrigeren Antikörperkonzentrationen gerechnet werden.

7. LEISTUNGSMERKMALE

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

7.A. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Im Rahmen der diagnostischen Erprobung wurden 519 Proben im Vergleich zu einem etablierten Mitbewerbertest gemessen. Davon waren 423 Blutspenderseren, 43 Seren von Kindern sowie 53 Seren von 17 Schwangeren mit klinischem Verdacht auf eine Primärinfektion (davon 12 Verläufe).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Neun-Felder-Tafel dargestellt:

		Referenztest		
		negativ	grenzwertig	positiv
CMV-IgG- ELISA PKS medac	negativ	167	0	0
	grenzwertig	4	0	0
	positiv	1	9	338

Spezifität = 97,1 %

Sensitivität = 100 %

Negativer Vorhersagewert : 100 %

Positiver Vorhersagewert : 97,1 %

Übereinstimmung : 97,3 %

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW AU	S	VK (%)	n		MW AU	S	VK (%)	n
PK	1,42	0,13	9,1	21	PK	1,20	0,06	5,0	11
Nr. 1	0,86	0,07	8,1	21	Nr. 4	2,67	0,09	3,4	11
Nr. 2	5,86	0,54	9,2	21	Nr. 5	4,24	0,38	9,0	11
Nr. 3	11,81	0,94	8,0	21	Nr. 6	10,45	0,73	7,0	11

PK = Positive Kontrolle; Nr. 4 = Liquor 1:4

8. LIQUORDIAGNOSTIK

Der Nachweis einer CMV-spezifischen Antikörpersynthese im ZNS im Rahmen der Liquordiagnostik ist Bestandteil der differential-diagnostischen Abklärung von Infektionen mit ZNS-Beteiligung.

Neben Pilzen und Bakterien zeichnen auch verschiedene Viren für Infektionen mit ZNS-Beteiligung verantwortlich.

Die Bestimmung einer CMV-spezifischen intrathekalen Antikörpersynthese erfolgt durch die Ermittlung des Antikörperindex (AI) nach Reiber (Reiber 1987, 1999). Für die Berechnung des AI müssen die folgenden Voraussetzungen erfüllt sein:

- Ermittlung des Albuminquotienten (Q_{alb}) zur Beurteilung der Schrankenfunktion und Berechnung des Limes-Wertes bei erhöhtem IgG-Quotienten ($Q_{ges} > Q_{lim}$)
- Ermittlung des Gesamt-IgG-Quotienten (Q_{ges})

8.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

8.1.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum-Liquor-Paaren.

8.1.2. Eine Vorbehandlung der Seren und Liquores, wie z.B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von humanen Erythrozyten sein.

8.1.3. Serum
Neben der 1 : 200-Verdünnung zur Bestimmung des Serostatus werden die Seren 1 : 800 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Zur Berechnung des AI wird die Verdünnung gewählt, deren AU-Wert positiv ist und innerhalb des Meßbereichs liegt (s. 6.A. und 8.2.). Liegen die AU-Werte für beide Verdünnungen in diesem Bereich (0,65 - 15 AU), ist für die AI-Berechnung der AU-Wert der 1 : 800-Verdünnung zu verwenden. Liegen die AU-Werte für beide Verdünnungen oberhalb von 15 AU, muß die Probe weiterverdünnt werden.

8.1.4. Liquor

Die Liquores werden standardmäßig 1 : 4 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Liegt die gemessene Antikörperkonzentration außerhalb des Meßbereichs (0,45 - 15 AU), muß die Probe weiterverdünnt oder in einer geringeren Verdünnungsstufe (max. 1 : 2) erneut gemessen werden.

Serum und Liquor immer parallel im gleichen Testlauf bestimmen (auch bei Wiederholungsmessungen)!

8.2. ARBEITSVORSCHRIFT

Der weitere Testansatz für die CMV-IgG-Bestimmung in Serum-Liquor-Paaren erfolgt gemäß Punkt 5.A.

8.3. BESTIMMUNG VON GESAMT-IgG UND ALBUMIN-GEHALT

Zusätzlich zu den CMV-spezifischen IgG-Bestimmungen sind der jeweils korrespondierende Gesamt-IgG-Gehalt und der Albumin-Gehalt in Serum und Liquor zu bestimmen.

8.4. TESTBEURTEILUNG/VALIDITÄT

* Validität

Es gelten die unter Punkt 6.A. angegebenen Validitätskriterien.

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

Zusätzlich gilt für die Liquordiagnostik:

- Zur AI-Bestimmung können nur positive Seren (Antikörpergehalt > 0,65 AU) herangezogen werden.
- Seren mit einem Antikörpergehalt < 0,45 AU in der 1:200-Verdünnung werden als seronegativ betrachtet.
- Bei seronegativen und grenzwertigen Proben kann kein AI bestimmt werden.
- In äußerst seltenen Fällen sind bei seronegativen Patienten auf Grund CMV-bedingter Enzephalopathien intrathekale Antikörper nachweisbar.
- Der Meßbereich für Liquor erstreckt sich von 0,45 - 15 AU.
- Liquores, die in der Verdünnung von 1 : 4 und bei **positivem Serostatus** unterhalb des Meßbereichs liegen, sollten in einer geringeren Verdünnung (maximal 1 : 2) wiederholt gemessen werden.

* Bewertung

- Berechnung der AU-Werte s. 6.A.
- Berechnung des erregerspezifischen IgG-Quotienten (Q_{spez})

$$Q_{\text{spez}} = \frac{\text{AU Liquor} \times \text{Verdünnung Liquor}}{\text{AU Serum} \times \text{Verdünnung Serum}}$$

- Berechnung des Antikörperindex

Der erregerspezifische Index errechnet sich dann nach den Formeln:

1. $AI = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{ges}}$ (für $Q_{\text{ges}} < Q_{\text{lim}}$)

2. $AI = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{lim}}$ (für $Q_{\text{ges}} > Q_{\text{lim}}$)

3. $Q_{\text{lim}} = 0,93 \times \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$

8.5. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- * AI-Werte von 0,6 - 1,3 gelten als Normalbereich.
- * AI-Werte $> 1,3$ und $\leq 1,5$ gelten als grenzwertig.
- * **Der pathologische Bereich ist festgelegt mit AI $> 1,5$.**
- * AI-Werte $< 0,6$ weisen auf analytische Fehler hin und sind nicht interpretierbar.
- * Liquordiagnostische Entscheidungskriterien für eine akute, aktive Erkrankung des ZNS sind eine erhöhte Zellzahl und ein erhöhter Albumin-Quotient als Ausdruck einer entzündlich bedingten Liquorflußbehinderung.
- * Erhöhte Antikörperindizes sind allein kein sicherer Beweis für die akute Phase einer infektiösen ZNS-Erkrankung, da Antikörper auch intrathekal über längere Zeiträume persistieren und polyspezifische ZNS-eigene Antikörpersynthesen vorkommen können. Gegebenenfalls ist eine signifikante Änderung des AI-Wertes über Zweitbestimmungen von Serum-Liquor-Paaren für die Beurteilung einer ZNS-Infektion angezeigt. Dazu ist eine weitere in einem klinisch sinnvollen zeitlichen Abstand erfolgende Probenentnahme erforderlich, die auf Grund klinischer Gesichtspunkte entschieden werden muß.

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 Arbeitsvorschriften 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. 47

Ausgabedatum: 02.11.2004

CMV-IgG-ELISA PCS medac

Enzyme immunoassay with **Pipetting Control System** (PCS) for the quantitative detection of IgG antibodies to Cytomegalovirus (CMV) in serum, plasma and cerebrospinal fluid (CSF)

Cat. no.: 115/Q/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.

Depending on the geographic area and prevalence of infection, IgG antibodies to CMV are found in 50 - 100 % of adults.

The CMV-IgG-ELISA PCS medac can be applied for the screening of the immunity of patients with a clinically suspected CMV infection.

Furthermore, the determination of CMV antibodies in blood donors is of special importance, because the transmission of cytomegalovirus via blood transfusions to immunosuppressed patients, e.g. to transplant recipients, might have serious consequences, e.g. graft rejection.

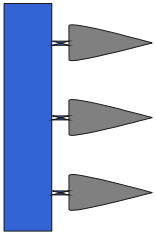
The detection of specific IgG antibodies using the quantitative CMV-IgG-ELISA PCS medac can be carried out fast and easily. By using test controls, which are calibrated against the reference of the National Centre of Blood Products in France, the Bloodbank of Lille, it is possible to quantify the specific anti-CMV-IgG level.

In addition to the **CMV-IgG-ELISA PCS medac**
Cat. no.: **115/Q/PKS** for 96 determinations

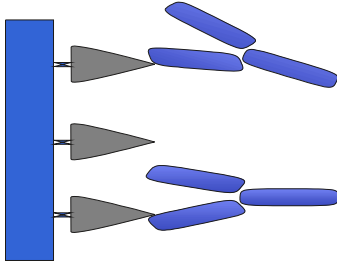
we also distribute the following products:

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,
CMV-IgA-ELA test PCS medac
Cat. no.: **112/PKS** for 96 determinations,
CMV-IgM-ELA test PCS medac
Cat. no.: **110/PKS** for 96 determinations.

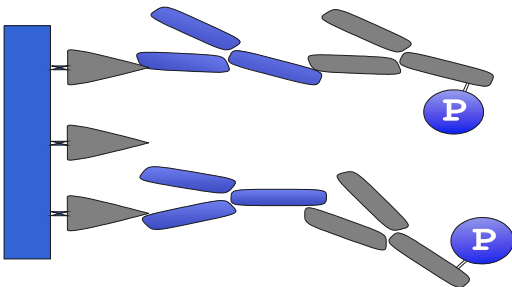
TEST PRINCIPLE



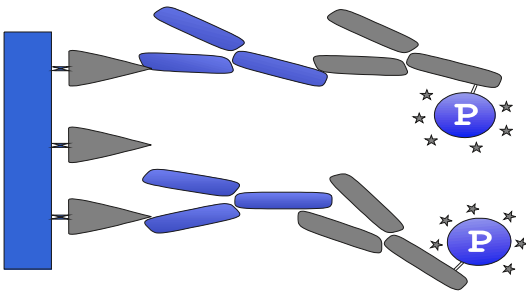
The plate is coated with CMV antigen.



The CMV-specific antibodies from the specimen are selectively bound to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies bind to the IgG antibodies (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

- ☞ 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.
- ☞ One-point quantification, no standard curve needed.
- ☞ No additional calibration curve for diagnostic of CSF needed.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 115/Q/PKS

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells, orange-coded (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with CMV antigen, 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 FCS, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
4.

CAL

Calibrator: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains FCS, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
5.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7.2-7.4, contains ProClin™ 300.
6.

VIR-DIL

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7.2-7.4, ready to use, contains ProClin™ 300.
7.

CON

Conjugate: 3 vials with 5.0 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready to use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
8.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
9.

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/ Calibrator	opened	2...8°C	6 weeks
Wash buffer	diluted	2...8°C	6 weeks
Sample diluent	opened	2...8°C	6 weeks
Conjugate	opened	2...8°C	6 weeks
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.

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 under point 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.

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, conjugate, calibrator) 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 manufactures 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, plasma samples and CSF samples (for the detection of CSF see 8.).
- 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. Serum or plasma samples have to be diluted 1 : 200 with sample diluent. We recommend to prepare an initial dilution of 1 : 50 (e.g. 10 µl serum + 490 µl sample diluent). For further 1 : 4 dilution just prepare the volume needed (e.g. 20 µl serum + 60 µl sample diluent). Samples outside the measuring range can be diluted further.
- 4.4. **The diagnostic investigation of serum-CSF is described in detail under 8.**

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, positive control and Calibrator 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 in a humid chamber up to 60 min at 2 - 8°C 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. 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!

- 5.5. Add conjugate (coloured green) to each well (except A1).

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

Please note:

When working with automated devices, 60 µl of conjugate 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.

- 5.6. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.
- 5.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.4.).

5.8. 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.

5.9. 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 THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Calibrator	Sample
Neg. control	-	50 µl	-	-	-
Pos. control	-	-	50 µl	-	-
Calibrator	-	-	-	50 µl	-
Sample	-	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37°C, wash 3x with 200 µl wash buffer					
Conjugate	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incubate for 60 min at 37°C, wash 3x with 200 µl wash buffer					
TMB-substrate	50 µl	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	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)					

*) manual/automatic procedure (see 5.5.)

6.A. CALCULATION OF RESULTES (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.

* Lot-specific data

The lot-specific data sheet provided with the kit contains the following information:

- Lot-specific calibration curve
- Curve parameters a, b and c
- Nominal OD value of the calibrator
- Lower OD limit of the calibrator
- Nominal concentration range (AU/ml) of the positive control

* Validity criteria

- The mean OD value of the **negative control** has to be **< 0.150**.
- The unit value of the **positive control** has to be within the nominal range indicated in the lot-specific data sheet.
- The mean OD value of the **calibrator** has to be above the lower OD limit indicated in the lot-specific data sheet.
- Additional validity criteria for the detection of serum-CSF pairs see 8.

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

* Correction of the results

The measured OD values of the positive control and the samples have to be corrected as follows:

$$OD_{\text{corrected}} = \frac{\text{Nominal OD value of the calibrator}}{\text{Measured OD value of the calibrator}} \times OD_{\text{measured}}$$

* Quantification of the results

The corresponding concentrations of the corrected OD values in AU/ml can be read from the lot-specific calibration curve (see lot-specific data sheet).

Alternatively, the concentrations can be calculated using the following formula:

$$\text{Concentration [AU/ml]} = b / \left(\frac{a}{OD_{\text{corrected}} - c} - 1 \right)$$

Most of the new ELISA readers allow to program the formula, thus enabling an automated data processing.

The measuring range spans from 0.45 to 15 AU/ml. Samples above have to be interpreted as > 15 AU/ml. These values must not be

extrapolated. The samples have to be retested in higher dilutions.

The cut-off is 0.55 AU/ml

Grey zone = 0.45 - 0.65 AU/ml

Attention! Important Note!

Due to the mathematical algorithm of the quantification negative or not defined AU values can be obtained in the following cases:

- If the corrected OD values are $< c$, negative AU values are indicated. These samples have to be interpreted as negative.
- If the corrected OD value is $= c$ (not allowed division by 0) the samples have to be interpreted as negative.
- Highly positive samples with corrected OD values $\geq a + c$ are calculated as negative or not defined AU values (not allowed division by 0). These samples have to be retested in higher dilutions or have to be interpreted as > 15 AU/ml.

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

- * Samples with unit values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE** with regard to immunity.
- * Samples with unit values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.

These samples should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.
- * Samples with unit 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.
- * Low false positive reactions, caused by antibodies against other Herpesviridae or by heterophilic antibodies, cannot be excluded in single cases.
- * Very high concentrations of lipids in positive samples can influence the measured concentration of antibodies. High concentrations of hemoglobin or bilirubin do not influence the test results.

* A lower antibody concentration has to be expected in citrate plasma in comparison to serum due to additional dilution.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

7.A. SENSITIVITY AND SPECIFICITY

519 samples were measured in comparison to an established reference assay. 423 samples were obtained from blood donors, 43 samples from children and 53 samples were derived from 17 pregnant women with symptoms of a primary CMV infection (12 follow ups).

The results obtained are shown in the table below:

		Reference assay		
		negative	equivocal	positive
CMV-IgG- ELISA PCS medac	negative	167	0	0
	equivocal	4	0	0
	positive	1	9	338

Specificity = 97.1 %
 Sensitivity = 100 %
 Negative predictive value : 100 %
 Positive predictive value : 97.1 %
 Concordance : 97.3 %

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation			
	mean AU	SD	CV (%)	n		mean AU	SD	CV (%)	n
PK	1.42	0.13	9.1	21	PC	1.20	0.06	5.0	11
N° 1	0.86	0.07	8.1	21	N° 4	2.67	0.09	3.4	11
N° 2	5.86	0.54	9.2	21	N° 5	4.24	0.38	9.0	11
N° 3	11.81	0.94	8.0	21	N° 6	10.45	0.73	7.0	11

PC = Positive Control; N° 4 = CSF 1:4

8. DIAGNOSTIC INVESTIGATIONS OF CEREBROSPINAL FLUID (CSF)

The detection of CMV-specific antibody synthesis in the central nervous system (CNS) during the diagnostic investigation of cerebrospinal fluid is an essential part of the differential diagnostic of infections involving the CNS.

Apart from fungi and bacteria, there are numerous viruses that can be responsible for infections with CNS involvement.

The identification of CMV-specific intrathecal antibody synthesis is performed by estimation of the antibody index (AI) according to Reiber (Reiber 1987, 1999). In order to calculate the AI the following conditions must be fulfilled:

- estimation of the albumin quotient (Q_{alb}) so as to assess the function of the blood-brain-barrier and to calculate the Limes value in patients with elevated IgG quotients ($Q_{tot} > Q_{lim}$)
- estimation of the total IgG quotient (Q_{tot})

8.1. SPECIMEN

- 8.1.1. The test is suitable for serum-CSF paired samples.
- 8.1.2. Pre-treatment of sera and CSF samples, e.g., inactivation, is not necessary. However they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.
- 8.1.3. Serum
In addition to the 1 : 200 dilution for determination of serostatus, the sera are diluted 1 : 800 with sample diluent. To calculate the AI, a dilution should be chosen so that its AU value will be positive and lie inside the measuring range (see 6.A. and 8.2.). If the AU values for both dilutions are within this range of 0.65 - 15 AU, the AU value of the 1 : 800 dilution should be chosen to calculate the AI. If the AU values for both dilutions are above 15 AU, the sample has to be further diluted.
- 8.1.4. Cerebrospinal fluid
The CSF samples are diluted to a standard dilution 1 : 4 with sample diluent. If the measured antibody concentration is outside the measuring range (0.45 - 15 AU), the sample has to be further diluted, or has to be retested in a lesser dilution (max. 1 : 2).

Serum and cerebrospinal fluid have always to be assayed in parallel in the same test run (this also applies to repeat measurements)!

8.2. TEST PROCEDURE

The further test setup for CMV-IgG determination in serum-CSF pairs is performed as described under 5.A.

8.3. DETERMINATION OF TOTAL IgG AND ALBUMIN CONCENTRATIONS

In addition to the CMV-specific IgG determinations, in each sample pair the total IgG concentration and the albumin concentration in serum and CSF have to be determined.

8.4. CALCULATION OF RESULTS/VALIDITY

* Validity

The validity criteria specified under 6.A. are applicable.

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

The following points also apply to CSF investigations:

- Only positive serum samples (antibody content > 0.65 AU) can be used for the calculation of the AI.
- Sera with an antibody content < 0.45 AU in a dilution of 1 : 200 are considered as sero-negative. In such cases the antibody index cannot be determined.
- The AI cannot be calculated in sero-negative and grey zone samples.
- In extremely rare cases, sero-negative patients may have demonstrable intrathecal antibodies because of CMV-associated encephalopathies.
- The assay range for CSF extends from 0.45 - 15 AU.
- CSF samples from patients with **positive serostatus** which at the dilution of 1 : 4 are below the assay range, should be re-tested in a lesser dilution (maximum 1 : 2).

* Evaluation

- Calculation of AU values see 6.A.
- Calculation of the pathogen-specific IgG quotient (Q_{spec}).

$$Q_{\text{spec}} = \frac{\text{AU CSF} \times \text{dilution CSF}}{\text{AU serum} \times \text{dilution serum}}$$

- Calculation of the antibody index

The pathogen-specific index is calculated from the fomulae:

1. $AI = Q_{\text{spec}}/Q_{\text{tot}}$ (for $Q_{\text{tot}} < Q_{\text{lim}}$)
2. $AI = Q_{\text{spec}}/Q_{\text{lim}}$ (for $Q_{\text{tot}} > Q_{\text{lim}}$)
3. $Q_{\text{lim}} = 0.93 \times \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1.7 \times 10^{-3}$

8.5. INTERPRETATION OF RESULTS

- * AI values from 0.6 - 1.3 are regarded as the normal range.
- * AI values > 1.3 and ≤ 1.5 are regarded as borderline.
- * **The abnormal range is defined as AI > 1.5 .**
- * AI values < 0.6 point to analytical errors and cannot be interpreted.
- * The CSF diagnostic criteria for an acute, active disease of the CNS are raised cell count and a raised albumin quotient. These reflect obstruction to CSF flow due to some inflammatory condition.
- * Elevated antibody indices are not reliable evidence of the acute phase of an infective CNS disease, because antibodies, even intrathecally, may persist for long periods, and because polyspecific CNS-intrinsic antibody synthesis may occur. In some circumstances it may be advisable to look for a significant change in the AI value by testing second paired serum-CSF samples. For this purpose further sample collection will be necessary and should be performed after a time interval chosen in the light of the clinical circumstances.

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. 47

Date of issue: 02.11.2004

CMV-IgG-ELISA PCS medac

Test immuno-enzymatique avec **S**ystème de **C**ontrôle de la **D**istribution des réactifs (SCD), destiné à la détection quantitative des anticorps IgG anti - Cytomégalovirus (CMV) dans le sérum, le plasma et le liquide céphalo-rachidien (LCR)

Cat. no.: 115/Q/PKS

USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO

INTRODUCTION

Le cytomégalovirus (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.

Dépendant de la situation géographique et de la prévalence de l'infection, les anticorps IgG spécifiques du Cytomégalovirus sont trouvés chez 50 à 100 % des adultes.

Le coffret CMV-IgG-ELISA PCS peut être utilisé pour définir le statut immunitaire d'un patient suspecté d'une infection à CMV.

Par ailleurs, la détection des anticorps CMV chez les donneurs de sang est très importante car la transmission du cytomégalovirus par transfusion chez des patients immunodéprimés ou greffés, peut avoir de lourdes conséquences comme par exemple le rejet d'une greffe.

Avec le test quantitatif CMV-IgG-ELISA PCS medac, la détection des anticorps IgG spécifiques, peut être effectuée rapidement et facilement. En utilisant un calibrateur titré par le centre national de référence en France (E.F.S.Lille), il est possible de définir un titre en anticorps anti CMV de type IgG.

En plus du réactif

CMV-IgG-ELISA PCS medac

Cat. no.: **115/Q/PKS** pour 96 déterminations

nous distribuons aussi les produits suivant:

CMV-IgG-ELA test PCS medac

Cat. no.: **115/PKS** pour 96 déterminations,

CMV-IgG-ELA test PCS medac

Cat. no.: **116/PKS** pour 5x96 déterminations,

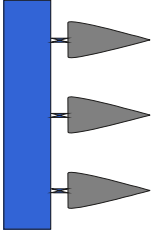
CMV-IgM-ELA test PCS medac

Cat. no.: **110/PKS** pour 96 déterminations,

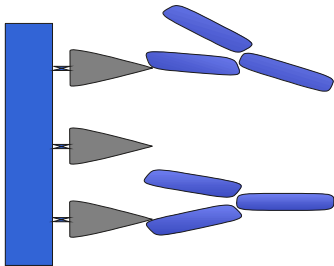
CMV-IgA-ELA test PCS medac

Cat. no.: **112/PKS** pour 96 déterminations.

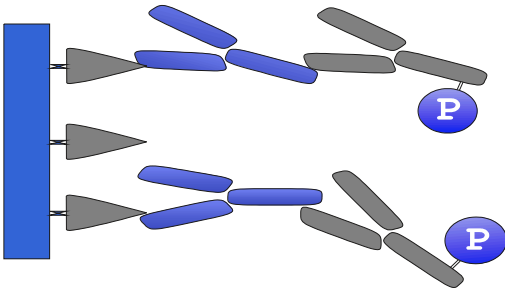
PRINCIPE DU TEST



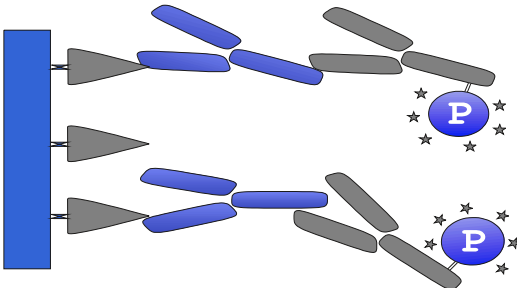
La plaque est recouverte d'antigène CMV.



Les anticorps spécifiques du CMV présents dans l'échantillon se lient à l'antigène.



Le conjugué anti IgG humaine marqué à la peroxydase se fixe sur ces anticorps spécifique (P = peroxydase).



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

Avantages du test

- ☞ Le système de contrôle de la distribution des réactifs (SCD) permet par un changement de couleur, un contrôle visuel de toutes les étapes de dépôts des réactifs et des échantillons.
- ☞ La microplaque, sécable puits à puits, permet une utilisation optimisée du réactif.
- ☞ Automatisation possible sur systèmes EIA ouverts.
- ☞ Quantification en un point, pas de courbe d'étalonnage.
- ☞ Il ne faut pas de calibration supplémentaire pour le diagnostic du LCR.

CONTENU DE LA TROUSSE

RÉF. : 115/Q/PKS

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits en U, de couleur orange (avec support et déshydratant, dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, recouverts d'antigène CMV et du BSA, présence d'un indicateur coloré dans les puits de réaction, prêts à l'emploi.
2.

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

Contrôle négatif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient du BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate gentamicine.
3.

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

Contrôle positif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient du BSA, du FCS, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
4.

CAL

Calibrateur: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient du BSA, du FCS, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
5.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, contenant un tampon PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, contient du ProClin™ 300.
6.

VIR-DIL

Diluant pour échantillons: 1 flacon de 110 ml, contenant une solution tamponnée PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, prête à l'emploi, contient du ProClin™ 300.
7.

CON

Conjugué: 3 flacons de 5,0 ml chacun, contenant une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguée à de la peroxydase du raifort (HRP), prête à l'emploi, couleur verte, contient du BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
8.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.
9.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 14 ml chacun, contenant du acide sulfurique 0,5 M (H₂SO₄), prête à l'emploi.

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 déshydratant	6 semaines
Contrôles/ Calibrateur	ouvert	2...8°C	6 semaines
Tampon de lavage	dilué	2...8°C	6 semaines
Diluant pour échantillons	ouvert	2...8°C	6 semaines
Conjugué	ouvert	2...8°C	6 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 utiliser les réactifs après la date de péremption inscrite sur le coffret.

2. REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- 2.1. Eau pour injection ou bidistillée. L'utilisation d'eau désionisée n'est pas conseillée.
- 2.2. Micropipettes réglables.
- 2.3. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des sérums de patients.
- 2.4. Dispositif de lavage des microplaques (par exemple multistepper ou ELISA washer).
- 2.5. Incubateur à 37 °C.
- 2.6. Lecteur de plaque avec filtres à 450 nm et 620 - 650 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

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

Calculer le nombre de puits nécessaire.

3.1. Microplaque

Conservation: les plaques non utilisées doivent être replacées dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant, puis sceller le sachet. Conservation et 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

Diluer le tampon de lavage concentré à 1/10 avec de l'eau doublement distillée. Par exemple, pour préparer un volume de 500 ml de tampon de lavage, ajouter 50 ml de solution concentrée à 450 ml d'eau bi-distillée. (10 ml de solution diluée est nécessaire pour une barrette de 8 puits).

Des cristaux peuvent se former dans le tampon de lavage (10 x). Dissoudre ces cristaux en chauffant (max. 37 °C) ou en tournant, à température ambiante.

Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôles, conjugué, calibrateur) 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 peut être effectué sur le sérum, le plasma et le LCR (pour la détection dans le LCR, voir point 8).

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

4.3. Sérum ou plasma sont à utiliser dilué au 1/200 dans le diluant des échantillons. Nous recommandons de préparer une dilution initiale au 1/50 (ex: 10 µl de sérum + 490 µl de diluant), puis au 1/4 (ex: 20 µl de d'échantillon dilué au 1/50 + 60 µl de diluant).

Les échantillons mesurés en dehors de la gamme peuvent être dilués davantage.

4.4. L'investigation diagnostique dans le serum - LCR est décrite au point 8.

5.A. MODE OPERATOIRE

- 5.1. Retirer la plaque de micro-titration de son sachet d'aluminium en coupant l'extrémité du sachet près de la partie scellée. Laisser le nombre de barrettes voulues dans 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 et 50 µl de calibrateur en double dans les cupules.

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

Remarque: 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. 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.

Remarque: Après les lavages, ne pas laisser les puits se dessécher, passer immédiatement à l'étape suivante.

- 5.5. Ajouter le conjugué (couleur verte) dans chaque puits (excepté A1).

50 µl de conjugué 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 importante 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.

- 5.6. 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.
- 5.7. Après l'incubation, laver 3 fois la microplaque (voir 5.4.).
- 5.8. Ajouter 50 μ l de TMB-substrat dans chaque puits (aussi A1) et incuber 30 min (\pm 2 min) à 37 °C (\pm 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.
- 5.9. 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 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

5.B. TABLEAU DE LA PROCEDURE TECHNIQUE

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

* procédure manuelle/automatique (voir 5.5.)

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 D.O. du puits blanc réactif (puits A1) doit être soustraite de toutes les autres valeurs de D.O.

- * Données spécifiques à chaque lot
Pour chaque trousse sont fournies des données spécifiques correspondant au lot utilisé :
 - Courbe de calibration spécifique au lot.
 - Paramètres a, b et c de la courbe.
 - Valeur de DO nominale du calibrateur.
 - DO limite basse du calibrateur.
 - Intervalle de concentration (UA/ml) attendu pour le contrôle positif.

- * Critères de Validité
 - La moyenne des DO du **contrôle négatif** doit être **< 0,150**.
 - La valeur du **contrôle positif** doit être comprise dans l'intervalle indiqué sur la feuille de données spécifique au lot utilisé.
 - La moyenne des DO du **calibrateur** doit être supérieure à la limite indiquée sur la feuille de données spécifique au lot utilisé.
 - Les crières de validité supplémentaires pour la détection des paires sérum - LCR, voir point 8.

Refaire la manipulation si les critère de validité ne sont pas respectés!

* Correction des résultats

Les valeurs des DO mesurées pour le contrôle positif et les échantillons doivent être corrigées selon la formule suivante :

$$DO_{\text{corrigée}} = \frac{\text{Valeur de DO nominale du calibrateur}}{\text{DO mesurée du calibrateur}} \times DO_{\text{mesurée}}$$

* Quantification des résultats

Les concentrations correspondantes au valeurs des DO corrigées (en UA/ml) peuvent être lues sur la courbe de calibration spécifique au lot utilisé (voir feuille de données spécifique à chaque lot utilisé, fournie dans les coffrets).

Autrement, les concentrations peuvent-êre calculées en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration [UA/ml]} = b / \left(\frac{a}{\text{DO}_{\text{corrigée}} - c} - 1 \right)$$

La programmation de cette formule est réalisable sur la plupart des lecteurs de microplaque permettant un calcul automatique des concentrations.

L'interval de mesure est compris entre 0,45 et 15 UA/ml. Les échantillons trouvés au dessus sont interprétés > 15 UA/ml. Ces valeurs ne peuvent être extrapolées. Ces échantillons peuvent être retestés avec une dilution supérieure.

La valeur seuil est 0,55 UA/ml

Zone grise = 0,45 - 0,65 UA/ml

Important!

Lié à l'algorithme mathématique, une valeur négative ou non interprétable peut être obtenue dans les cas suivants:

- Si la valeur de DO corrigée est < c, une valeur négative en UA/ml est indiquée. Cet échantillon doit être interprété comme négatif.
- Si la valeur de DO corrigée est = c (division par 0 impossible), l'échantillon est interprété comme négatif.
- Un échantillon positif fort, avec une valeur de DO corrigée ≥ a + c donne une valeur en UA/ml négative ou non interprétable (division par 0 impossible). Cet échantillon doit être retesté avec une dilution plus haute ou être interprété > 15 UA/ml.

6.B.INTERPRETATION DES RESULTATS/ LIMITES DE LA METHODE

- * Les échantillons trouvés au dessous de la zone grise sont rendus **NEGATIFS**.
- * Les échantillons trouvés dans la zone grise sont rendus **LIMITES DU SEUIL**.

Ces échantillons sont à retester ensemble avec un deuxième prélèvement effectué 14 jours plus tard.

- * Les échantillons trouvés au dessus de la zone grise sont rendus **POSITIFS**.

- * Les résultats seront toujours interprétés en fonction du contexte clinique et l'addition d'analyses complémentaires.
- * Dans de rare cas, une faible réaction positive peut être observée avec des anticorps dirigés contre d'autres virus appartenant à la famille des Herpès virus ou avec des anticorps hétérophiles.
- * Une très grande concentration de lipide peut influencer la concentration des anticorps d'un échantillon positif.

Des concentrations élevées d'hémoglobine et de bilirubine dans le sérum, n'ont pas d'influence sur les résultats.

- * Une concentration plus basse en anticorps doit être observée avec du plasma-citrate en comparaison avec le sérum à cause de la dilution plus importante.

7. CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES

Les résultats des évaluations sont présentés ci-après.

7.A. SENSIBILITE ET SPECIFICITE

519 échantillons ont été testés en comparaison à une technique de référence: 423 échantillons de donneurs de sang, 43 échantillons d'enfants et 53 échantillons provenant de 17 femmes enceintes présentant des symptômes d'infection récente à CMV (12 suivis sérologiques).

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau ci-après.

		Test de Référence		
		négatif	limite	positif
CMV-IgG-ELISA PCS medac	négatif	167	0	0
	limite	4	0	0
	positif	1	9	338

Spécificité = 97,1 %

Sensibilité = 100 %

Valeur prédictive négative : 100 %

Valeur prédictive positive : 97,1 %

Concordance : 97,3 %

7.B. PRECISION

Echan- tillon	Variation Intra-série				Echan- tillon	Variation Inter-série			
	UA moyenne	E.T.	CV (%)	n		UA moyenne	E.T.	CV (%)	n
PC	1,42	0,13	9,1	21	PC	1,20	0,06	5,0	11
N° 1	0,86	0,07	8,1	21	N° 4	2,67	0,09	3,4	11
N° 2	5,86	0,54	9,2	21	N° 5	4,24	0,38	9,0	11
N° 3	11,81	0,94	8,0	21	N° 6	10,45	0,73	7,0	11

PC = Contrôle Positif; N° 4 = LCR 1 : 4

8. INVESTIGATIONS DIAGNOSTIQUES DANS LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR)

La détection de la synthèse d'anticorps CMV-spécifiques dans le système nerveux central (SNC) pendant l'investigation diagnostique du liquide céphalo-rachidien est une partie essentielle du diagnostic différentiel des infections impliquant le SNC.

Outre les fongis et les bactéries, il y a différents virus qui peuvent être responsables d'infections ayant des implications au niveau du SNC.

L'identification de la synthèse intrathécale d'anticorps CMV spécifiques est réalisée par estimation de l'index d'anticorps (AI) selon Reiber (Reiber 1987, 1999). Afin de calculer le AI, les conditions suivantes doivent être remplies:

- Estimation du quotient d'albumine (Q_{alb}) de manière à déterminer la fonction de la barrière sang-cerveau et de calculer la valeur de Lime chez les patients ayant des quotients IgG élevés ($Q_{tot} > Q_{lim}$).
- Estimation du quotient IgG total (Q_{tot}).

8.1. ECHANTILLON

8.1.1. Le test convient pour des paires de sérum-LCR.

8.1.2. Un pré-traitement du sérum ou du LCR, par exemple une inactivation, n'est pas nécessaire. Cependant ils ne doivent pas être contaminés par des microorganismes ou contenir des globules rouges.

8.1.3. Serum

En plus de la dilution 1 : 200 pour la détermination du status sérique, les sera sont dilués 1 : 800 avec le diluant pour échantillon. Pour calculer le AI, une dilution doit être choisie de manière à ce que sa valeur UA soit positive et soit située dans la fourchette de mesure (voir 6.A et 8.2.). Si les valeurs UA pour les 2 dilutions sont situées entre 0,65 - 15 UA, la valeur UA de la dilution 1 : 800 doit être choisie pour calculer le AI. Si les valeurs UA pour les deux dilutions sont au-dessus de 15 UA, l'échantillon doit être plus dilué.

8.1.4. Liquide cérebrospinal

Les échantillons de LCR sont dilués à 1 : 4 avec le diluant pour échantillon. Si la concentration en anticorps est en dehors de la fourchette de mesure (0,45 - 15 UA), l'échantillon devra être plus dilué ou retesté avec une dilution moindre (max. 1 : 2).

Le sérum et le liquide cérebrospinal doivent toujours être testés en parallèle dans la même série (cela est aussi d'application pour refaire des mesures)!

8.2. PROCEDURE DU TEST

Le test CMV IgG pour les paires sérum - LCR est effectué comme décrit au point 5.A.

8.3. DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EN IGG TOTALES ET ALBUMINE

En plus de la détermination des IgG CMV spécifiques, pour chaque paire sérum - LCR, la concentration en IgG totales et en albumine devront être déterminés.

8.4. CALCUL DES RESULTATS/VALIDITE

* Validité
critères de validités spécifiés au point 6.A. sont d'application.

Recommencer la série si les résultats n'entrent pas dans les spécifications.

Les points suivants sont aussi applicables pour les études du LCR:

- Seul les échantillons sériques positifs (concentration en anticorps > 0,65 UA) peuvent être utilisés pour le calcul du AI.

- Les séra ayant une concentration en anticorps < 0,45 UA à une dilution de 1 : 200 sont considérés comme négatifs. Dans de tel cas l'index d'anticorps ne peut être déterminé.
- L'index d'anticorps ne peut être calculé pour les échantillons négatifs ou dans la zone grise.
- Dans des cas extrêmement rares, des patients séro négatifs peuvent avoir des anticorps intrathécaux à cause d'encéphalo-pathies associées à la présence de CMV.
- La fourchette d'essai pour le LCR s'étend de 0,45 à 15 UA.
- Les échantillons de LCR de patients, ayant un **sérum positif**, qui à la dilution de 1 : 4 sont en-dessous de la fourchette de mesure, doivent être retestés à une dilution plus basse (maximum 1 : 2).

* Calcul

- Calcul des valeurs UA: voir 6.A.
- Calcul du quotient spécifique IgG pathogène (Q_{spec})

$$Q_{spec} = \frac{UA \text{ LCR} \times \text{dilution LCR}}{UA \text{ sérum} \times \text{dilution sérum}}$$

- Calcul de l'index d'anticorps

L'index pathogène spécifique est calculé à partir de la formule:

1. $AI = Q_{spec}/Q_{tot}$ (pour $Q_{tot} < Q_{Lim}$)
2. $AI = Q_{spec}/Q_{lim}$ (pour $Q_{tot} > Q_{Lim}$)
3. $Q_{lim} = 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$

8.5. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- * Les valeurs de AI de 0,6 à 1,3 sont considérés comme normaux.
- * Les valeurs de AI > 1,3 et ≤ 1,5 sont considérées comme limites.
- * **Les valeurs anormales sont définies comme supérieures à 1,5.**
- * Les valeurs de AI < 0,6 sont considérées comme erronées et ne peuvent pas être interprétées.

- * Les critères diagnostiques du LCR pour une maladie aigüe et active du CNS sont une augmentation du comptage cellulaire et un quotient d'albumine augmenté.
- * Cela reflète l'obstruction du flux du LCR à cause de certaines conditions inflammatoires.
- * Des index d'anticorps élevés ne sont pas une évidence fiable d'une phase aigüe d'une maladie infectieuse du CNS, car les anticorps, même intrathécaux, peuvent persister pendant une longue période et car une sythèse d'anticorps polyspécifiques intrinsèques au CNS peut apparaître. Dans certaines circonstances, il peut être indiqué de chercher un changement significatif dans la valeur du AI en testant une seconde paire sérum - LCR. Dans ce but, d'autre collectes d'échantillons seront nécessaires et devront être réalisées avec un interval de temps choisi à la lumière des circonstances cliniques.

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'évacuation 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.

LITTÉRATURE

voir p. 47

Date de parution: 02.11.2004

LITERATUR/REFERENCES/LITTÉRATURE

Doerr, H. W., Holtz, T., Frauenhofer, M. und Braun, R., Immunologische Diagnostik der Zytomegalievirus (CMV)-Infektion, Lab. med. 9, 28-35, (1985).

Flik, J., A comparison of 2 quantitative ELISAs used to detect IgG antibodies against HCMV in transplant recipients, Poster presented at the 5th CMV-Congress in Stockholm, (1995).

Hengster, P. and Dierich, M. P., Cytomegalovirus serology: Comparison of different ELISAs with complement fixation and indirect immunofluorescence for detection of antibodies. Lab. med. 12, 363-367, (1988).

Höher, P. G. und Werner, J., Virus-Serologische Untersuchungen zur Cytomegalovirus-Durchseuchung bei Blutspendern der Wuppertaler Blutbank, Lab. med. 8, 290-293, (1984).

Krech, T., Wegmann, T., und Stanisic, M., Granulöse Zytomegalie Hepatitis, Schweiz. med. Wschr. 114, 469-475, (1984).

Luthardt, T., Transfusionsbedingte Zytomegalievirusinfektionen, Steinkopff Verlag, Darmstadt, (1985).

Pass, R. F. et al., Outcome of Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection: Results of Longterm Longitudinal Follow up, Pediatrics 66, No. 5, 758-762, (1980).

Peterson, P. K. et al., Cytomegalovirus Disease in Renal Allograft Recipients: A Prospective Study of Clinical Features, Risk Factors and Impact on Renal Transplantation, Medicine 59, No. 4, 283-300, (1980).

Plotkin, S. A., Immunology of Cytomegalovirus, Comprehensive Immunology, Immunology of Human Infection, Plenum Publishing Corporation, 233 Spring Street, New York 89, 108, (1982).

Reynolds, D. W., Stagno, S. and Alford, C. A., in Laboratory Diagnosis of Cytomegalo Infections, Editors: Lennette, E. H. and Schmidt, N. J., American Public Health Association, 5th ed., Chapter 13, 399-439, (1979).

Sachers, M., Emmerich, P., Mohr, H. and Schmitz, H., Simple Detection of Antibodies to different Viruses using Rheumatoid Factor and Enzyme Labelled Antigen (ELA), J. Virol. Methods 10, 99-110, (1985).

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).