

# CYTOMEGALOVIRUS ELISA IgG

## Producto para diagnóstico *in vitro*

**G1004:** Prueba inmunoenzimática indirecta para la detección y semicuantificación de anticuerpos IgG frente a citomegalovirus en suero/plasma humano. 96 tests.

### INTRODUCCIÓN:

Citomegalovirus (CMV) es un miembro de la familia de los herpesvirus y se caracteriza por la presencia de infección latente después de la primoinfección. Es un importante agente de enfermedad congénita y puede causar enfermedad grave en trasplantados y en enfermos de SIDA. Una primoinfección o reactivación de una infección latente durante el embarazo puede ser transmitida al feto o al niño durante el parto. Los niños afectados congénitamente pueden desarrollar graves secuelas neurológicas. La primoinfección en población adulta puede ser asintomática o producir distintos síndromes como mononucleosis, hepatitis o neumonitis. La presencia de una infección activa por CMV puede ser detectada por métodos serológicos y debe ser confirmada por aislamiento viral o identificación de antígenos o ácidos nucleicos del virus. De todas las técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de CMV, ELISA es la más ampliamente empleada por su alta sensibilidad y fácil manejo.

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Método de ELISA basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados, la unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

### CARACTERÍSTICAS:

Todos los reactivos a excepción de la solución de lavado vienen listos para su uso.

Las soluciones de dilución de muestras y de conjugado están coloreadas como ayuda a la realización de la técnica.

No se precisa dilución previa de la muestra.

Los pocillos son individuales, por lo que solo se consumen tantos pocillos como pruebas se van a realizar.

### CONTENIDO DEL KIT:

**1** VIRCELL CYTOMEGALOVIRUS PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con antígenos de citomegalovirus, cepa AD-169 (ATCC VR-538).

**2** VIRCELL SERUM DILUENT: 25 ml de diluyente para sueros: tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, con Neolone y Bronidox y coloreado de azul. Listo para su uso.

**3** VIRCELL IgG POSITIVE CONTROL: 500 µl de suero control positivo conteniendo 200 U./ml de IgG anti-cytomegalovirus con Neolone y Bronidox.

**4** VIRCELL IgG CUT OFF CONTROL: 500 µl de suero cut off conteniendo 10 U./ml de IgG anti-cytomegalovirus con Neolone y Bronidox.

**5** VIRCELL IgG NEGATIVE CONTROL: 500 µl de suero control negativo con Neolone y Bronidox.

**6** VIRCELL IgG CONJUGATE: 15 ml de una dilución de globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa, con Neolone y Bronidox y coloreada de naranja. Lista para su uso.

**7** VIRCELL TMB SUBSTRATE SOLUTION: 15 ml de solución de sustrato: tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.

**8** VIRCELL STOP REAGENT: 15 ml de solución de parada: ácido sulfúrico 0,5 M.

**9** VIRCELL WASH BUFFER: 50 ml de solución de lavado (concentrado 20x): tampón fosfatos con Tween<sup>R</sup>-20 y con Proclin 300.

**10** VIRCELL SEMIQUANTIFICATION SAMPLE CONTROL: 500 µl de control de semicuantificación, conteniendo entre 20 y 50 U./ml de IgG anti-Cytomegalovirus, con Neolone y Bronidox.

**Conservar entre 2 y 8°C y comprobar la fecha de caducidad.**

### Material necesario no contenido en el kit:

-Pipeta de precisión para dispensar 5 y 100 µl.

-Pipeta multicanal de precisión para dispensar 100 µl.

-Lavador de placas de ELISA.

-Incubador/baño termostaticado.

-Espectrofotómetro de placas de ELISA con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm.

-Agua destilada.

-Alternativamente procesador automático de ELISA.

### CONSERVACIÓN:

Conservar entre 2 y 8°C. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La caducidad indicada será válida siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 8°C.

### CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

Componente	Estabilidad
Solución de lavado diluida (1x)	4 meses a 2-8°C
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8°C

### ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:

Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.

No permitir el secado de la placa entre los lavados y la adición de los reactivos.

La solución de sustrato es fotosensible. Evitar la exposición directa a la luz y desechar si presenta coloración azul. La solución de sustrato no debe entrar en contacto con oxidantes como soluciones de hipoclorito ni con algunos metales. Evitar el contacto con partes metálicas o componentes metálicos de equipos o instrumentos sin antes haber comprobado su compatibilidad.

Utilizar solo la cantidad de solución de lavado, sustrato, diluyente de sueros y conjugado necesarias para la realización de la prueba. No devolver a los viales el exceso sobrante.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

**RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:**

- Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
- Usar solo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Solo las soluciones de lavado, sustrato, parada y diluyente de sueros son compatibles con los equivalentes en otras referencias y lotes de ELISA VIRCELL.
- Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar solo material limpio y preferentemente desechable.
- No utilizar en caso de deterioro del envase.
- No pipetear con la boca.
- El diluyente para sueros, placa, conjugados y controles de este equipo contienen material de origen animal. Los controles contienen además material de origen humano. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg y anticuerpos frente a VIH y Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos. Los pocillos contienen antígeno inactivado, no obstante, deben manejarse con precaución. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de éstos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.
- Para la utilización del producto en sistemas automáticos de análisis se recomienda una evaluación previa. VIRCELL dispone de juegos de muestras para su ensayo en paralelo con el método manual. Estos juegos pueden ser solicitados con tal finalidad. Asimismo, es posible la consulta de un listado de sistemas automatizados aprobados para su utilización con la gama de productos ELISA VIRCELL.
- Durante los períodos de incubación, un adecuado sellado de las placas con la lámina adhesiva que se suministra evita la desecación de la muestra y garantiza la repetitividad de la muestra.
- Evitar el contacto de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M) con la piel o los ojos. En caso de contacto, lavar la zona inmediatamente con agua.
- Proclin 300 está incluido como conservante en la solución de lavado. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. En caso de contacto con la piel lavar con agua y jabón abundantes. Para más información, solicite la hoja de información del producto.

**TOMA DE MUESTRA:**

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas asépticas o estériles para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros/plasmas deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20°C, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. No utilizar muestras hiperlipémicas, hemolizadas o contaminadas. Las muestras que presenten partículas pueden ser clarificadas por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente.

**PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:**

El único reactivo que es necesario preparar con antelación a la realización de la prueba es la solución de lavado. Para ello completar hasta 1 litro con agua destilada un vial de 50 ml de solución de lavado concentrada (20x). Si aparecen cristales

durante la conservación de la solución concentrada, calentar a 37°C antes de diluirlo. Una vez preparada conservar entre 2 y 8°C.

**PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:**

- Ajustar una estufa/baño de agua a 37±1°C.
- Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando sacar la placa del envase.
- Agitar todos los componentes.
- Sacar el número de pocillos **1** necesarios para el número de muestras que se van a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero cut off. Colocar el resto de los pocillos en el sobre y volver a cerrarlo.
- Añadir 100 µl de diluyente de muestras **2** a todos los pocillos que se vayan a emplear. Añadir 5 µl de las muestras, 5 µl del control positivo **3**, 5 µl del suero cut off **4** (en duplicado), y 5 µl del control negativo **5** en los pocillos correspondientes. En el caso de la realización manual del método, se agitará la placa en un agitador (2 minutos) para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos. Si no es posible asegurar esta agitación, debe hacerse una predilución de la muestra en tubo o placa añadiendo el doble del volumen de diluyente de muestras **2** y de muestra. Homogenizar con la pipeta y trasvasar seguidamente 105 µl de cada muestra ya diluida a los pocillos **1**.
- Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 45 minutos a 37±1°C.
- Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado **9**, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
- Añadir inmediatamente 100 µl de conjugado IgG **6** a todos los pocillos.
- Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 30 min. a 37±1°C.
- Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado **9**, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
- Añadir inmediatamente 100 µl de solución de sustrato **7** a todos los pocillos.
- Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.
- Añadir inmediatamente 50 µl de solución de parada **8** a todos los pocillos.
- Valorar espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

**CONTROL DE CALIDAD INTERNO:**

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles.

La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

**PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:**

Cada ensayo debe utilizar control positivo, negativo y cut off. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo.



Las densidades ópticas (D.O.) de los controles deben estar en los rangos siguientes. En caso contrario se desechará la prueba.

Control	D.O.
Control positivo	>0,9
Control negativo	<0,5
Control cut off	>0,55
	<1,5

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

##### CUALITATIVO

Calcular la media de las D.O. del suero cut off.

**Índice de anticuerpos= (D.O. de la muestra / media de D.O. del suero cut off) x10**

Índice	Interpretación
<9	Negativo
9-11	Dudoso
>11	Positivo

Las muestras con resultados dudosos deben ser vueltas a analizar y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 9 se considera que no tienen anticuerpos específicos frente a citomegalovirus de tipo IgG.

Las muestras con índices superiores a 11 se considera que tienen anticuerpos específicos frente a citomegalovirus de tipo IgG.

##### SEMICUANTITATIVO

Para estimar la concentración relativa de anticuerpos IgG específicos anti-Cytomegalovirus presentes en la muestra se podría dibujar una gráfica semilogarítmica. Por ejemplo, se podrían representar en un eje los logaritmos de las U./ml de cada control y en el otro la media de sus correspondientes D.O.. Para ello, sería necesario realizar el ensayo con los controles por duplicado. Se podría trazar una línea que uniera los dos puntos y que permitiría asignar un valor aproximado de U./ml a la muestra cuya D.O. se conoce.

En el kit se incluye un control de calibración con un contenido comprendido entre 20-50 U./ml.

#### LIMITACIONES DEL MÉTODO:

- Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
- El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, lavados y tiempos de incubación.
- Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos. El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante técnicas de aislamiento.
- El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
- La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.
- Las muestras recogidas muy pronto en el transcurso de una infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En esos casos se recomienda realizar un ensayo para determinación de

IgM u obtener una segunda muestra transcurridos entre 14 y 21 días, para ser ensayado en paralelo con la muestra original con el fin de determinar una seroconversión.

7. Los resultados obtenidos en la detección de IgG en neonatos deben ser interpretados con precaución, ya que las IgG maternas son transferidas pasivamente de la madre al feto antes del nacimiento. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.

8. Los resultados de determinación de anticuerpos de una muestra única no deben ser usados para el diagnóstico de una infección reciente. Se deben recoger muestras pareadas (aguda y convaleciente) para ser ensayadas paralelamente y determinar seroconversión o un incremento significativo en el nivel de anticuerpos.

9. En pacientes inmunodeprimidos un resultado negativo no excluye la presencia de infección.

10. Cuando el resultado de una muestra se quiere expresar en U./ml hay que tener en cuenta que el valor de los resultados medidos por encima del cut off no se relaciona con la cantidad de anticuerpos.

11. Los resultados de prestaciones incluidos corresponden a estudios comparativos con equipos de referencia comerciales en una muestra poblacional definida. Pueden encontrarse pequeñas variaciones en poblaciones diferentes o con equipos de referencia distintos.

#### PRESTACIONES

##### • SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:

###### TEST 1

Se ensayaron 84 muestras de suero/plasma con CYTOMEGALOVIRUS ELISA IgG frente a otro equipo ELISA comercial, obteniendo los siguientes resultados:

	Nº muestras	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgG	84	100	100
95% C.I.		92-100	89-100

C.I. Intervalo de confianza

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.

###### TEST 2

Se ensayaron 60 muestras de suero/plasma con CYTOMEGALOVIRUS ELISA IgG frente a otros equipos ELISA comerciales, obteniendo los siguientes resultados frente al consenso:

	Nº muestras	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgG	60	100	96
95% C.I.		89-100	81-99

C.I. Intervalo de confianza

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.

##### • PRECISIÓN INTRAENSAYO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente 10 veces cada uno en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	1,72
CN	10	8,20
CO	10	1,67

C.V. Coeficiente de variación



**PRECISIÓN INTERENSAYO:**

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	2,48
CN	10	14,36
CO	10	2,18

C.V. Coeficiente de variación

**• REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:**

Se ensayaron 10 muestras caracterizadas positivas frente a otros miembros del grupo herpesvirus (virus Epstein Barr, herpes simplex tipo 1 y 2 y varicella-zoster) y del grupo sindrómico (*Toxoplasma gondii*). Se realizó un ensayo IgG a 2 muestras caracterizadas positivas frente a anticuerpos antinucleares.

Las muestras ensayadas dieron resultados negativos, demostrando la reacción específica del ensayo sin reacción cruzada o interferencias ocasionadas por los agentes descritos.

**SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:**

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-y°C
	Contiene suficiente para <n> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	<X> pocillos

**BIBLIOGRAFÍA:**

- Alford, C. A., K. Hayes, and W. Britt. 1988. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: comparison of antibody responses to virus-encoded proteins between women with and without intrauterine infection. *J Infect Dis* 158:917-24.
- Dolan, J., J. D. Briggs, and G. B. Clements. 1989. Antibodies to cytomegalovirus in renal allograft recipients: correlation with isolation of virus. *J Clin Pathol* 42:1070-7.
- Drew, W. L. 1988. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3:S468-76.
- Kraat, Y. J., R. M. Hendrix, M. P. Landini, and C. A. Bruggeman. 1992. Comparison of four techniques for detection of antibodies to cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 30:522-4.
- Lutz, E., K. N. Ward, R. Szydlo, and J. M. Goldman. 1996. Cytomegalovirus antibody avidity in allogeneic bone marrow recipients: evidence for primary or secondary humoral responses depending on donor immune status. *J Med Virol* 49:61-5.
- Marsano, L., R. P. Perrillo, M. W. Flye, D. W. Hanto, E. D. Spitzer, J. R. Thomas, P. R. Murray, D. W. Windus, E. M. Brunt, and G. A. Storch. 1990. Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney and liver transplant recipients. *J Infect Dis* 161:454-61.
- Nielsen, C. M., K. Hansen, H. M. Andersen, J. Gerstoft, and B. F. Vestergaard. 1987. An enzyme labelled nuclear antigen immunoassay for detection of cytomegalovirus IgM antibodies in human serum: specific and non-specific reactions. *J Med Virol* 22:67-76.
- Nielsen, S. L., E. Ronholm, I. Sorensen, and H. K. Andersen. 1986. Detection of immunoglobulin G antibodies to cytomegalovirus antigens by antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 24:998-1003.
- Nielsen, S. L., I. Sorensen, and H. K. Andersen. 1988. Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A, and G in congenital, primary, and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 26:654-61.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:

[customerservice@vircell.com](mailto:customerservice@vircell.com)

REVISADO: 2018-06-28

L-G1004-ES-01

