

# Bioclin

## BIOLISA CMV IgM

K 123 - 1

### INSTRUÇÕES DE USO

#### FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos IgM para Citomegalovírus (CMV) em soro ou plasma humano por enzimaímunensaio em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

#### PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaímunensaio ou imunoenzimática.

O Kit BIOLISA CMV IgM é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgM para CMV no soro ou plasma humano. Anticorpos IgM para CMV presentes na amostra se ligam aos anticorpos revestidos na microplaca formando complexos anticorpos anti-IgM humana - anticorpos IgM anti-CMV. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Os antígenos de CMV recombinantes conjugados à peroxidase são adicionados à microplaca e então incubados. Os antígenos conjugados ligam-se aos complexos anticorpos anti-IgM humana - anticorpos IgM anti-CMV presentes. Realiza-se nova lavagem para remover os excedentes. Após esta etapa, os Substratos A e B são adicionados e incubados, produzindo uma cor azul que indica a quantidade de anticorpos IgM presentes nas amostras. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

#### REAGENTES

##### 1. Placa Sensibilizada.

Estocar entre 2 e 8° C.

##### 2. Conjugado

Antígenos recombinantes de CMV ligados à peroxidase; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 3. Lavagem Concentrada (50x)

Solução tampão, surfactante e conservante.

##### 4. Diluente de Amostra

Solução tampão e conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 5. Substrato A

Solução tampão contendo peróxido de hidrogênio; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 6. Substrato B

Solução tampão contendo tetrametilbenzidina (TMB); conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 7. Solução de Parada

Ácido clorídrico 1M. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 8. Calibrador Cut-Off

Anticorpos IgM anti-CMV diluídos; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 9. Controle Negativo

Anticorpos IgM não reativos para CMV; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 10. Controle Positivo

Anticorpos IgM anti-CMV; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

##### 11. Seladores de Placa

#### APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa sensibilizada	1 Unidade (96 cavidades)	2 Unidades (96 cavidades)	5 Unidades (96 cavidades)
2- Conjugado	1 Frasco X 12 mL	2 Frascos X 12 mL	5 Frascos X 12 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco X 20 mL	2 Frascos X 20 mL	4 Frascos X 20 mL
4- Diluente de Amostra	1 Frasco X 12 mL	2 Frascos X 12 mL	5 Frascos X 12 mL
5- Substrato A	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
6- Substrato B	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
7- Solução de Parada	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	4 Frascos X 8 mL
8- Calibrador Cut-Off	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
9- Controle Negativo	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
10- Controle Positivo	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
11- Seladores de Placa	3 unidades	5 unidades	10 unidades

#### EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

##### Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

##### Materiais necessários não contidos no Kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5, 50 e 100 µL com precisão maior que 1,5%.
- 2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 100 µL e 300 µL, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
- 5- Pipetas com volumes reguláveis (200 µL a 1000 µL) para preparação do Substrato.
- 6- Tubos de ensaio para a preparação dos Substratos A e B.
- 7- Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8- Cronômetro ou relógio.
- 9- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluída.
- 10- Água destilada ou deionizada.
- 11- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 12- Incubadora de 37 ° C ± 2 ° C.

#### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. **Não congelar.** Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

#### CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3 - O envelope contendo as tiras deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2-8°C;
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;
- 5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, ions diversos e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados;
- 6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente;
- 7 - Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro 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, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina;
- 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 armazenamento ou etapas de incubação;
- 12 - A Solução de Parada contém ácido clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com o devido cuidado.

#### AMOSTRAS

Utilizar soro ou plasma (EDTA ou Heparina).

Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8 ° C, pelo período máximo de 7 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 7 dias, podem ser estocadas por até 30 dias à temperatura de -20°C (freezer).

#### DESCRIÇÃO DO PROCESSO

##### PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

##### 1) Solução de Lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco n° 3 (Lavagem Concentrada) em 1.000 mL de água destilada ou deionizada. Estocar entre 2 e 8° C até a data de validade impressa no frasco original. Pode ser armazenada em temperatura ambiente.

Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 ° até dissolução.

##### 2) Substrato – Solução de Trabalho

Determinar a quantidade de cavidades a serem utilizadas para preparo de um volume adequado.

Preparar a solução misturando partes iguais do Substrato A e Substrato B 15 minutos antes de sua utilização.

Mantenha-o protegido da luz até ser utilizado.

Para cada microcavidade (teste), utilizar:

##### 50µL de Substrato A + 50µL de Substrato B

Por exemplo: misture 1 mL de Substrato A e 1mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes). Ocorre sobra de reagente

#### TÉCNICA

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.

Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.

- 1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Calibrador, controles e amostras (podendo ser testadas em duplicata);
- 2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL);
- 3- Pipetar 100µL de Calibrador Cut-Off, controle negativo, controle positivo, nas cavidades determinadas;
- 4- Pipetar 100µL de Diluente de Amostra nas cavidades determinadas para as amostras e, em seguida, pipetar 5 µL de amostra sobre o Diluente de Amostra;
- 5- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
- 6- Ocorrerá mudança de cor de verde para azul nas cavidades das amostras; Cobrir as cavidades com o selador de placa;
- 6- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 ° C ± 2°C;
- 7- Retirar o selador das cavidades;
- 8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (manual); Usar 300µL aproximadamente de Solução de Lavagem, previamente diluída, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem;
- 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.

9- Pipetar 100µL de Conjugado em cada cavidade exceto na cavidade do Branco (OPCIONAL).

10- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

Cobrir as cavidades com o selador de placa.

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

12- Retirar o selador de placa das cavidades.

13- Repetir o item 8.

##### 14-ATENÇÃO Siga um dos seguintes Procedimentos:

A) Pipetar 100µL de Substrato previamente preparado\* – Solução de trabalho (A + B) em cada cavidade.

\*VIDE PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Ou,

B) Pipetar 50µL de Substrato A em cada cavidade.

Pipetar 50µL de Substrato B em cada cavidade.

15- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

Cobrir as cavidades com o selador de placa.

16- Incubar por 10 minutos ± 1 minuto em uma incubadora a 37 ° C ± 2 ° C.

17- Retirar o selador de placa das cavidades.

18- Pipetar 50µL de Solução de Parada em cada cavidade.

19- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

20- Leia a 450nm (filtro primário) / 630nm (filtro secundário) em até no máximo 30 minutos.

## VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco, controles e calibrador estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBANCIA
Cavidade Branco	< 0,050
Controle Negativo	< 0,150
Calibrador Cut-Off	> 0,150 e < 0,400
Controle Positivo	> 0,500

As absorvâncias para os controles e calibradores foram obtidas após a diminuição da absorvância do branco. Para a leitura em filtro único (450 nm) considerar limite de branco < 0,100. Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

## DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

### QUALITATIVO

Considerar como Cut-Off a absorvância média obtida com o Calibrador Cut-Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Calibrador Cut-Off	A1 = 0,249
	A2 = 0,263
Absorvância média do Calibrador Cut-Off	$(0,249 + 0,263)/2 = 0,256$

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

Exemplo:

ITEM	ABSORVANCIA
Amostra	1,037
Valor de Cut-Off	0,256
Índice: Amostra/ Valor de Cut-Off	$1,037 / 0,256 = 4,05$

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADOS	QUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	$\geq 0,9$ e $\leq 1,1$

**Observação:** No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. 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. Se a nova amostra for positiva, a amostra deve ser considerada positiva.

### 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. Enfim, todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis.

### CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve estabelecer valores de referência para os controles em níveis baixo, normal e elevado para monitorar a performance do teste.

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

#### Exatidão

#### Sensibilidade e Especificidade Clínica

O Kit BIOLISA CMV IgM analisou amostras clínicas em comparação com outro método de EIA. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do Kit BIOLISA CMV IgM é 89,3% e a especificidade clínica é de 91,1%.

#### CMV IgM EIA x EIA REFERÊNCIA

MÉTODO	EIA REFERÊNCIA		TOTAL	
	POSITIVO	NEGATIVO		
BIOLISA CMV IgM	POSITIVO	25	9	34
	NEGATIVO	3	92	95
RESULTADO TOTAL	28	101	129	

Sensibilidade Clínica: 89,3% (71,8 - 97,7%)  
Concordância global: 90,7% (84,3 - 95,1) Especificidade Clínica: 91,1% (83,7 - 95,8%)  
95% Intervalo de confiança

#### Precisão

### REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Repetibilidade		
	1	2	3
Média	0,753	1,347	3,558
Desvio padrão	0,023	0,035	0,025
Coeficiente de variação (%)	3,110	2,606	0,704

## REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens durante 3 dias consecutivos com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Reprodutibilidade		
	1	2	3
Média	0,752	1,357	3,552
Desvio padrão	0,002	0,015	0,009
Coeficiente de variação (%)	0,230	1,091	0,239

## SIGNIFICADO CLÍNICO

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.

## NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 – 96 testes  
Apresentação 2 – 192 testes  
Apresentação 3 – 480 testes

## BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.

## DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda  
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: ( 31 ) 3439.5454 - Fax ( 31 ) 3439.5455  
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 na ANVISA: 10269360189

Revisão: Junho/11