

CMV IgM

Anticuerpos IgM contra el Citomegalovirus (CMV) (Elisa)

Uso Previsto:

El ensayo CMV IgM es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa in vitro de anticuerpos IgM contra el citomegalovirus (CMV) en suero y plasma humanos.

Resumen: 1-3

El citomegalovirus (CMV) (del griego cito-, "célula" y megalos-, "grande") es un género de virus del orden Herpesvirales, en la familia Herpesviridae, en la subfamilia Betaherpesvirinae. Los humanos y los monos sirven como huéspedes naturales.

Actualmente hay ocho especies en este género, incluida la especie tipo, el citomegalovirus humano (HCMV, herpesvirus humano 5, HHV-5), que es la especie que infecta a los humanos. Las enfermedades asociadas con HHV-5 incluyen mononucleosis y neumonía. En la literatura médica, la mayoría de las menciones de CMV sin más especificaciones se refieren implícitamente al CMV humano. El CMV humano es el más estudiado de todos los citomegalovirus.

Principio de Prueba:

Duración total de la prueba: 70 minutos

Este kit utiliza el principio de captura ELISA para detectar CMV IgM. Las tiras de micropocillos de poliestireno están recubiertas previamente con IgM anti-humana de ratón (específica de cadena anti- μ). Durante el primer paso de incubación, todos los anticuerpos IgM se unen al anticuerpo monoclonal IgM antihumano de ratón recubierto en la microplaca, incluido el IgM anti-CMV, los pocillos se lavan para eliminar las proteínas séricas no unidas y los antígenos del CMV se conjugan con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP- conjugado) se agregan. Durante el segundo paso de incubación, si hay anticuerpos IgM CMV en la muestra, los antígenos conjugados con HRP se unirán a los complejos IgM anti-CMV humanos formados previamente y el conjugado HRP no unido se eliminará mediante lavado. Las soluciones de cromógeno que contienen tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de urea se agregan a los pocillos y, en presencia del inmunocomplejo de anticuerpo IgM antihumano (antígeno IgM (HRP), los cromógenos incoloros son hidrolizados por el conjugado de HRP unido a un color azul). producto El color azul se vuelve amarillo después de detener la reacción con ácido sulfúrico.

La cantidad de intensidad de color se puede medir y es proporcional a la cantidad de anticuerpo capturado en los pocillos y a la cantidad de anticuerpo en la muestra, respectivamente.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 11,0 ml de HRP (peroxidasa de rábano picante) marcada con antígeno CMV. Contiene 0,1% de conservante ProClin300.
- Diluyente de muestra, 1 vial, 11 ml, listo para usar
- Control Positivo, 1 vial, 0,2 mL.
- Control Negativo, 1 vial, 0,2 ml
- Sustrato, 1 vial, 11mL, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L.
- Concentrado de solución de lavado: símbolo 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), solución de lavado PBS-Tween.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos).

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 μ L con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua destilada

Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.

- Tome las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio.
 - La eliminación de todos los materiales de desecho debe realizarse de acuerdo con las pautas locales.
 - No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
 - No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
 - Todos los desechos de muestras y reacciones deben considerarse potencialmente biopeligrosos. La manipulación de las muestras y los residuos de la reacción debe realizarse de acuerdo con las normativas y directrices locales.
 - La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras graves. En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
 - Los ácidos neutralizados y otros desechos líquidos deben descontaminarse agregando un volumen suficiente de hipoclorito de sodio para obtener una concentración final de al menos 1,0%. Puede ser necesaria la exposición a hipoclorito de sodio al 1,0 % durante 30 minutos para garantizar una descontaminación eficaz.
 - Algunos reactivos contienen 0,05 % o 0,1 % de ProClin 300 que puede causar sensibilización por contacto con la piel, por lo que debe evitarse. Los reactivos y sus recipientes deben desecharse de forma segura. En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.
 - El sustrato tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lave los objetos contaminados antes de reutilizarlos. Si es inhalado, lleve a la persona al aire libre.
 - Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS), que está disponible a pedido.
 - No fume, beba, coma ni se aplique cosméticos en el área de trabajo.
 - No pipetear con la boca. Use ropa protectora, guantes desechables y protección para los ojos y la cara al manipular muestras y reactivos. Lávese las manos después de su uso.
 - Si alguno de los reactivos entra en contacto con la piel o los ojos, lavar abundantemente la zona con agua.
- Almacenamiento y estabilidad
- Almacenar a 2-8°C.
 - Selle y devuelva los reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones se mantendrá la estabilidad durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.
- Recolección y preparación de muestras
- Se recomienda suero o plasma humano para este ensayo.
 - Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas. Estable durante 7 días a 2-8°C y 1 mes a -20°C. Congelar una sola vez.
 - No utilice muestras inactivadas por calor.
 - Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, por lo que se deben eliminar mediante centrifugación. Asegúrese de que se haya formado completamente el coágulo en las muestras de suero antes de la centrifugación.
 - Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.

Solución de Lavado (Dilución 40X):

Agregue agua desionizada al concentrado de solución de lavado concentrado 40X. Diluya 25 ml de solución de lavado concentrada con 975 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 1000 ml. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos invirtiéndolos suavemente antes de usarlos.

- **Preparación:** Identifique dos pocillos como control negativo (p. ej., B1, C1), dos pocillos como control positivo (p. ej., D1, E1) y un blanco (p. ej., A1, no se deben añadir muestras ni conjugado HRP en el pocillo de blanco). Si los resultados se determinarán mediante el uso de un lector de placas de doble longitud de onda, se podría omitir el requisito de uso del pozo en blanco. Use solo la cantidad de tiras requeridas para la prueba.
- **Adición de Diluyente de Muestras:** agregue 100 μ L de diluyente de muestras en sus respectivos pocillos, excepto en el blanco.
- **Adición de Muestra:** agregue 10 μ L de control positivo, control negativo y muestra en sus respectivos pocillos excepto el blanco. Mezclar golpeando suavemente la placa. Utilice una punta de pipeta de eliminación separada para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

Nota: Después de agregar la muestra, los reactivos en los pocillos cambian de color azul a verde.

- **Incubación:** cubra la placa con la tapa de la placa e incube durante 30 minutos a 37°C.
- **Lavado:** Al final de la incubación, retire y deseche la cubierta de la placa. Lave cada pocillo 5 veces con solución de lavado diluido. Cada vez, permita que los micropocillos se empapen durante 30 a 60 segundos. Después del último ciclo de lavado, coloque el plato sobre papel secante o una toalla limpia y golpéelo suavemente para eliminar los restos.
- **Adición de Conjugado:** agregue 100 µL de conjugado en cada pocillo excepto en el blanco.
- **Incubación:** cubra la placa con la tapa de la placa e incube durante 30 minutos a 37°C.
- **Lavado:** Al final de la incubación, retire y deseche la cubierta de la placa. Lave cada pocillo 5 veces con solución de lavado diluido. Cada vez, permita que los micropocillos se empapen durante 30 a 60 segundos. Después del último ciclo de lavado, coloque el plato sobre papel secante o una toalla limpia y golpéelo suavemente para eliminar los restos.
- **Coloración:** agregue 100 µL de sustrato en cada pocillo, incluido el blanco. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos evitando la luz. La reacción enzimática entre el sustrato TMB y el conjugado HRP produce un color azul en el control positivo y en los pocillos de muestras positivas.
- **Parada:** Usando una pipeta multicanal o manualmente, agregue 50 µL de solución de parada en cada pocillo y mezcle suavemente. Se desarrolla un color amarillo intenso en el control positivo y en los pocillos de muestra positivos para CMV IgM.
- **Medición:** Calibre el lector de placas con el pocillo en blanco y lea la absorbancia a 450 nm. Si se utiliza un instrumento de doble filtro, establezca la longitud de onda de referencia en 630 nm. Calcule el valor de corte y evalúe los resultados. (Nota: lea la absorbancia dentro de los 10 minutos después de detener la reacción).

Control de Calidad y Cálculo:

- Lea la densidad óptica (DO) de la muestra a 450 nm con un lector de microplacas.
- Valor medio de la DO del control negativo $\leq 0,1$ y valor de la DO del control positivo $\geq 0,8$, la prueba es válida; de lo contrario, la prueba no es válida.
- Valor de Corte, Cut-Off (C.O.) = Valor medio de la DO del control negativo + 0,10 (Calculado por 0,05 cuando el valor medio de la DO del control negativo es $\leq 0,05$, calculado por el valor real cuando el valor medio de la DO del control negativo es $> 0,05$).

Resultados Positivos: Valor de D.O. de la Muestra \geq C.O.

Las muestras que arrojan una absorbancia igual o mayor que el valor de corte se consideran inicialmente reactivas, lo que indica que probablemente se detectó CMV IgM utilizando CMV IgM ELISA. Todas las muestras inicialmente reactivas deben volver a analizarse por duplicado utilizando CMV IgM ELISA antes de la interpretación final de los resultados del ensayo. Las muestras repetidamente reactivas pueden considerarse positivas para CMV IgM con CMV IgM ELISA.

Resultados Negativos: Valor de DO de la Muestra $<$ C.O.

Las muestras que arrojan una absorbancia inferior al valor de corte son negativas para este ensayo, lo que indica que no se ha detectado CMV IgM con ELISA CMV IgM, por lo tanto, es probable que el paciente no esté infectado con CMV y que la sangre no contenga CMV IgM.

Limitaciones:

- Los resultados positivos deben confirmarse con otro método disponible e interpretarse junto con la información clínica del paciente.
 - El diagnóstico clínico no debe establecerse en base a un solo resultado de prueba. Debe integrar datos clínicos y de laboratorio y encontrar Características de rendimiento Especificidad
- Se probó un estudio de 256 personas con kits ELISA y se encontró que la especificidad era del 98,15 %.

Sensibilidad:

Entre 221 CMV IgM confirmados fueron positivos cuando se analizaron con este ELISA, y 219 muestras de las cuales se detectaron con positivo, la sensibilidad fue del 99,10%.

Precisión:

Intra-Ensayo:

CV ≤ 15 %

La precisión dentro de la serie se ha determinado mediante el uso de 15 réplicas de tres muestras: un positivo bajo, un positivo medio y un positivo alto.

Inter-Ensayo:

CV ≤ 20 %

La precisión entre ejecuciones se ha determinado mediante 3 ensayos independientes en las mismas tres muestras: un positivo bajo, un positivo medio y un positivo alto. Se analizaron tres lotes diferentes del kit de prueba ELISA CMV IgM utilizando estas muestras durante un período de 5 días.

Especificidad Analítica:

- No se observan interferencias hasta concentraciones de 1 mg/mL Acetaminofén, 0,2 mg/mL Ácido gentísico, 0,1 mg/mL Ácido ascórbico, 0,1 mg/mL Ácido acetosalicílico, 0,1 mg/mL Cafeína, 0,6 mg/mL Ácido oxálico, 2 mg/mL de Bilirrubina, 2 mg/mL de Hemoglobina y 1 % de Etanol.
- Los factores reumatoides no interfieren con la prueba.
- No se observa reactividad cruzada en muestras positivas para sífilis, HBsAg, VHC, HCG.

Referencia:

1. "Zona Viral". ExPASy. Consultado el 15 de junio de 2015.
2. TICV. "Taxonomía de virus: versión de 2014". Consultado el 15 de junio de 2015.
3. Ryan KJ, Ray CG, eds. (2004). Sherris Microbiología Médica (4ª ed.). Colina McGraw. págs. 556, 566–9. ISBN 0-8385-8529-9.

