

Bioclin

BIOLISA CMV IgG DBS

REF K274

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste imunoenzimático indireto (ELISA) para determinação quantitativa e qualitativa de Anticorpos IgG para Citomegalovírus (CMV) em amostras de **sangue seco coletadas em papel filtro (DBS)**. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático

O kit BIOLISA CMV IgG DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de detecção qualitativa e quantitativa indireta de Anticorpos IgG para CMV em amostras humanas de sangue seco coletadas em papel filtro. Anticorpos IgG Anti-CMV, presentes na amostra de sangue seco são eluidas e se ligam aos Antígenos revestidos na microplaca formando imunocomplexos Antígeno-Anticorpos IgG. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Anticorpos Anti-IgG humano conjugados à Peroxidase são adicionados à microplaca, que é então incubada. Os Anticorpos Anti-IgG humano conjugados a enzima ligam-se aos Anticorpos IgG presentes, ligados à placa revestida com Antígenos. Nova lavagem é realizada para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado produzindo uma cor azul, que indica a quantidade de Anticorpos IgG Anti-CMV presentes na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação havendo uma mudança de cor de azul para amarelo. A intensidade da cor é medida em 450/620 nm.

REAGENTES

1- Padrões Referência (A - E) - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Cinco (5) frascos (A - E) de Padrões Referência contendo Anticorpos IgG Anti-CMV em diferentes concentrações em solução de tampão contendo surfactante, estabilizantes, corante e conservante. As concentrações dos Padrões Referência (A-E) variam a cada lote. Vide rótulos dos frascos. **Potencialmente infectante.**

2- Conjugado - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, Anticorpo Anti-IgG humano ligado à Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.

3- Placa Sensibilizada - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Placa sensibilizada com antígenos de CMV purificados.

4- Lavagem Concentrada - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.

5- Substrato - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Ureia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.

6- Solução de Parada - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Ácido Clorídrico 1 M.

7- Tampão de Eluição - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.

8- Controle Negativo DBS - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Amostra não reativa para anticorpos IgG Anti-CMV impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

9- Controle Positivo DBS - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Amostra reativa para anticorpos IgG Anti-CMV impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Padrões Referência (A-E)	1 Frasco x 1 mL	1 Frasco x 1 mL	1 Frasco x 2 mL
2- Conjugado	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
4- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	1 Frasco x 100 mL	1 Frasco x 250 mL
5- Substrato	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
6- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
7- Tampão de Eluição	1 Frasco x 20 mL	1 Frasco x 40 mL	1 Frasco x 100 mL
8- Controle Negativo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades
9- Controle Positivo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior

Materiais necessários, não contidos nos kit:

- Pipetas capazes de dispensar volumes de 100 a 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).
- Lavadora de microplaca para técnica em papel filtro.
- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
- Papel absorvente para secar as microcavidades.
- Cronômetro ou relógio.
- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluição.
- Água destilada ou deionizada.
- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- Incubadora 37 °C ± 2 °C.
- Picotador de papel (diâmetro de 3 ± 0,2 mm).

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C. O transporte em temperaturas até 30 °C não deverá exceder 5 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.

3- O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8 °C.

4- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.

5- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.

6- A Solução de Parada contém Ácido Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.

7- Toda matéria-prima do produto é testada sendo não reagente para

HBsAg e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém amostra biológica é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.

8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

9- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.

10- Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.

11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.

12- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

13- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

14- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

15- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Sangue Seco coletado em papel filtro (DBS) - EDTA ou Punção

O papel filtro utilizado deve ser específico para coleta de amostras de sangue seco, a exemplo dos modelos S&S 903 e Ahlstrom 226. O laboratório deve certificar da qualidade das amostras antes da sua utilização.

Os estudos de estabilidade, realizado pelo departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Bioclin, mostram que as amostras de sangue seco em papel filtro podem ser armazenadas por até 35 dias à temperatura ambiente, 2 anos a 2-8 °C ou 2 anos a -20 °C. O Manual “Coleta de sangue: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)”⁷, relata que as amostras de sangue seco em papel filtro podem ser armazenadas à temperatura ambiente, desde que fiquem protegidas de fonte de luz solar direta e em baixa umidade. Para armazenamento de até 2 anos, as amostras devem permanecer sob refrigeração, entre 2 e 8 °C. O armazenamento por tempo superior a 2 anos deve ser realizado à temperatura de -20 °C.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA CMV IgG DBS é estável após aberto por até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco Nº 4 (Lavagem Concentrada) na proporção 1:20 de água destilada ou deionizada; por exemplo: 50 mL de solução de Lavagem Concentrada em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 °C por até 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

Todos os demais reagentes são prontos para uso.

TÉCNICA

Para uso em equipamentos automáticos, consulte ao SAC (Serviço de Assessoria de Cliente).

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 °C) por, no mínimo, 40 minutos.

1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Padrões Referência (A - E), Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel de filtro (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.

2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).

3- Adicionar um disco de 3 mm de Controle Positivo DBS, Controle Negativo

DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel filtro, previamente picotadas, nas cavidades determinadas.

4- Pipetar 100 µL dos Padrões Referência (A - E) nas cavidades previamente determinadas.

5- Pipetar 100 µL do Tampão de Eluição, inclusive na cavidade para o Branco. Não pipetar nas cavidades dos Padrões Referência (A - E).

6- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos, cobrir as cavidades com selador de placas.

7- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

8- Retirar o selador das cavidades.

9- Após incubação descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora para técnica de papel filtro). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, previamente preparada, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem com agitação (*shake*) de 5 segundos. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

Nota: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

10- Pipetar 100 µL de Conjugado em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.

11- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

12- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

13- Retirar o selador de placa das cavidades.

14- Repetir o item 9.

15- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.

16- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

17- Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

18- Retirar o selador de placa das cavidades.

19- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.

20- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

21- Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco, Controles e Padrões Referência estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Branco	< 0,100
Padrão Referência A	< 0,100
Padrão Referência B	> 0,200 e < 0,600
Padrão Referência C	> B e < D
Padrão Referência D	> C e < E
Padrão Referência E	> 1,400
Controle Negativo DBS	< 0,100
Controle Positivo DBS	> 0,500

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

CÁLCULOS

QUALITATIVO

Considerar como Cut Off a absorbância média obtida com o Padrão Referência B.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIAS
Padrão Referência B	0,412
	0,411
Cut Off = Absorbância Média do Padrão Referência B	(0,412 + 0,411 / 2 = 0,412

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Amostra	1,254
Valor de Cut-Off	0,412
Índice = Amostra / Valor de Cut-Off	1,254 / 0,412 = 3,04

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados. Cada laboratório deverá validar o cut-off conforme instrumentação utilizada e população pesquisada.

QUANTITATIVO

Uma curva de calibração é usada para determinar a concentração de anticorpos IgG para CMV em amostras desconhecidas.

Preparo da Curva de Calibração

Registrar as absorbâncias obtidas na leitora de microplaca, como apresentado no exemplo abaixo. Calcular as médias das duplicatas (caso sejam realizadas duplicatas). Plotar as absorbâncias médias de cada Padrão Referência (A-E) versus a concentração correspondente em UI/mL (descrita no rótulo) em papel milimetrado e traçar a curva.

PADRÃO REFERÊNCIA	CONCENTRAÇÃO (VIDE RÓTULO)	ABSORBÂNCIA	MÉDIA DAS DUPLICATAS
A	0,0 UI/mL	0,005	0,006
		0,006	
B	1,2 UI/mL	0,412	0,411
		0,409	
C	4,5 UI/mL	0,902	0,906
		0,910	
D	9,0 UI/mL	1,301	1,305
		1,308	
E	18,0 UI/mL	2,121	2,122
		2,123	

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Após o cálculo do índice das amostras, considerar os índices abaixo para determinação dos resultados.

RESULTADOS	QUALITATIVO	QUANTITATIVO
	ÍNDICE	CONCENTRAÇÃO
Negativo (Não Reagente)	≤ 0,8	≤ 1,2
Indeterminado	Entre 0,8 e 1,2	Entre 1,2 e 1,4
Positivo (Reagente)	≥ 1,2	≥ 1,4

Amostras com índice superior ou igual a 1,2 são consideradas como positivas, amostras com índice inferiores ou igual a 0,8 são consideradas como negativas e amostras que apresentam índice entre 0,8 e 1,2 são consideradas indeterminadas. Dessa forma, temos que a amostra citada no exemplo, cuja absorbância foi 1,254 e índice de 3,04, apresenta resultado

positivo (Índice ≥ 1,2).

O cálculo da concentração das amostras testadas também pode ser realizado utilizando programas adequados de computador, através de regressão linear.

AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (UI/mL)	RESULTADO QUANTITATIVO
1	0,125	Abaixo do limite inferior de detecção	< 1,2 UI/mL
2	2,942	Acima do limite superior de detecção	> 18,0 UI/mL
3	0,685	1,66	1,66 UI/mL

Observações: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada em duplicata. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis, antes do diagnóstico descritivo da doença. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis, antes do diagnóstico descritivo da doença.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada para as concentrações de Triglicérides 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Foi realizado um estudo com 73 amostras de sangue seco coletada em papel de filtro negativas para CMV IgG, mas positivas para outras infecções, a fim de se avaliar a possibilidade de reatividade cruzada destes interferentes no resultado do BIOLISA CMV IgG DBS. Dentre elas 7 amostras positivas para HTLV, 10 amostras positivas para Sífilis, 6 amostras positivas para HBsAg, 10 amostras positivas para HCV, 7 amostras positivas para Doença de Chagas, 6 amostras positivas para Zika, 10 amostras positivas para Toxoplasmose, 10 amostras positivas para Rubéola e 7 amostras positivas para HIV. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para HTLV, Sífilis, HBsAg, HCV, Doença de Chagas, Zika, Toxoplasmose, Rubéola e HIV. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnóstico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

DESEMPENHO DO PRODUTO

PRECISÃO

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Repetibilidade	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	2,422	1,151	0,119
Desvio Padrão	0,100	0,059	0,011
Coefficiente de Variação (%)	4,123	5,101	8,931

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Reprodutibilidade	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	2,441	1,159	0,119
Desvio Padrão	0,075	0,040	0,010
Coefficiente de Variação (%)	3,051	3,441	8,556

Considerando a variação de todas as amostras testadas no estudo de precisão, foi observado que o kit apresentou um coeficiente de variação inferior a 20%.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit BIOLISA CMV IgG DBS é 0,08 UI/mL.

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O kit BIOLISA CMV IgG DBS foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzaimunoensaio de referência. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA CMV IgG DBS é 98,5% e a especificidade clínica é 98,0%.

BIOLISA CMV IgG DBS	REFERÊNCIA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	65	1	66
Negativo	1	49	50
Total	66	50	116

Sensibilidade Clínica: 98,5% (65/66) - IC 95% (91,8 a 99,9%)

Especificidade Clínica: 98,0% (49/50) - IC 95% (89,4 a 99,9%)

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Citomegalovirus (CMV) é um membro da família do Herpes Vírus que inclui os vírus Herpes Simplex (HSV) 1 e 2, vírus da Varicela Zoster (VZV) e o vírus Epstein-Barr (EBV). É um patógeno humano transmitido através da saliva, contato sexual, perinatal, transplante de órgão ou transfusão de sangue. Na maioria dos casos, a infecção permanece assintomática. No entanto, a infecção pelo CMV pode causar doenças graves em recém-nascidos e indivíduos imunodeprimidos, como pacientes com AIDS, câncer ou de pacientes que receberam transplante de órgãos. Durante a terapia imunossupressora, frequentemente ocorre uma reativação do vírus latente ou infecção primária. As infecções por CMV podem ser adquiridas antes do nascimento, durante o parto e mais tarde na vida. Podendo causar graves anomalias congênitas, tais como microcefalia, deficiência motora e retardamento mental. Portanto, a determinação primária de infecção materna e sua distinção da infecção latente são de grande importância. A presença de anticorpos IgM indica a presença de infecção primária, enquanto a presença de anticorpos IgG indica o estado imunológico dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hodinka, RL, and Friedman, HM. Human Cytomegalovirus. In: Manual of Clinical Microbiology 6th Edition (1995) 884-894.
- Hanshaw, JB, Scheiner, AP, Moxley, AW, Gaev, L, Abel, V, and Scheiner, B. School Failure and Deafness after "Silent" Congenital Cytomegalovirus Infection. N. Engl. J. Med. (1976) 295:468-470.
- Reynolds, DW, Stagno, S, Stubbs, KG, Dabte, AJ, Livingston, NM, Saxon, SS, Alford, CA. Inapparent Congenital Cytomegalovirus. N. Engl. J. Med. (1974) 790:291-296.
- Stern, H. Cytomegalovirus Vaccine: Justification and Problems. In: Waterson AP (ed.) Recent Advances in Clinical Virology (1977) 117-134.

5. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.

6. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR

7. Coleta de sangue: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)

8. Bioclin – Dados de arquivos

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

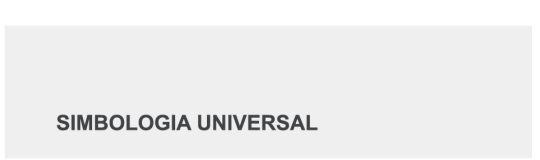
Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do kit BIOLISA CMV IgG DBS na ANVISA: 10269360460

Revisão: Março/2025



	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N>- TESTE		INFLAMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZAR		PRODUTO ESTERILIZADO
	CUIDADO		PERIGO

BIOLISA CMV IgG DBS

REF **K274**

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto para la determinación cuantitativa y cualitativa de anticuerpos IgG contra citomegalovirus (CMV) en **muestras de sangre seca recogidas en papel de filtro (DBS)**. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimaimunoensayo o inmunoenzimático
El kit BIOLISA CMV IgG DBS es un enzimoimmunoensayo en fase sólida basado en el principio de detección indirecta cualitativa y cuantitativa de anticuerpos IgG frente al CMV en muestras de sangre humana desecada recogidas en papel de filtro. Los anticuerpos IgG anti-CMV presentes en la muestra de sangre seca se eluyen y se unen a los antígenos recubiertos en la microplaca formando inmunocomplejos antígeno-anticuerpo IgG. Tras la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Los Anticuerpos Anti-IgG Humanos conjugados con Peroxidasa se añaden a la microplaca, que se incuba a continuación. Los anticuerpos anti-IgG humanos conjugados con enzimas se unen a los anticuerpos IgG presentes en la placa recubierta de antígeno. Se realiza un nuevo lavado para eliminar cualquier exceso. Después de este paso, se añade el Substrato y se incuba, produciendo un color azul, que indica la cantidad de Anticuerpos IgG Anti-CMV presentes en la muestra. Se añade la Solución de Parada para detener la reacción y el color cambia de azul a amarillo. La intensidad del color se mide a 450/620 nm..

REACTIVOS

1- Estándares de Referencia (A - E) - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Cinco (5) viales (A - E) de Estándares de Referencia que contienen Anticuerpos IgG Anti-CMV en diferentes concentraciones en una solución tampón que contiene surfactante, estabilizadores, colorante y conservante. Las concentraciones de los Estándares de Referencia (A-E) varían con cada lote. Véanse las etiquetas de los frascos. **Potencialmente infeccioso.**
2- Conjugado - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón, Anticuerpo Anti-IgG Humano ligado a Peroxidasa, tensioactivo, estabilizantes, colorante y conservante.

3- Placa sensibilizada - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Placa sensibilizada con antígenos CMV purificados.

4- Lavado concentrado - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloruro de Potasio < 100 mmol/L, Cloruro de Sodio < 5 mol/L), tensioactivo y conservante.

5- Substrato - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón que contiene peróxido de urea, tetrametilbencidina (TMB) y conservante.

6- Solución de parada - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Ácido Clorhídrico 1 M.

7- Tampón de Elución - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón, tensioactivo, estabilizante y conservante.

8- Control Negativo DBS - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Muestra no reactiva para anticuerpos IgG Anti-CMV impregnada en papel de filtro.

Potencialmente infeccioso.

9- Control Positivo DBS - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Muestra reactiva para anticuerpos IgG Anti-CMV impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**

PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Estándares de Referencia (A-E)	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 2 mL
2- Conjugado	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidad	2 Unidades	5 Unidades
4- Lavado Concentrado	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
5- Substrato	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
7- Tampón de Elución	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
8- Control Negativo DBS	1 Unidad	2 Unidades	3 Unidades
9- Control Positivo DBS	1 Unidad	2 Unidades	3 Unidades

EQUIPOS E INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el cuadro anterior

Materiales necesarios, no contenidos en los kit:

- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 100 a 500 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
- Repipetador para el pipeteado repetitivo de volúmenes de 300 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
- Lavador de microplacas para técnica de papel de filtro.
- Lector ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 630 nm de longitud de onda.
- Papel absorbente para secar las microcavidades.
- Cronómetro o reloj.
- Botella para almacenar la solución de lavado después de la dilución.
- Agua destilada o desionizada.
- Instrumentos de control de calidad.
- Incubadora 37 °C ± 2 °C.
- Picadora de papel (diámetro 3 ± 0,2 mm).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento debe oscilar entre 2 y 8 °C. El transporte a temperaturas de hasta 30 °C no debe superar los 5 días. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

1- Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.

2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.

3- El sobre que contiene la microplaca sólo debe abrirse cuando haya alcanzado la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de microcavidades no utilizadas en el sobre, ciérrelo y consérvelo entre 2 y 8 °C.

4- El agua utilizada para limpiar el material debe ser fresca y libre de contaminantes.

5- Las columnas desionizadoras saturadas liberan agua alcalina, varios iones, agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.

6- La solución de parada contiene ácido clorhídrico, que es un ácido fuerte.

Por lo tanto, manipúlela con el debido cuidado.

7- Todas las materias primas del producto están testadas como no reactivas para HBSAg, anti-HIV y Anti-HCV. Sin embargo, estas pruebas no garantizan completamente la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga una muestra biológica es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, deben tomarse precauciones de bioseguridad al manipular estos productos.

8- Pipetear siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.

9- Como medida de protección, cubra la placa durante la reacción.

10- Asegúrese de que el fondo de la cavidad está limpio y seco y de que no hay burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante la prueba.

11- No exponer los reactivos, especialmente el Substrato, a luz fuerte o vapores de hipoclorito durante las etapas de almacenamiento o incubación.

12- Recomendamos aplicar las normas locales, estatales y federales de protección del medio ambiente para que los reactivos y el material biológico sean eliminados de acuerdo con la legislación vigente.

13- Para información sobre bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consulte la FDS (Ficha de Datos de Seguridad) disponible en www.bioclin.com.br o contactando con el Centro de Atención al Cliente de Quibasa.

14- No utilice el producto si el embalaje está dañado.

15- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y se sometan a un mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Sangre seca recogida en papel de filtro (DBS) - EDTA o Punción

El papel de filtro utilizado debe ser específico para la recogida de muestras de sangre seca, como los modelos S&S 903 y Ahlstrom 226. El laboratorio debe comprobar la calidad de las muestras antes de su utilización. Los estudios de estabilidad realizados por el departamento de Investigación y Desarrollo de Bioclin demuestran que las muestras de sangre seca en papel de filtro pueden conservarse hasta 35 días a temperatura ambiente, 2 años a 2-8 °C o 2 años a -20 °C. El Manual "Coleta de sangre: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)"¹⁰, informa que las muestras de sangre seca en papel de filtro pueden almacenarse a temperatura ambiente, siempre que estén protegidas de la luz solar directa y en condiciones de baja humedad. Para un almacenamiento de hasta 2 años, las muestras deben conservarse refrigeradas entre 2 y 8 °C. El almacenamiento durante más de 2 años debe realizarse a -20 °C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de la Apertura

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit BIOLISA CMV IgG DBS es estable tras su apertura durante un máximo de 30 días. Esta estabilidad puede variar dependiendo de las condiciones de la prueba y del ambiente. Por lo tanto, se sugiere monitorizar el rendimiento del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado

Diluir el contenido del frasco nº 4 (Lavado Concentrado) en una proporción de 1:20 de agua destilada o desionizada; por ejemplo: 50 mL de solución de Lavado Concentrado en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Después de la preparación, la solución puede almacenarse entre 2 y 30 °C durante un máximo de 30 días. Si se produce cristalización, calentar a 37 °C hasta que se disuelva.

Todos los demás reactivos están listos para usar

TÉCNICA

Para su uso en equipos automáticos, póngase en contacto con nuestro Servicio de Atención al Cliente.

Antes de iniciar el ensayo, dejar estabilizar todos los reactivos, muestras y controles a temperatura ambiente (15 - 30 °C) durante al menos 40 minutos.

1- Separar los pocillos a utilizar considerando: Estándares de Referencia (A - E), Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recogidas en papel de filtro (se recomienda realizar el test

por duplicado). Devolver las tiras de microplaca no utilizadas a su envase original precintado.

2- Separar el primer pocillo para el blanco (OPCIONAL).

3- Añadir un disco de 3 mm de DBS Control Positivo, DBS Control Negativo y muestras de sangre seca recogidas en papel de filtro, previamente picadas, en los pocillos determinados.

4- Pipetear 100 µL de Estándares de Referencia (A - E) en los pocillos previamente determinados.

5- Pipetear 100 µL de Tampón de Elución, **incluso** en el pocillo de Blanco. **No pipetee** en los pocillos de Estándares de Referencia (A - E).

6- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir los pocillos con un sellador de placas.

7- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.

8- Retirar el sellador de los pocillos.

9- Después de la incubación, desechar el contenido de los pocillos por aspiración (arandela para técnica de papel de filtro). Utilizar aproximadamente 300 µL de solución de lavado **previamente preparada** y realizar un total de cinco (5) ciclos de lavado con una agitación de 5 segundos. Para asegurarse de que la placa está seca, al final del lavado, golpee la placa durante unos segundos sobre papel absorbente.

Nota: Un lavado/secado deficiente puede causar resultados inadecuados.

10- Pipetear 100 µL de Conjugado en todos los pocillos, **incluido** el pocillo blanco.

11- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubrir los pocillos con el sellador de placas.

12- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.

13- Retirar el sellador de placas de los pocillos.

14- Repita el punto 9.

15- Pipetear 100 µL de sustrato en todos los pocillos, **incluido** el pocillo en blanco.

16- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubrir los pocillos con el sellador de placas.

17- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.

18- Retirar el sellador de placas de los pocillos.

19- Pipetear 100 µL de solución de parada en todos los pocillos.

20- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.

21- Leer utilizando un filtro doble: 450 nm / 630 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Compruebe que los resultados obtenidos para lo Blanco, Controles y los Estándares de Referencia son compatibles con los valores que se muestran a continuación:

ITEM	ABSORBANCE
Blanco	< 0,100
Estándar de Referencia A	< 0,100
Estándar de Referencia B	> 0,200 y < 0,600
Estándar de Referencia C	> B y < D
Estándar de Referencia D	> C y < E
Estándar de Referencia E	> 1,400
Control Negativo DBS (R8)	< 0,100
Control Positivo DBS (R9)	> 0,500

Si los valores están fuera de los esperados, debe repetirse la técnica.

CÁLCULOS

CUALITATIVO

Considere la absorbancia media obtenida con el Estándar de Referencia B como el Cut Off.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIAS
Estándar de Referencia B	0,412
	0,411
Cut Off = Absorbancia Média del Estándar de Referencia B	$(0,412 + 0,411) / 2 = 0,412$

Calcular el Índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	1,254
Valor de Cut-Off	0,412
Índice = Muestra / Valor de Cut-Off	$1,254 / 0,412 = 3,04$

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son meramente ilustrativos y no pueden utilizarse para calcular resultados. Cada laboratorio debe validar el punto de corte en función de la instrumentación utilizada y de la población encuestada.

CUANTITATIVO

Se utiliza una curva de calibración para determinar la concentración de anticuerpos CMV IgG en muestras desconocidas.

Preparación de la Curva de Calibración

Registrar las absorbancias obtenidas en el lector de microplacas, como se muestra en el ejemplo abajo. Calcular las medias de los duplicados (si se hacen duplicados). Trazar las absorbancias medias de cada estándar de referencia (A-E) frente a la concentración correspondiente en UI/mL (descrita en la etiqueta) en papel milimetrado y para dibujar la curva.

ESTÁNDAR DE REFERENCIA	CONCENTRACIÓN (VIDE RÓTULO)	ABSORBANCIA	PROMEDIO DE DUPLICADOS
A	0,0 UI/mL	0,005	0,006
		0,006	
B	1,2 UI/mL	0,412	0,411
		0,409	
C	4,5 UI/mL	0,902	0,906
		0,910	
D	9,0 UI/mL	1,301	1,305
		1,308	
E	18,0 UI/mL	2,121	2,122
		2,123	

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Después del cálculo del índice de las muestras, considerar los índices abajo para la determinación de los resultados.

RESULTADOS	CUALITATIVO	CUANTITATIVO
	ÍNDICE	CONCENTRACIÓN
Negativo (No Reactivo)	$\leq 0,8$	$\leq 1,2$
Indeterminado	Entre 0,8 y 1,2	Entre 1,2 y 1,4
Positivo (Reactivo)	$\geq 1,2$	$\geq 1,4$

Las muestras con un índice mayor o igual a 1,2 se consideran positivas, las muestras con un índice menor o igual a 0,8 se consideran negativas y las muestras con un índice entre 0,8 y 1,2 se consideran indeterminadas. Así,

la muestra citada en el ejemplo, cuya absorbancia era de 1,254 y el índice de 3,04, muestra un resultado positivo (Índice $\geq 1,2$).

La concentración de las muestras analizadas también puede calcularse mediante programas informáticos adecuados, utilizando la regresión lineal.

MUESTRA	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN CALCULADA (UI/mL)	RESULTADO CUALITATIVO
1	0,125	Por debajo del límite inferior de detección	< 1,2 UI/mL
2	2,942	Por encima del límite superior de detección	> 18,0 UI/mL
3	0,685	1,66	1,66 UI/mL

Observaciones: En caso de resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse por duplicado. Las muestras que obtengan repetidamente resultados indeterminados deberán volver a analizarse utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, deberá tomarse una nueva muestra en un plazo de dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra tomada. Todos los resultados deben interpretarse en conjunción con el resto de información clínica disponible antes de poder realizar un diagnóstico descriptivo de la enfermedad. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable y no son el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en una sola prueba. Deben incluirse otras pruebas de confirmación antes de considerar positiva una muestra. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse en conjunción con otra información clínica disponible antes de poder realizar un diagnóstico descriptivo de la enfermedad.

INTEFERENTES

No se observaron interferencias en las concentraciones de triglicéridos 1200 mg/dL, ácido acetilsalicílico 20 mg/dL, ácido ascórbico 2 g/dL, creatina 200 mg/dL, bilirrubina 1 g/dL, albúmina 10 g/dL, hemoglobina 1000 mg/dL, ácido oxálico 60 mg/dL, factor reumatoide 980 UI/mL, proteína C reactiva 41,2 mg/dL y antiestreptolisina O 1023 UI/mL.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio con 73 muestras de sangre seca recogidas en papel de filtro que eran negativas para CMV IgG pero positivas para otras infecciones, con el fin de evaluar la posibilidad de reactividad cruzada de estos interferentes en el resultado de BIOLISA CMV IgG DBS. Estas incluían 7 muestras positivas para HTLV, 10 muestras positivas para Sifilis, 6 muestras positivas para HBsAg, 10 muestras positivas para HCV, 7 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 6 muestras positivas para Zika, 10 muestras positivas para Toxoplasmosis, 10 muestras positivas para Rubéola y 7 muestras positivas para HIV. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para HTLV, Sifilis, HBsAg, HCV, Enfermedad de Chagas, Zika, Toxoplasmosis, Rubéola y HIV. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar completamente la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe tener en cuenta los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El laboratorio clínico debe disponer de un programa interno de control de calidad, en el que se establezcan claramente los procedimientos, las normas, los límites y la tolerancia a las variaciones. Es importante destacar que todos los sistemas de medición tienen una variabilidad analítica característica, que debe ser controlada por los propios laboratorios. Para ello, es aconsejable utilizar controles para evaluar la precisión y exactitud de las dosis.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

PRECISIÓN

Repetibilidad

La repetibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

Repetibilidad	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	2,422	1,151	0,119
Desvío Patrón	0,100	0,059	0,011
Coefficiente de Variación (%)	4,123	5,101	8,931

Reproductibilidad

La reproductibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

Reproductibilidad	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	2,441	1,159	0,119
Desvío Patrón	0,075	0,040	0,010
Coefficiente de Variación (%)	3,051	3,441	8,556

Considerando la variación de todas las muestras analizadas en el estudio de precisión, se observó que el kit tenía un coeficiente de variación inferior al 20%.

Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica del kit BIOLISA CMV IgG DBS es de 0,08 UI/mL.

Sensibilidad e Especificidad Clínica

El kit BIOLISA CMV IgG DBS se utilizó para analizar muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas mediante otro método de inmunoensayo enzimático de referencia. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA CMV IgG DBS es del 98,5% y la especificidad clínica del 98,0%.

BIOLISA CMV IgG DBS	REFERENCIA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	65	1	66
Negativo	1	49	50
Total	66	50	116

Sensibilidad Clínica: 98,5% (65/66) - IC 95% (91,8 a 99,9%)

Especificidad Clínica: 98,0% (49/50) - IC 95% (89,4 a 99,9%)

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

El citomegalovirus (CMV) es un miembro de la familia de los virus del herpes que incluye el virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, el virus de la varicela zóster (VVZ) y el virus de Epstein-Barr (VEB). Es un patógeno humano que se transmite a través de la saliva, el contacto sexual, los cuidados perinatales, los trasplantes de órganos o las transfusiones de sangre. En la mayoría de los casos, la infección permanece asintomática. Sin embargo, la infección por CMV puede causar enfermedades graves en recién nacidos e individuos inmunodeprimidos, como pacientes con SIDA, cáncer o que han recibido trasplantes de órganos. Durante la terapia inmunosupresora, suele producirse una reactivación del virus latente o de la infección primaria. Las infecciones por CMV pueden adquirirse antes del nacimiento, durante el parto y más adelante en la vida. Pueden causar anomalías congénitas graves como microcefalia, discapacidad motora y retraso mental. Por lo tanto, la determinación primaria de la infección materna y su distinción de la infección latente son de gran importancia. La presencia de anticuerpos IgM indica la presencia de infección primaria, mientras que la presencia de anticuerpos IgG indica el estado inmunológico de los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hodinka, RL, and Friedman, HM. Human Cytomegalovirus. In: Manual of Clinical Microbiology 6th Edition (1995) 884-894.
- Hanshaw, JB, Scheiner, AP, Moxley, AW, Gaev, L, Abel, V, and Scheiner, B. School Failure and Deafness after "Silent" Congenital Cytomegalovirus Infection. N. Engl. J. Med. (1976) 295:468-470.
- Reynolds, DW, Stagno, S, Stubbs, KG, Dabte, AJ, Livingston, NM, Saxon, SS, Alford, CA. Inapparent Congenital Cytomegalovirus. N. Engl. J. Med. (1974) 790:291-296.
- Stern, H. Cytomegalovirus Vaccine: Justification and Problems. In: Waterson AP (ed.) Recent Advances in Clinical Virology (1977) 117-134.

5. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.

6. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337-44.2017 AACR

7. Coleta de sangue: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)

8. Bioclin – Dados del archivos.

GARANTÍA DE CALIDAD

ANTES de ser liberado para el consumo, todos los reactivos Bioclin son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validez mencionada en el embalaje de presentación, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
 Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
 CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
 Tel.: +55 (31) 3439-5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
 CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileira

ATENCIÓN AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente
 Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro del kit BIOLISA CMV IgG DBS en la ANVISA:
 10269360460

Revisión: Marzo/2025



NUMERO DE CATALOGO



FABRICADO POR



NUMERO DE LOTE



CONTROLAR



FECHA DE FABRICACION



CONTROL POSITIVO



FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)



CONTROL NEGATIVO



LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)



RIESGO BIOLÓGICO



EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA



INFLAMABLE



VER INSTRUCCIONES DE USO



CORROSIVO



PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO



TOXICO



PROTEGER DE LUZ Y CALOR



NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA



NO REUTILIZA



PRODUCTO ESTERILIZADO



PRECAUCIÓN



PELIGRO

BIOLISA CMV IgG DBS

REF K274

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative and qualitative determination of cytomegalovirus (CMV) IgG antibodies in **dried blood samples collected on filter paper (DBS)**. For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic
The BIOLISA CMV IgG DBS kit is a solid-phase immunoassay based on the principle of indirect qualitative and quantitative detection of IgG antibodies to CMV in dried human blood samples collected on filter paper. Anti-CMV IgG antibodies present in the dried blood sample are eluted and bind to the Antigens coated on the microplate forming Antigen-IgG Antibody immunocomplexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Peroxidase-conjugated Human Anti-IgG Antibodies are added to the microplate, which is then incubated. The enzyme-conjugated Human Anti-IgG Antibodies bind to the IgG Antibodies present on the Antigen-coated plate. Another wash is carried out to remove any excess. After this step, the Substrate is added and incubated, producing a blue color, which indicates the amount of Anti-CMV IgG Antibodies present in the sample. The Stop Solution is added to stop the reaction and the color changes from blue to yellow. The intensity of the color is measured at 450/620 nm.

REAGENTS

1- Reference Standards (A - E) - Store between 2 and 8°C. Contains: Five (5) vials (A - E) of Reference Standards containing Anti-CMV IgG Antibodies in different concentrations in a buffer solution containing surfactant, stabilizers, dye and preservative. The concentrations of the Reference Standards (A-E) vary with each batch. See bottle labels. **Potentially infectious.**

2- Conjugate - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, Peroxidase-linked Human Anti-IgG Antibody, surfactant, stabilizers, dye and preservative.

3- Sensitized plate - Store between 2 and 8°C. Contains: Sensitized plate with purified CMV antigens.

4- Concentrated Wash - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.

5- Substrate - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.

6- Stop Solution - Store between 2 and 8°C. Contains: 1 M Hydrochloric Acid.

7- Elution Buffer - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, surfactant, stabilizer and preservative.

8- DBS Negative Control - Store between 2 and 8°C. Contains: Non-reactive sample for IgG Anti-CMV antibodies impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**

9- DBS Positive Control - Store between 2 and 8°C. Contains: Reactive sample for IgG Anti-CMV antibodies impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**

PRESENTATION

REAGENTS	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Reference Standards (A-E)	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 2 mL
2- Conjugate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Sensitized Plate	1 Unit	2 Units	5 Units
4- Concentrated Wash	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
5- Substrate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6- Stop Solution	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
7- Elution Buffer	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
8- DBS Negative Control	1 Unit	2 Units	3 Units
9- DBS Positive Control	1 Unit	2 Units	3 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials in the kit:

- Reagents described in the above table

Required materials not contained in the kit:

- Pipettes capable of dispensing volumes from 100 to 500 µL with a coefficient of variation of less than 1.5%.
- Repipettor for repetitive pipetting of volumes of 300 µL with a coefficient of variation of less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- Microplate washer for filter paper technique.
- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm wavelength.
- Absorbent paper to dry the microcavities.
- Stopwatch or clock.
- Bottle to store the washing solution after dilution.
- Distilled or deionized water.
- Quality control tools.
- Incubator 37 °C ± 2 °C.
- Paper mincer (diameter 3 ± 0.2 mm).

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The storage temperature should be between 2 and 8 °C. Transportation at temperatures up to 30 °C should not exceed 5 days. Keep away from light and avoid moisture. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE

1- For *in vitro* diagnostic use only.

2- Strictly follow the proposed methodology in order to obtain accurate results.

3- The sachet containing the microplate should only be opened after it has reached room temperature. Replace the unused microcavity strips in the sachet, seal and store between 2 and 8 °C.

4- The water used to clean the material must be fresh and free of contaminants.

5- Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, oxidizing and reducing agents which can significantly alter the results.

6- The Stop Solution contains hydrochloric acid, which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.

7- All the product's raw materials are tested as non-reactive for HBsAg, anti-HIV and Anti-HCV. However, these tests do not provide complete assurance

TO OBTAIN THE INSTRUCTIONS FOR USE IN PRINTED FORMAT, AT NO ADDITIONAL COST, CONTACT CUSTOMER ADVISORY SERVICE:

SAC: +55 (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

of the absence of infectious agents. The handling of any product containing a biological sample is potentially capable of transmitting diseases. Biosafety precautions must therefore be taken when handling these products.

8- Always pipette the reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between the microcavities.

9- As a protective measure, cover the plate during the reaction.

10- Ensure that the bottom of the cavity is clean and dry and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the test.

11- Do not expose reagents, especially the Substrate, to strong light or hypochlorite vapors during storage or incubation steps.

12- We recommend applying local, state and federal environmental protection regulations so that reagents and biological material are disposed of in accordance with current legislation.

13- For information related to biosafety or in the event of accidents with the product, consult the SDS (Safety Data Sheet) available at www.bioclin.com.br or by contacting Quibasa's Customer Service Center.

14- Do not use the product if the packaging is damaged.

15- It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and undergo periodic maintenance.

SAMPLES

Dried blood collected on filter paper (DBS) - EDTA or Puncture

The filter paper used must be specific for collecting dried blood samples, such as the S&S 903 and Ahlstrom 226 models. The laboratory must check the quality of the samples before use. Stability studies carried out by Bioclin's Research and Development department show that dried blood samples on filter paper can be stored for up to 35 days at room temperature, 2 years at 2-8 °C or 2 years at -20°C. The Manual "Coleta de sangue: Diagnóstico e Monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)"¹⁰, reports that dried blood samples on filter paper can be stored at room temperature, as long as they are protected from direct sunlight and in low humidity. For storage of up to 2 years, samples should be kept refrigerated between 2 and 8 °C. Storage for longer than 2 years should be at -20 °C.

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Opening

The results of the stability test show that the BIOLISA CMV IgG DBS kit is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary according to the test conditions and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the product's performance using the kit's internal controls and the technique's validation criteria.

PREPARATION OF WORKING REAGENT

Washing Solution

Dilute the contents of vial No. 4 (Concentrated Wash) in a 1:20 ratio of distilled or deionized water; for example: 50 mL of Concentrated Wash solution in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored between 2 and 30 °C for up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolved.

All other reagents are ready for use.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult the Customer Service Department (SAC).

Before starting the test, leave all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 - 30 °C) for at least 40 minutes.

1- Separate the wells to be used considering: Reference Standards (A - E), DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood samples collected on filter paper (it is recommended to test in duplicate). Return the unused microplate strips to their original sealed packaging.

2- Separate the first well for the blank (OPTIONAL).

3- Add a 3 mm disk of DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood samples collected on filter paper, previously minced, to the determined wells.

4- Pipette 100 µL of Reference Standards (A - E) into the previously determined wells.

5- Pipette 100 µL of Elution Buffer, **including** into the Blank well. **Do not**

pipette into the Reference Standards (A - E) wells.

6- Homogenize gently for ± 30 seconds, cover the wells with a plate sealer.

7- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.

8- Remove the sealer from the wells.

9- After incubation, discard the contents of the wells by aspiration (washer for filter paper technique). Use approximately 300 µL of **previously prepared** washing solution and carry out a total of five (5) washing cycles with a 5-second shake. To ensure that the plate is dry, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.

Note: Poor washing/drying can cause inadequate results.

10- Pipette 100 µL of Conjugate into all the wells, **including** the blank well.

11- Homogenize gently for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.

12- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.

13- Remove the plate sealer from the wells.

14- Repeat item 9.

15- Pipette 100 µL of Substrate into all wells, **including** the blank well.

16- Homogenize gently for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.

17- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.

18- Remove the plate sealer from the wells.

19- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.

20- Homogenize gently for ± 30 seconds.

21- Read using a double filter: 450 nm / 630 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Check that the results obtained for the Blank, Controls and Reference Standards are compatible with the values shown below:

ITEM	ABSORBANCE
Blank	< 0.100
Reference Standard A	< 0.100
Reference Standard B	> 0.200 and < 0.600
Reference Standard C	> B and < D
Reference Standard D	> C and < E
Reference Standard E	> 1.400
DBS Negative Control	< 0.100
DBS Positive Control	> 0.500

If the values are outside the expected values, the technique should be repeated.

CALCULATIONS

QUALITATIVE

Consider the average absorbance obtained with Reference Standard B as the Cut Off.

Example:

ITEM	ABSORBANCE
Reference Standard B	0.412
	0.411
Cut Off = Average Absorbance of Reference Standard B	$(0.412 + 0.411) / 2 + 0.200 = 0.412$

Calculate the Index by dividing the absorbance of the sample by the Cut Off value.

Example:

ITEM	ABSORBANCIA
Sample	1.254
Cut-Off Value	0.412
Index = Sample / Cut-Off Value	$1.254 / 0.412 = 3.04$

Note: The data presented in the examples is for illustrative purposes only and cannot be used to calculate results. Each laboratory must validate the cut-off according to the instrumentation used and the population surveyed.

QUANTITATIVE

A calibration curve is used to determine the concentration of CMV IgG antibodies in unknown samples.

Preparation of the Calibration Curve

Record the absorbances obtained on the microplate reader, as shown in example below. Calculate the averages of the duplicates (if duplicates are made). Plot the average absorbances of each Reference Standard (A-E) versus the corresponding Concentration in IU/mL (described on the label) on graph paper and draw the curve.

REFERENCE STANDARD	CONCENTRATION (SEE LABEL)	ABSORBANCE	DUPLICATES AVERAGE
A	0.0 IU/mL	0.005	0.006
		0.006	
B	1.2 IU/mL	0.412	0.411
		0.409	
C	4.5 IU/mL	0.902	0.906
		0.910	
D	9.0 IU/mL	1.301	1.305
		1.308	
E	18.0 IU/mL	2.121	2.122
		2.123	

INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the sample index, consider the indexes below to determine the results.

RESULTS	QUALITATIVE	QUANTITATIVE
	INDEX	CONCENTRATION
Negative (Non Reactive)	$\leq 0,8$	$\leq 1,2$
Indeterminate	Between 0,8 and 1,2	Between 1,2 and 1,4
Positive (Reactive)	$\geq 1,2$	$\geq 1,4$

Samples with an index greater than or equal to 1.2 are considered positive, samples with an index less than or equal to 0.8 are considered negative and samples with an index between 0.8 and 1.2 are considered indeterminate.

Thus, the sample cited in the example, whose absorbance was 1.254 and index 3.04, shows a positive result (index ≥ 1.2).

The concentration of the samples tested can also be calculated using suitable computer programs, using linear regression.

SAMPLE	ABSORBANCE	CALCULATED CONCENTRATION (UI/mL)	QUANTITATIVE RESULT
1	0.125	Below the lower limit of detection	< 1,2 UI/mL
2	2.942	Above the upper limit of detection	> 18,0 UI/mL
3	0.685	1,66	1,66 UI/mL

Observations: In the event of an indeterminate result, the sample must be retested in duplicate. Samples with repeatedly indeterminate results should be retested using an alternative method. If the results remain indeterminate, a new sample should be taken within two weeks. The result of the last sample taken should prevail. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information before a descriptive diagnosis of the disease can be made. A negative result does not exclude the possibility of exposure. The results provided by this kit must be interpreted by the medical professional responsible and are not the sole criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

LIMITATIONS OF THE PROCESS

The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single test. Other confirmatory tests should be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information before a descriptive diagnosis of the disease can be made.

INTERFERENTS

No interference was observed for the concentrations of Triglycerides 1200 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 10 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Rheumatoid Factor 980 IU/mL, C-Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 IU/mL.

CROSS-REACTIVITY

A study was carried out with 73 dried blood samples collected on filter paper that were negative for CMV IgG but positive for other infections, in order to assess the possibility of cross-reactivity of these interferents in the BIOLISA CMV IgG DBS result. These included 7 samples positive for HTLV, 10 samples positive for Syphilis, 6 samples positive for HBsAg, 10 samples positive for HCV, 7 samples positive for Chagas Disease, 6 samples positive for Zika, 10 samples positive for Toxoplasmosis, 10 samples positive for Rubella and 7 samples positive for HIV. No cross-reactivity was observed with samples positive for HTLV, Syphilis, HBsAg, HCV, Chagas Disease, Zika, Toxoplasmosis, Rubella and HIV. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis must take into account the patient's clinical data together with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to note that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. To this end, it is advisable to use controls to assess the precision and accuracy of dosages.

PRODUCT PERFORMANCE

PRECISION

Repeatability

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Repeatability	SAMPLE		
	1	2	3
Average	2.422	1.151	0.119
Standard Deviation	0.100	0.059	0.011
Coefficient of Variation (%)	4.123	5.101	8.931

Reproducibility

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Reproducibility	SAMPLE		
	1	2	3
Average	2.441	1.159	0.119
Standard Deviation	0.075	0.040	0.010
Coefficient of Variation (%)	3.051	3.441	8.556

Considering the variation of all samples tested in the precision study, it was observed that the kit presented a coefficient of variation of less than 20%.

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the BIOLISA CMV IgG DBS kit is 0.08 IU/mL.

Clinical Sensitivity and Specificity

The BIOLISA CMV IgG DBS kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed using another reference enzyme immunoassay method. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA CMV IgG DBS kit is 98.5% and the clinical specificity is 98.0%.

BIOLISA CMV IgG DBS	REFERENCE		
	Positive	Negative	Total
Positive	65	1	66
Negative	1	49	50
Total	66	50	116

Clinical Sensitivity: 98.5% (65/66) - IC 95% (91.8 a 99.9%)

Clinical Specificity: 98.0% (49/50) - IC 95% (89.4 a 99.9%)

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Cytomegalovirus (CMV) is a member of the herpesvirus family that includes herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, varicella zoster virus (VZV) and Epstein-Barr virus (EBV). It is a human pathogen that is transmitted through saliva, sexual contact, perinatal care, organ transplants or blood transfusions. In most cases, the infection remains asymptomatic. However, CMV infection can cause severe disease in newborns and immunosuppressed individuals, such as patients with AIDS, cancer or who have received organ transplants. During immunosuppressive therapy, reactivation of latent virus or primary infection often occurs. CMV infections can be acquired before birth, during delivery and later in life. They can cause severe congenital anomalies such as microcephaly, motor disability and mental retardation. Therefore, primary determination of maternal infection and its distinction from latent infection are of great importance. The presence of IgM antibodies indicates the presence of primary infection, while the presence of IgG antibodies indicates the immune status of the patients.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Hodinka, RL, and Friedman, HM. Human Cytomegalovirus. In: Manual of Clinical Microbiology 6th Edition (1995) 884-894.
- Hanshaw, JB, Scheiner, AP, Moxley, AW, Gaev, L, Abel, V, and Scheiner, B. School Failure and Deafness after "Silent" Congenital Cytomegalovirus Infection. N. Engl. J. Med. (1976) 295:468-470.
- Reynolds, DW, Stagno, S, Stubbs, KG, Dabte, AJ, Livingston, NM, Saxon, SS, Alford, CA. Inapparent Congenital Cytomegalovirus. N. Engl. J. Med. (1974) 790:291-296.
- Stern, H. Cytomegalovirus Vaccine: Justification and Problems. In: Waterson AP (ed.) Recent Advances in Clinical Virology (1977) 117-134.
- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2,

2002:31.

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337-44.2017 AACR
- Coleta de sangue: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB).
- Bioclin – Archive Data.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** reagents are tested by the Department of Quality Control. The quality of reagents is assured until expiration date stated on the presentation packaging, when stored and transported under appropriate conditions.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Phone: +55 (31) 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service
Phone.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for CMV IgG DBS kit: 10269360460

Review: March/2025

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR <N> TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER