

# **CITOMEGALOVIRUS IgG AVIDITY**

**EIA WELL**

**REF:K3CGA  
45 TESTES**

**RADIM**

# CITOMEGALOVIRUS IgG AVIDITY

## EIA WELL

REF: K3CGA  
45 TESTES

### REAGENTES DO KIT

<b>REAGENTES</b>	<b>QUANTIDADE 96 TESTES</b>	<b>ESTADO FÍSICO</b>
Microplaca	1 microplaca 96 testes	Pronto para uso
Solução de Lavagem (20X)	1 X 50 ml	Concentrado
Diluyente de Amostra	1 X 20ml	Concentrado
Controle Baixo	1 X 2ml	Liofilizado
Controle Alto	1 X 2ml	liofilizado
Reagente Dissociante	1 X 10ml	Pronto para uso
Conjugado enzimático	1 X 14 ml	Pronto para uso
TMB	2 X 15 ml	Pronto para uso
Reagente Bloqueador	1X 14 ml	Pronto para uso

## **INSTRUÇÕES DE USO**

### **CITOMEGALOVIRUS IgG AVIDITY**

#### **IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS ANTI-CITOMEGALOVIRUS IgG EM SORO OU PLASMA HUMANO**

#### **SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO**

### **1. APLICAÇÕES CLÍNICAS**

O Citomegalovirus (CMV) é um vírus de formato icosaédrico, de 180 a 250nm de diâmetro, pertencente à família do Vírus da Herpes. O Vírus tem um efeito citopatólogo, com alargamento das células hospedeiras e evidência citoplasmática bem como inclusões nucleares. Atualmente o CMV é considerado a causa mais freqüente de anomalias congênitas em consequência das infecções intra-uterinas. Cerca de 2% das mulheres grávidas contraem infecção primária ou re-infecção, enquanto que 10 a 20% de bebês recém-nascidos com infecções congênitas de CMV apresentam lesões significativas para o sistema nervoso central. Sabe-se agora que a lesão fetal é causa principalmente devido a uma infecção primária, mais do que a uma re-infecção. O CMV é também uma causa importante de complicações em transplante de órgãos, particularmente em transplante de rim. Nestes casos, novamente a infecção primária é mais nociva do que uma re-infecção.

O diagnóstico da infecção primária adquirida recentemente por meios de anticorpos IgM específicos pode ser difícil, devido a presença do IgM mesmo em infecções recorrentes. Além disso, os anticorpos IgM circulantes podem persistir por muitos meses e mesmo por dois anos em pacientes imunodeprimidos. Avaliar a avidéz do IgG específico demonstrou ser particularmente útil na identificação da infecção primária. De fato, a resposta inicial do anticorpo IgG à infecção é caracterizada pelos anticorpos com avidéz baixa, na qual a ligação aos lugares de antígeno específico é facilmente dissociada.

### **2. PRINCÍPIO DO ENSAIO**

O presente método se baseia em um ensaio imunoenzimático (ELISA), no qual é permitido que o soro do paciente reaja em duplicata com um revestimento de antígeno CMV de uma micropilaca. Após a primeira incubação, seguida pela lavagem da micropilaca, os poços replicados são incubados, cada um com uma solução tampão diferente, uma das quais contendo uréia. O reagente uréia causa dissociação da ligação antígeno-anticorpo formada previamente. O grau de dissociação depende da avidéz dada do anticorpo. Após o ciclo de lavagem, os anticorpos que ainda estão ligados com a fase sólida serão evidenciados pelas reações subseqüentes, primeiro com o anticorpo IgG anti-humano (conjugado com peroxi-

dase horsehadish) e depois com uma solução cromógena (TMB) em tampão substrato. A leitura colorimétrica será executada utilizando um espectrofotômetro a 450nm e a 405nm. A razão entre as densidades óticas dos dois poços é então calculada e expressa em percentual de Aidez.

### 3. REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT: PREPARO E ESTABILIDADE

- Os reagentes são suficientes para 96 poços, que corresponde a 45 testes.
- Armazenar o kit entre 2 e 8°C.
- A data de validade de cada reagente se encontra no rótulo do frasco.
- Uma vez aberto, o kit é estável quando armazenado entre 2 e 8°C por 2 meses.

#### 3.1 Reagentes Específicos

- **Microplaca Sensibilizada:** 96 poços quebráveis, revestidas com antígeno viral CMV. Manter os poços não utilizados entre 2 e 8°C na bolsa plástica fornecida (recipiente de microplaca) e cuidadosamente vedada.

- **Controle de Baixa aidez:** 1 frasco de soro padrão com anti-CMV IgG humano de aidez baixa. Liofilizado e de coloração vermelha. Conservante: NaN3 (<0.1%). Reconstituir o conteúdo do frasco com 2ml de água destilada, antes do uso. Após a reconstituição, armazenar entre 2 e 8°C por 2 meses; para períodos mais longos congelar a -20°C.

- **Controle de Alta Aidez:** 1 frasco de soro padrão com anti-CMV IgG humano de alta aidez. Liofilizado e de coloração azul. Conservante: NaN3 (<0.1%). Reconstituir o conteúdo do frasco com 2ml de água destilada, antes do uso. Após a reconstituição, armazenar entre 2 e 8°C por 2 meses; para períodos mais longos congelar a -20°C.

- **Reagente de Dissociação:** 1 frasco (10ml) de Uréia em solução tampão. Pronto para uso.

- **Conjugado Enzimático:** 1 frasco (14ml) de conjugado monoclonal de camundongo IgG anti-humano com peroxidase horseradish (HRPO) em soro padrão com estabilizantes. Pronto para o uso e de coloração rosa. Conservante: Neomicina.

#### 3.2 Reagentes comuns para os kits To.R.C.H. S.T.D. e linhas de Doenças Infantis

- **Solução de Lavagem (concentrada):** 1 frasco (50ml) de PBS-Tween 20. Conservante: Timerosal (<0.05%). Antes do uso, diluir a quantidade necessária na proporção de 1:20 com H<sub>2</sub>O destilada. Armazenar a Solução de Lavagem diluída por 30 dias entre 2 e 8°C. No caso de cristais não dissolvidos, ressuspender a solução colocando o frasco a 37°C por alguns minutos.

- **Diluyente de Amostra (concentrado):** 1 frasco (20ml) de soro padrão com estabilizantes, de coloração vermelha. Conservante: NaN3 (< 0.1%). Antes do uso, diluir na proporção de 1:20 com Solução de Lavagem previamente diluída (ver item 2). Armazenar o Diluyente de Amostra diluído por 30 dias entre 2 e 8°C.

- **TMB Cromógeno:** 1 frasco (15ml) de Tetrametilbenzidina com tampão citrato-fosfato, DMSO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pronto para uso

- **Reagente bloqueador:** 1 frasco (14 ml) de 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pronto para uso.

- Seladores de Placas Adesivos
- Bolsa plástica

#### **4. MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO.**

##### **4.1 Teste Manual**

- Pipetas ajustáveis e automáticas que utilizem ponteiros descartáveis.
- Estufa seca, ajustável à temperatura de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Provetas graduadas para diluição de reagentes.
- Bomba de aspiração ou lavadora automatizada para lavagem dos poços.
- Espectrofotômetro de microplaca capaz de medir as absorbâncias (DO) no intervalo de 0-3.0 A e filtro de 450nm, 620nm e 405nm.
- H<sub>2</sub>O destilada.

##### **4.2 Teste Automático**

- Este teste pode ser realizado em equipamento automatizado para microplacas em kits ELISA.
- Garantimos sua aplicação em equipamentos automatizados RADIM e/ou SEAC.
- Caso o usuário utilize um equipamento não-RADIM ou SEAC para microplaca fica sob sua responsabilidade assegurar-se que o equipamento foi apropriadamente testado para kits ELISA.

#### **5. AVISOS E PRECAUÇÕES**

**Para que sejam obtidos resultados reprodutíveis e corretos, as seguintes regras deverão ser observadas:**

- Não misturar reagentes específicos (ver 3.1) de lotes diferentes.
- É possível misturar reagentes comuns (ver 3.2) de lotes diferentes.
- Não utilizar reagentes depois de expiradas suas datas de validade.
- Não armazenar ou deixar reagente e amostras em temperaturas elevadas ou em áreas de possível contaminação.
- Utilizar vidros completamente limpos, sem contaminação de íon metálico ou substâncias oxidantes.
- Utilizar água destilada ou deionizada, armazenadas em recipientes perfeitamente limpos.
- Evitar cuidadosamente qualquer contaminação entre amostras: para esta finalidade ponteiros descartáveis devem ser utilizadas para cada amostra e reagente.
- Não modificar de forma alguma o Procedimento de Ensaio. Se não for respeitado:
  - o tempo exato de incubação, a quantidade a ser adicionada nos reagentes e a temperatura; poderão acarretar resultados clínicos incorretos.
  - Reconstituir os reagentes liofilizados, se presentes, conforme descrito nos respectivos rótulos. Qualquer desvio no uso do reagente ou volumes errados pode afetar a confiabilidade do resultado obtido.

- No caso de procedimento manual, é importante utilizar pipetas calibradas e possuir os manuais técnicos apropriados. É de fundamental importância uma preparação e distribuição precisa dos reagentes. Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso, que foi corretamente calibrado e cumpriu todas as manutenções regularmente.

- Assegurar que a bomba de aspiração ou a lavadora automática se encontram em perfeitas condições de uso. A rinsagem inadequada dos poços pode causar classificações errôneas das amostras. Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso.

- Assegurar que o espectrofotômetro de microplacas se encontra em perfeitas condições de uso. O uso de um espectrofotômetro não calibrado ou filtros sujos podem causar uma leitura errônea das amostras com conseqüentes classificações incorretas das amostras. Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso.

- Assegurar que a estufa (se necessário) se encontra em perfeitas condições de uso. A temperatura de incubação diferente de  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pode causar uma perda da sensibilidade e/ou desnaturação biológica (amostras e/ou reagentes). Assegurar que o equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso e, periodicamente verificar a temperatura registrada.

- Assegurar que o agitador de microplaca (se necessário) se encontra em perfeitas condições de uso. Uma má agitação pode causar classificações incorretas das amostras. Assegurar que o equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso.

- Assegurar que todo equipamento utilizado para armazenagem das amostras e/ou o sistema se encontram em perfeitas condições de uso. A armazenagem em temperatura diferente da sugerida pode causar desnaturação do material biológico (amostras e/ou reagentes). Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso e, periodicamente verificar a temperatura registrada.

- Utilizar um método apropriado para correta identificação das amostras de pacientes. A identificação errônea pode causar perda da especificidade do sistema e resultados clínicos incorretos.

**Para evitar contaminação ambiental e pessoal, as seguintes precauções devem ser observadas:**

- Ao manipular material potencialmente infectante e durante a realização do ensaio, utilizar luvas.

- Não pipetar reagentes com a boca.

- Não fumar, comer, beber ou aplicar cosméticos durante o ensaio.

- Os reagentes: Cromógeno e Bloqueador devem ser manipulados com cuidado. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. No caso de acidente, enxaguar com água corrente.

- Todo material de origem humana utilizado para preparação deste kit foi testado e considerado negativo para HBsAg, anti-HIV e anti-HCV. Considerando que nenhum teste no momento pode garantir ausência completa destes vírus, todas as amostras e reagentes contendo material biológico utilizado para o ensaio devem

ser considerados potencialmente infectantes.

- Evitar respingos e formação de aerossol; nesses casos, lavar cuidadosamente com uma solução de 3% de hipoclorito de sódio. Todo o material de limpeza utilizado deve ser tratado como potencialmente infectante e descartado da forma correta.

- Todo o material utilizado no ensaio deve ser considerado como potencialmente infectante; portanto, deverá ser descontaminado antes de ser descartado e estar em conformidade com os procedimentos de segurança estabelecidos pela legislação local vigente.

- Alguns reagentes contêm azida sódica como conservante; para evitar a formação de azidas metálicas explosivas em tubulações de cobre e chumbo, os reagentes devem ser descartados lavando-se os canos de drenagem com grandes quantidades de água.

## 6. COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

O ensaio pode ser realizado em amostras de soro ou plasma. Amostras altamente hemolizadas ou lipêmicas devem ser descartadas. Amostras de plasma podem apresentar filamentos de fibrina que podem interferir no ensaio; assegurar que as amostras estão perfeitamente límpidas antes de testar. Manter as amostras apropriadamente armazenadas entre 2 e 8°C por 1 ou 2 dias; para períodos mais longos é aconselhável congelar as amostras a -20°C. O congelamento/descongelamento repetido das amostras deve ser evitado.

Antes do uso, diluir as amostras na proporção de 1:300 com Diluente de Amostra diluído (ver REAGENTES).

Exemplo: 10µL da amostra + 2990µL de Diluente de Amostra diluído.

## 7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

- Para iniciar o ensaio, as amostras e reagentes deverão estar à temperatura ambiente.

- Homogeneizar as amostras por inversão antes do uso.

**7.1** Preparar os poços em duplicata para: Branco, Controle de Baixa Avidéz, Controle de Alta Avidéz e Amostras.

**7.2** Pipetar **100µL** do Controle de Baixa Avidéz nos poços C1 e D1; **100µL** do Controle de Alta Avidéz nos poços E1 e F1; **100µL** da primeira amostra (diluída) nos poços G1 e H1; proceder da mesma forma para todas as outras amostras.

**7.3** Cobrir a microplaca com a folha adesiva fornecida e incubar os poços por **60 ± 5 minutos a 37 ± 2°C**.

**7.4** Aspirar à mistura incubada e lavar os poços **4 vezes** com **350µL** de Solução de Lavagem diluída. Aspirar todo líquido dos poços.

**7.5** Pipetar **100µL** do Diluente de Amostra em todos os poços ímpares (A1, C1, E1, G1, etc.) e 100µL do Reagente de Dissociação em todos os poços pares (B1, D1, F1, H1, etc.).

**7.6** Cobrir a microplaca com a folha adesiva fornecida e incubar os poços por **30 ± 2 minutos a 37 ± 2°C**.

7.7 Aspirar e lavar os poços conforme descrito no item 7.4.

7.8 Adicionar **100µL** do Conjugado Enzimático em todos os poços.

7.9 Cobrir a microplaca com a folha adesiva fornecida e incubar os poços durante **30 ± 2 minutos a 37 ± 2°C**.

7.10 Aspirar e lavar os poços conforme descrito no item 7.4.

7.11 Pipetar **100µL** de Cromógeno em todos os poços.

7.12 Incubar os poços por **10 minutos a 37±2°C**.

7.13 Pipetar **100µL** de Reagente Bloqueador em todos os poços.

7.14 Ler a absorbância dos poços com um espectrofotômetro bicromático a **450nm**, com filtro de referência de **620nm** (ajustando o equipamento em zero com o poço Branco). No caso de excesso de valores de absorbância, ler a **405nm**. A leitura deve ser realizada em até 15 minutos após o final do ensaio.

\* Caso utilize um equipamento automatizado RADIM e/ou SEAC no procedimento, favor consultar o respectivo manual.

## 8. ESQUEMA DO ENSAIO:

Poços	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
Controle Baixa Avidéz	/	/	100µl	100µ	/	/	/	/
Controle Alta Avidéz	/	/	/	/	100µl	100µl	/	/
Amostra	/	/	/	/	/	/	100µl	100µl
Incubar a 37±2°C por 60 minutos ±5 Lavar 4 X com 350µl de Solução de lavagem								
Diluyente amostra	100µl	/	100µl	/	100µl	/	100µl	/
Reagente dissociante	/	100µl	/	100µl	/	100µl	/	100µl
Incubar a 37±2°C por 30 minutos ±5 Lavar 4 X com 350µl de Solução de lavagem								
Conjugado	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubar a 37±2°C por 30 minutos ±5 Lavar 4 X com 350µl de Solução de lavagem								
Conjugado	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incuba a 37±2°C por 10 minutos								
Bloqueador	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Ler a 450 - 620nm / 405 - 620nm								

## 9. CÁLCULO DOS RESULTADOS

**9.a** Subtrair o valor do Branco (D.O. média dos poços A1 e B1) de todos os poços.

**9.b** Para cada amostra, assegurar que a D.O. dos poços incubadas com diluente de amostra seja de >0.300. Se for, você pode prosseguir. Se não for, a amostra não tem concentração suficiente para avaliar a avidéz IgG (pacientes negativos à infecção Toxoplasma ou outros pacientes infectados com uma resposta do anti-corpo ainda muito fraca).

**9.c** Para cada amostra e controle, calcular a razão percentual entre a D.O. da cavidade tratada com Reagente de Dissociação e a D.O. da cavidade tratada com o Diluente de Amostra. Esta razão será a Avidéz percentual da amostra/controle.

$$\frac{\text{D.O. Reagente de Dissociação}}{\text{D.O. Diluente de Amostra}} \times 100 = \% \text{ Avidéz}$$

**9.d** Amostras com D.O. >3.00 a 540nm em ambas os poços, devem ser lidas a 405nm. Em tais casos, o percentual de avidéz têm que ser calculado, baseado na leitura no ponto 9.c..

- Se for utilizado um equipamento automático para leitura de microplacas RADIM e/ou SEAC, a leitura espectrofotométrica será realizada automaticamente em três comprimentos de onda diferentes: 450, 620 e 405 nm, permitindo desta forma uma faixa de leitura mais ampla.

### 9.1 Exemplo de Cálculo

Amostra	D.O. Diluente de amostra	D.O. Reagente de Dissociação	% de Avidéz
Controle de Baixa Avidéz	0.947	0.178	18.8%
Controle de Alta Avidéz	1.244	0.972	78.1%
Amostra	0.565	0.080	14.1%

### 9.2 Critério de Validação

A D.O. a 450nm dos Controles de Baixa e Alta Avidéz nos poços tratados com Diluente de Amostra devem ser >0.500.

O percentual de Avidéz (calculado conforme tabela acima) deve ser <35% para o Controle de Baixa Avidéz e >45% para o Controle de Alta Avidéz. Em qualquer caso, os resultados têm que ser estabelecidos pela avaliação clínica e teste de diagnóstico adicional.

### 9.3 Interpretação dos resultados

% de avides >45%	IgG anti-CMV com alta avides
% de avides 35-45%	IgG anti- CMV com avides média (zona cinza)
% de avides <35%	IgG anti-CMV com avides baixa

**\*Nota: Verificar sempre a validação do ensaio, baseando-se nos valores obtidos na Folha de Controle de Qualidade.**

## 10. DESEMPENHO DO ENSAIO

### 10.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada em um grupo de 118 amostras clínicas com infecção passada ou secundária. O resultado foi de 97.4%.

### 10.2 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi avaliada em um grupo de 33 amostras com infecção primária. O resultado foi de 93.9%.

### 10.3 Especificidade Analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a habilidade do ensaio em detectar precisamente o analito específico na presença de fatores potencialmente interferentes na amostra padrão. Estudos controlados de substâncias potencialmente interferentes mostraram que a performance do ensaio não foi afetada por anticoagulantes (EDTA, citrato e heparina).

### 10.4 Precisão

A precisão foi avaliada em um equipamento da Radim determinando a repetibilidade e a reprodutibilidade do ensaio (variabilidade intra-ensaio e inter-ensaio), em 3 soros com diferentes porcentagens de avides.

#### Repetibilidade (intra-ensaio)

Soro	Media	±	D.S.	C.V.	Repetições
	(% de Avides)			%	Nº
A	11.5	±	0.8	7.1	10
B	53.2	±	3.6	6.7	10
C	82.9	±	2.1	2.5	10

#### Reprodutibilidade (inter-ensaio)

Soro	Media	±	D.S.	C.V.	Repetições
	(% de Avides)			%	Nº
A	11.15	±	2.98	26.7	10
B	18.44	±	2.26	12.3	10
C	76.39	±	10.64	13.9	10

## 11. LIMITES DE ENSAIO







Um resultado de Aidez alta não exclui a possibilidade de uma infecção recente. Por outro lado, devido à alta especificidade do teste, um resultado positivo indica fortemente uma infecção nos 3 meses anteriores.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ahlfors K (1982). Epidemiological studies of congenital cytomegalovirus infection. Scand J. Inf.Dis., suppl.34.
2. Stern H. Turker S.M. (1973). Prospective study of cytomegalovirus infection in pregnancy.Br.Med.J. 2:268-270.
3. Doerr MW. (1978). Cytomegalovirus infection in pregnancy.J.Virol.Methods 17:127-132.
4. Stagno S., Pass R.F., Cloud G., Britt W.J., Henderson R.E.,Walton P.D., Veren D.A., Page F.,ALFORD C.A. (1986).
5. Pass R.F., Griffiths P.D., August A.M. (1983). Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: Comparison of patients with primary and recurrent infections.J.Inf.Dis. 147:40-46.

## SÍMBOLOS

*EN 980 - EDMA*

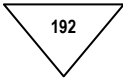
REF	Referencia ou número do pedido
	Lote
	Data de vencimento
IVD	Para uso diagnóstico In-vitro
	Marcação CE segundo a diretiva IVD 98/79 CE
	Conservar entre 2 e 8°C
	Fabricante
	Risco biológico



Consultar as instruções de uso



Suficiente para 96 testes



Suficiente para 192 testes



Data de referência



Reconstituir com



Água destilada ou deionizada

**Fabricado por:**

RADIM SPA  
Via del Mare, 125  
00040 – Pomezia  
ITÁLIA

**Importado e distribuído por:**

RADIM LATINO AMÉRICA DIAGNÓSTICOS LTDA.  
Rua Domingos de Moraes, 1061 cj 111 e 112 – Vila Mariana  
CEP. 04009-002 – São Paulo – SP  
CNPJ. 04.595.434/0001-32

**Serviço de Atendimento ao Consumidor:**

Fone: 11 – 5084-9669 / Fax: 11 – 5082-2029

**POTENCIALMENTE INFECTANTE**

Uso exclusivo para diagnóstico in vitro

Conservar entre 2º a 8ºC

Reg: ANVISA: 80103990036

Resp.: Técnico: Sueli S. Nakano / CRBM - 4501