

INTENCIÓN DE USO

El kit CMV IgM ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgM de Citomegalovirus en suero o plasma humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Citomegalovirus (CMV) es un virus perteneciente a la familia de los herpes. La mayoría de los adultos y niños que se contagian del virus no exhiben síntomas ni consecuencias. La infección de CMV tiene significancia clínica principalmente en mujeres embarazadas, niños recién nacidos con posible infección congénita, pacientes trasplantados inmunosuprimidos, e individuos con HIV. El CMV tiene una amplia presencia, más del 60% de la población se ve infectada en algún momento de sus vidas. Un incremento significativo de anticuerpos de CMV IgG mediante ELISA sugiere un contagio reciente o bien la reactivación de una infección de CMV latente. El anticuerpo de CMV IgM puede ser detectado por ELISA en infecciones primarias (93-100%) así como en infecciones reactivadas (40%). Una respuesta de IgM puede verse reducida o ausente en pacientes inmunocomprometidos con una infección activa. En pacientes trasplantados, la infección por CMV puede ser asociada a una alta mortalidad.

PRINCIPIO DE ENSAYO

El suero diluido del paciente es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgM específico, en caso de estar presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y el conjugado enzimático es agregado para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, en caso de estar presente. El exceso de conjugado enzimático es lavado para luego agregar el sustrato. La microplaca es incubada a efectos de permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM específico en la muestra.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos antígeno CMV	12x8x1
2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar)	22 ml
3. Calibrador: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrulado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984:
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación – descongelación.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare la solución de lavado 1X agregando el contenido de la botella (25X) a 475 mL de agua destilada o desionizada. Almacene a temperatura ambiente (18-26°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µl de la muestra a 200 µl del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 100 µl del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100 µl de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µl de solución de frenado.
9. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

EJEMPLO DE MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador O.D.	0.8
Factor de Calibración (CF)	0.5
Valor Punto de Corte	0.4
Control Positivo O.D.	1.2
Anticuerpo Índice	3.0
Muestra del Paciente O.D.	1.6
Anticuerpo Índice	4.0

CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser mayor que 0.250.
2. El Anticuerpo Índice para control negativo debe ser menor que 0.9.
3. El Anticuerpo Índice para control positivo debe ser menor que 1.2.

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de CMV IgM; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.9 Anticuerpo no detectado de CMV IgM por ELISA

0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 Anticuerpo detectado de CMV IgM por ELISA

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Para asegurar sensibilidad y especificidad en esta prueba IgM, el diluyente de la muestra provisto fue formulado para bloquear posibles interferencias de IgG y de Factor Reumatoideo (RF). Puede observarse turbidez luego de diluir la muestra, lo que se debe al bloque del suero IgG y no ha demostrado interferencia en los resultados. Dicha turbidez puede ser removida mediante centrifugación.
2. En especímenes con un alto RF y gran presencia de anticuerpos autoinmunes, no puede asegurarse la eliminación de interferencias.
3. Las muestras lipémicas pueden causar resultados erróneos.

PERFORMANCE

1. Sensibilidad y Especificidad:

120 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 31 sueros resultaron positivos y 84 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 96%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	CMV IgM ELISA		
	+	-	Total
Kit de Referencia ELISA	31	2	33
-	3	84	87
Total	34	86	120

2. Precisión:

Estudio Intra-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	16	1.28	0.124	9.68
2	16	1.21	0.057	4.71
3	16	0.12	0.006	4.87

Estudio Inter-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	10	3.17	0.222	7.00
2	10	2.55	0.200	7.84
3	10	0.27	0.012	4.44

REFERENCIAS

1. Mangano WE; Gruninger RP. Use of viral cultures and serologic tests for cytomegalovirus infection. Rational or random? Am J Clin Pathol 1996; 106(2):180-4.
2. Gupta CK; Leszczynski J; Gupta RK; Siber GR. An enzyme immunoassay based micro- neutralization test for titration of antibodies to human cytomegalovirus (CMV) and its correlation with direct ELISA measuring CMV IgG antibodies. Biologicals 1996; 24(1):41-9.
3. Gutierrez J; Maroto MC. A comparison of two ELISA methods for the investigation of anti- cytomegalovirus IgG antibodies. Microbios 1997; 90(364-365):151-4.