



Supplementary Instructions for Use

Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity ELISA

IVD



REF EIA-5964

 **48**



Manufactured by:

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Technologie & Waldpark
Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach
Germany

Distributed by:

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg
Telefon: +49 (0)6421-1700 0,
Fax: +49-(0)6421-1700 50
Internet: www.drg-diagnostics.de
E-Mail: drg@drg-diagnostics.de

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTRODUCTION.....	2
2	INTENDED USE.....	2
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
4	MATERIALS.....	2
5	STABILITY AND STORAGE	2
6	REAGENT PREPARATION	3
7	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	3
8	ASSAY PROCEDURE	4
9	RESULTS.....	5
10	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	6
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	6
12	PRECAUTIONS AND WARNINGS	6
1	EINLEITUNG.....	7
2	VERWENDUNGSZWECK.....	7
3	TESTPRINZIP	7
4	MATERIALIEN	7
5	STABILITÄT UND LAGERUNG	7
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	8
7	ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN	8
8	TESTDURCHFÜHRUNG	9
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	10
10	TESTMERKMALE	11
11	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	11
12	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	11
13	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA.....	12
14	SCHEME OF THE ASSAY	12
	SYMBOLS USED.....	13

1 INTRODUCTION

The presence of IgG antibodies to Cytomegalovirus indicates the occurrence of the infection but does not distinguish between recent and past infection. Virus-specific IgM antibodies are first detected approximately in ten days and peak at about four weeks post infection. They may persist for several months after acute infections. Based on the evidence that antibody avidity gradually increases after exposure to an immunogen, avidity of IgG antibodies can be used as a marker for distinguishing recent primary from long-term infections. Avidity describes the binding strength of a specific antibody to its antigen. Low-avidity IgG antibodies indicate a primary infection, whereas the presence of IgG antibodies with high avidity points to persistency or reactivation of infection.

2 INTENDED USE

The Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity ELISA is intended to indicate the CMV-specific IgG avidity in human serum or plasma (citrate, heparin) to differentiate between acute and past infection.

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample (dual pipetting). After washing the wells to remove all unbound sample material, one well is incubated with avidity reagent and the corresponding well with washing buffer. The avidity reagent removes the low-avidity antibodies from the antigens whereas the high-avidity ones are still bound to the specific antigens. After second washing step to remove the rest of avidity reagent and low-avidity antibodies, a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a third washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4 MATERIALS

4.1 Reagents supplied

- **Avidity Reagent :**
1 bottle containing 15 mL of an urea solution; coloured blue; ready to use; black cap.
- **Control Low:**
1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; $\leq 0.02\%$ (v/v) MIT.
- **Control High:**
1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; $\leq 0.02\%$ (v/v) MIT.

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2 Materials supplied

- 1 Instruction for use Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity ELISA (Product Number: EIA-5964)
- 1 Instruction for use Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA (Product Number: EIA-3808)
- 1 empty labelled bottle (white with white cap) for ready to use Washing Buffer

5 STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2 °C - 8 °C.

The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2 °C - 8 °C.

6 REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20 °C - 25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1 Avidity Reagent

If crystals have been formed in the reagent, warm up to 37 °C e.g. in a water bath and mix gently until they disappear.

6.2 Washing Buffer

It is recommended to fill 15 mL ready to use Washing Buffer into supplied bottle (see 4.2) to use it in step 5 of the test preparation.

Note: Ready to use Washing Buffer is stable for 5 days at room temperature (20 °C - 25 °C).

7 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) **CMV IgG positive samples** with this assay.

Note: For samples with high absorbance values (OD > 2.000) appropriate higher dilutions should be used.

7.1 Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted **1+100** with IgG Sample Diluent.

Dispense 10 µL sample and 1 mL IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8 ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 °C ± 1 °C.

For avidity determination dual pipetting of standards/controls and diluted samples is needed.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave wells A1/A2 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 °C ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL of Avidity Reagent in wells B1, C1, D1, E1 etc., except for the Substrate Blank well A1. Dispense 100 µL of Washing Buffer in wells B2, C2, D2, E2 etc., except for the Substrate Blank well A2.
6. **Incubate for exactly 10 min at 37 °C ± 1 °C.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the blank wells (A1/A2).
9. **Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
10. Repeat step 4.
11. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
12. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
13. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
14. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1 Measurement

Adjust the ELISA microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9 RESULTS

9.1 Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank** Absorbance value < **0.100**
- **Control Low** Avidity (%): < **45 %**
- **Control High** Avidity (%): > **55 %**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2 Calculation of Results

For each patient sample or control calculate the ratio between the absorbance of the well dispensed with Avidity Reagent and the absorbance of the well dispensed with Washing Buffer multiplied by 100:

$$\frac{\text{Absorbance (sample or control) Avidity Reagent}}{\text{Absorbance (sample or control) Washing Buffer (diluted 1+19)}} \times 100 = \text{Avidity (\%)}$$

Note: For samples with high absorbance values (OD > 2.000) appropriate higher dilutions should be used.

9.3 Interpretation of Results

Result	Avidity	Interpretation
Low-avidity IgG	< 45 %	An avidity index of less than 45 % indicates a primary infection acquired within the past 2 months.
Equivocal	45 – 55 %	No clinical interpretation can be deduced from an equivocal result. It is recommended to take a second sample within an appropriate period of time (e.g. 2 weeks) and repeat testing. If the result of the repeated test is still equivocal, precise statements regarding the time of infection cannot be made.
High-avidity IgG	> 55 %	The presence of high-avidity IgG indicates a past infection or reinfection.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.
In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.
A result of high avidity cannot exclude the possibility of a recent infection.

9.3.1 Antibody Isotypes and State of Infection

IgG	IgM	IgG-Avidity	Probable result
+	-	low	Vague, further investigation necessary
+	-	high	Indicative of a past infection
+	+	low	Suggests a current or very recent infection
+	+	high	Suggests a past infection with persisting IgM or reactivation of infection

10 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications. For further information about the specific performance characteristics please contact DRG.

10.1 Diagnostic Performance

The evaluation of the diagnostic performance of the Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG assay was performed in comparison to well defined samples. The resulting relative agreement was 99.1 %.

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.


12 PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1 Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

 Warning	H317	May cause an allergic skin reaction.
	P261	Avoid breathing spray
	P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
	P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
	P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
	P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2 Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1 EINLEITUNG

Obwohl die Anwesenheit von IgG-Antikörpern gegen das Cytomegalievirus auf das Vorliegen einer Infektion hindeutet, kann man nicht zwischen einer akuten und einer bereits abgelaufenen Infektion unterscheiden. Virus-spezifische IgM-Antikörper sind ca. zehn Tage nach der Infektion erstmals nachweisbar und erreichen nach ungefähr vier Wochen ihre höchste Konzentration. Sie können für mehrere Monate nach der akuten Infektion im Blut persistent sein. Aufgrund der Tatsache, dass die Antikörper-Avidität nach der Exposition zum Antigen allmählich zunimmt, kann die Avidität von IgG-Antikörpern als Marker benutzt werden, um zwischen einer akuten oder einer bereits länger zurückliegenden Infektion zu unterscheiden. Avidität beschreibt die Bindungsstärke der spezifischen Antikörper an das Antigen. Niedrig-avide IgG-Antikörper deuten auf eine frische Infektion hin, während hoch-avide IgG-Antikörper ein Hinweis auf eine länger zurückliegende Infektion oder eine Reaktivierung sind.

2 VERWENDUNGSZWECK

Der Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity ELISA ist für die Aviditätsbestimmung der spezifischen IgG-Antikörper gegen Cytomegalievirus in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin), und zur Differenzierung zwischen akuten und zurückliegenden Infektionen bestimmt.

3 TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe (zweifaches Pipettieren) binden. Nach dem Waschen, wodurch das ungebundene Probenmaterial entfernt wird, wird eine Vertiefung mit dem Aviditätsreagenz und die andere dazugehörige Vertiefung mit dem Waschpuffer inkubiert. Durch das Aviditätsreagenz wird die Bindung zwischen den niedrig-aviden Antikörpern und den Antigenen gelöst, während die hoch-aviden Antikörper noch an den spezifischen Antigenen gebunden bleiben. Nach dem zweiten Waschschritt werden die Reste des Aviditätsreagenzes sowie niedrig-avide Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem dritten Waschschritt wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4 MATERIALIEN

4.1 Mitgelieferte Reagenzien

- **Aviditätsreagenz:**
1 Flasche mit 15 mL Harnstofflösung; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **Kontrolle Niedrig:**
1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; blaue Verschlusskappe; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Kontrolle Hoch:**
1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe; ≤ 0,02% (v/v) MIT.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2 Mitgeliefertes Zubehör

- 1 Arbeitsanleitung Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity ELISA (Produktnummer: EIA-5964)
- 1 Arbeitsanleitung Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA (Produktnummer: EIA-3808)
- 1 leere, etikettierte Flasche (weiß mit weißem Deckel) für den gebrauchsfertigen Waschpuffer

5 STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2 °C - 8 °C lagern.

Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1 Aviditätsreagenz

Sollte eine Kristallisation im Aviditätsreagenz auftreten, das Reagenz z. B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor der Verwendung gut mischen.

6.2 Waschpuffer

Es wird empfohlen 15 mL des gebrauchsfertigen Waschpuffers in die mitgelieferte Flasche (siehe 4.2) zu überführen, um diese in dem Schritt 5 der Testvorbereitung zu verwenden.

Beachte: Der gebrauchsfertige Waschpuffer ist bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) 5 Tage haltbar.

7 ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden, die **CMV IgG positiv** sind.

Beachte: Bei Proben mit sehr hohen Absorptionswerten (OD > 2,000) sollen entsprechend höhere Verdünnungen verwendet werden.

7.1 Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis **1 + 100** mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen,

z. B. 10 µL Probe und 1 mL IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

Für die Aviditätsbestimmung ist ein zweifaches Pipettieren der Standards/Kontrollen und Patientenproben erforderlich.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Die Vertiefungen A1/A2 sind für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Aviditätsreagenz in die Vertiefungen B1, C1, D1, E1 usw., mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
100 µL Waschpuffer in die Vertiefungen B2, C2, D2, E2 usw., mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A2 vorgesehenen, pipettieren.
6. **Genau 10 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1/A2 vorgesehenen, pipettieren.
9. **30 min bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
10. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
11. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
12. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
13. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
14. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.1 Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1 Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert** Absorption **< 0,100**
- **Kontrolle Niedrig** Avidität (%): **< 45 %**
- **Kontrolle Hoch** Avidität (%): **> 55 %**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2 Messwertberechnung

Für jede Probe bzw. Kontrolle wird das Verhältnis zwischen dem Absorptionswert der Vertiefung, die mit dem Aviditätsreagenz inkubiert wurde, und dem Absorptionswert der entsprechenden Vertiefung, die mit dem Waschpuffer inkubiert wurde, bestimmt und mit 100 multipliziert.

$$\frac{\text{Absorptionswert (Probe oder Kontrolle) Aviditätsreagenz}}{\text{Absorptionswert (Probe oder Kontrolle) Waschpuffer (verdünnt 1+19)}} \times 100 = \text{Avidität (\%)}$$

Beachte: Bei Proben mit sehr hohen Absorptionswerten (OD > 2,000) sollen entsprechend höhere Verdünnungen verwendet werden.

9.3 Interpretation der Ergebnisse

Ergebnis	Avidität	Interpretation
Niedrig-avide IgG	< 45 %	Ein Aviditätsindex unter 45 % weist auf eine primäre Infektion, die innerhalb der letzten 2 Monate erworben wurde, hin.
Grenzwertig	45 - 55 %	Wenn die Ergebnisse innerhalb der Grauzone liegen, kann keine klinische Interpretation daraus abgeleitet werden. Es wird empfohlen den Test zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. in 2 Wochen) mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, ist die Ermittlung des Infektionszeitpunktes nicht möglich.
Hoch-avide IgG	> 55 %	Die Präsenz hoch-avider IgG deutet auf einen länger zurückliegenden Infektionszeitpunkt oder eine Reinfektion hin.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert. Die Präsenz hoch-aviden Antikörper schließt die Möglichkeit einer frischen Infektion nicht aus.

9.3.1 Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

IgG	IgM	IgG-Avidität	Wahrscheinliches Ergebnis
+	-	niedrig	Unklar, weitere Untersuchungen erforderlich
+	-	hoch	Deutet auf eine abgelaufene Infektion hin
+	+	niedrig	Deutet auf eine frische oder gerade abgelaufene Primärinfektion hin
+	+	hoch	Deutet auf eine abgelaufene Infektion mit persistierendem IgM oder eine Reaktivierung der Infektion hin

10 TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte DRG.

10.1 Diagnostische Leistung

Die Evaluierung der diagnostischen Leistung des Avidity Cytomegalovirus (CMV) IgG Tests wurde im Vergleich zu gut definierten Proben durchgeführt. Die daraus resultierende relative Übereinstimmung war 99,1%.

11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12 SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

12.1 Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.



Achtung

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

12.2 Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

Prince HE and Lapé-Nixon M. Role of Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity Testing in Diagnosing Primary CMV Infection during Pregnancy. Clin Vaccine Immunol. 2014; 21(10): 1377–1384.

Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. Clin. Microbiol. Rev. 2002;15:680–715.

Zaia JA, Sissons JG, Riddell S, Diamond DJ, Wills MR, Carmichael AJ, Weekes MP, Gandhi M, Rosa CL, Villacres M, Lacey S, Markel S, Sun J. Status of Cytomegalovirus Prevention and Treatment in 2000. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2000; 339-355.

Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

14 SCHEME OF THE ASSAY**Test Preparation**

Prepare reagents and samples as described.














Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.

Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank A1/A2	Avidity Control Low B1	Avidity Control Low B2	Avidity Control High C1	Avidity Control High C2	Sample (diluted 1+100) e. g. D1	Sample (diluted 1+100) e. g. D2
Avidity Control Low	-	100 µL	100 µL	-	-	-	-
Avidity Control High	-	-	-	100 µL	100 µL	-	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	-	100 µL	100 µL
Cover wells with foil Incubate for 1 h at 37 °C ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer							
Avidity Reagent	-	100 µL	-	100 µL	-	100 µL	-
Washing Buffer	-	-	100 µL	-	100 µL	-	100 µL
Cover wells with foil Incubate for exactly 10 min at 37 °C ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer							
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer							
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark							
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)							

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité
	Avidity Reagent	Aviditätsreagenz	Reagente di Avidità	Reactivo de Avidéz	Réactif d'Avidité
	Control, low avidity	Kontrolle, niedrig-avid	Controllo, bassa avidità	Control, bajo grado de avidéz	Contrôle, avidité faible
	Control, high avidity	Kontrolle, hoch-avid	Controllo, altà avidità	Control, alto grado de avidéz	Contrôle, avidité élevée