



## 1. INTENDED USE

The VIR-ELISA CMV-IgG AVIDITY is a supplementary reagent kit for the determination of CMV-specific IgG avidity in human serum and plasma. It has to be used in combination with the VIR-ELISA ANTI-CMV-IgG [REF] EG 101.

[REF] EAv 101 ▽ 48 [IVD]

## 2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The detection of antibodies is based on the principle of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The purified, homogeneous antigen is fixed to each well of the microtiterstrips. Any specific antibodies present in the patient's sample (set up in duplicate) are bound during the first incubation.

After removing unbound material by washing, avidity reagent [UREA] is added to one well of the duplicate and wash solution (ready to use) to the other well of the duplicate. Using the special reagent for avidity the binding capacity of immune complex becomes dissolved but only for antibodies with low affinity whereas antibodies with high affinity keep associated with the antigen.

After removing unbound material by a further wash cycle, the presence of specific antibodies which are still bound to the antigen are detected using Anti-human IgG during the third incubation.

Excess peroxidase conjugate is then removed and TMB substrate is added, resulting in the development of a blue colour. The enzyme reaction is terminated by the addition of a stop solution. The intensity of the yellow colour thus developed is proportional to the concentration of antibodies in the sample.

## 3. DIAGNOSTIC RELEVANCE

Human cytomegalovirus (CMV) is a herpesvirus which is ubiquitously distributed in the human population. CMV is the most common cause of congenital infection, occurring in approximately 1% of all live births. Since CMV infections in immunocompetent individuals and pregnant women are asymptomatic or accompanied by symptoms not specific for CMV, laboratory methods are needed to diagnose CMV infection. In the absence of seroconversion, CMV-specific immunoglobulin M (IgM) is a sensitive and specific indicator of active or recent CMV infection.

However, the presence of CMV IgM is not a specific indicator of primary CMV infection as it is often produced during nonprimary infections. The measurement of the CMV IgG avidity index has been shown to be useful in identifying and excluding primary CMV infections with no pregestational CMV serology. Avidity describes the binding strength of specific antibody to antigen. It was found to be low in the first phase after primary infection but then to increase over time.

Detection of low-avidity CMV IgG in specimens indicates that primary CMV infection has occurred within the past 6 to 8 months, whereas detection of high-avidity CMV IgG excludes primary infection.

## 4. COMPONENTS OF THE TEST KIT

The test kit includes:

### AVIDITY REAGENT [UREA]

One vial containing 5,0 ml of ready-to-use avidity reagent. The avidity reagent contains 0,095% sodium azide as preservative.

### POSITIVE CONTROL / LOW AVIDITY [CONTROL LA]

One vial of 1.2 ml, containing human serum (low avidity) with 0,095% sodium azide as preservative. Ready to use.

*The safety data sheet (MSDS) is available upon request.*

## 5. STORAGE AND STABILITY

Store all reagents at 2-8°C. Protect them from intense light and do not freeze. The expiration date of each component is indicated on the respective vial label. Do not use reagents beyond the expiration date.

## 6. MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- VIR-ELISA ANTI-CMV-IgG [REF] EG 101
- Test tubes for sample dilution
- Timer
- Micropipettes, multipipettes 10-1000 µl
- One-liter graduated cylinder, distilled water
- ELISA washer or multichannel pipette
- Spectrophotometer for micro-plates (450 nm/ reference wavelength 630/620 nm)
- Paper towels, pipette tips

## 7. WARNINGS OR PRECAUTIONS SAFETY PRECAUTIONS

The ELISA test is for [IVD] use only.

1. Only qualified and well-trained employees should carry out the assay procedure.
2. The instruction for use describes the applicable test method. In case of modification or applications others than the intended use, or the use of automatic processors, the user has to validate the procedure and take the responsibility for it.
3. Seal all bottles properly after use in order to avoid bacterial contamination. All samples and kit components should be considered potentially infectious. All control samples have been tested for Hepatitis Bs antigen, anti-HIV I and II, anti-HCV (CE/FDA) and found to be negative.
4. Avoid contact with skin and mucous membranes when handling reagents, which contain preservatives (see kit contents). Wash thoroughly with water in case of contact and possibly look up a doctor.
5. Reagents containing sodium azide may react with lead and copper plumbing, building up explosive metal acids. Flush with sufficient water when disposing of reagents.
6. For disposal the legal regulations have to be followed.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

1. Microbially contaminated specimen may cause interference.
2. Lipaemic, hemolytic or icteric samples should only be tested with reservations although in our testing no negative influence has been found.
3. Suitable specimens are serum or plasma (heparinized, EDTA) samples obtained by standard laboratory techniques.
4. The samples should not be heat-inactivated since non-specific results may occur.
5. Patient samples should be stored at  $\pm$  2-8°C. For long term storage  $\pm$  -20°C or lower is recommended. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
6. **Note:** Diluted patient samples must be used on the same day.

## 9. GENERAL INFORMATION **Please note: important !**

### Impact of Antibody Concentration on the Determination of Avidity

Due to the competition of specific antibodies with low and high affinity to the same binding site of corresponding antigen (solid phase on microtiter plate), the concentration of antigen-specific antibodies will influence the level of the avidity index. In order to keep the ratio between antigen and antibody constant, the antibody concentration of the sample has to be within the linear measuring range, this means it has to be > than the upper value of the cut-off range and < than the value of the positive control ([CONTROL+]) from test kit [REF] EG 101. The avidity indices of samples with an antibody concentration within this range can be calculated right away without further dilution of the samples. But samples with an antibody concentration less than 1,5 ratio might cause a false classification of the avidity index and should therefore be retested with a new serum sample. For the correct determination of avidity, samples higher than the positive control ([CONTROL+]) should be prediluted prior to the test, depending on the previously measured CMV-IgG concentration. The following dilutions are recommended:

Samples > than the [CONTROL+] and with a ratio >5,5 should be prediluted 1:10 and

Samples > than the [CONTROL+] and with a ratio < 5,5 should be prediluted 1:2.

If the prediluted samples lie again above the [CONTROL+], they must be diluted further (e.g. 1:20) and if they lie below the cut-off value, the samples must be diluted less (e.g. 1:5).

## 10. REAGENT PREPARATION

The determination of CMV-specific IgG avidity is carried out under utilisation of the VIR-ELISA ANTI-CMV-IgG [REF] EG 101.

**Bring all reagents to room temperature (21°C-25°C) prior to use !**

[WASHBUF] : Dilute the [WASHBUF25x] 1:25 with distilled water e.g. add 40ml of [WASHBUF25x] to 960 ml distilled water and mix well.

**Dilution of samples IgG:** Dilute patient samples 1:101 with [SPE DIL] e.g. 10µl sample + 1ml [SPE DIL] or resp. 10µl prediluted sample (e.g. 1:2) with 1ml [SPE DIL]; mix thoroughly.

**Controls are ready to use.**

Take the required [MTS] out of the foil packets and place them in the holder. Possibly remaining wells of a [MTS] have to be stored at 2-8°C tightly sealed in the plastic bag provided, with the desiccant inside.

## 11. PIPETTING AND INCUBATION STEPS

- A. Pipette 100 µl of sample diluent into well A1 (Blank). Pipette 100µl of the controls or diluted patient sample into the wells. The **CONTROL+**, the **CONTROL** and the patient samples must be set up in duplicates.
- B. Incubate the wells at room temperature (21...25°C) for 30 minutes, protected from intense light.
- C. Wash the wells four times as described in section N. **WASHING PROCEDURE**
- D. Add 100µl of ready to use avidity reagent **UREA** to one well of the duplicate, add 100µl of the diluted wash solution to the other well of the duplicate and to all other wells (Blank, negative control and cut-off-control).
- E. Incubate the wells at room temperature (21...25°C) for exactly 5 minutes, protected from intense light.
- F. Wash the wells four times as described in section k. **WASHING PROCEDURE**
- G. Add 100µl of ready-to-use peroxidase conjugate to each well.
- H. Incubate the wells at room temperature (21...25°C) for 30 minutes, protected from intense light.
- I. Repeat washing as in section C above.
- J. Add 100µl of ready-to-use TMB substrate to each well.
- K. Incubate the wells at room temperature (21...25°C), in the dark for 10 minutes
- L. Add 100µl of stop solution to each well. Tap gently to ensure homogenous color distribution and read within 10 minutes.
- M. To read the plate, make sure that the bottom is free from moisture and that no air bubbles are in the wells. Read the absorbance of the well contents at 450nm on a suitable plate reader. On readers equipped with a dual wavelength facility set the reference filter to 620/630 nm.

### ATTENTION:

The absorbance (OD) of the Blank must be always subtracted from the OD values of the controls and samples.

### PROCEDURAL NOTES

Do not allow the wells to dry out between incubations.  
Comply with the given incubation temperatures and times.

### N. **WASHING PROCEDURE**

The washing procedure can be done manually with a multichannel pipette or on an automatic plate washer. Empty the wells, invert and tap dry on paper towel. Wash four times with a soaking time of approx. 30 seconds (300 µl ).

## 12. CALCULATION OF RESULTS

For each sample and positive control, calculate the percent ratio between the O.D. of the well treated with Avidity Reagent and the O.D. of the well treated with Wash Solution and multiply with the factor 100. This ratio will be the sample/control percent Avidity.

$$\frac{\text{O.D. value (with avidity reagent)}}{\text{O.D. value (with wash solution)}} \times 100 = \text{Avidity Index (AI \%)}$$

Interpretation of sample results:

RESULT	DEFINITION
low avidity IgG	avidity index < 40%
equivocal range	avidity index 40% - 45%
high avidity IgG	avidity index > 45%

Determination of CMV-specific IgG antibody avidity could be used as a diagnostic marker to distinguish between primary infection and non-primary infection. An avidity index of less than 40% indicates a primary infection acquired within the past 6 – 8 months. The range between 40% and 45% is defined as equivocal. Equivocal results should be retested. If the equivocal result is confirmed it is not possible to determine the time of infection. The presence of high avidity IgG, that means an avidity index >45%, essentially excludes the possibility that infection occurred within the previous 4 months.

## 13. VALIDITY OF THE ASSAY

All controls should be carried out with every test run.

The test must comply with the following validation criteria:

- Avidity index of the **CONTROL** should be <25%.
- Avidity index of the **CONTROL+** should be >50%.

See also validation criteria of the VIR-ELISA ANTI-CMV-IgG **REF** EG 101.

If controls give invalid levels then results from the test samples are invalid too and retesting is required.

## 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Diagnostic validity

#### Clinical specificity

The clinical specificity of the test was evaluated testing 166 anti-CMV-IgG positive samples from blood donors, pregnant women and patients. All the samples showed an avidity index >45% (mean value = 65%). **Specificity value = 100 %**. In addition the clinical specificity of the test was evaluated testing 18 samples coming from 9 patient panels with a history of CMV reinfections/ CMV past infections. All the samples showed an avidity index >45% (mean value = 63%). **Specificity value = 100 %**.

#### Clinical sensitivity

The clinical sensitivity of the test was evaluated testing two commercially available seroconversion panels. These panels, one a 15 member seroconversion panel and the other a 25 member seroconversion panel, depict the onset and decline of IgM and IgG antibodies over a period of time. The results of the avidity testing have been compared to the results of a reference assay (ELISA). All the samples showed an avidity index <40% (mean value = 21%) The sensitivity was calculated based on the results found. **Sensitivity value = 100 %**. In addition the clinical sensitivity of the test was evaluated testing 24 samples coming from 16 patient panels with evidence of acute primary CMV infections. All the samples showed an avidity index <40% (mean value = 23%). **Sensitivity value = 100 %**.

The results refer only to the groups of samples investigated.

### Precision and reproducibility

Intra-assay reproducibility was determined with samples of different avidity by testing each sample for at least 22 times in one test run. The calculated coefficients of variation (CV) of the samples were < 10%.

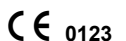
Inter-assay reproducibility was determined by testing samples of different avidity in 10 independent test runs. The calculated CV's of the samples were < 10%.

## 15. **Bib**

1. Avidity of Immunoglobulin G Directed against Human Cytomegalovirus during Primary and Secondary Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Subjects. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 1997, p. 469-473, Vol. 4, No. 4.
2. A New Method with General Diagnostic Utility for the Calculation of Immunoglobulin G Avidity. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Sep. 1999, p. 725-728, Vol. 6, No. 5.
3. Diagnosis of and Screening for Cytomegalovirus Infection in Pregnant Women. Journal of Clinical Microbiology, Sep. 2005, p 4713-4718, Vol. 43, No. 9.
















**Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH**, In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12  
email: info@viro-immun.de



## Symbole nach IVD/ symbols used with IVD devices/ Symbole /

### Símbolos/ Simboli/ Simbolos/ Symboly/ Címkékén/ Συμβολα IVD

	Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Rendszeri roztok vzork/ Mintahígító/ Αραιωτικό Δείγματος
	Waschlösung/ wash solution/ solution de lavage/ solución limpiadora/ soluzione lavaggio/ solução de lavagem/ Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 25x/ Promývací roztok 25x/ Mosópufferkoncentrátum 25x/ Διάλυμα Πλύσης 25x
	Aviditätsreagenz / avidity reagent / réactif d'avidité / reactivo de avidina / reagente di avidità / reagente de avidéz / reagenție pro testování avidity /άντιδραστήριο δυνάμης σύνδεσης
	Positive Kontrolle/Niedrig-avide / positive control/low avidità/ contrôle positif/faible avidité / control positivo/bajo grado de avidéz / controllo positivo/bassa avidità / controle positivo/baixa avidéz / pozitivní kontrola/nízká avidita / θετικός μάρτυρας/χάμηλή δυνάμη σύνδεσης
	Literatur/ Literature/ Littérature/ Bibliografia/ Bibliografia/ Literatura/ Irodalom/ Βιβλιογραφία
	Charge/ lot/ Lot/ lote/ carcia/ lote/ Číslo šarže/ Lot Szám/ Αριθμός παρτίδας
	In-vitro-Diagnostikum/ in vitro diagnostic/ Diagnostic in vitro/ diagnóstico in-vitro/ In-vitro diagnostic/ diagnóstico In-vitro/ In vitro diagnostikum /In Vitro Diagnosztikum/ Διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro
	Artikel Nr./ reference or order number/ Référéncie ou numéro de commande/ referencia o número de pedido/ codice di riferimento o di commissione/ referênciã ou número de encomenda/ Katalogové číslo/ Katalógusban Szereplő Kód/ Κωδικός Καταλόγου
	96 Bestimmungen/ tests/ testés/ determinazioni/ testes / Počet Testů/ Vizsgálatok Száma/ Αριθμός εξετάσεων
	Gebrauchsanweisung beachten/ consult instructions for use/ consulter le mode d'emploi/consultar las instrucciones de uso/ consultare le istruzioni per l'uso/ consultar instruções de uso/ Přečtěte si Návod k použití/ Olvassa el a Használati Utasítást/ Δείτε Οδηγίες Χρήσεως
	Temperaturgrenzen/ temperature limitation/ Limites de température/ Limites de temperatura/ Limiti di temperatura/ Limites de temperatura/ Teplotní limity/ Hőmérsékleti Korlátok/ Θερμοκρασιακά όρια
	Verfallsdatum:/ expiry date/ date d'expiration/ Fecha de caducidad/ Data di decadenza/ Limite de validade/ Datum expirace/ Lejárati Idő/ Ημερομηνία λήξης (Χρήση έως ...)
	Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/ Vyroben/ Gyártó/ Κατασκευάζεται από...



## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der VIR-ELISA CMV-IgG AVIDITY ist eine Zusatz-Reagenzienpackung, welche in Verbindung mit dem VIR-ELISA ANTI-CMV -IgG [REF] EG 101, die Bestimmung der Avidität von IgG-spezifischen Antikörpern gegen Cytomegalie Virus in humanem Serum und Plasma ermöglicht.

[REF] EAv 101 ▽ 48 [IVD]

## 2. TESTPRINZIP

Der Nachweis der Antikörper basiert auf dem Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Die Mikrotiterstreifen sind mit gereinigtem, homogenisiertem, inaktiviertem Antigen beschichtet. In der Untersuchungsprobe des Patienten vorhandene spezifische CMV-IgG-Antikörper werden an das Antigen gebunden (Doppelansatz). Nach sorgfältigem Waschkvorgang, bei dem alle nicht gebundenen Probenbestandteile entfernt werden, wird Aviditätsreagenz in die eine Vertiefung und gebrauchsfertige Waschlösung in die andere Vertiefung des Doppelansatzes pipettiert.

Bei niedrig-aviden CMV-IgG-Antikörpern kommt es zu einer Auflösung der Immunkomplexe durch das Aviditätsreagenz [UREA] und bei hoch-aviden Antikörpern bleiben die Immunkomplexe bestehen. Nach einem weiteren Waschkvorgang wird Anti-human IgG Peroxidase-Konjugat pipettiert, das sich an die noch bestehenden Immunkomplexe anlagert. Im nachfolgenden Waschprozess wird überschüssiges Peroxidase Konjugat entfernt. Nach der Inkubation mit TMB-Substrat entsteht eine photometrisch messbare Enzym/ Substratreaktion (blaue Färbung), die durch Zugabe von Stopplösung (Farbumschlag zu gelber Färbung), gestoppt wird. Der gemessene Extinktionswert ist proportional der spezifischen Antikörperkonzentration.

## 3. DIAGNOSTISCHE RELEVANZ

Das humane Cytomegalievirus (CMV) ist ein weitverbreitetes DNA-Virus und zählt zu der Familie der Herpesviridae. Die kongenitale Cytomegalie gilt heute als die häufigste transplazentar übertragene Infektionskrankheit. Sie tritt bei ca. 1% aller Lebendgeburten auf. Da eine CMV-Infektion bei Immunkompetenten und Schwangeren häufig inapparent oder ohne auffällige Symptome verläuft, werden serologische Verfahren für die Diagnose eingesetzt. Der CMV-IgM-Antikörper-Nachweis ist ein sensibler und spezifischer Marker für eine akute oder kürzlich stattgefunden Infektion, jedoch ist der IgM-Nachweis nicht spezifisch für Primärinfektionen, da auch bei Reinfektionen IgM-Antikörper gebildet werden können. In den Fällen bei denen der Serostatus vor bzw. zu Beginn einer Schwangerschaft nicht bekannt ist, kann die Aviditätsbestimmung von Anti-CMV-IgG helfen, um zwischen einer Primär- und einer Nicht-Primärinfektion (zurückliegende Infektion, Reaktivierung) zu unterscheiden. Die Avidität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen. In der frühen Phase einer Primärinfektion zeigen die IgG-Antikörper eine schwächere Bindung zum Antigen, welche dann aber sukzessive zunimmt. Der Nachweis von niedrig-aviden Anti-CMV-IgG lässt auf eine Primärinfektion innerhalb der letzten 6 – 8 Monate schließen wohingegen der Nachweis von hoch-aviden Anti-CMV-IgG eine Primärinfektion ausschließt.

## 4. KITKOMPONENTEN

Die Testpackung beinhaltet:

### AVIDITÄTSREAGENZ [UREA]

Ein Fläschchen (5,0 ml) Aviditätsreagenz, mit 0,095% Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

### POSITIVE KONTROLLE / NIEDRIG-AVIDE [CONTROL<sub>L</sub>]A

Ein Fläschchen (1,2 ml) Humanserum (niedrig-avide), mit 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

**Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich**

## 5. LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien sind bei  $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$  zu lagern. Reagenzien nicht einfrieren sowie vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Die Haltbarkeit der Reagenzien ist auf den Etiketten angegeben, nach Verfallsdatum sind diese nicht mehr zu verwenden.

## 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- VIR-ELISA ANTI-CMV-IgG [REF] EG 101
- Röhren für die Probenverdünnung
- Stoppuhr
- Mikropipetten, Multipipette 10 – 1000  $\mu\text{l}$
- Messzylinder für 1 L, Aqua dest.
- ELISA -Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten:  
Wellenlänge 450 nm/Referenzwellenlänge 630/620nm
- Saugfähiges Papier, Einwegspitzen

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN SICHERHEITSHINWEISE

Der Test ist ausschließlich für [IVD] hergestellt.

1. Die Testdurchführung muss durch ausgebildetes Fachpersonal erfolgen.
2. Die Gebrauchsanweisung enthält die Angabe über die Testmethode. Eine Modifikation oder andere Anwendung sowie die Anwendung von automatischen Prozessoren müssen vom Anwender validiert werden und liegen in dessen Verantwortung.
3. Die Fläschchen nach Gebrauch gut verschließen, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden. Alle Patientenproben und Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Kontrollen wurden auf HBs-Ag, HCV- und HIV I und II -Ak (CE/FDA) getestet und für negativ befunden.
4. Einige Reagenzien (siehe Kitinhalt) enthalten Konservierungsmittel. Der Kontakt mit Haut und Schleimhaut ist zu vermeiden. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
5. Das in den Reagenzien enthaltene Natriumazid bildet bei Kontakt mit Blei- und/ oder Kupferrohren explosive Metallazide, deshalb sollte bei deren Beseitigung mit reichlich Wasser nachgespült werden.  
S-Sätze: 26.1, 28.1 und S-46. Gefahrenhinweis: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken Arzt aufsuchen.
6. Zur Entsorgung sind die gesetzlichen Regelungen zu beachten.

## 8. PROBENGEWINNUNG- UND LAGERUNG

1. Bakteriell verunreinigte Proben können zu unzuverlässigen Testergebnissen führen.
2. Lipämische, hämolytische sowie ikterische Proben (Serum oder Plasma) sollten nur unter Vorbehalt eingesetzt werden, obwohl in unseren Untersuchungen kein negativer Einfluss festgestellt wurde.
3. Serum- oder Plasma- (Heparin, EDTA) Proben, die nach Standard-Labortechniken entnommen sind, sind zur Untersuchung geeignet.
4. Hitzebehandelte Proben dürfen nicht verwendet werden.
5. Kurzfristige Lagerung der Proben bei  $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$ , eine längerfristige Lagerung wird bei  $\pm 20^{\circ}\text{C}$  empfohlen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.
6. **Hinweis:** In [SPE<sub>DIL</sub>] verdünnte Proben müssen am gleichen Tag im Test eingesetzt werden.

## 9. ALLGEMEINE INFORMATION Wichtig, bitte beachten!

Durch die Konkurrenz zwischen hoch- und niedrigaffinen Antikörpern um die gleichen Bindungsstellen an der antigenbeschichteten Platte hat die jeweilige Konzentration der in der Probe vorliegenden antigenspezifischen Antikörper Einfluss auf die Höhe des Aviditätsindex. Für eine korrekte Messung der Avidität muss das Verhältnis zwischen Antigen und Antikörper immer konstant sein und deshalb muss die CMV-IgG-Antikörperkonzentration der zu untersuchenden Probe im linearen Messbereich liegen, d.h. im Bereich zwischen oberen Cut-off-Wert und dem Wert der positiven Kontrolle (= [CONTROL<sub>L</sub>]<sup>+</sup> aus dem Testkit [REF] EG 101). Die Aviditätsindizes von Proben deren OD-Werte in diesem Bereich liegen können direkt berechnet werden, jedoch positive Proben mit niedrigen Anti-CMV-IgG Konzentrationen (Ratio < 1,5) können eine falsche Klassifizierung verursachen und sollten deshalb anhand einer neuen Probe wiederholt werden.

Proben oberhalb der Positiven Kontrolle ([CONTROL<sub>L</sub>]<sup>+</sup>) müssen für eine korrekte Bestimmung der Avidität, in Abhängigkeit von der vorab bestimmten CMV-IgG-Antikörperkonzentration, vorverdünnt werden. Folgende Verdünnungen werden empfohlen:

Proben mit einem Wert > dem der [CONTROL<sub>L</sub>]<sup>+</sup> und einem Ratio-Wert von > 5,5 sollten 1:10 vorverdünnt werden,

Proben mit einem Wert > dem der [CONTROL<sub>L</sub>]<sup>+</sup> und einem Ratio-Wert von < 5,5 sollten 1:2 vorverdünnt werden.

Liegen die vorverdünnten Proben weiterhin oberhalb der [CONTROL<sub>L</sub>]<sup>+</sup> müssen sie nochmals höher verdünnt werden (z.B. 1:20). liegen sie unterhalb des Cut-off-Wertes müssen sie weniger hoch verdünnt werden (z.B. 1:5).

## 10. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Die Bestimmung der Avidität von IgG-spezifischen Antikörpern gegen Cytomegalie Virus in humanem Serum und Plasma erfolgt unter Anwendung des VIR-ELISA ANTI-CMV-IgG [REF] EG 101.

**Vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur (21°C-25°C) bringen.**

**[WASHBUF]:** Das Konzentrat 1:25 mit aqua dest. verdünnen  
z.B. 40 ml [WASHBUF<sub>25x</sub>] + 960 ml aqua dest. Waschlösung gut mischen!

**Probenverdünnung:** Untersuchungsproben 1:101 mit [SPE<sub>DIL</sub>] im Röhren verdünnen. z.B. 10  $\mu\text{l}$  Probe + 1 ml [SPE<sub>DIL</sub>] oder resp. 10  $\mu\text{l}$  vorverdünnte Probe (z.B. 1:2) + 1 ml [SPE<sub>DIL</sub>]; Die Verdünnung gut mischen!

### Die Kontrollen sind gebrauchsfertig!

Benötigte Anzahl [MTS] den Folienverpackungen entnehmen und in den Halterahmen einsetzen. Nicht benötigte [MTS] in den mit Trockenmittel versehenen Plastikbeutel geben, gut verschließen und bei  $\pm 2-8^{\circ}\text{C}$  lagern.

## 11. PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

- A. Pipettieren Sie 100µl **[SPE|DIL]** in Well A1 (Blank). Pipettieren Sie 100 µl der Kontrollen und der verdünnten Patientenprobe(n) in die Wells, dabei die verdünnten Patientenprobe(n) als auch die **[CONTROL+]** und die **[CONTROL|LA]** als Doppelansatz pipettieren.
- B. 30 Minuten bei Raumtemperatur (21-25 °C) inkubieren. Platte dabei keiner direkten Sonneneinstrahlung aussetzen.
- A. Waschen Sie die Wells 4-mal, wie in N. **WASCHVORGANG** beschrieben
- B. Pipettieren Sie 100 µl des gebrauchsfertigen Aviditätsreagenzes (**[UREA]**) in das eine Well des Doppelansatzes, pipettieren Sie 100µl der gebrauchsfertigen Waschlösung in das andere Well des Doppelansatzes als auch in alle anderen Wells (Blank, Negativ Kontrolle und Cut-off-Kontrolle).
- C. 5 Minuten bei Raumtemperatur (21-25°C) inkubieren. Platte dabei keiner direkten Sonneneinstrahlung aussetzen.
- D. Wiederholen Sie den Waschschrift wie in C.
- E. 100 µl gebrauchsfertiges Peroxidase-Konjugat in alle Wells pipettieren.
- F. 30 Minuten bei Raumtemperatur (21-25°C) inkubieren. Platte dabei keiner direkten Sonneneinstrahlung aussetzen.
- G. Wiederholen Sie den Waschschrift wie in C.
- H. 100 µl gebrauchsfertiges TMB-Substrat in alle Wells pipettieren.
- I. Platte sofort dunkel stellen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (21-25°C) inkubieren.
- J. 100 µl Stopplösung in alle Wells pipettieren. Vorsichtig aufklopfen, um eine gleichmäßige Farbverteilung sicherzustellen, und innerhalb von 10 Minuten messen.
- K. Stellen Sie vor dem Messen der Platte sicher, dass der Boden frei von Feuchtigkeit ist und keine Luftblasen in den Wells sind. Messen Sie die in den Wells entstandene Farbreaktion bei 450 nm mit einem geeigneten Platten-Photometer. Bei Photometern, die bei 2 Wellenlängen messen können, setzen Sie den Referenzfilter auf 620/630 nm.

### ACHTUNG:

Die Extinktion (OD) des Blank muss immer von den ODs der Proben und Kontrollen subtrahiert werden.

### HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

Lassen Sie die Wells zwischen den Inkubationen nicht austrocknen. Halten Sie die Inkubationstemperaturen und -zeiten ein.

### N. WASCHVORGANG

Der Waschvorgang kann manuell mit einer Mehrkanal-Pipette oder auf einem automatischen Platten-Washer durchgeführt werden. Die Wells leeren, umdrehen und auf trockenem, saugfähigem Papier aufklopfen. 4-mal Waschen mit einer Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden (300 µl).

## 12. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die OD-Werte der beiden Ansätze werden prozentual ins Verhältnis gesetzt. Der berechnete Wert wird als Aviditätsindex bezeichnet.

$$\frac{\text{OD-Wert (mit Aviditätsreagenz)}}{\text{OD-Wert (mit Waschlösung)}} \times 100 = \text{Aviditätsindex (AI \%)}$$

Interpretation der Ergebnisse:

ERGEBNIS	DEFINITION
Niedrig-avide IgG-Antikörper	Aviditätsindex < 40%
Grenzwertbereich	Aviditätsindex 40% - 45%
Hoch-avide IgG-Antikörper	Aviditätsindex > 45%

Die Aviditätsbestimmung der CMV-IgG-spezifischen Antikörper hat sich als wichtige zusätzliche Methode, zur Unterscheidung zwischen einer Primärinfektion und einer Reinfektion, erwiesen. Ein Aviditätsindex unter 40% lässt auf eine Primärinfektion innerhalb der letzten 6 – 8 Monate schließen. Der Bereich zwischen 40% und 45% wird als Grenzwertbereich interpretiert. Proben mit Ergebnissen innerhalb dieses Bereiches müssen wiederholt werden. Bei wiederholt grenzwertigem Ergebnis kann keine Aussage über den Infektionszeitpunkt getroffen werden. Der Nachweis von hoch aviden CMV-IgG-Antikörpern (Aviditätsindex >45%) schließt eine Infektion innerhalb der letzten 4 Monate aus.

## 13. VALIDITÄT DES ASSAYS

Die Kontrollen müssen bei jedem Testlauf mitgeführt werden.

Folgende Kriterien zur Testvalidierung müssen erfüllt sein:

- Aviditätsindex der **[CONTROL|LA]** muss <25% sein
- Aviditätsindex der **[CONTROL+]** muss >50% sein

Bitte beachten Sie auch die Validitätskriterien des VIR-ELISA ANTI-CMV-IgG **[REF]** EG 101.

Werden die Sollwerte nicht erreicht, sind die Testergebnisse der Proben invalide und der Test muss wiederholt werden.

## 14. TESTCHARACTERISTIKA

### 14.1 Diagnostische Validität

#### Klinische Spezifität

Die klinische Spezifität des Tests wurde anhand von 166 anti-CMV-IgG positiven, Blutspende-, Laborproben und Proben von Schwangeren evaluiert. Bei allen Proben wurde ein Aviditätsindex von >45% gefunden (Mittelwert = 65%). **Spezifität = 100 %**.  
Zusätzlich wurde der Test anhand von 18 Proben aus 9 Patientenverläufen mit bestätigter CMV-Reinfektion / abgelaufener CMV-Infektion evaluiert. Bei allen Proben wurde ein Aviditätsindex von >45% gefunden (Mittelwert = 63%). **Spezifität = 100 %**.

#### Klinische Sensitivität

Die klinische Sensitivität wurde bewertet, indem zwei kommerziell verfügbare Seroconversion panel geprüft wurden. Diese Probenpanel, einer mit 15 und der andere mit 25 Einzelproben, stellen den Beginn und den Rückgang der IgM- und IgG-Antikörperproduktion über einen längeren Zeitraum dar. Die Ergebnisse der CMV-IgG Aviditätstestung, verglichen mit den Ergebnissen eines Referenztestes (ELISA), zeigten eine 100%-ige Übereinstimmung. Bei allen anti-CMV-IgG positiven Proben wurde ein Aviditätsindex von <40% gefunden (Mittelwert = 21%). **Sensitivität = 100 %**.  
Zusätzlich wurde der Test anhand von 24 Proben aus 16 Patientenverläufen mit bestätigter CMV-Primärinfektion evaluiert. Bei allen Proben wurde ein Aviditätsindex von <40% gefunden (Mittelwert = 23%). **Sensitivität = 100 %**.

Die Ergebnisse beziehen sich nur auf die untersuchten Probenkollektive.

### 14.2 Präzision und Reproduzierbarkeit

Die intraserielle Präzision (Intraassay) wurde mit unterschiedlich aviden Proben im Mehrfachansatz (n=22) innerhalb einer antigenbeschichteten Platte ermittelt. Die berechneten Variations-Koeffizienten (VK) der Proben betragen < 10 %.

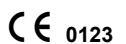
Für die Bestimmung der interseriellen Reproduzierbarkeit (Interassay) wurden unterschiedlich avide Proben in 10 unabhängig voneinander durchgeführten Testläufen angesetzt. Die berechneten Variations-Koeffizienten (VK) der Proben betragen < 10 %.

## 15. **[Bib]**

1. Avidity of Immunoglobulin G Directed against Human Cytomegalovirus during Primary and Secondary Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Subjects. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 1997, p. 469-473, Vol. 4, No. 4.
2. A New Method with General Diagnostic Utility for the Calculation of Immunoglobulin G Avidity. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Sep. 1999, p. 725-728, Vol. 6, No. 5.
3. Diagnosis of and Screening for Cytomegalovirus Infection in Pregnant Women. Journal of Clinical Microbiology, Sep. 2005, p 4713-4718, Vol. 43, No. 9.
















**Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH**, In der Au 29, D-61440 Oberursel, Germany -Tel.: +49-6171-6281-00 - Fax: +49-6171-6281-12  
email: info@viro-immun.de



## Symbole nach IVD/ symbols used with IVD devices/ Symbole /

### Símbolos/ Simboli/ Simbolos/ Symboly/ Címkékén/ Συμβολα IVD

	Probenverdünnungspuffer/ dilution buffer/ Tampon de dilution/ reactivo compensador/ soluzione tampone/ estabilizador de diluição/ Rendszeri roztok vzork/ Mintahígító/ Αραιωτικό Δείγματος
	Waschlösung/ wash solution/ solution de lavage/ solución limpiadora/ soluzione lavaggio/ solução de lavagem/ Konzentrat/ concentrate / Concentré / concentrado/ concentrato/ concentrado 25x/ Promývací roztok 25x/ Mosópufferkoncentrátum 25x/ Διάλυμα Πλύσης 25x
	Aviditätsreagenz / avidity reagent / réactif d'avidité / reactivo de avidina / reagente di avidità / reagente de avidéz / reagenție pro testování avidity /άντιδραστήριο δυνάμης σύνδεσης
	Positive Kontrolle/Niedrig-avidé / positive control/low avidità / contrôle positif/faible avidité / control positivo/bajo grado de avidéz / controllo positivo/bassa avidità / controle positivo/baixa avidéz / pozitivní kontrola/nízká avidita / θετικός μάρτυρας/χάμηλή δυνάμη σύνδεσης
	Literatur/ Literature/ Littérature/ Bibliografia/ Bibliografía/ Literatura/ Irodalom/ Βιβλιογραφία
	Charge/ lot/ Lot/ lote/ carcia/ lote/ Číslo šarže/ Lot Szám/ Αριθμός παρτίδας
	In-vitro-Diagnostikum/ in vitro diagnostic/ Diagnostic in vitro/ diagnóstico in-vitro/ In-vitro diagnostic/ diagnóstico In-vitro/ In vitro diagnostikum /In Vitro Diagnosztikum/ Διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro
	Artikel Nr./ reference or order number/ Référéncé ou numéro de commande/ referencia o número de pedido/ codice di riferimento o di commissione/ referêncía ou número de encomenda/ Katalogové číslo/ Katalógusban Szereplő Kód/ Κωδικός Καταλόγου
	96 Bestimmungen/ tests/ testés/ determinazioni/ testes / Počet Testů/ Vizsgálatok Száma/ Αριθμός εξετάσεων
	Gebrauchsanweisung beachten/ consult instructions for use/ consulter le mode d'emploi/consultar las instrucciones de uso/ consultare le istruzioni per l'uso/ consultar instruçoes de uso/ Přečtěte si Návod k použití/ Olvassa el a Használati Utasítást/ Δείτε Οδηγίες Χρήσεως
	Temperaturgrenzen/ temperature limitation/ Limites de température/ Limites de temperatura/ Limiti di temperatura/ Limites de temperatura/ Teplotní limity/ Hőmérsékleti Korlátok/ Θερμοκρασιακά όρια
	Verfallsdatum:/ expiry date/ date d'expiration/ Fecha de caducidad/ Data di decadenza/ Limite de validade/ Datum expirace/ Lejárati Idő/ Ημερομηνία λήξης (Χρήση έως ...)
	Hergestellt von/ manufactured from/ fabriqué par/ elaborado por/ fabbricato da/ produzido por/ VÝrobce/ Gyártó/ Κατασκευάζεται από...