

BIOLISA CMV IgM DBS

REF **K273**

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste imunoenzimático captura (ELISA) para determinação de anticorpos da classe IgM anti-Citomegalovírus (CMV) em amostras biológicas de sangue seco coletadas em papel filtro (DBS), para triagem Pré-Natal e Neonatal, através de teste de enzimmunoensaio. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático.

O kit BIOLISA CMV IgM DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de detecção qualitativa por captura de Anticorpos da classe IgM anti - Citomegalovírus (CMV) em amostras humanas de sangue seco coletadas em papel filtro. Anticorpos IgM presentes na amostra de sangue seco são eluidas e se ligam aos Anticorpos anti-IgM revestidos na microplaca formando imunocomplexos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Antígenos de CMV conjugados à Peroxidase são adicionados à microplaca que é então incubada. Os Antígenos conjugados a enzima ligam-se aos Anticorpos IgM anti-CMV presentes, ligados à placa revestida com anticorpos anti-IgM. Nova lavagem é realizada para remover os excedentes. Após esta etapa o Substrato é adicionado, produzindo uma cor azul que indica a quantidade de Anticorpos IgM 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- Placa Sensibilizada – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Placa sensibilizada com anticorpos anti-IgM.

2- Conjugado – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, Antígenos de CMV conjugados à peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.

3- 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.

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

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

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

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

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

APRESENTAÇÃO

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

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

- Reagentes descritos no quadro anterior

Materiais necessários não contidos no 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 620 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

- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**
- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
- 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.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.
- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.
- A Solução de Parada contém Ácido Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.
- 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 de 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, Punção ou Calcanhar (em neonatos)

O papel filtro utilizado dever 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)” ⁵, 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, em sacos plásticos fechados hermeticamente com ou sem dessecante. 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 IgM DBS é estável após aberto 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 3 (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 ao 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: 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 3mm de Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel filtro, previamente picotados, nas cavidades determinadas.

4- Pipetar 100 µL do Tampão de Eluição, em todas as cavidades, **inclusive na cavidade para o Branco.**

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

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

7- 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.

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

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

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

11- Retirar o selador de placa das cavidades.

12- Repetir o item 7.

13- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades. **Inclusive na cavidade do Branco.**

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

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

16- Retirar o selador de placa das cavidades.

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

18- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

19- Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 620 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

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

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Branco	< 0,150
Controle Negativo DBS	< 0,150
Controle Positivo DBS	> 0,500

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

CÁLCULOS QUALITATIVO

Calcular Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = (Absorbância Média do Controle Negativo DBS x 0,05) + 0,220.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Controle Negativo DBS	0,040
	0,041
Cut Off = (Absorbância Média do Controle Negativo DBS x 0,05) + 0,220.	((0,040 + 0,041) / 2 x 0,05) + 0,220 = 0,222

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

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Amostra	0,532
Valor de Cut Off	0,222
Índice = Amostra / Valor de Cut Off	0,532 / 0,222 = 2,40

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.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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 0,532 e índice de 2,40, apresenta resultado positivo (índice ≥ 1,2).

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. 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. 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 diagnostico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo. A utilização de amostras de sangue seco em papel filtro que foram coletadas, secas e armazenadas de forma insatisfatória podem gerar resultados inadequados.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.

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 Reumatoide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Foi realizado um estudo com 48 amostras de sangue total em papel de filtro negativas para CMV IgM, mas positivas para outras infecções, a fim de se avaliar a possibilidade de reatividade cruzada destes interferentes no resultado do BIOLISA CMV IgM DBS. Dentre elas 5 amostras positivas para HTLV, 6 amostras positivas para Sífilis, 6 amostras positivas para HBsAg, 5 amostras positivas para HCV, 7 amostras positivas para Doença de Chagas, 6 amostras positivas para Zika, 4 amostras positivas para Toxoplasmose, 4 amostras positivas para Rubéola e 5 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 diagnostico 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	2,624	0,075	0,026
Desvio Padrão	0,053	0,005	0,004
Coefficiente de Variação (%)	2,04	6,45	14,38

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 absorbancia:

Reprodutibilidade	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	2,296	0,074	0,038
Desvio Padrão	0,059	0,005	0,005
Coefficiente de Variação (%)	2,58	6,68	13,46

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit BIOLISA CMV IgM DBS foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzimmunoensaio de referência. As amostras analisadas eram de pacientes neonatos e adultos. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA CMV IgM DBS é 98,0% e a especificidade clínica é 96,4%.

		Resultado Referência		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA CMV IgM DBS	Positivo	98	2	100
	Negativo	5	137	142
	Total	103	137	242

Sensibilidade Clínica: 98,0% (98/100) IC 95% = 95,3 a 100,0 %

Especificidade Clínica: 96,5% (137/142) IC 95% = 93,5 a 99,5%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Citomegalovírus (CMV) é um membro da família 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, transplantação 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 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.

Sendo assim, o kit Biolisa CMV IgM DBS, é uma valiosa ferramenta no acompanhamento da triagem Pré-Natal e Neonatal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 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 Cytomegalovuruss. 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.
- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
- Ministério da Saude. Manual Técnico - Triagem Neonatal Biológica 2016.
- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

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 IgM DBS na ANVISA: 10269360447

Revisão: Fevereiro/2024

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	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		INFLÂMABEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO

BIOLISA CMV IgM DBS

REF K273

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba de captura por inmunoensayo enzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM anti-Citomegalovirus (CMV) de clase IgM en muestras biológicas de sangre seca recolectadas en papel de filtro (DBS), para tamizaje prenatal y neonatal, mediante una prueba de inmunoensayo enzimático. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimoinmunoensayo o inmunoensayo enzimático. El kit BIOLISA CMV IgM DBS es un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el principio de detección cualitativa mediante captura de anticuerpos de clase IgM anti-Citomegalovirus (CMV) en muestras de sangre humana seca recolectadas en papel de filtro. Los anticuerpos IgM presentes en la muestra de sangre seca se eluyen y se unen a los anticuerpos anti-IgM recubiertos en la microplaca formando complejos inmunes. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Se añaden antígenos CMV conjugados con peroxidasa a la microplaca, que luego se incuba. Los antígenos conjugados enzimáticamente se unen a los anticuerpos IgM anti-CMV presentes, adheridos a la placa recubierta con anticuerpos anti-IgM. Se realiza un nuevo lavado para eliminar el exceso. Luego de este paso, se agrega el Sustrato, produciendo un color azul que indica la cantidad de Anticuerpos IgM anti-CMV presentes en la muestra. Se agrega la solución de parada para detener la reacción y se produce un cambio de color de azul a amarillo. La intensidad del color se mide a 450/620 nm.

REACTIVOS

- 1- Placa Sensibilizada** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Placa sensibilizada con anticuerpos anti-IgM.
- 2- Conjugado** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón, antígenos CMV conjugados con peroxidasa, tensioactivo, estabilizadores, colorante y conservante.
- 3- Lavado Concentrado** – Conservar 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.
- 4- Sustrato** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón que contiene peróxido de urea, tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
- 5- Solución de parada** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Ácido Clorhídrico 1 M.
- 6- Tampón de Elución** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón, tensioactivo, estabilizador y conservante.
- 7- Control negativo DBS** – Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Muestra no reactiva para anticuerpos IgM Anti-CMV impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Control Positivo DBS** – Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Muestra reactiva para anticuerpos IgM Anti-CMV impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**

PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidad	2 Unidades	5 Unidades
2- Conjugado	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Lavado Concentrada	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
4- Sustrato	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
5- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6- Tampón de Elución	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
7- Control Negativo DBS	1 Unidad	2 Unidades	3 Unidades
8- 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 el kit:

- 1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 100 a 500 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
- 2- Repipetador para pipeteo repetitivo de volúmenes de 300 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplacas para técnica de papel filtro.
- 4- Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 620 nm de longitud de onda.
- 5- Papel absorbente para secar las microcavidades.
- 6- Cronómetro o reloj.
- 7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
- 8- Agua destilada o desionizada.
- 9- Herramientas de Control de Calidad.
- 10- Incubadora 37 °C ± 2 °C.
- 11- Trituradora de papel (diámetro 3 + 0,2 mm).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

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

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- Únicamente para uso de diagnóstico *in vitro*.
- 2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.
- 3- El sobre que contiene la microplaca sólo debe abrirse después de alcanzar la temperatura ambiente. Devuelva las tiras de microcavidades no utilizadas al sobre, ciérrelo y guárdelo entre 2 y 8 °C.
- 4- El agua utilizada para limpiar el material debe ser reciente y libre de contaminantes.
- 5- Las columnas desionizantes saturadas liberan agua alcalina, diversos iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.
- 6- La solución de parada contiene ácido clorhídrico, que es un ácido fuerte. Por tanto, manéjelo con el debido cuidado.
- 7- Todas las materias primas del producto están probadas y no son reactivas para HBsAg y Anti-HCV. Sin embargo, estas pruebas no ofrecen total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga una muestra biológica es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tomar las precauciones de bioseguridad adecuadas 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, la placa debe estar cubierta durante la reacción.
- 10- Se debe asegurar que el fondo de la cavidad esté limpio y seco y que no haya 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 Sustrato, a luz fuerte o vapores de Hipoclorito durante las etapas de almacenamiento o incubación.
- 12- Recomendamos aplicar normas de protección ambiental locales, estatales y federales para que los reactivos y material biológico sean dispuestos de acuerdo con la legislación vigente.
- 13- Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consulte la HDS (Hoja de Datos de Seguridad) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o mediante solicitud a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.
- 14- No utilice el producto si el embalaje está dañado.
- 15- Es imprescindible que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Sangre seca recogida en papel de filtro (DBS) – EDTA, Punción o Talón (en recién nacidos)

El papel de filtro utilizado debe ser específico para la recolección de muestras de sangre seca, como los modelos S&S 903 y Ahlstrom 226. El laboratorio debe certificar la calidad de las muestras antes de su uso. Los estudios de estabilidad, realizados por el departamento de Investigación y Desarrollo de Bioclin, muestran que las muestras de sangre seca en papel de filtro pueden almacenarse hasta 35 días a temperatura ambiente, 2 años a 2-8 °C o 2 años a -20° W. El Manual "Colección de Sangre: Diagnóstico y seguimiento de las ETS, SIDA y Hepatitis Virales: Brasilia, Ministerio de Salud, Departamento de ETS, SIDA y Hepatitis Virales. 2010, 98 págs. (Serie TELELAB)" ⁵, 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, en bolsas plásticas herméticamente cerradas con o sin desecante. Para almacenamiento de hasta 2 años, las muestras deben permanecer refrigeradas, entre 2 y 8 °C. El almacenamiento durante más de 2 años debe realizarse a una temperatura de -20 °C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad después de la apertura

Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit BIOLISA CMV IgM DBS es estable después de abrirlo por hasta 30 días. Esta estabilidad puede variar según la prueba y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de lavado

Diluir el contenido de la botella N° 3 (Lavado Concentrado) en una proporción 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 se puede almacenar entre 2 y 30 °C hasta por 30 días. Si se produce cristalización, calentar a 37 °C hasta que se disuelva.

Todos los demás reactivos están listos para usar.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos consultar con SAC (Servicio de Asesoramiento al Cliente).

- Antes de comenzar el ensayo, coloque todos los reactivos, muestras y controles para que se establezcan a temperatura ambiente (15 – 30 °C) durante al menos 40 minutos.
- 1- Separar las cavidades a utilizar considerando: Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recolectadas en papel de filtro (se recomienda realizar la prueba por duplicado). Devuelva las tiras de microplacas no utilizadas al embalaje sellado original.
- 2- Separar la primera cavidad para el Blanco (OPCIONAL).
- 3- Agregue un disco de 3 mm de Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recolectadas en papel de filtro, previamente perforado, en las cavidades determinadas.

- 4- Pipetee 100 µL de tampón de elución en todos los pocillos, **incluido el pocillo Blanco**.
- 5- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir los pocillos con sellador de placas.
- 6- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 7- Después de la incubación, desechar el contenido de las cavidades mediante aspiración (Técnica de lavadora para papel de filtro). Utilice aproximadamente 300 µL de Solución de Lavado, **previamente preparada**, y realice un total de cinco (5) ciclos de lavado con agitación de 5 segundos. Para asegurar que el plato se seque, al final del lavado, golpee el plato durante unos segundos sobre papel absorbente.
- Nota:** Un lavado/secado deficiente puede provocar resultados inadecuados.
- 8- Pipetee 100 µL de conjugado en todos los pocillos, **incluido el pocillo Blanco**.
- 9- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra las cavidades con sellador de placas.
- 10- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 11- Retirar el sellador de placas de las cavidades.
- 12- Repetir el punto 7.
- 13- Pipetear 100 µL de Sustrato en todos los pocillos. **Incluso en la cavidad del Blanco**.
- 14- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra las cavidades con sellador de placas.
- 15- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 16- Retirar el sellador de placas de las cavidades.
- 17- Pipetee 100 µL de solución de parada en todos los pocillos.
- 18- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.
- 19- Leer usando doble filtro: 450 nm / 620 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN TÉCNICA

Compruebe si los resultados obtenidos en la lectura del Blanco y de los Estándares de Referencia son compatibles con los valores que se presentan a continuación:

ITEM	ABSORBÁNCIAS
Blanco	< 0,150
Control Negativo DBS	< 0,150
Control Positivo DBS	> 0,500

Si los valores están fuera de los valores esperados se debe repetir la técnica.

CÁLCULOS

CUALITATIVO

Calcule el Cut Off de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cut Off = (Absorbancia media del control negativo DBS x 0,05) + 0,220.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBÁNCIAS
Control Negativo DBS	0,040
	0,041
Cut Off = (Absorbância Média del Control Negativo DBS x 0,05) + 0,220.	((0,040 + 0,041) / 2 x 0,05) + 0,220 = 0,222

Calcule el índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off. Ejemplo:

ITEM	ABSORBÁNCIAS
Muestra	0,532
Valor de Cut Off	0,222
Índice = Muestra / Valor de Cut Off	0,532 / 0,222 = 2,40

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son solo para ilustración y no se pueden utilizar para calcular resultados. Cada laboratorio debe validar el punto de corte según la instrumentación utilizada y la población investigada.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Después de calcular el índice de muestra, considere los índices siguientes para determinar los resultados.

RESULTADOS	CUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo (No Reactivo)	≤ 0,8
Indeterminado	0,8 e 1,2
Positivo (Reactivo)	≥ 1,2

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. Por tanto, la muestra mencionada en el ejemplo, cuya absorbancia fue de 0,532 y índice de 2,40, presenta un resultado positivo (índice ≥ 1,2).

Observaciones: En caso de resultado indeterminado, la muestra deberá volver a analizarse por duplicado. Las muestras que produzcan resultados repetidamente indeterminados se deben volver a analizar utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra dentro de dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recogida. La interpretación de una prueba diagnóstica no debe establecerse basándose en un único ensayo. Se deben incluir otras pruebas de confirmación antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible, antes del diagnóstico descriptivo de la enfermedad. 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 establecerse en base a una única prueba. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible antes del diagnóstico definitivo. El uso de muestras de sangre seca en papel de filtro que hayan sido recolectadas, secadas y almacenadas de manera insatisfactoria puede generar resultados inadecuados. 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.

INTERFERENCIAS

No se observaron interferencias para 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. 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 48 muestras de sangre total en papel de filtro negativas para CMV IgM, pero positivas para otras infecciones, con el fin de evaluar la posibilidad de reactividad cruzada de estas interferencias en el resultado de DBS de BIOLISA CMV IgM. Entre ellos 5 muestras positivas para HTLV, 6 muestras positivas para Sifilis, 6 muestras positivas para HBsAg, 5 muestras positivas para VHC, 7 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 6 muestras positivas para Zika, 4 muestras positivas para Toxoplasmosis, 4 muestras positivas para Rubéola y 5 muestras positivas para VIH. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para HTLV, Sifilis, HBsAg, VHC, Enfermedad de Chagas, Zika, Toxoplasmosis, Rubéola y VIH. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa de control de calidad interno, donde estén claramente establecidos los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a variaciones. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presentan una variabilidad analítica característica, la cual debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para ello, se recomienda utilizar controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las dosificaciones.

RENDIMIENTO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad

La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

Repetibilidad	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	2,624	0,075	0,026
Desvío Patrón	0,053	0,005	0,004
Coefficiente de Variación (%)	2,04	6,45	14,38

Reproducibilidad

La reproducibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

Reproducibilidad	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	2,296	0,074	0,038
Desvío Patrón	0,059	0,005	0,005
Coefficiente de Variación (%)	2,58	6,68	13,46

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICAS

El kit BIOLISA CMV IgM DBS se utilizó para el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas mediante otro método de inmunoensayo enzimático de referencia. Las muestras analizadas procedieron de pacientes neonatales y adultos. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA CMV IgM DBS es del 98,0% y la especificidad clínica es del 96,4%.

		Resultado Referência		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA CMV IgM DBS	Positivo	98	2	100
	Negativo	5	137	142
	Total	103	137	242

Sensibilidad Clínica: 98,0% (98/100) IC 95% = 95,3 a 100,0 %

Especificidad Clínica: 96,5% (137/142) IC 95% = 93,5 a 99,5%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

El citomegalovirus (CMV) es un miembro de la familia de los virus del herpes que incluye el virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, el virus de la varicela zóster (VZV) y el virus de Epstein-Barr (EBV). Es un patógeno humano que se transmite a través de la saliva, el contacto sexual, el contacto perinatal, el trasplante de órganos o la transfusión 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 y en personas inmunocomprometidas, como pacientes con SIDA, cáncer o pacientes que han recibido trasplantes de órganos. Durante la terapia inmunosupresora, a menudo ocurre una reactivación del virus latente o una infección primaria. Las infecciones por CMV se pueden adquirir antes del nacimiento, durante el parto y más adelante en la vida. Puede provocar graves anomalías congénitas, como microcefalia, discapacidad motora y retraso mental. Por 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. Por lo tanto, el kit Biolisa CMV IgM DBS es una herramienta valiosa en el seguimiento del cribado prenatal y neonatal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 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.
- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
- Ministério da Saude. Manual Técnico - Triagem Neonatal Biológica 2016.
- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de ser despachados al consumo, todos los reactivos de **Bioclin** son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está garantizada hasta la fecha de vencimiento mencionada en el empaque de presentación, siempre y cuando sean almacenados y transportados en condiciones adecuadas.

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

ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR

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

Número de Registro del kit BIOLISA CMV IgM DBS en la ANVISA: 10269360447

Revisión: Febrero/2024

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACIÓN		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		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTÁ DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

BIOLISA CMV IgM DBS

REF K273

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION
 Enzymatic immunoassay capture test (ELISA) for determining anti-Cytomegalovirus (CMV) class IgM antibodies in biological samples of dried blood collected on filter paper (DBS), for Pre-Natal and Neonatal screening, using an enzyme immunoassay test. Only for *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE OF ACTION
Methodology: Enzymeimmunoassay or enzyme immunoassay.
 The BIOLISA CMV IgM DBS kit is a solid-phase enzyme immunoassay based on the principle of qualitative detection by capture of anti-Cytomegalovirus (CMV) IgM class antibodies in human dried blood samples collected on filter paper. IgM antibodies present in the dried blood sample are eluted and bind to the anti-IgM antibodies coated on the microplate forming immune complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Peroxidase-conjugated CMV antigens are added to the microplate, which is then incubated. The enzyme-conjugated Antigens bind to the anti-CMV IgM Antibodies present, attached to the plate coated with anti-IgM antibodies. New washing is carried out to remove excess. After this step, the Substrate is added, producing a blue color that indicates the amount of anti-CMV IgM Antibodies present in the sample. The Stop Solution is added to stop the reaction and there is a color change from blue to yellow. Color intensity is measured at 450/620 nm.

REAGENTS
1- Sensitized Plate – Store between 2 and 8°C. Contains: Plate sensitized with anti-IgM antibodies.
2- Conjugate – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, CMV antigens conjugated to peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
3- Concentrated Washing – 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.
4- Substrate – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
5- Stop Solution – Store between 2 and 8°C. Contains: 1 M Hydrochloric Acid.
6- Elution Buffer – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, surfactant, stabilizer and preservative.
7- DBS Negative Control – Store between 2 and 8°C. Contains: Non-reactive sample for IgM Anti-CMV antibodies impregnated in filter paper. **Potentially infectious.**
8- DBS Positive Control – Store between 2 and 8°C. Contains: Reactive sample for IgM Anti-CMV antibodies impregnated in filter paper. **Potentially infectious.**

REAGENTS	1	2	3
	96 cavities	192 cavities	480 cavities
1- Sensitized Plate	1 Unit	2 Units	5 Units
2- Conjugate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Concentrated Washing	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
4- Substrate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
5- Stop Solution	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6- Elution Buffer	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
7- DBS Negative Control	1 Unit	2 Units	3 Units
8- DBS Positive Control	1 Unit	2 Units	3 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS
 - Reagents described in the previous table

Required materials not contained in the kit:
1- Pipettes capable of dispensing volumes of 100 to 500 µL with a coefficient of variation of less than 1.5%.
2- Repipettor for repetitive pipetting of 300 µL volumes with a coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
3- Microplate washer for filter paper technique.
4- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 620 nm wavelength.
5- Absorbent paper to dry the microcavities.
6- Stopwatch or clock.
7- Bottle to store the Washing Solution after dilution.
8- Distilled or deionized water.
9- Quality Control Tools.
10- Incubator 37 °C ± 2 °C.
11- Paper shredder (diameter 3 + 0.2 mm).

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

SPECIAL CARES
1- For *in vitro* diagnostic use only.
2- Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
3- The sachet containing the microplate must only be opened after reaching room temperature. Return the unused microcavity strips to the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
4- The water used to clean the material must be recent and free from contaminants.
5- Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, and oxidizing and reducing agents that 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 raw materials for the product are tested and are non-reactive for HBsAg and Anti-HCV. However, these tests do not offer complete assurance of the absence of infectious agents. The handling of any product that contains a biological sample is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, it is necessary to take appropriate biosafety precautions 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, the plate must be covered during the reaction.
10- It must be ensured 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 the reagents, especially the Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation stages.
12- We recommend applying local, state and federal environmental protection standards so that reagents and biological material are disposed of in accordance with current legislation.
13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the SDS (Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or through a request through SAC (Customer Advisory Service) from Quibasa.
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 subjected to periodic maintenance.

SAMPLES
Dried blood collected on filter paper (DBS) – EDTA, Puncture or Heel (in neonates)
 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 certify 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° W. The Manual "Blood Collection: Diagnosis and monitoring of STDs, AIDS and Viral Hepatitis: Brasília, Ministry of Health, Department of STD, AIDS and Viral Hepatitis. 2010, 98 p. (TELELAB Series)" ⁵, 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, in hermetically sealed plastic bags with or without desiccant. For storage of up to 2 years, samples must remain refrigerated, between 2 and 8 °C. Storage for more than 2 years must be carried out at a temperature of -20 °C.

PROCESS DESCRIPTION
Stability After Opening
 The stability test results prove that the BIOLISA CMV IgM DBS kit is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary depending on test and environmental conditions. Therefore, it is suggested to monitor the product's performance using the kit's internal controls and the technique validation criteria.

PREPARATION OF WORKING REAGENTS
Washing Solution
 Dilute the contents of bottle No. 3 (Concentrated Washing) 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 to use.

TECHNIQUE
For use in automatic equipment, consult SAC (Customer Advisory Service).
 Before starting the assay, place all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 – 30 °C) for at least 40 minutes.
1- Separate the cavities to be used considering: DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood samples collected on filter paper (it is recommended to test in duplicate). Return unused microplate strips to the original sealed packaging.
2- Separate the first cavity for the Blank (OPTIONAL).
3- Add a 3mm disc of DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood samples collected on filter paper, previously perforated, into the determined cavities.

4- Pipette 100 µL of Elution Buffer into all wells, **including the Blank well.**
5- Homogenize gently for ± 30 seconds, cover the wells with plate sealer.
6- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
7- After incubation, discard the contents of the cavities by aspiration (Washer for filter paper technique). Use approximately 300 µL of Washing Solution, **previously prepared**, and perform a total of five (5) washing cycles with 5-second shaking. To ensure the plate dries, at the end of washing, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
Note: Poor washing/drying may cause inadequate results.
8- Pipette 100 µL of Conjugate into all wells, **including the Blank well.**
9- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
10- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
11- Remove the plate sealer from the cavities.
12- Repeat item 7.
13- Pipette 100 µL of Substrate into all wells. **Including in the Blank cavity.**
14- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
15- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
16- Remove the plate sealer from the cavities.
17- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
18- Gently homogenize for ± 30 seconds.
19- Read using a double filter: 450 nm / 620 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE CHECK
 Check whether the results obtained for reading the Blank and Reference Standards are compatible with the values presented below:

ITEM	ABSORBANCES
Blank	< 0.150
DBS Negative Control	< 0.150
DBS Positive Control	> 0.500

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

CALCULATIONS
QUALITATIVE
 Calculate Cut Off according to the following formula:

Cut Off = (DBS Negative Control Mean Absorbance x 0.05) + 0.220.

Example:

ITEM	ABSORBANCES
DBS Negative Control	0.040
	0.041
Cut Off = (DBS Negative Control Mean Absorbance x 0.05) + 0.220.	((0.040 + 0.041) / 2 x 0.05) + 0.220 = 0.222

Calculate the Index by dividing the sample absorbance by the Cut Off value. Example:

ITEM	ABSORBANCES
Sample	0.532
Cut Off Value	0.222
Index = Sample / Cut Off Value	0.532 / 0.222 = 2.40

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

INTERPRETATION OF RESULTS

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

RESULTS	QUALITATIVE
	INDEX
Negative (Non-Reactive)	≤ 0.8
Undetermined	0.8 and 1.2
Positive (Reagent)	≥ 1.2

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. Therefore, the sample mentioned in the example, whose absorbance was 0.532 and index of 2.40, presents a positive result (index ≥ 1.2).

Observations: In case of an indeterminate result, the sample must be re-analyzed in duplicate. Samples that yield repeatedly indeterminate results should be retested using an alternative method. If the results remain indeterminate, a new sample should be collected within two weeks. The result of the last sample collected must prevail. The interpretation of a diagnostic test should not be established based on a single assay. Other confirmatory tests must 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 descriptive diagnosis of the disease. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, and are not the only criteria for determining the patient's diagnosis and/or treatment.

PROCESS LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be established based on a single test. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information prior to definitive diagnosis. The use of dried blood samples on filter paper that have been collected, dried and stored unsatisfactorily may generate inadequate results. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional and are not the only criteria for determining the diagnosis and for patient treatment.

INTERFERENCES

No interference was observed for 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 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 48 whole blood samples on filter paper that were negative for CMV IgM, but positive for other infections, in order to evaluate the possibility of cross-reactivity of these interferences in the BIOLISA CMV IgM DBS result. Among them 5 positive samples for HTLV, 6 positive samples for Syphilis, 6 positive samples for HBsAg, 5 positive samples for HCV, 7 positive samples for Chagas Disease, 6 positive samples for Zika, 4 positive samples for Toxoplasmosis, 4 positive samples for Rubella and 5 positive samples 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 consider 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 highlight that all measurement systems present a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. To this end, it is recommended to use controls, which allow evaluating the precision and accuracy of the 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	2.624	0.075	0.026
Standard Deviation	0.053	0.005	0.004
Coefficient of Variation (%)	2.04	6.45	14.38

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	2.296	0.074	0.038
Standard Deviation	0.059	0.005	0.005
Coefficient of Variation (%)	2.58	6.68	13.46

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The BIOLISA CMV IgM DBS kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed using another reference enzyme immunoassay method. The samples analyzed were from neonatal and adult patients. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA CMV IgM DBS kit is 98.0% and the clinical specificity is 96.4%.

		Reference Result		
		Positive	Negative	Total
BIOLISA CMV IgM DBS	Positive	98	2	100
	Negative	5	137	142
	Total	103	137	242

Clinical Sensitivity: 98.0% (98/100) IC 95% = 95.3 to 100.0 %

Clinical Specificity: 96.5% (137/142) IC 95% = 93.5 to 99.5%

DIAGNOSTIC MEANING

Cytomegalovirus (CMV) is a member of the Herpes Virus family that includes Herpes Simplex Virus (HSV) 1 and 2, Varicella Zoster Virus (VZV), and Epstein-Barr Virus (EBV). It is a human pathogen transmitted through saliva, sexual contact, perinatal contact, organ transplantation or blood transfusion. In most cases, the infection remains asymptomatic. However, CMV infection can cause serious illness in newborns and immunocompromised individuals, such as patients with AIDS, cancer, or patients who have received organ transplants. During immunosuppressive therapy, reactivation of the latent virus or primary infection often occurs. CMV infections can be acquired before birth, during childbirth, and later in life. It can cause serious congenital anomalies, such as microcephaly, motor disability and mental retardation. Therefore, the 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 immunological status of the patients. Therefore, the Biolisa CMV IgM DBS kit is a valuable tool in monitoring Pre-Natal and Neonatal screening.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCE

1. Hodinka, RL, and Friedman, HM. Human Cytomegalovirus. In: Manual of Clinical Microbiology 6th Edition (1995) 884-894.
2. 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.
3. Reynolds, DW, Stagno, S, Stubbs, KG, Dabte, AJ, Livingston, NM, Saxon, SS, Alford, CA. Inapparent Congenital Cytomegalovovirus. N. Engl. J. Med. (1974) 790:291-296.

4. Stern, H. Cytomegalovirus Vaccine: Justification and Problems. In: Waterson AP (ed.) Recent Advances in Clinical Virology (1977) 117-134.
5. TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
6. Ministério da Saude. Manual Técnico - Triagem Neonatal Biológica 2016.
7. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

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



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 - Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

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

ANVISA registration for BIOLISA CMV IgM DBS kit: 10269360447

Review: February/2024

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