

AESKULISA[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

MANUAL DE INSTRUÇÕES

AESKULISA[®] Cytomegalovirus IgG / IgM
AESKULISA[®] Cytomegalovirus gB IgG
Ref 6032 / 6033 / 6035



Atualizações	
Versão atual	V.004 de 07/04/2021
Versão anterior	V.003 de 20/01/2020
Alterações no capítulo	1; 8.4.2; 10; 11.1
Motivo para as alterações	IVDR Atualização



AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim, Germany
Tel: +49-6734-9622-0
Fax: +49-6734-9622-2222
Info@aesku.com
www.aesku.com

Índice

1	Finalidade	3
2	Importância diagnóstica	3
3	Princípio do teste <i>AESKULISA</i> ®	4
4	Antigénio	4
5	Componentes do <i>AESKULISA</i> ®	4
6	Materiais adicionalmente necessários	5
7	Armazenamento e prazo de validade.....	5
8	Execução do <i>AESKULISA</i> ®	6
8.1	Indicações gerais.....	6
8.2	Preparação de reagentes	6
8.2.1	Tiras de microtitulação (prontas a usar).....	6
8.2.2	Calibradores (prontos a usar)	7
8.2.3	Controlos (prontos a usar)	7
8.2.4	Diluinte de amostra (5x conc.)	7
8.2.5	Solução de lavagem (50x conc.).....	7
8.2.6	Conjugado POD anti-IgA, IgG ou IgM humano (pronto a usar)	7
8.2.7	Substrato (pronto a usar)	7
8.2.8	Solução de paragem (pronta a usar).....	7
8.3	Preparação da amostra	7
8.3.1	Material de amostra	7
8.3.2	Diluição da amostra	7
8.3.3	Absorção do fator reumatoide com <i>AESKULISA</i> ® IgM.....	8
8.3.4	Armazenamento da amostra.....	8
8.4	Execução.....	8
8.4.1	Esquema de pipetagem.....	8
8.4.2	Realização do teste	9
8.5	Execução no caso de aplicação automatizada	10
9	Avaliação <i>AESKULISA</i> ®.....	10
9.1	Normalização.....	10
9.2	Avaliação quantitativa.....	10
9.3	Área limite.....	11
9.4	Áreas de medição.....	11
9.5	Avaliação qualitativa	11
9.6	Critérios de validade	11
9.7	Interpretação dos resultados	12
10	Características de desempenho <i>AESKULISA</i> ®	13
10.1	Sensibilidade e especificidade analíticas	13
10.2	Sensibilidade e especificidade diagnóstica	13
10.3	Valores esperados.....	14
10.4	Precisão	14
11	Indicações de segurança	15
11.1	Advertências e procedimentos de segurança	15
11.2	Eliminação	16
12	Referências	16

1 Finalidade

Os Aeskulisa® Cytomegalovirus IgG e IgM são imunoenaios qualitativos e quantitativos para comprovar a presença de anticorpos IgG e IgM humanos no soro ou no plasma produzidos contra o citomegalovírus. O Aeskulisa® Cytomegalovirus IgM serve de teste inicial para a detecção de infecções agudas. O Aeskulisa® Cytomegalovirus IgG permite a confirmação de um contacto com o agente patogénico e auxilia a determinação do estado de imunidade.

O Aeskulisa® Cytomegalovirus gB IgG é um imunoenasiao qualitativo e quantitativo para a detecção de anticorpos IgG humanos no soro ou no plasma dirigido contra a glicoproteína B (gB) dos HCMV.

A interpretação dos resultados pode apenas ser realizada no contexto do quadro clínico. Não se deverá fundamentar o diagnóstico com base nos resultados dos testes realizados, uma vez que este diagnóstico deverá ser feito sempre depois de se avaliarem todos os dados clínicos e de medicina laboratorial. Para a confirmação devem ser realizados outros exames. Os imunoenaios Aeskulisa® são concebidos exclusivamente para utilização para diagnóstico *in vitro* apenas por pessoal qualificado, com formação, especialmente treinado e familiarizado com os métodos laboratoriais.

2 Importância diagnóstica

Os citomegalovírus humanos (HCMV) são vírus patogénicos humanos da família *Herpesviridae*, também conhecidos como herpesvírus humanos 5 (HHV 5), disseminados por todo o mundo. Os agentes patogénicos da citomegalia, com um tamanho de 200 nm, têm uma cápsula icosaédrica que rodeia o genoma do dsDNA constituído por cerca de 230.000 bp e é encerrada por uma membrana lipídica na qual estão incorporadas várias glicoproteínas. Os citomegalovírus caracterizam-se pelo seu ciclo de replicação notavelmente lento. As células infetadas estão geralmente muito aumentadas.

Os citomegalovírus humanos são transmitidos principalmente por infeções por esfregaço de secreções corporais (por exemplo, saliva, lágrimas, urina ou sémén), por contacto de mucosas, transfusões de sangue, transplantes de órgãos e por via transplacentária ou intrauterina. A soroprevalência mostra uma maior inter-relação com os padrões de vida socioeconómicos, variando entre 40-60% na Europa. As infeções primárias são geralmente assintomáticas em indivíduos saudáveis e imunocompetentes. Em caso de doença, podem ocorrer sintomas semelhantes aos da gripe com febre, dor de cabeça e dores nos membros e inchaço dos gânglios linfáticos após um período de incubação de duas a seis semanas. Complicações tais como miocardite, trombocitopenia ou polineuropatia são raras em indivíduos imunocompetentes. Tal como com todos os herpesvírus, a infeção primária leva à persistência do agente patogénico ao longo da vida.

Em indivíduos com imunodeficiências congénitas ou adquiridas, ou sob terapia imunossupressora, a infeção por HCMV pode causar complicações graves como colite, hepatite, pneumonia ou encefalite. Os pacientes com transplantes correm o risco de deficiência funcional ou mesmo de perda do transplante em caso de infeção ou reativação de HCMV.

Um risco particular é colocado por uma infeção primária por HCMV durante a gravidez, que - no caso de transmissão transplacentária do agente patogénico - pode levar a uma infeção congénita com danos consideráveis e até à morte do nascituro. O risco de infeção fetal e a extensão dos danos variam em função do tempo de infeção. As infeções congénitas por HCMV podem resultar em perturbações de crescimento, défices motores, microcefalia, perturbações neurológicas com atraso mental e especialmente deficiência auditiva ou mesmo surdez. Observam-se também

hepatoesplenomegalia, icterícia, petéquias, calcificações intracerebrais e coriorretinite. A infeção por HCMV é considerada a infeção congénita mais comum.

Para o diagnóstico de uma infeção por citomegalovírus, estão disponíveis tanto procedimentos comprovativos diretos como indiretos. No diagnóstico de rotina, a deteção indireta de infeções por citomegalovírus é efetuada através da deteção serológica de anticorpos IgG e IgM específicos de HCMV.

3 Princípio do teste Aeskulisa®

O Aeskulisa® (AESKU Enzyme Linked Immunosorbent Assay) é um procedimento imunológico, que comprovou a sua eficácia especialmente na deteção de anticorpos. A reação de comprovação baseia-se na interação específica de anticorpos e antigénios. Para esse efeito, as tiras de teste das placas de microtitulação da Aeskulisa® foram revestidas com antigénios específicos de agentes infecciosos para a fixação dos anticorpos existentes na amostra do paciente. Outros anticorpos secundários marcados com peroxidase detetam os imunocomplexos assim formados. A enzima catalisa uma reação, em cuja evolução, um substrato incolor é transformado num produto com cor. A intensidade de sinal do produto de reação é proporcional à atividade de anticorpo na amostra e é registada fotometricamente.

4 Antigénio

A comprovação da presença de anticorpos com o Aeskulisa® Cytomegalovirus IgG e IgM baseia-se na utilização de citomegalovírus inativados (estirpe AD-169). A comprovação da presença de anticorpos com o Aeskulisa® Cytomegalovirus gB IgG baseia-se na utilização de uma proteína de fusão recombinante que consiste em domínios AD2 imunogénicos das glicoproteínas B (gB) de citomegalovírus.

5 Componentes do Aeskulisa®

Componentes do teste	Cor da solução	Cor da tampa	Número / Volume
Tiras de microtitulação quebráveis [MP] cada uma, com oito cavidades individuais revestidas (total 96), 1 estrutura de teste. O material de revestimento específico do teste está inativado.	-	-	12 unidades
Calibradores A – D [CAL] (prontos a usar) Soro humano ou anticorpo quimérico em solução com proteína (BSA); com corante; conservante ProClin. As atividades dos anticorpos dos calibradores estão indicadas nos respetivos rótulos e no certificado de controlo de qualidade do Aeskulisa®.	amarelo*	branco	4 x 1,5 ml
Controlo positivo [CON +] (prontos a usar) Soro humano ou anticorpo quimérico em solução com proteína (BSA); com corante; conservante ProClin.	amarelo*	vermelho	1 x 1,5 ml
Controlo negativo [CON –] (pronto a usar) Soro humano ou anticorpo quimérico em solução com proteína (BSA); com corante; conservante ProClin.	amarelo*	verde	1 x 1,5 ml

Diluyente de amostra SB 5x , 5x conc. Solução com proteínas (BSA); com corante; Conservante < 0,1 % azida de sódio. O diluyente de amostra para os AESKULISA® IgM Immunoassays contém absorvente Rf.	IgG, IgA: amarelo IgM: verde	branco	1 x 20 ml
Solução de lavagem WASHB 50x , 50x conc. Solução com Tween 20; com corante; conservante ProClin.	verde	branco	1 x 20 ml
Conjugado anti-IgA, IgG ou IgM humano CONJ (pronto a usar) Anticorpo policlonal dirigido contra IgA, IgG ou IgM humana, conjugado com peroxidase de rábano, estabilizado numa solução com proteínas (BSA); com corante; conservante ProClin.	IgA: vermelho IgG: azul IgM: verde	IgA: vermelho IgG: azul IgM: verde	1 x 15 ml
Substrato SUB (pronto a usar) TMB/H ₂ O ₂ .estabilizado	incolor	preto	1 x 15 ml
Solução de paragem PARAGEM (pronta a usar) 1 M ácido clorídrico (HCl).	incolor	branco	1 x 15 ml
Certificado de controlo de qualidade	-	-	1 unidade
Instruções para a utilização	-	-	1 unidade

*A intensidade da cor aumenta com a atividade de anticorpo.

6 Materiais adicionalmente necessários

- Equipamento de laboratório habitual com material em vidro (cilindro 100 – 1000 ml), tubos para diluições, misturador de vórtice, micropipetas (10, 100, 200, 500, 1000 µl) ou multipipeta ajustável (100 – 1000 µl).
- Espectrofotómetro para placas de microtitulação com filtro, comprimento de onda 450 nm, comprimento de onda de referência recomendado na gama de 600 a 690 nm (p. ex. 620 nm).
- Dispositivo de lavagem para placas de microtitulação (multipipeta 300 µl, pipeta multicanais ou sistema automático de lavagem).
- Papel de filtro
- *Água destilada*
Os AESKULISA® Immunoassays foram desenvolvidos com água purificada (*purified water*), conforme definição dada pela Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 - NF 21) e pela Farmacopeia Europeia (Eur. Ph. 4te Ed.).

7 Armazenamento e prazo de validade

As tiras de microtitulação devem ser sempre guardadas na película de embalagem e fechadas com o saco de secagem. Se o armazenamento for realizado corretamente na embalagem original e a conservação for realizada de 2 a 8 °C, os reagentes e a placa de microtitulação podem ser conservados, mesmo após a quebra, até à data de expiração indicada. As soluções diluídas têm uma validade de quatro semanas, sendo conservadas de 2 a 8 °C.

8 Execução do AESKULISA®

8.1 Indicações gerais

O cumprimento exato das instruções para a utilização garante resultados de teste corretos. Para uma utilização correta dos AESKULISA® Immunoassays, podem apenas ser utilizados reagentes AESKULISA®. Estes últimos não podem ser substituídos por reagentes de outros fabricantes.

As placas de microtitulação, os calibradores, os controlos e os conjugados dos AESKULISA® Immunoassays são ajustados especificamente de acordo com o teste e o lote e não podem ser utilizados noutros lotes. As avaliações dos calibradores e controlos são indicadas no certificado de controlo de qualidade do AESKULISA® Immunoassay. A solução de lavagem, a solução do substrato e a solução de paragem podem ser combinadas com todos os AESKULISA® Immunoassays, independentemente do teste e do lote utilizado.

O diluente de amostra dos AESKULISA® Immunoassays IgA e IgG pode ser usado com todos os AESKULISA® Immunoassays IgA e IgG (REF 6xxx), independentemente do teste e do lote utilizado. O diluente de amostra dos AESKULISA® IgM Immunoassays contém absorvente Rf e pode ser usado com todos os AESKULISA® IgM Immunoassays para a serologia infecciosa (REF 6xxx), independentemente do teste e do lote utilizado.

Para evitar uma contaminação, devem ser sempre aplicadas técnicas assépticas para retirar os reagentes. A solução de conjugado e substrato nunca deverá ser pipetada com ponteiros contaminados com outros reagentes. A reprodutibilidade dos resultados está, entre outros, dependente da homogeneização cuidadosa dos reagentes. Por esse motivo, as diluições dos reagentes e das amostras devem ser bem misturadas antes da utilização. Uma diluição incorreta pode ter como resultado a perda da sensibilidade.

Além disso, deve ter-se atenção a uma técnica de pipetagem cuidadosa e ao cumprimento das temperaturas e dos tempos incubação especificados. Uma lavagem correta evita inespecificidades dos testes.

Durante o armazenamento e a incubação, os reagentes devem ser protegidos da exposição à luz intensa. Nunca podem ser expostos a temperaturas superiores a 37 °C. Depois da utilização, os reagentes devem voltar a ser bem fechados para evitar a secagem e a contaminação. Ao fechar os frascos deve evitar-se trocar as tampas.

Os AESKULISA® Immunoassays podem apenas ser avaliados se os critérios de validade tiverem sido cumpridos.

8.2 Preparação de reagentes

Todos os componentes e a placa de microtitulação tem de ser colocados à temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de se iniciar o teste. Os reagentes líquidos têm de ser bem misturados. Para a diluição dos concentrados tampão podem apenas ser utilizados frascos de vidro limpos.

8.2.1 Tiras de microtitulação (prontas a usar)

As tiras de microtitulação contêm abreviaturas do antigénio com que foram revestidas.

8.2.2 Calibradores (prontos a usar)

Os calibradores CAL A – CAL D estão prontos a usar e não podem ser diluídos. Em cada execução do teste, os calibradores têm de acompanhar o teste, independentemente do número de tiras de teste utilizadas.

8.2.3 Controlos (prontos a usar)

Os controlos positivos CON+ e os controlos negativos CON– estão prontos a usar e não podem ser diluídos. Em cada execução do teste, os controlos têm de acompanhar o teste, independentemente do número de tiras de teste utilizadas.

Independentemente das diretivas nacionais, os laboratórios podem também validar e utilizar alternativamente controlos próprios.

8.2.4 Diluente de amostra (5x conc.)

O diluente de amostra concentrado tem de ser diluído 1:5 com água destilada, antes da utilização (p. ex. 20 ml + 80 ml). O diluente de amostra dos AESKULISA® IgM Immunoassays contém absorvente Rf.

8.2.5 Solução de lavagem (50x conc.)

A solução de lavagem concentrada tem de ser diluída 1:50 com água destilada, antes da utilização (p. ex. 20 ml + 980 ml).

8.2.6 Conjugado POD anti-IgA, IgG ou IgM humano (pronto a usar)

O conjugado está pronto a usar.

8.2.7 Substrato (pronto a usar)

O substrato TMB tem de ser sempre pipetado em ponteiras novas para evitar contaminações. A solução do substrato deve ser protegida contra a exposição à luz intensa.

8.2.8 Solução de paragem (pronta a usar)

A solução de paragem está pronta a usar.

8.3 Preparação da amostra

8.3.1 Material de amostra

Recomenda-se a utilização de amostras de soro ou plasma EDTA frescas. Não devem ser usadas amostras ictericas, lipémicas, hemolisadas ou com contaminação bacteriana. As amostras singulares devem ser centrifugadas (< 1000 x g) e o sobrenadante deve ser retirado para outra utilização. As amostras não podem ser termicamente inativadas.

8.3.2 Diluição da amostra

As amostras dos pacientes têm de ser diluídas 1:101 (p. ex. 10 µl + 1000 µl) com 1x diluente de amostra e bem misturadas.

8.3.3 Absorção do fator reumatoide com AESKULISA® IgM

Os fatores reumatoides (Rf) são predominantemente autoanticorpos da classe IgM, que se fixam preferencialmente aos imunocomplexos IgG. A comprovação da presença de anticorpos IgM específicos para o agente patogénico pode levar a resultados falso positivos devido a esses fatores reumatoides. Além disso, os anticorpos IgM, específicos para o agente patogénico, com ligação mais fraca, podem ser afastados por anticorpos IgG com ligação mais forte. Um comprovativo IgM pode então produzir um falso negativo. Por esse motivo, o diluente de amostra dos AESKULISA® IgM Immunoassays contém um absorvente Rf especial. A absorção Rf é efetuada através da diluição da amostra do paciente num diluente de amostra 1x dos AESKULISA® IgM Immunoassays e seguido de uma incubação durante, **no mínimo, 15 minutos, à temperatura ambiente.**

8.3.4 Armazenamento da amostra

As amostras dos pacientes devem ser utilizadas dentro de 8 horas e não devem ser guardadas por um período superior a 48 horas, devendo ser conservadas entre 2 – 8 °C. É possível um armazenamento mais prolongado das amostras a ≤ -20 °C. Deve evitar-se a descongelação e congelação repetidas.

8.4 Execução

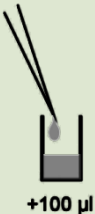

8.4.1 Esquema de pipetagem


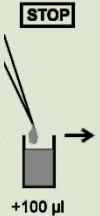

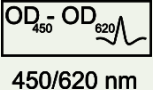
De acordo com a aplicação quantitativa ou qualitativa pretendida do AESKULISA® Immunoassay recomenda-se o esquema de pipetagem seguinte:

	Aplicação quantitativa						Aplicação qualitativa				
	1	2	3	4			1	2	3	4	
A	CAL A	P3				A	CON-	P5			
B	CAL B	P4				B	CAL B	P6			
C	CAL C	P5				C	CAL B	...			
D	CAL D	P6				D	CON+				
E	CON-	...				E	P1				
F	CON+					F	P2				
G	P1					G	P3				
H	P2					H	P4				
	CAL A	Calibrador A					CON-	Controlo negativo			
	CAL B	Calibrador B					CAL B	Controlo <i>cut off</i>			
	CAL C	Calibrador C					CON+	Controlo positivo			
	CAL D	Calibrador D									
	CON-	Controlo negativo									
	CON+	Controlo positivo									

8.4.2 Realização do teste

Colocar o número de cavidades necessárias na estrutura do teste e criar uma folha de protocolo. Para o processamento manual recomenda-se a utilização à temperatura ambiente.

Passo de trabalho	Símbolo	Descrição
1. Adição de calibradores, controlos e amostras diluídas		Adição de 100 µl de calibradores, controlos e amostras diluídas prontos a usar em cada cavidade.
2. Incubação da amostra		Incubação durante 30 +/- 3 minutos a 20 – 32 °C.
3. Lavar 3 x		Aspirar o líquido das cavidades; por cavidade, encher 300 µl de 1x solução de lavagem, aspirar a solução de lavagem e repetir o procedimento mais 2x; bater a placa.
4. Adição do conjugado		Adição de 100 µl de solução de conjugado pronta a usar, em cada cavidade.
5. Incubação do conjugado		Incubação durante 30 +/- 3 minutos a 20 – 32 °C.
6. Lavar 3 x		Aspirar o líquido das cavidades; por cavidade, encher 300 µl de 1x solução de lavagem, aspirar a solução de lavagem e repetir o procedimento mais 2x; bater a placa.
7. Adição do substrato		Adição de 100 µl de solução de substrato pronta a usar, em cada cavidade.

8. Incubação do substrato		<p>Incubação durante 30 +/- 3 minutos a 20 – 32 °C. Proteger da radiação de luz intensa.</p>
9. Adição de solução de paragem		<p>Adição de 100 µl de solução de paragem em cada cavidade na ordem da adição do substrato.</p>
10. Incubação		<p>Opcional: Incubar durante 5 minutos.</p>
11. Misturar		<p>Agitar cuidadosamente a placa durante 5 segundos.</p>
12. Análise		<p>Medir a densidade ótica no prazo de 30 minutos em 450 nm contra um comprimento de onda de referência recomendado de 620 nm.</p>

8.5 Execução no caso de aplicação automatizada

O processamento dos **AESKULISA**® Immunoassays é efetuado analogamente à aplicação manual. A execução do teste indicada deve ser respeitada. Os **AESKULISA**® Immunoassays estão avaliados para serem utilizados com os mais variados instrumentos; os respetivos Assay files serão disponibilizados a pedido. Para o processamento automático de **AESKULISA**® Immunoassays noutros aparelhos, a avaliação dos Assay files é recomendada pelo fornecedor do kit de teste em colaboração com o fornecedor do instrumento. O processamento automático correto do **AESKULISA**® Immunoassay terá de ser, em seguida, validado pelo utilizador.

9 Avaliação **AESKULISA**®

9.1 Normalização

A calibração do **AESKULISA**® Cytomegalovirus IgG e IgM e do **AESKULISA**® Cytomegalovirus gB IgG foi efetuada em soros de referência internos. Os resultados quantitativos são apresentados em U/ml.

9.2 Avaliação quantitativa

Basicamente é recomendada a avaliação quantitativa para os **AESKULISA**® Immunoassays. Para gerar a curva padrão, os sinais de medição ótica (densidade ótica, OD) dos calibradores são aplicados contra a sua atividade de anticorpo (em IU/ml ou U/ml). As atividades de anticorpo dos calibradores estão indicadas no certificado de controlo de qualidade **AESKULISA**® específico do lote. Para a avaliação, recomendamos coordenadas log/lin e uma logística de ajuste de 4 parâmetros (4 PL). Com base na curva gerada, a partir dos sinais de medição óticos das amostras, é deduzida a sua atividade de anticorpo correspondente.

9.3 Área limite

A área limite do AESKULISA® Immunoassay encontra-se indicada no certificado de controlo de qualidade e identifica a área dos resultados de medição de limite. A avaliação de uma amostra de um paciente abaixo da área de limite caracteriza um resultado de teste negativo; a avaliação de uma amostra de um paciente acima da área de limite é interpretada como um resultado positivo. Devido às diferentes seroprevalências e programas de vacinação recomendamos que se verifique e eventualmente ajuste a área de limite através de análises próprias.

9.4 Áreas de medição

A área de medição do AESKULISA® Immunoassay encontra-se indicada no certificado de controlo de qualidade. No âmbito do estudo de avaliação do desempenho foram comprovadas a linearidade de diluição das amostras, bem como a elevada precisão e reprodutibilidade dos resultados de medição nesta área. As amostras que fornecem resultados acima da área de medição, devem ser avaliadas com >máx. As amostras que fornecem resultados abaixo da área de medição, devem ser avaliadas com <mín. Se as amostras dos pacientes atingirem valores de medição acima da área de medição, podem ser novamente analisadas numa diluição superior. Para a quantificação, as atividades de anticorpo contidas devem ser multiplicadas pelo fator de diluição adicional.

9.5 Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa com AESKULISA® Immunoassays é realizada com base na comparação da densidade ótica (OD) da amostra do paciente com a densidade ótica média do calibrador B (calibrador de *cut off* CAL B) aplicado em duplicado. Se a densidade ótica da amostra do paciente se situar na área +/- 20 % do valor médio da densidade ótica do calibrador de *cut off* CAL B, esta deve ser avaliada como ambígua. Com uma OD mais elevada, a amostra do paciente é positiva, com uma OD mais reduzida, deve ser classificada como negativa.

9.6 Critérios de validade

Para uma realização do teste válida, terão de cumprir-se os seguintes critérios de validade:

- OD CAL A < 0,3
- OD CAL A < OD CAL B < OD CAL C < OD CAL D
- OD CAL D > 1,3
- O controlo negativo tem de ser avaliado negativamente.
- O controlo positivo não pode ser avaliado negativamente.
- No caso de aplicação quantitativa do AESKULISA® Immunoassays, o controlo positivo terá de se situar na área de validade indicada no certificado de controlo de qualidade AESKULISA® específico do lote.
- No caso de aplicação qualitativa dos AESKULISA® Immunoassays, os valores OD do calibrador B *cut off* (CAL B) em duplicado, não podem divergir mais de 20 % entre si.

Se estes critérios não forem cumpridos o teste é inválido e tem de ser repetido.

No caso de uma realização inválida do teste, deverão verificar-se os prazos de validade dos reagentes (prontos a usar), as condições de armazenamento, os tempos e as temperaturas de incubação, as pipetas, o sistema de lavagem, incluindo os ciclos de lavagem, o fotómetro, bem como outros aparelhos utilizados. Caso não se encontre qualquer motivo para a realização inválida do teste ou para outros resultados divergentes, contacte o fornecedor ou o fabricante do kit de teste.

9.7 Interpretação dos resultados

Um resultado positivo no AESKULISA® Immunoassay confirma a presença de anticorpos específicos. Um resultado negativo indica que, na amostra do paciente não existe atividade de anticorpo relevante contra o agente patogénico, no entanto, não exclui uma infeção muito recente. No caso de um resultado ambíguo não é possível efetuar uma avaliação segura da amostra do paciente. Nesse caso, o teste deverá ser repetido paralelamente com uma nova amostra de soro (pares de soro) recolhida com um intervalo de uma a duas semanas.

A infeção primária com HCMV está geralmente associada à formação de anticorpos IgM e IgG e à seroconversão. A atividade IgG responsável pela proteção imunológica mantém-se geralmente para toda a vida. Após uma infeção, a atividade de anticorpos IgM normalmente volta a diminuir, mas também pode persistir durante vários meses. Assim, as deteções positivas de IgM podem ser causadas por uma persistência mais longa de IgM, por reativações de HCMV, por uma estimulação policlonal anterior ou também por reações cruzadas com anticorpos contra outros vírus, bem como por fatores reumatóides. Assim, a deteção serológica de anticorpos IgM de citomegalovírus por si só não é conclusiva da infeção aguda por citomegalovírus. Uma deteção positiva de IgM deve, portanto, ser sempre clarificada por outros testes como a PCR, a determinação da avidéz ou a deteção de anticorpos IgG contra a glicoproteína B (gB AD2) de HCMV.

No contexto das infeções primárias pelo HCMV, observa-se uma formação retardada de anticorpos IgG contra a glicoproteína B (gB) do HCMV. Em contraste, os anticorpos IgG contra a gB podem frequentemente ser detetados imediatamente em infeções recorrentes por HCMV. A ausência de anticorpos IgG contra a gB AD2 pode assim servir como indicador para identificar mulheres grávidas com risco aumentado de transmissão transplacentária de HCMV, embora se deva notar que aproximadamente 20% de todos os indivíduos infetados com HCMV não desenvolvem anticorpos IgG contra a gB.

As reações cruzadas de anticorpos contra outros herpesvírus (por exemplo HSV, EBV ou VZV) não podem ser excluídas.

Esquema de interpretação básico dos resultados serológicos

Atividade IgM de HCMV	Atividade IgG de HCMV	Atividade IgG gB de HCMV	Avaliação
negativo	negativo	negativo	Não são comprováveis anticorpos específicos. No caso de existir uma suspeita fundamentada, recomenda-se a realização de outro teste após uma a duas semanas.
positivo	negativo / positivo	negativo	Indicação de uma infeção aguda por HCMV. Para a confirmação são recomendados outros exames.
negativo	positivo	positivo	Indicação de infeção prévia por HCMV / latência.

A interpretação dos resultados pode apenas ser realizada no contexto do quadro clínico. Não se deverá fundamentar o diagnóstico com base nos resultados dos testes realizados, uma vez que este diagnóstico deverá ser feito sempre depois de se avaliarem todos os dados clínicos e de medicina laboratorial. Para a confirmação devem ser realizados outros exames.

10 Características de desempenho Aeskulisa®

10.1 Sensibilidade e especificidade analíticas

O Limite de Branco (LoB) foi avaliado através de múltiplas análises de poços que contêm apenas amostras de tampão. O Limite de Detecção (LoD) foi avaliado através de múltiplas análises de amostras negativas.

	Limite de Branco (LoB)	Limite de Detecção (LoD)
AESKULISA® Cytomegalovirus IgG	0,09 U/ml	1,73 U/ml
AESKULISA® Cytomegalovirus IgM	0,11 U/ml	0,64 U/ml
AESKULISA® Cytomegalovirus (gB) IgG	0,69 U/ml	2,50 U/ml

A especificidade analítica dos Aeskulisa® Immunoassays foi examinada através da adição de substâncias potencialmente interferentes às amostras e determinação da sua influência sobre o resultado de medição. Não foi possível detetar uma influência significativa da hemoglobina (até 800 mg/dl), da bilirrubina (até 20 mg/dl), do conjugado de bilirrubina (até 20 mg/dl) e dos triglicéridos (até 3000 mg/dl) sobre os resultados de medição.

10.2 Sensibilidade e especificidade diagnóstica

Para o cálculo da sensibilidade e especificidade dos Aeskulisa® Cytomegalovirus IgG e IgM foram examinados respetivamente mais de 180 soros de dadores de sangue e pessoas com suspeita de infeção por citomegalovírus e os resultados foram comparados com os resultados dos ensaios imunológicos do citomegalovírus IgG e IgM de um concorrente europeu líder.

Para calcular a especificidade do imunoensaio Aeskulisa® Cytomegalovirus gB IgG, foram examinadas 100 amostras de soro de mães seronegativas a CMV com sintomas clínicos inconspícuos no momento do nascimento dos seus filhos. Os resultados foram comparados com os do imunoensaio de citomegalovírus IgG de um dos principais concorrentes europeus.

A sensibilidade do imunoensaio Aeskulisa® Cytomegalovirus gB IgG foi determinada pela análise de 101 amostras de soro de mulheres grávidas latentemente infetadas com CMV, nas quais foi observada uma reação positiva contra o antígeno gB2 na imunomarcação de um dos principais fabricantes europeus. Os soros com sinal isolado contra gB1 e sinal negativo contra gB2 não foram considerados nesta análise.

	Sensibilidade	Especificidade
AESKULISA® Cytomegalovirus IgG	97,8 %	97,7 %
AESKULISA® Cytomegalovirus IgM	> 99 %	98,1 %
AESKULISA® Cytomegalovirus (gB) IgG	> 99 %	93,6 %

Para o cálculo da sensibilidade e especificidade não foram considerados os resultados classificados como ambíguos.

10.3 Valores esperados

A análise de soros de doadores de sangue não selecionados com **AESKULISA**[®] Cytomegalovirus IgG e IgM, bem como com **AESKULISA**[®] Cytomegalovirus gB IgG, mostrou a seguinte distribuição:

AESKULISA [®]	Número de amostras	negativo	ambíguo	positivo
Cytomegalovirus IgG	100	30 (30,0 %)	0 (0,0 %)	70 (70,0 %)
Cytomegalovirus IgM	100	96 (96,0 %)	3 (3,0 %)	1 (1,0 %)
Cytomegalovirus gB IgG	100	46 (46,0 %)	3 (3,0 %)	51 (51,0 %)

10.4 Precisão

Para o apuramento da precisão e reprodutibilidade dos resultados de medição com **AESKULISA**[®] Cytomegalovirus IgG e IgM, bem como com **AESKULISA**[®] Cytomegalovirus gB IgG, os intraensaio e interensaio, bem como a variação inter-lotes foram determinados com várias amostras de diferentes atividades de anticorpos.

AESKULISA[®] Cytomegalovirus IgG

Amostra	Extinção (OD)	Atividade IgG	Intraensaio CV (U/ml)	Interensaio CV (U/ml)	Inter-lotes CV (U/ml)
Soro 1	0,259	3,5 U/ml	5,6 %	18,1 %	20,5 %
Soro 2	0,832	19,4 U/ml	5,8 %	14,1 %	10,8 %
Soro 3	1,474	54,0 U/ml	7,2 %	11,6 %	6,6 %
Soro 4	1,688	72,4 U/ml	8,8 %	14,9 %	13,4 %
Soro 5	1,704	73,6 U/ml	6,6 %	10,3 %	7,8 %

AESKULISA[®] Cytomegalovirus IgM

Amostra	Extinção (OD)	Atividade IgM	Intraensaio CV (U/ml)	Interensaio CV (U/ml)	Inter-lotes CV (U/ml)
Soro 1	0,419	7,0 U/ml	4,5 %	6,8 %	6,6 %
Soro 2	0,882	19,7 U/ml	5,9 %	6,3 %	6,5 %
Soro 3	1,098	27,8 U/ml	4,8 %	5,6 %	9,1 %
Soro 4	1,559	52,6 U/ml	5,4 %	7,7 %	10,3 %
Soro 5	1,627	57,4 U/ml	5,4 %	6,4 %	9,7 %

AESKULISA® Cytomegalovirus gB IgG

Amostra	Extinção (OD)	Atividade IgG	Intraensaio CV (U/ml)	Interensaio CV (U/ml)	Inter-lotes CV (U/ml)
Soro 1	0,322	5,2 U/ml	2,7 %	10,8 %	15,6 %
Soro 2	0,746	17,8 U/ml	3,8 %	7,2 %	9,3 %
Soro 3	1,237	38,5 U/ml	5,7 %	7,4 %	8,5 %
Soro 4	1,592	57,7 U/ml	3,9 %	10,3 %	11,9 %
Soro 5	2,588	138,0 U/ml	3,7 %	14,5 %	14,9 %

Mediante pedido, estão disponíveis relatórios de estudo mais abrangentes sobre características adicionais de desempenho, como sensibilidade analítica, especificidade analítica, veracidade, veracidade, precisão, recuperação, linearidade, limites de detecção e alcance de medição.

11 Indicações de segurança

11.1 Advertências e procedimentos de segurança

Os AESKULISA® Immunoassays estão exclusivamente previstos para o diagnóstico *in vitro* e apenas pela aplicação por parte de profissionais qualificados, que dominem perfeitamente as técnicas de trabalho. Para o manuseamento dos reagentes do teste e das amostras dos pacientes aplicam-se as regras reconhecidas da boa prática laboratorial. Se o produto estiver danificado ou as informações do produto, incluindo a rotulagem, estiverem incorretas ou contiverem erros, contacte o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Não pipetar com a boca. Nas áreas onde se trabalha com reagentes de teste ou com amostras de pacientes não se deve comer, beber ou fumar. Na manipulação de reagentes de testes e amostras de pacientes evitar o contacto direto através do uso de batas de laboratório, luvas descartáveis e óculos de proteção. Em seguida, lavar bem as mãos.

O produto contém diluições de soros humanos. Embora todos os soros utilizados tenham sido testados negativos para anticorpos anti-HIV 1- e 2-Ak, HBsAg (antigénio de superfície do vírus da hepatite B) e anticorpos anti-HCV-Ak, têm de ser considerados potencialmente infecciosos. Além disso, o produto contém ingredientes de origem animal. Durante a utilização deverão ser respeitadas as diretrizes nacionais aplicáveis.

Dado que os componentes individuais do kit contêm reagentes potencialmente perigosos, estes poderão causar irritação nos olhos e na pele.

Os componentes individuais contêm azida de sódio (NaN_3) como conservante. A azida de sódio pode ser tóxica se ingerida ou se for absorvida através da pele ou dos olhos. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre das canalizações e formar azidas de metal altamente explosivas. Para evitar a acumulação de azida, deverá lavar essas soluções com uma grande quantidade de água, durante a sua eliminação.

Os calibradores e controlos, bem como as amostras dos pacientes devem ser classificados como potencialmente infecciosos e devem ser manipulados de acordo com as diretivas nacionais. As amostras dos pacientes e todos os materiais potencialmente infecciosos devem ser descontaminados após a realização do teste.

Os reagentes devem ser guardados fora do alcance de crianças.

Qualquer incidente grave que tenha ocorrido relativamente ao dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro onde se encontra o utilizador e/ou o paciente.

Um resumo de Segurança e Desempenho está disponível através da Eudamed, bem como a pedido.

11.2 Eliminação

Para a descontaminação e eliminação, respeite as recomendações da CDC, bem como a legislação local e nacional em vigor!

12 Referências

Enders, G. (2006) Labormedizinische Aspekte bei Zytomegalie und Toxoplasmose. Gynäkologie + Geburtshilfe 1, 24 – 8.

Hamprecht, K. (2014) Zytomegalie. AWMF-Leitlinie zur Labordiagnostik schwangerschafts-relevanter Virusinfektionen.

Rothe, M. *et al.* (2001) An antigen fragment encompassing the AD2 domains of glycoprotein B from two different strains is sufficient for differentiation of primary vs. recurrent human cytomegalovirus infection by ELISA. J. Med. Virol. 65, 719 – 29.

Schoppel, K. *et al.* (1997). The humoral immune response against human CMV is characterized by a delayed synthesis of glycoproteinspecific antibodies. J. Inf. Dis. 175, 533 – 44.

Simboli sulle etichette / Symbols on labels / Symboles sur étiquettes / Símbolos sobre las etiquetas / Symbole auf den Etiketten / Σύμβολα στις ετικέτες / Símbolos nos rótulos



Diagnosi in vitro, For in vitro diagnostic use, Pour diagnostic in vitro, Para uso diagnóstico in vitro, In Vitro Diagnostikum, In Vitro Διαγνωστικό μέσο, Para uso Diagnóstico in vitro



Numero d'ordine, Catalogue number, Référence Catalogue, Numéro de catálogo, Bestellnummer, Αριθμός παραγγελίας, Número de catálogo



Descrizione lotto, Lot, Lot, Lote, Chargen Bezeichnung, Χαρακτηρισμός παρτίδας, Lote



Conformità europea, EC Declaration of Conformity, Déclaration CE de Conformité, Declaración CE de Conformidad, Europäische Konformität, Ευρωπαϊκή συμφωνία, Declaração CE de Conformidade



96 determinazioni, 96 tests, 96 tests, 96 ensayos, 96 Bestimmungen, 96 προσδιορισμοί, 96 Testes



Rispettare le istruzioni per l'uso, See instructions for use, Voir les instructions d'utilisation, Ver las instrucciones de uso, Gebrauchsanweisung beachten, Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης, Ver as instruções de uso



Da utilizzarsi entro, Use by, Utilise avant le, Utilizar antes de, Verwendbar bis, Χρήση μέχρι, Utilizar antes de



Conservare a 2-8°C, Store at 2-8°C (35-46°F), Conserver à 2-8°C, Conservar a 2-8°C, Lagerung bei 2-8°C, Φυλάσσεται στους 2-8°C, Conservar entre 2-8°C



Prodotto da, Manufactured by, Fabriqué par, Fabricado por, Hergestellt von, Κατασκευάζεται από, Fabricado por



Calibratore cut-off, Cut off Calibrator, Etalon Seuil, Calibrador de cut-off, Grenzwert Kalibrator, Οριακός ορός Αντιδραστήριο αθμονόμησης, Calibrador de cut-off



Controllo positivo, Positive Control, Contrôle Positif, Control Positivo, Positiv Kontroll, Θετικός ορός ελέγχου, Controllo positivo



Controllo negativo, Negative Control, Contrôle Négatif, Control Negativo, Negativ Kontrolle, Αρνητικός ορός ελέγχου, Controllo negativo



Calibratore, Calibrator, Etalon, Calibrador, Kalibrator, Αντιδραστήριο βαθμονόμησης, Calibrador



Recupero, Recovery, Corrélation, Recuperado, Wiederfindung, Ανάκτηση, Recuperação



Coniugato, Conjugate, Conjugé, Conjugado, Konjugat, Σύζευγμα, Conjugado,

MP

Micropiastra rivestita, Coated microtiter plate, Microplaque sensibilisée, Microplaca recubierta, Beschichtete Mikrotiterplatte, Επικαλυμμένη μικροπλάκα, Microplaca revestida

WASHB

Tampone di lavaggio, Wash buffer, Tampon de Lavage, Tampón de lavado, Waschruffer, Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, Solução de lavagem

SUB

Tampone substrato, Substrate buffer, Substrat, Tampón sustrato, Substratpuffer, Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος, Substrato

STOP

Reagente bloccante, Stop solution, Solution d'Arrêt, Solución de parada, Stopreagenz, Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης, Solução de paragem

SB

Tampone campione, Sample buffer, Tampon Echantillons, Tampón de muestra, Probenpuffer, Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, Diluente de amostra