



ImmunoComb® II

CMV IgM



Código: 60461005

Formato: 12 pruebas

Para uso diagnóstico in vitro solamente

Uso Previsto

El kit ImmunoComb® II **CMV IgM** es una prueba rápida para la detección cualitativa de anticuerpos IgM contra el citomegalovirus (CMV) en el suero o plasma humano. 12 pruebas pueden ser realizadas con un kit.

Introducción

El Citomegalovirus es miembro de la familia *Herpesviridae*. Es un virus ubicuo con altos porcentajes de infección durante los primeros años de vida. Al menos un 80% de la población adulta en todo el mundo acarrea anticuerpos contra CMV. La infección con CMV puede ser adquirida a través del contagio congénito, en el momento del nacimiento, o a edades más avanzadas a causa de la transmisión por vía de transfusión de sangre, productos sanguíneos, saliva y otros fluidos corporales. La infección de CMV es en su mayor parte asintomática. Sin embargo, pueden presentarse ocasionalmente síntomas como fiebre persistente, neumonitis, enteritis, mononucleosis y hepatitis.

En dos instancias la infección de CMV puede causar serias complicaciones: infección primaria durante los primeros meses del embarazo, conduciendo a anomalías congénitas en el feto, e infección en pacientes inmunodeficientes, como recipientes de órganos o trasplantes de médula ósea y personas que sufren del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En los pacientes de trasplantes, el CMV es la más común causa infecciosa de muerte. En los pacientes de SIDA, las enfermedades inducidas por el CMV afectan por lo general los pulmones, los intestinos y el sistema nervioso central. Otra grave complicación, la retinitis, puede producir ceguera.

La determinación de anticuerpos IgM anti-CMV permite el diagnóstico efectivo de la infección aguda o reciente de CMV. La prueba es particularmente útil en el seguimiento de mujeres embarazadas que no estuvieron expuestas previamente al CMV y por consiguiente no están protegidas contra el virus. Además, la determinación del anticuerpo IgM específico en el recién nacido es útil para el diagnóstico del contagio congénito de CMV.

Principio de la Prueba

La prueba ImmunoComb® II CMV IgM es un ensayo inmunoenzimático indirecto de fase sólida (EIA). La fase sólida es un Peine con 12 proyecciones (dientes).

Cada diente está sensibilizado en dos áreas reactivas:

punto superior — IgM humano (Control Interno)
punto inferior — antígenos de CMV inactivados

La Bandeja de Desarrollo tiene 6 filas (A-F) de 12 pocillos. Cada fila contiene una solución reactiva lista para ser usada en cada etapa del ensayo. La prueba es realizada en etapas, pasando el Peine de una fila a otra, con un período de incubación en cada etapa.

Al comienzo de la prueba, las muestras de suero o plasma son pre-tratadas con anti-IgG humano (removedor), para prevenir interferencias como resultado de la competencia con el IgG anti-CMV y el factor reumatoideo. Las muestras previamente tratadas se incuban posteriormente con la solución en los pocillos de la fila A. Si existe IgM anti-CMV en las muestras, se unirá específicamente a los antígenos de CMV en el punto inferior de los dientes del Peine (Figura 1). Los componentes no unidos son lavados en la fila B. En la fila C, el IgM capturado en los puntos inferiores de los dientes y el IgM humano en el punto superior (Control Interno), reaccionan con anticuerpos anti-IgM humano marcados con fosfatasa alcalina (FA). En las dos filas siguientes, los componentes libres son eliminados mediante un lavado. En la fila F la fosfatasa alcalina ligada reacciona con los componentes cromogénicos. Los resultados se pueden apreciar como puntos color azul grisáceo en la superficie de los dientes del Peine.

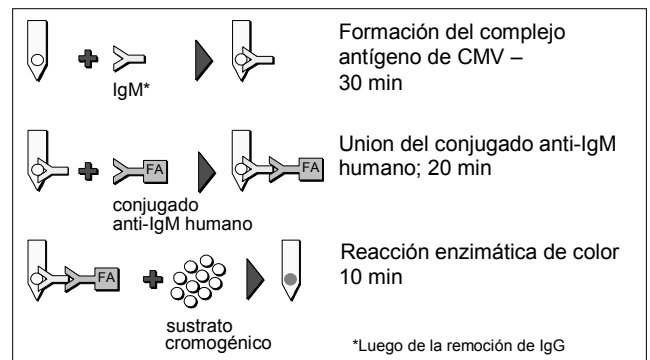


Figura 1. Principio de la Prueba

El kit incluye un Control Positivo (IgM anti-CMV) y un Control Negativo, que deben incluirse cada vez que se realiza la prueba. Al término de ésta, el diente usado con el Control Positivo debe mostrar 2 puntos de color azul grisáceo. El diente usado con el Control Negativo debe mostrar el punto superior y un punto inferior muy tenue o la ausencia del mismo. El punto superior debe también aparecer en todos los demás dientes, a fin de confirmar que el kit funciona apropiadamente y que la prueba fue realizada de manera correcta.

Contenido del Kit

Peine

El kit contiene un Peine de plástico. El Peine tiene 12 dientes, un diente para cada prueba (Figura 2). Cada diente está sensibilizado en dos áreas reactivas:

punto superior — IgM humano (Control Interno)
punto inferior — antígenos de CMV inactivados

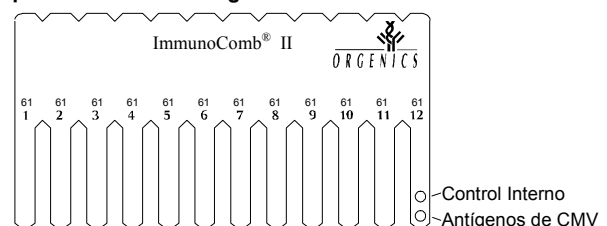


Figura 2. Peine

El Peine es suministrado en un empaque de aluminio que contiene una bolsa desecante.

Bandeja de Desarrollo

El kit contiene una bandeja de desarrollo cubierta con papel de aluminio. La Bandeja de Desarrollo (Figura 3) contiene todos los reactivos necesarios para la prueba. La Bandeja de Desarrollo consiste de 6 filas (A-F) de 12 pocillos cada una.

Los contenidos de cada fila son los siguientes:

- Fila A diluyente de muestras con anticuerpos de cabra anti-IgG humano
- Fila B solución de lavado
- Fila C anticuerpos anti-IgM humano marcados con fostatasa alcalina
- Fila D solución de lavado
- Fila E solución de lavado
- Fila F solución de sustrato cromogénico conteniendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul tetrazolio (NBT)

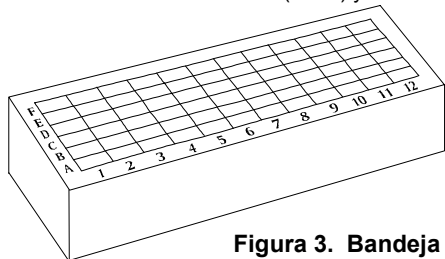


Figura 3. Bandeja de Desarrollo

Control Positivo — 1 frasco (tapa roja) de 0.4 ml de plasma humano diluido e inactivado con calor, conteniendo anticuerpos IgM anti-CMV.

Control Negativo — 1 frasco (tapa verde) de 0.4 ml de plasma humano diluido, reconstituido e inactivado con calor, negativo para anticuerpos anti-CMV.

Solución Removedora — 1 frasco conteniendo 4 ml de anticuerpos diluidos de cabra anti-IgG humano.

Perforador — para perforar la cubierta de aluminio de los pocillos de la Bandeja de Desarrollo.

Seguridad y Precauciones

- Todos los materiales de origen humano usados en la preparación del kit pasaron pruebas que demostraron que no son reactivos al antígeno de superficie de la hepatitis B, así como a anticuerpos de HIV o el virus de la hepatitis C. Ya que ningún método puede garantizar por completo la ausencia de contaminación viral, todas las soluciones de referencia y todas las muestras humanas deben ser manejadas como si fueran potencialmente infecciosas.
- Use guantes quirúrgicos y ropas de laboratorio. Siga los procedimientos de laboratorio aceptados para el trabajo con suero o plasma humano.
- No use la pipeta aspirando con la boca.
- Deseche todas las muestras, Peines usados*, Bandejas de Desarrollo y otros materiales usados con el kit como desechos biocontaminantes.
- No mezcle reactivos de lotes diferentes.
- No use el kit después de la fecha de caducidad.

Conservación y estabilidad del kit

- El kit es enviado a 2-8° C. Durante el transporte el kit puede ser conservado a menos de 30° C durante cortos períodos de tiempo que no excedan de 48 horas. Los controles internos indican que el kit no ha sido dañado durante el transporte.
- Conservar el kit en su caja original a 2-8° C.
- No congelar el kit.
- Después de abrir el kit inicialmente, los componentes deben ser conservados a 2-8° C.
- El funcionamiento del kit después de su apertura inicial, es estable hasta la fecha de caducidad del mismo si se conserva a 2-8° C.
- Después del uso inicial, el peine y la bandeja de reactivos no pueden ser utilizados más de tres veces.

Manejo de las Muestras

- Es posible usar suero o plasma en la prueba.
- Las muestras pueden ser almacenadas por 7 días a temperaturas de 2° a 8°C antes de la prueba. Para almacenar las muestras por más de 7 días, congélelas a -20°C o a temperaturas más bajas.
- Después de descongelar las muestras de suero, centrifúguelas. Use el sobrenadante para la prueba. Evite congelar y descongelar repetidamente.
- Los anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato sódico no han mostrado tener efecto sobre los resultados del test.

* A menos que sea archivado para consulta posterior

Procedimiento de la Prueba

Equipo Necesario

- Pipetas de precisión ajustables con puntas desechables con capacidad de 25 µl y 100 µl
- Tijeras
- Cronómetro de laboratorio o reloj
- Microtubos o micropocillos de titulación

Preparación de la Prueba

Ponga todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente y realice la prueba a temperatura ambiente (22°-26°C).

Preparación de la Bandeja de Desarrollo

1. Incube la Bandeja de Desarrollo en una incubadora a 37°C por 20 minutos; o deje a temperatura ambiente (22°-26°C) por 3 horas.
 2. Cubra la mesa de trabajo con papel absorbente, para ser desechado como desecho biocontaminante al concluir la prueba.
 3. Mezcle los reactivos sacudiendo la Bandeja de Desarrollo.
- Nota:** No retire la cubierta de aluminio de la Bandeja de Desarrollo; rómpala usando la punta desechable de la pipeta o el perforador, cuando las instrucciones de la prueba así lo indiquen.

Preparación del Peine

Precaución: Para asegurar el funcionamiento apropiado de la prueba, no toque los dientes del Peine.

1. Abra el empaque de aluminio por el borde perforado. Retire el Peine.
2. Es posible utilizar todo el Peine y la Bandeja de Desarrollo o una parte. Para utilizar parte del Peine:
 - a. Determine cuantos dientes va a necesitar para analizar las muestras y los controles. Se necesita un diente para cada prueba. Cada diente tiene impreso el número del código del kit, "61", para permitir la identificación de los dientes sueltos.
 - b. Doble y rompa verticalmente el Peine, o córtelo con tijeras (ver Figura 4) para separar el número requerido para las pruebas (Nro. de pruebas mas dos controles).
 - c. Vuelva a meter la porción no utilizada del Peine en el empaque de aluminio (con la bolsa desecante). **Cierre bien el empaque** (con un clip, por ejemplo) para mantenerlo seco. Almacene el Peine en la caja original del kit a temperaturas de 2° a 8°C para su uso posterior.

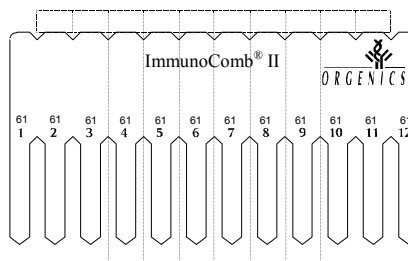


Figura 4. Fraccionamiento del Peine

Instrucciones de la Prueba

Pre-tratamiento de Muestras y Controles

1. Para cada muestra y control, vierta 100 µl de solución removedora en un microtubo o un pocillo de microtitulación.
2. A cada microtubo o pocillo, añada 25 µl de muestra, o del Control Positivo o Negativo que vienen con el kit. **Mezcle** la solución rellenando y vaciando repetidamente la pipeta.
3. Programe el cronómetro e incube por 10 minutos.

Agregar Muestras Pre-tratadas a la Bandeja de Desarrollo

4. Pipete 25 µl de una muestra pre-tratada. Perfore la cubierta de aluminio de un pocillo de la fila A con la punta de la pipeta o el perforador y vacíe la muestra en el fondo del pocillo. **Mezcle** la solución rellenando y vaciando el pocillo. Deseche la punta de la pipeta.
5. Repita el paso 4 para las demás muestras y los dos controles prediluidos. Use un nuevo pocillo en la fila A y cambie la punta de la pipeta para cada muestra o control.
6. Programe el reloj e incube por 10 minutos.

Reacción Antígeno-Anticuerpo (Fila A de la Bandeja de Desarrollo)

7. a. Inserte el Peine (con el lado **impreso** hacia Ud.) en los pocillos de la fila A que contienen las muestras y los controles.
Mezcle: Retire e inserte el Peine en los pocillos varias veces
- b. Deje el Peine en la fila A e incube por exactamente 30 minutos. Programe el reloj. Antes de cumplirse los

30 minutos, perforo la cubierta de la fila B, utilizando el perforador. No abra más pozos de los necesarios.

- c. Al cumplirse los 30 minutos, saque el Peine de la fila A. **Absorba el líquido adherido** a las puntas de los dientes apoyándolos sobre un papel absorbente limpio. No toque la superficie frontal del diente.

Primer Lavado (Fila B)

8. Inserte el Peine en los pocillos en la fila B. **Agite:** retire e inserte vigorosamente el Peine en los pocillos por al menos 10 segundos para que quede bien lavado. Repita el lavado varias veces agitando en el transcurso de 2 minutos; mientras tanto, perforo el papel aluminio de la fila C. Después de dos minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido** como en el paso 7c.

Unión del Conjugado (Fila C)

9. Inserte el Peine en los pocillos de la fila C. **Mezcle** como en el paso 7a. Incube la Bandeja de Desarrollo con el Peine por 20 minutos. Perforo el papel aluminio de la fila D. Después de 20 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

Segundo Lavado (Fila D)

10. Inserte el Peine en los pocillos de la fila D. **Agite** repetidamente durante 2 minutos, como en el paso 8. Mientras tanto, perforo el papel aluminio de la fila E. Después de 2 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

Tercer Lavado (Fila E)

11. Inserte el Peine en los pocillos de la fila E. **Agite** repetidamente durante 2 minutos. Mientras tanto, perforo el papel aluminio de la fila F. Después de 2 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

Reacción de Color (Fila F)

12. Inserte el Peine en los pocillos de la fila F. **Mezcle.** Incube la Bandeja de Desarrollo con el Peine por 10 minutos. Después de 10 minutos, retire el Peine.

Detención de la Reacción (Fila E)

13. Inserte el Peine de nuevo en la fila E. Después 1 minuto, retire el Peine y seque al aire.

Almacenamiento de las Partes No Usadas del Kit

Bandeja de Desarrollo

Si no usó todos los pocillos de la Bandeja de Desarrollo, puede almacenarla para ser utilizada posteriormente:

- Selle los pocillos usados con una cinta adhesiva ancha a fin de que nada se derrame fuera de los pocillos, incluso en caso de que la Bandeja de Desarrollo sea volcada.

Otros Materiales del Kit

- Vuelva a colocar la(s) Bandeja(s) de Desarrollo, Peine(s), perforador, solución removedora, controles e instrucciones en la caja original del kit y almacene a temperatura de 2° a 8°C.

Resultados de las Pruebas

Validación

A fin de confirmar el funcionamiento correcto de la prueba y demostrar que los resultados son válidos, deben cumplirse las siguientes tres condiciones (ver Figura 5):

- El **Control Positivo** debe producir **dos** puntos en el diente del Peine.
- El **Control Negativo** debe producir un punto **superior** (Control Interno). El punto inferior debe no aparecer o aparecer tenuemente, sin afectar la interpretación de los resultados.
- Cada muestra analizada** debe producir un punto **superior** (Control Interno).

Si cualquiera de las tres condiciones no se cumple, los resultados son inválidos y las muestras y controles deben ser reexaminados.

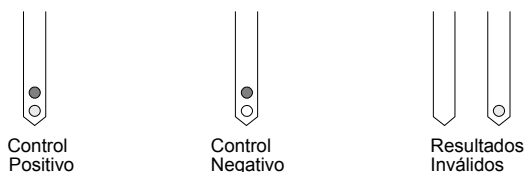


Figura 5. Validación de la Prueba

Interpretación Cualitativa de los Resultados

Interpretación Visual

Compare la intensidad del punto inferior de cada diente de la muestra con la del punto **inferior** del diente del **Control Positivo** (Figura 6).

- Un punto con una intensidad **mayor** que o **igual** a la del Control Positivo indica la presencia de anticuerpos IgM anti-CMV en la muestra.
- La ausencia de un punto o su presencia con una intensidad **menor** que la del Control Positivo indica la **ausencia** de anticuerpos anti-CMV en la muestra (Resultado **Negativo**).

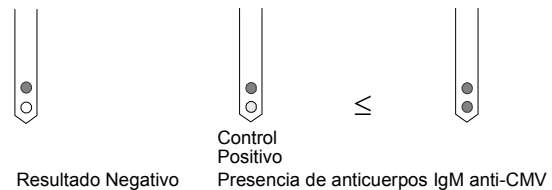


Figura 6. Resultados

Documentación de los Resultados

Debido a que el color que aparece en el Peine es estable, los Peines pueden ser archivados para consulta posterior.

Limitaciones

Como con otras pruebas ideadas para el diagnóstico in vitro, los resultados de la prueba deben ser evaluados en relación a la sintomatología, historia clínica y otros parámetros de laboratorio del paciente.

Eficacia de la Prueba*

La sensibilidad y especificidad del kit **ImmunoComb® II CMV IgM** fueron evaluadas en un panel de 498 muestras de suero, en comparación con dos ensayos de referencia EIA. Los resultados son resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la Prueba

Ensayos de Referencia**	ImmunoComb® II CMV IgM	
	Positivo	Negativo
Positivo	163	2
Negativo	6	327

Las siguientes características de desempeño fueron calculadas:

Sensibilidad = 98.8 %
Especificidad = 98.2 %

Capacidad de repetición

Diez peines fueron elegidos al azar de varios lotes de una producción. Los 10 peines fueron probados 12 veces con un suero positivo de anti-CMV IgM y los resultados fueron analizados visualmente. En todas las pruebas la muestra dieron resultados positivos.

Reproductibilidad

Dos muestras positivas de anti-CMV IgM fueron probadas en tres peines de diferentes lotes de la producción. Los resultados fueron analizados visualmente. En todas las pruebas las muestras dieron resultados positivos.

Reacción cruzada

Fueron encontradas insignificantes muestras positivas de CMV IgG con reacción cruzadas. La reacción cruzada con muestras positivas de otras infecciones de herpesviridae tales como Varicela-zona, EBV, ANA y HSV fueron encontradas también insignificantes. No puede ser excluida, una interferencia leve con los sueros de mujeres embarazadas y de pacientes positivos del factor reumatoide.


Interferencia

No se observo ninguna interferencia con muestras hemolíticas (hemoglobina mayor de 10mg/ml) lipemica (colesterol mayor de 281.6mg/dL; triglicéridos mayor de 381.0mg/dL) y Alta bilirrubina (mayor a 20mg/dl).


















* Datos detallados disponibles

Bibliografía

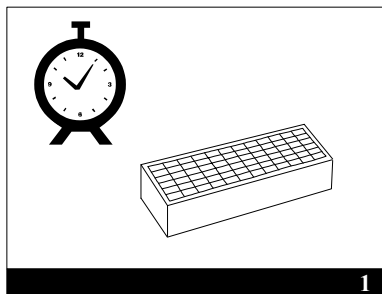
- Corey L.** 1994. Herpesviruses, *In*: Sherris JC, ed. Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases. Edited by Kenneth J.R., Norwalk, C.T., Appleton & Lange.
- Clewley, G.S., Emery, V.C., Griffiths, P.** 1998. Diagnosis of CMV and other herpesviruses. *In*: Bowden, R.A., Ljungman, P., Paya, C.V., eds. Transplant infections. Philadelphia, Penn: Lippincott; p. 51-62.
- Hirsch, M.S.** 1998. Cytomegalovirus and human herpesvirus types 6, 7 and 8. *In*: Harrison's principles of internal medicine. Edited by Fauci, A.S., et al. New York: McGraw-Hill.
- Griffiths, P., Emery, V.** 1997. Cytomegalovirus. *In*: Clinical virology. New York, Ny: Churchill, Livingstone. p. 445-470.
- Laing, R.B., Brettle, R.P., Leen, C.L.** 1997. Effect of CMV serology and CMV disease on AIDS morbidity and mortality. *Infection*. 25(4): p. 255.
- Landini, M.P.** 1993. New approaches and perspectives in Cytomegalovirus diagnosis. *In*: Melnick, J.L., ed Prog. Med Virol. Basel, Karger. Vol 40: pp. 157-177.
- Ljungman, P., Griffiths, P. and Paya, C.** 2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 34(8): p. 1094-1097.
- Maine, G.T., Lazzarotto, T., Landini, M.P.** 2001. New developments in the diagnosis of maternal and congenital CMV infection. *Expert Rev Mol Diagn*. 1(1): p. 19-29.

<p>Fabricante:</p>  <p>ORGENICS P.O.Box 360 Yavne 70650, Israel Tel: 972-8-9429201 Fax: 972-8-9438758</p>	<p>Representante autorizado en UE Organics France S.A. 19, rue Lambrechts 92400 Courbevoie, France</p> <p>Tel: 01 41 99 92 90 Fax: 01 41 99 92 95</p> <p>Version: 60461005/S6/OR (06/2005)</p>
--	--

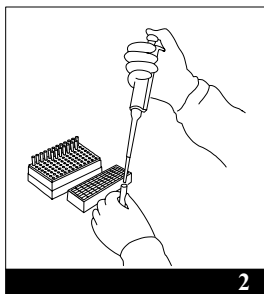
Leyenda de los símbolos

	ImmunoComb® tarjeta
	Bandejas de Desarrollo
	Control positivo
	Control negativo
	Perforador
	Consulte las instrucciones de uso
	Atención, ver instrucciones de uso
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura
	Contenido suficiente para 12 ensayos
	Fabricante
	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Número de catálogo
	Solución Removedora
	Código de lote
	Fecha de caducidad
	Numero de serie

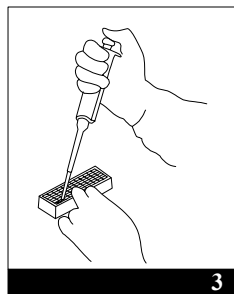
Resumen de los Principales Procedimientos de la Prueba



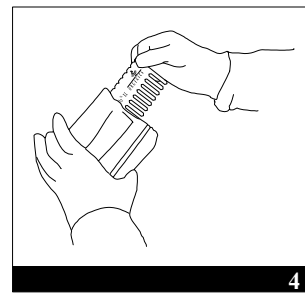
1
Preincubación de la Bandeja de Desarrollo: 3 hrs a temperatura ambiente o 20 minutos a 37°C



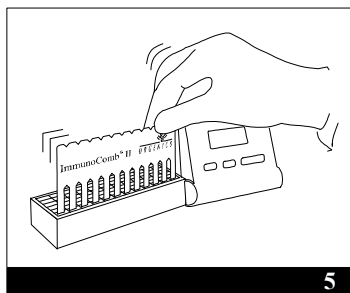
2
Tomar las muestras y controles para ser pretratadas



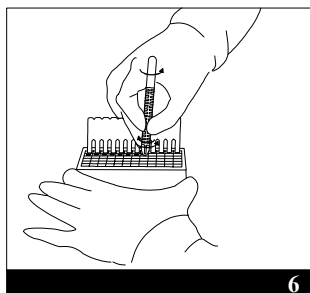
3
Agregar muestras y controles pre-tratados a la fila A. Mezclar e Incubar



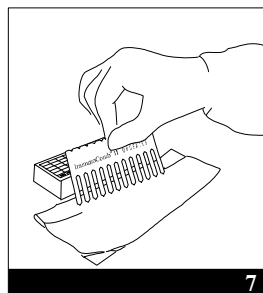
4
Sacar el Peine del empaque



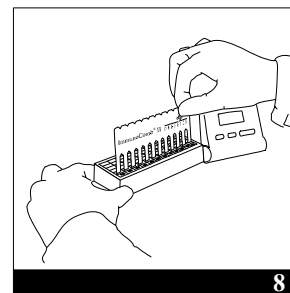
5
Insertar el Peine y mezclar en la fila A. Incubar



6
Perforación de la fila B



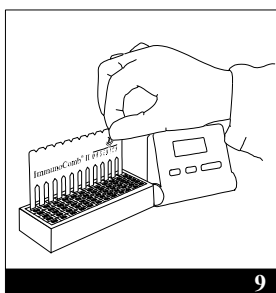
7
Absorber el líquido adherido a los dientes



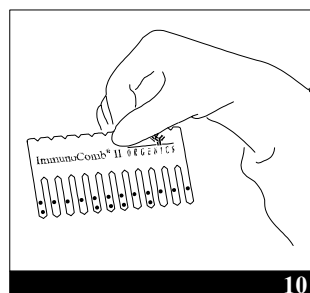
8
Insertar el Peine y agitar en la fila B. Incubar

Luego de mezclar/agitar e incubar en las filas C,D y E

.....



9
Reacción de color en la fila F



10
Resultados

Resumen del Procedimiento de la Prueba

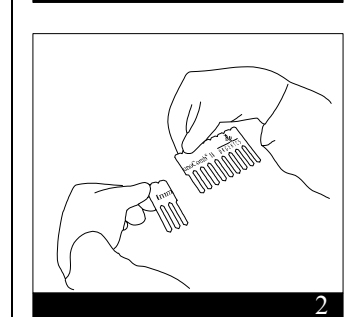
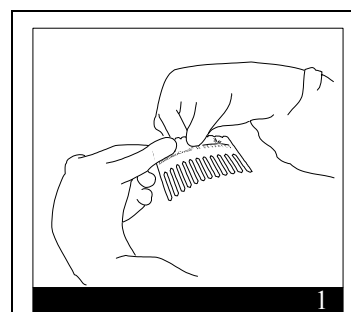
Las instrucciones abreviadas abajo son para los usuarios experimentados en el uso del kit ImmunoComb® II CMV IgM.

(Para instrucciones detalladas, favor referirse al texto completo)

1. Lleve todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente y realice la prueba a temperatura ambiente.
2. Pre-trate 25 µl de cada muestra y control mezclando con 100 µl de solución removedora e incube por 10 min.
3. Vierta 25 µl de cada muestra y control pre-tratado en los pocillos de la fila A de la Bandeja de Desarrollo. **Mezcle** e incube por 10 minutos.
4. Inserte el Peine en la fila A y continúe como se describe en la Tabla 1:

Tabla 1. Resumen del Procedimiento de la Prueba

Paso	Fila	Proceda como sigue
Reacción Antígeno-anticuerpo	A	Mezcle; incube 30 minutos; absorba.
Lavado	B	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Unión del conjugado	C	Mezcle; incube 20 minutos; absorba.
Lavado	D	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Lavado	E	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Reacción de color	F	Mezcle; incube 10 minutos.
Detención de la reacción	E	Incube 1 minuto; seque al aire.



Manera de romper el Peine