

Prospecto de QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA

 2 x 96

El ensayo de IFN- γ en sangre total que mide la respuesta a los
estimulantes del sistema inmunitario innato y adaptativo

Versión 1

IVD Para uso de diagnóstico in vitro



REF 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, EE.UU.

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ALEMANIA

1079024ES Rev. 03

 www.QuantiFERON.com



Contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación de la prueba	4
Principios del ensayo	5
Tiempo necesario para la realización del ensayo	6
Componentes y almacenamiento	6
Materiales necesarios pero no suministrados	8
Almacenamiento y manipulación	8
Advertencias y precauciones	10
Advertencias	10
Precauciones	11
Obtención y manipulación de muestras	13
Instrucciones de uso	17
Cálculos e interpretación del ensayo	24
Generación de curva estándar	24
Control de calidad del ensayo	25
Interpretación de los resultados	25
Limitaciones	27
Características de rendimiento	27
Estudios clínicos	27
Características del rendimiento del ensayo	32
Información técnica	33
Muestras de plasma coaguladas	33
Guía de resolución de problemas	34
Referencias	37
Símbolos	38
Información de contacto	38
Resumen del procedimiento	39

Uso previsto

El ensayo QuantiFERON Monitor (QFM) es una prueba de diagnóstico in vitro diseñada para detectar la función inmunitaria mediada por células a través de la medición del interferón gamma (IFN- γ) en plasma mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) después de incubar sangre total heparinizada con estimulantes de la respuesta inmunitaria innata y adquirida. El ensayo se utiliza para la detección de la respuesta inmunitaria mediada por células en la población trasplantada de órganos sólidos con estado inmunosuprimido.

QFM se ha diseñado para ser utilizado junto con la valoración de riesgos y otras evaluaciones médicas y diagnósticas.

Resumen y explicación de la prueba

La inmunodeficiencia se caracteriza por la capacidad reducida de generar eficazmente una respuesta inmunitaria. La debilidad o ausencia de respuesta puede derivar en una inmunodeficiencia (1) primaria o adquirida (secundaria).

Las inmunodeficiencias primarias se heredan genéticamente y se caracterizan por deficiencias de distintos componentes del sistema inmunitario innato o adaptativo (1). No obstante, la mayoría de las inmunodeficiencias son adquiridas (secundarias) y pueden ser causadas por agentes patógenos, fármacos (como los tratamientos inmunosupresores que se prescriben después de un trasplante de órganos), enfermedades (como el cáncer, la leucemia o el linfoma) o contaminantes medioambientales (1).

La base molecular de la inmunodeficiencia es muy variada, aunque es cierto que la inmunidad mediada por células desempeña un papel fundamental a la hora de inducir muchas de las manifestaciones clínicas observadas. Hoy por hoy, el diagnóstico y el tratamiento de los síndromes de inmunodeficiencia depende del agente causante (2, 3).

Por ejemplo, el procedimiento habitual para controlar el estado de inmunodeficiencia celular de pacientes sometidos a un trasplante de órganos sólidos (TOS) y que reciben medicamentos supresores del sistema inmunitario es la gestión ad hoc. El estado de la respuesta inmunitaria del sujeto se determina generalmente a partir de los niveles farmacológicos y la evaluación clínica/patológica de la función del injerto (2, 3).

Varios ensayos de la función de las células T miden la inmunidad celular a mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA), el mitógeno de fitolaca y la concanavalina A (ConA); sin embargo, solo miden la capacidad funcional de las células T y solo son un subconjunto de las células involucradas en la

inmunidad celular. Cada vez es más evidente que los mecanismos inmunitarios innatos contribuyen significativamente a la defensa del huésped, ya sea por su propia acción o por la mejora de la respuesta de células T específicas. Por lo tanto, la combinación de las respuestas funcionales de las células inmunitarias innatas (células naturales asesinas [NK, del inglés Natural Killer]) y adaptativas (células T) conforman un análisis mucho más exhaustivo de la inmunidad celular (2, 3).

QFM es una prueba de diagnóstico in vitro que utiliza una combinación de estimulantes (en forma de sedimento LyoSphere™) específicos para distintos tipos celulares implicados tanto en el sistema inmunitario innato como en el adaptativo. El estado funcional del sistema inmunitario de un paciente se valora a partir de la medición de la respuesta a la estimulación del sistema inmunitario innato y adaptativo con agonistas de receptores tipo Toll (TLR) y de receptores de células T (TCR), respectivamente. La detección del interferón gamma (IFN- γ) mediante ELISA permite obtener una medición cualitativa y cuantitativa de la función inmunitaria mediada por células.

Principios del ensayo

El ensayo QFM utiliza estimulantes liofilizados (QFM LyoSpheres™) que se añaden a sangre total heparinizada. La sangre se extrae en los tubos y se incuba entre 16 y 24 horas. Posteriormente se retira el plasma para determinar si se ha producido IFN- γ como respuesta a los estimulantes.

El ensayo QFM se lleva a cabo por fases. En primer lugar, se extrae sangre total en un tubo de recogida de sangre para QFM. A continuación, se añade QFM LyoSphere al tubo, que debe someterse a incubación a 37 °C lo antes posible y siempre durante las 8 horas posteriores a la extracción. Tras un periodo de incubación comprendido entre 16 y 24 horas, se centrifugan los tubos, se retira el plasma y se mide la cantidad de IFN- γ (expresado en unidades internacionales por mililitro; UI/ml) mediante ELISA. A continuación, se comparan los valores obtenidos con un rango de valores esperados a fin de tipificar la respuesta inmunitaria del paciente.

El ensayo QFM permite realizar una medición a la vez cuantitativa y cualitativa de la función inmunitaria. En cambio, los resultados del ensayo QFM no permiten cuantificar directamente el nivel de supresión inmunitaria.

A menudo, la cantidad de IFN- γ en muestras de plasma puede estar por encima de los límites superiores de la mayoría de lectores ELISA, incluso en sujetos con inmunosupresión moderada. Por este motivo se recomienda diluir las muestras de plasma con una proporción 1:10 y/o 1:100 en diluyente verde y analizarlas mediante ELISA junto con plasma sin diluir.

Nota: el umbral del ensayo QFM puede variar en función del nivel de inmunosupresión del sujeto y de las condiciones de cada trasplante.

Consulte el apartado "Interpretación de los resultados" en la página 25 de este prospecto para conocer el esquema de interpretación de los resultados de QFM.

Tiempo necesario para la realización del ensayo

A continuación se estima el tiempo necesario para la realización del ensayo QFM. También se indica el tiempo necesario cuando se analizan varias muestras en un lote.

Tubos de sangre para la incubación a 37 °C: de 16 a 24 horas

ELISA: Aproximadamente 3 horas para una placa de ELISA
(un máximo de 88 muestras)

< 1 hora de trabajo

Añadir entre 10 y 15 minutos por cada placa adicional

Componentes y almacenamiento

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
N.º de referencia	0650-0701
Número de extracciones	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 viales
<i>Prospecto de QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
Tubos de recogida de sangre para QuantiFERON Monitor	
N.º de referencia	0650-0101
Número de extracciones	100
Tubos de recogida de sangre para QuantiFERON Monitor (tapón blanco y anillo blanco)	100 tubos
<i>Prospecto de los tubos de recogida de sangre para QuantiFERON Monitor</i>	1

Componentes del kit ELISA para 2 placas de QuantiFERON Monitor	Kit ELISA para 2 placas
N.º de referencia	0650-0201
Tiras de microplacas, 12 x 8 pocillos (revestidas con anticuerpos monoclonales murinos anti-humano IFN- γ)	2 conjuntos Tiras de microplacas para 12 x 8 pocillos
IFN- γ Standard, lyophilized (estándar de IFN- γ , liofilizado; contiene IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, 0,01% p/v de timerosal)	1 x vial (8 UI/ml después de su reconstitución)
Green Diluent (GD, diluyente verde; contiene caseína bovina, suero de ratón normal, 0,01% p/v de timerosal)	1 x 30 ml vial
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (conjugado 100x concentrado, liofilizado; IFN- γ HRP murino anti-humano, contiene 0,01% p/v de timerosal)	1 x 0,3 ml después de su reconstitución
Wash Buffer 20x Concentrate (tampón de lavado 20x concentrado; pH 7,2, contiene 0,05% v/v de ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (solución enzimática de sustrato; contiene H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (solución enzimática de parada; contiene 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Prospecto de QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Contiene ácido sulfúrico. Consulte la página 11 para conocer las precauciones necesarias.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Incubador a 37 °C*; no se necesita CO₂
- Pipetas calibradas de diferentes volúmenes*
- Pipeta multicanal calibrada† capaz de dispensar 50 µl y 100 µl con puntas desechables
- Agitador de microplacas†
- Agua desionizada o destilada, 2 litros
- Lavador de microplacas (lavador automático recomendado)
- Lector de microplacas† equipado con un filtro de 450 nm y un filtro de referencia entre 620 nm y 650 nm
- Cilindro graduado (cilindro de medición)
- Toallitas absorbentes con poca pelusa

Almacenamiento y manipulación

Tubos de recogida de sangre

Almacene los tubos de recogida de sangre para QFM a una temperatura comprendida entre 4 y 25 °C. Los tubos de recogida de sangre para QFM deben estar a una temperatura de entre 17 y 25 °C en el momento del llenado y mezclado con sangre.

LyoSpheres

Guarde los sedimentos QFM LyoSpheres a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.

Reactivos del kit ELISA

Guarde los reactivos del kit ELISA a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.

Proteja en todo momento la solución enzimática de sustrato de la luz directa del sol.

* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

Reactivos de ELISA reconstituidos sin utilizar

Consulte el apartado "Fase 2: ELISA para IFN- γ " en la página 18 para obtener las instrucciones sobre cómo reconstituir los reactivos del kit ELISA.

- El estándar reconstituido del kit puede conservarse durante 3 meses como máximo si se almacena a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

Anote la fecha de reconstitución del estándar del kit.

- Una vez reconstituido, el conjugado 100x concentrado que no se haya utilizado debe volver a almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C y debe utilizarse durante los 3 meses siguientes.

Anote la fecha de reconstitución del conjugado.

- El conjugado listo para el uso debe utilizarse en las 6 horas siguientes a su preparación (consulte la tabla 1).
- El tampón de lavado listo para el uso puede almacenarse a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) un máximo de 2 semanas.

Advertencias y precauciones

Para uso de diagnóstico in vitro

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN®.

Advertencias

- El ensayo QFM permite realizar una medición a la vez cuantitativa y cualitativa de la función inmunitaria. En cambio, los resultados del ensayo QFM no permiten cuantificar directamente el nivel de supresión inmunitaria.
- Los resultados del ensayo QFM deben utilizarse junto con presentaciones clínicas, historiales médicos y otros indicadores clínicos para determinar el estado inmunitario de un paciente.
- El umbral del ensayo QFM puede variar en función del nivel de inmunosupresión del sujeto y de las condiciones de cada trasplante.

Precauciones

Para uso de diagnóstico in vitro.



PRECAUCIÓN: manipule la sangre y el plasma humanos como material potencialmente infeccioso. Cumpla las directrices pertinentes para la manipulación de sangre y productos sanguíneos. Elimine las muestras y los materiales que hayan estado en contacto con la sangre o los productos sanguíneos según la normativa federal, nacional y local.

Las siguientes indicaciones de riesgo y advertencia hacen referencia a los componentes del kit QuantiFERON Monitor ELISA.

Indicaciones de peligro



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(Solución enzimática de parada QuantiFERON)

Contiene: ácido sulfúrico al. Atención! Puede ser corrosivo para los metales. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(Solución enzimática de sustrato QuantiFERON)

Atención! Provoca una leve irritación cutánea. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.



QuantiFERON Green Diluent
(Diluyente verde QuantiFERON)

Contiene: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Contiene: tartrazina. Atención! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.



QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate
(Tampón de lavado 20x concentrado QuantiFERON)

Contiene: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Evitar su liberación al medio ambiente.

Más información

Hojas de datos de seguridad: www.qiagen.com/safety

- Cualquier desviación respecto al procedimiento indicado en el *Prospecto de QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* puede generar resultados erróneos. Lea las instrucciones atentamente antes de realizar el ensayo.
- **Importante:** Inspeccione los viales antes de utilizarlos. No utilice viales de conjugado, estándar de IFN- γ o QFM LyoSphere que muestren signos de daños o en los que el sello de goma no esté intacto. No utilice viales rotos. Adopte las precauciones de seguridad apropiadas para eliminar los viales de forma segura. Recomendación: utilice un abridor de viales para abrir los viales de conjugado, estándar de IFN- γ o QFM LyoSphere y minimizar el riesgo de daños provocados por el tapón de encapsulado metálico.
- No utilice el kit ELISA si algún frasco de reactivo muestra signos de estar dañado o perder líquido.
- No mezcle ni utilice tiras de microplacas, estándar IFN- γ , diluyente verde o conjugado 100x concentrado de diferentes lotes del kit QFM ELISA. Otros reactivos (tampón de lavado 20x concentrado, solución enzimática de sustrato y solución enzimática de parada) pueden intercambiarse entre kits siempre y cuando los reactivos no hayan caducado y se anote la información de los lotes.
- Elimine los reactivos no utilizados y las muestras biológicas de acuerdo con la normativa de seguridad local y nacional correspondiente y las leyes medioambientales.
- No utilice los tubos de recogida de sangre para QFM, QFM LyoSpheres ni QFM ELISA después de la fecha de caducidad indicada.
- Asegúrese de que el equipo de laboratorio se ha calibrado/validado para el uso.

Obtención y manipulación de muestras

El ensayo QFM solo debe realizarse con sangre total recogida en un tubo de recogida de sangre con heparina de litio o directamente en un tubo de recogida de sangre para QFM; se necesita 1 ml de sangre entera para cada ensayo. Los tubos de recogida de sangre deben etiquetarse correctamente con la hora de recogida de la sangre.

Importante: tanto la estimulación de muestras de sangre para QFM (es decir, la adición de QFM LyoSphere a una alícuota sanguínea de 1 ml) como su posterior incubación a 37 °C deben producirse durante las 8 horas siguientes a la recogida de la sangre.

Antes de la incubación, mantenga las muestras de sangre a temperatura ambiente (22 ± 5 °C).

Siga los procedimientos que se describen a continuación para obtener resultados óptimos:

1. Coloque las etiquetas correspondientes en los tubos.
Asegúrese de que cada tubo de recogida de sangre para QFM esté correctamente etiquetado con los detalles del paciente y la hora de la recogida de sangre.
2. Extraiga 1 ml de sangre de cada sujeto mediante venopunción directamente en un tubo de recogida de sangre para QFM. El procedimiento debería realizarlo un flebotomista.

Nota importante: los tubos se deben encontrar a una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C en el momento de llenarlos de sangre.

Los tubos de recogida de sangre para QFM pueden utilizarse hasta 810 metros por encima del nivel del mar.

Como los tubos de 1 ml absorben la sangre relativamente despacio, mantenga el tubo adherido a la aguja durante 2-3 segundos cuando parezca que está lleno del todo. De este modo conseguirá extraer el volumen correcto.

La marca negra en el lateral del tubo de recogida de sangre para QFM indica un volumen de llenado de 1 ml. Los tubos de recogida de sangre para QFM se fabrican para obtener $1 \text{ ml} \pm 10\%$ y se utilizan de forma óptima en este rango. Si el nivel de sangre de un tubo está fuera del rango marcado por la línea, extraiga una nueva muestra de sangre.

Si utiliza una aguja con aletas para extraer la sangre, utilice un tubo de recogida de sangre de purga para asegurarse de que el conducto está lleno de sangre antes de utilizar el tubo de recogida de sangre para QFM.

Si los tubos de recogida de sangre para QFM se utilizan a una altura superior a los 810 metros o si se obtiene un volumen bajo, los usuarios pueden extraer la sangre con una jeringa y transferir inmediatamente 1 ml al tubo de recogida de sangre para QFM. Por motivos de seguridad, la mejor forma de realizar este proceso es quitar la aguja de la jeringa tomando las precauciones de seguridad oportunas, quitar el tapón del tubo de recogida de sangre para QFM y añadir 1 ml de sangre (hasta llegar al centro de la marca negra situada en el lateral de la etiqueta del tubo). Vuelva a colocar bien el tapón y mezcle como se describe a continuación.

Si se utiliza un torniquete, aflójelo en cuanto introduzca la aguja en la vena para evitar variaciones en la presión que podrían afectar el volumen de sangre recogido.

También existe la posibilidad de extraer la sangre en un tubo de recogida de sangre genérico con heparina de litio como anticoagulante y transferirla luego al tubo de recogida de sangre para QFM. Utilice solo heparina de litio como anticoagulante sanguíneo porque los demás anticoagulantes interfieren en el ensayo. Llene un tubo de recogida de sangre (volumen mínimo 3 ml) y mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo varias veces para disolver la heparina. La sangre debe conservarse a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) antes de transferirla a los tubos de recogida de sangre para QFM para proceder a su estimulación con QFM LyoSphere. Asegúrese de mezclar bien la sangre invirtiendo con cuidado los tubos inmediatamente antes de la dispensación. Dispense una alícuota sanguínea de 1 ml en un tubo de recogida de sangre para QFM. La dispensación debe realizarse de forma aséptica y garantizando la aplicación de los procedimientos de seguridad oportunos; a continuación, quite el tapón del tubo de recogida de sangre para QFM y añada 1 ml de sangre (hasta llegar al centro de la marca negra situada en el lateral de la etiqueta del tubo). Vuelva a colocar los tapones y mezcle tal como se describe más abajo.

3. Cuando termine de llenar los tubos, inviértalos con cuidado varias veces para disolver la heparina.

Importante: si agita el tubo con demasiada fuerza, puede "romper" el gel, lo que alteraría los resultados.

4. Deje equilibrar los viales de QFM LyoSphere a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) inmediatamente antes del uso.

5. Añada QFM LyoSphere a 1 ml de sangre de forma totalmente aséptica. Destape el tubo de recogida de sangre.

Dé unos toquitos al vial de QFM LyoSphere con cuidado sobre una superficie dura para que el sedimento QFM LyoSphere se deposite en el fondo del vial. A continuación, destape el vial de QFM LyoSphere quitando primero el aro metálico y luego el tapón de goma.

Vierta QFM LyoSphere con cuidado en 1 ml de muestra de sangre. Para hacerlo, alinee el borde del vial de vidrio con el del tubo de recogida de sangre para QFM y luego invierta el vial suavemente para transferir QFM LyoSphere al tubo de recogida de sangre para QFM (consulte la ilustración 1).

Importante: si QFM LyoSphere cae fuera del tubo de recogida de sangre para QFM, deséchelo y abra otro vial de QFM LyoSphere.

Importante: no deje el vial de QFM LyoSphere abierto durante un periodo de tiempo prolongado. QFM LyoSphere debe añadirse a la sangre lo antes posible después de destapar el vial.

Si se añade QFM LyoSphere a sangre recogida en el tubo de recogida de sangre para QFM, asegúrese de taponar los tubos de muestras con los tapones correctos.

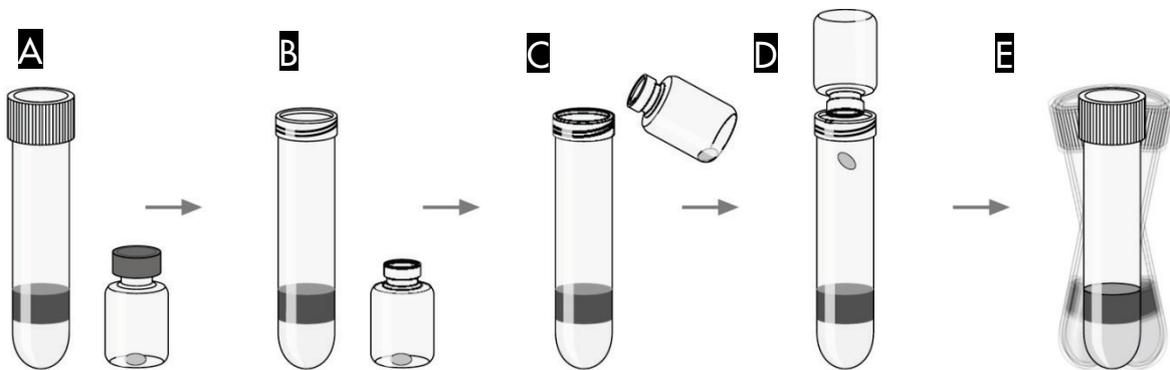


Ilustración 1. Adición de QFM LyoSphere. **A** Tubo de recogida de sangre para QFM y vial de QFM LyoSphere. **B** Quite el tapón del tubo de recogida de sangre para QFM y el aro metálico y el tapón de goma del vial de QFM LyoSphere. **C** Añada inmediatamente QFM LyoSphere a la sangre alineando el borde del vial de vidrio con el del tubo de recogida. **D** Invierta suavemente el vial para transferir el sedimento LyoSphere al tubo de recogida. **E** Vuelva a taponar el tubo de recogida de sangre para QFM y agítelo entre 5 y 10 veces.

6. Tape el tubo de recogida de sangre para QFM y agítelo entre 5 y 10 veces con fuerza suficiente para que QFM LyoSphere se disuelva por completo.

Si QFM LyoSphere se adhiere a la parte interior de la superficie del tubo, recubra LyoSphere con sangre al invertir el tubo para disolverlo.

Asegúrese de tapar el tubo cuando termine de añadir QFM LyoSphere para evitar añadir por equivocación un segundo LyoSphere al mismo tubo.

Nota: QFM LyoSphere es de color blanco, por lo que deja de ser visible en cuanto se disuelve en la sangre.

Importante: Si agita el tubo con demasiada fuerza, puede "romper" el gel, lo que alteraría los resultados.

7. Después de añadir y disolver QFM LyoSphere, coloque los tubos de recogida de sangre para QFM en el incubador a 37 ± 1 °C lo antes posible y siempre durante las 8 horas siguientes a la recogida de la sangre.

Instrucciones de uso

Fase 1: incubación de la sangre y obtención de plasma

Materiales suministrados

- Tubos de recogida de sangre para QFM (consulte el apartado “Componentes y almacenamiento”, en la página 6)

Materiales necesarios (no suministrados)

- Consulte el apartado “Materiales necesarios pero no suministrados”, en la página 8.

Procedimiento

1. Incube los tubos de recogida de sangre para QFM que contienen alícuotas sanguíneas de 1 ml con QFM LyoSphere EN POSICIÓN VERTICAL a una temperatura de 37 ± 1 °C durante un periodo comprendido entre 16 y 24 horas.

Nota: el incubador no requiere CO₂ ni humidificación.

Una vez finalizada la incubación, los tubos de recogida de sangre para QFM pueden conservarse entre 4 y 27 °C durante 3 días antes de centrifugarlos.

2. Después de la incubación, la retirada del plasma se realiza mediante el centrifugado de los tubos de recogida de sangre para QFM durante 15 minutos a una velocidad de entre 2.000 y 3.000 × *g* (RCF). El tapón de gelatina separa las células del plasma. Si no fuera así, vuelva a centrifugar los tubos.

Es posible recoger el plasma sin centrifugar, aunque en tal caso, habrá que poner especial cuidado para retirar el plasma sin alterar las células.

3. Las muestras de plasma solo se deben extraer con ayuda de una pipeta.

Importante: después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de extraer la muestra. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.

Las muestras de plasma pueden cargarse directamente desde los tubos de recogida de sangre para QFM centrifugados a la placa ELISA para QFM, incluso si se utilizan equipos ELISA automatizados.

Las muestras de plasma pueden almacenarse durante 28 días a una temperatura entre 2 y 8 °C o, después de la extracción del plasma, por debajo

de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante periodos más largos. Es necesario sellar las alícuotas de muestras de plasma obtenidas antes de proceder a su almacenamiento.

Si obtiene muestras de plasma, obtenga un volumen mínimo de $150\text{ }\mu\text{l}$ para permitir la repetición del ensayo en caso necesario.

A menudo, la cantidad de IFN- γ en muestras de plasma puede estar por encima de los límites superiores de la mayoría de lectores ELISA, incluso en sujetos con inmunosupresión moderada. Por este motivo se recomienda diluir las muestras de plasma con una proporción 1:10 y/o 1:100 en diluyente verde y analizarlas mediante ELISA junto con plasma sin diluir (consulte el apartado Fase 2: ELISA para IFN- γ).

Fase 2: ELISA para IFN- γ

Materiales suministrados

- Kit ELISA para 2 placas de QuantiFERON Monitor (consulte el apartado "Componentes y almacenamiento" en la página 6)

Materiales necesarios (no suministrados)

- Consulte el apartado "Materiales necesarios pero no suministrados", en la página 8.

Preparación

A menudo, la cantidad de IFN- γ en plasma puede estar por encima de los límites superiores de la mayoría de los lectores ELISA, incluso en sujetos con inmunosupresión moderada. Por este motivo se recomienda diluir las muestras de plasma con una proporción 1:10 y/o 1:100 en diluyente verde y analizarlas mediante ELISA junto con plasma sin diluir.

En casos de pacientes con un estado de inmunosupresión acentuado, puede ser suficiente preparar y analizar solamente una muestra de plasma sin diluir para obtener un resultado cuantitativo.

Nota: para la interpretación de los resultados deberían utilizarse los resultados de las muestras comprendidos en el rango de QFM ELISA (i.e., hasta 10 UI/ml). Si el plasma sin diluir genera resultados por encima del rango de QFM ELISA, debería utilizarse la dilución más baja capaz de generar un resultado comprendido en el rango de QFM ELISA como resultado indicado (teniendo en cuenta el factor de dilución).

Procedimiento

1. Todas las muestras de plasma y los reactivos, excepto el conjugado 100x concentrado, deben estar a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) antes de ser utilizados. Espere por lo menos 60 minutos para permitir el equilibrado.
2. Retire las tiras innecesarias del bastidor de microplacas, vuelva a cerrar la bolsita de aluminio y colóquela de nuevo en la nevera donde quedará almacenada hasta que se necesite.

Deje por lo menos 1 tira para los estándares del QFM y tiras suficientes para el número de sujetos que se quieran diagnosticar. Después, guarde el bastidor y la tapa para usarlos con el resto de las tiras.

3. Reconstituya el estándar de IFN- γ liofilizado añadiendo el volumen de agua desionizada o destilada que se indica en la etiqueta del vial del estándar. Mezcle con suavidad para evitar la formación de espuma y lograr así una solubilización completa. Después de reconstituir el estándar con el volumen indicado se obtiene una solución con una concentración de 8,0 UI/ml.

Importante: el volumen de reconstitución del estándar de IFN- γ es diferente para cada lote. Consulte la etiqueta del vial del estándar para garantizar que se utiliza el volumen correcto de agua desionizada o destilada.

Utilice el estándar del kit reconstituido para obtener una serie de 2 diluciones y luego una serie de 4 diluciones de IFN- γ en diluyente verde (GD) (consulte la ilustración 2). El S1 (estándar 1) contiene 4,0 UI/ml, el S2 (estándar 2) contiene 1,0 UI/ml, el S3 (estándar 3) contiene 0,25 UI/ml y el S4 (estándar 4) contiene 0 UI/ml (solamente GD). Los estándares deben analizarse por duplicado. Prepare diluciones nuevas del estándar del kit para cada ensayo ELISA.

Procedimiento recomendado para estándares duplicados

- a. Etiquete 4 tubos como "S1", "S2", "S3" y "S4".
- b. Añada 150 μ l de GD a S1, S2, S3 y S4.
- d. Añada 150 μ l del estándar del kit a S1 y mezcle bien.
- d. Transfiera 50 μ l de S1 a S2 y mezcle bien.
- e. Transfiera 50 μ l de S2 a S3 y mezcle bien.
- f. Diluyente verde (GD) por sí solo sirve como estándar cero (S4).

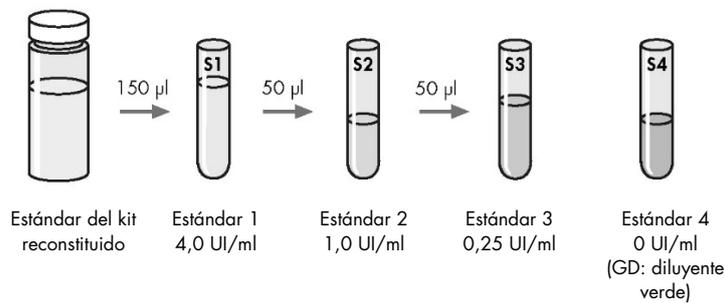


Ilustración 2. Preparación de la curva del estándar

4. Reconstituya el conjugado 100x concentrado y liofilizado con 0,3 ml de agua desionizada o destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación de espuma y lograr así una solubilización completa del conjugado. El conjugado listo para utilizar se prepara diluyendo la cantidad necesaria de conjugado 100x concentrado en diluyente verde (tabla 1. Preparación del conjugado). Vuelva a guardar inmediatamente los conjugados 100x concentrados no utilizados a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Utilice exclusivamente diluyente verde.

Tabla 1. Preparación del conjugado

Número de tiras	Volumen de conjugado 100x concentrado	Volumen de diluyente verde
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Mezcle bien las muestras de plasma procedentes de los tubos de recogida de sangre que hayan sido congeladas o almacenadas antes de verterlas en el pocillo ELISA.

Importante: si las muestras de plasma se añaden directamente desde los tubos para QFM centrifugados, evite mezclar el plasma. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.

6. Recomendación: diluya las muestras de plasma en una proporción 1:10.
- Añada 90 µl de diluyente verde (GD) a un tubo etiquetado con los detalles del paciente y la proporción "1:10".
 - A continuación, añada 10 µl de muestras de plasma mezcladas (consulte el paso 5 para obtener detalles sobre la diferencia entre muestras de plasma mezcladas y las añadidas directamente desde tubos QFM centrifugados).
 - Mezcle bien mediante pipeteado para reducir al mínimo la formación de espuma.

7. Recomendación: diluya muestras de plasma en una proporción 1:100.
 - Prepare una dilución 1:10 (consulte el paso 6 anterior).
 - Añada 90 µl de diluyente verde a un tubo etiquetado con los detalles del paciente y la proporción "1:100".
 - Añada 10 µl de la dilución 1:10.
 - Mezcle bien mediante pipeteado para reducir al mínimo la formación de espuma.

Recomendación: analice las siguientes muestras en paralelo y en este orden:

- sin diluir, 1:10, 1:100

El software de análisis QFM también permite analizar las siguientes opciones de muestras de sujetos:

- Sin diluir
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Sin diluir, 1:10

8. Añada 50 µl de conjugado recién preparado listo para usar a los pocillos de ELISA mediante una pipeta multicanal.
9. Añada 50 µl de muestra de plasma para analizar a los pocillos correspondientes usando una pipeta multicanal. Luego añada 50 µl a cada uno de los estándares 1 a 4. Analice los estándares por duplicado.
10. Tape cada una de las placas y mezcle bien el conjugado y las muestras de plasma/estándares durante 1 minuto en un agitador de microplacas. Evite las salpicaduras.
11. Incube a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) durante 120 ± 5 minutos. No exponga las placas a la luz directa del sol mientras estén en el incubador.
12. Durante la incubación, diluya 1 parte del tampón de lavado 20x concentrado con 19 partes de agua desionizada o destilada y mezcle bien. Se incluye suficiente tampón de lavado 20x concentrado para preparar 2 litros de tampón de lavado listo para utilizar.
Lave los pocillos con 400 µl de tampón de lavado listo para usar durante al menos 6 ciclos en un lavador de placas automático. Se recomienda utilizar un lavador de placas automático.

Es muy importante lavar bien las placas para que el análisis dé los resultados esperados. Asegúrese de que todos los pocillos están completamente llenos de tampón de lavado antes de iniciar cada ciclo de lavado. Recomendación: deje escurrir los pocillos durante un mínimo de 5 segundos entre ciclo y ciclo para optimizar los resultados.

Añada un desinfectante normal de laboratorio al depósito de evacuación y siga los procedimientos establecidos para descontaminar materiales potencialmente infecciosos.

13. Coloque las placas boca abajo sobre un paño absorbente sin pelusa y dé unos toquitos para escurrir los restos de tampón de lavado que puedan quedar. Añada 100 µl de solución enzimática de sustrato a cada pocillo, tape cada placa y mezcle bien con un agitador de microplacas.
14. Incube a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) durante 30 minutos.
No exponga las placas a la luz directa del sol mientras estén en el incubador.
15. Después de la incubación, añada 50 µl de solución enzimática de parada a cada pocillo y mezcle bien con un agitador de microplacas.
La solución enzimática de parada debería añadirse a los pocillos en el mismo orden y aproximadamente a la misma velocidad utilizada al añadir la solución enzimática de sustrato en el paso 13.
16. Mida la densidad óptica (DO) a los 5 minutos de detener la reacción mediante un lector de microplacas equipado con un filtro de 450 nm y un filtro de referencia de 620 a 650 nm. Los valores de DO se utilizan para calcular los resultados.

Cálculos e interpretación del ensayo

El programa de análisis del QuantiFERON Monitor se utiliza para analizar los datos obtenidos y calcular los resultados. Puede obtenerlo desde www.QuantiFERON.com. Asegúrese de utilizar la versión más actualizada del programa de análisis QuantiFERON Monitor.

El programa evalúa la calidad del análisis, genera una curva estándar y proporciona un resultado para cada sujeto, calculado tal y como se describe en el apartado Interpretación de los resultados.

Si el plasma sin diluir está por encima del rango superior (es decir, > 10 UI/ml) de QFM ELISA, el software de análisis de QuantiFERON Monitor indica la dilución más baja capaz de generar un resultado comprendido en el rango de QFM ELISA, tomando siempre en cuenta el factor de dilución.

En lugar de utilizar el programa de análisis del QuantiFERON Monitor, pueden determinarse los resultados con el siguiente método.

Generación de curva estándar

(Cuando no se utiliza el programa del QuantiFERON Monitor)

Determine los valores DO medios de las réplicas del estándar del kit para cada placa.

Genere una curva estándar en escala $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ mediante el trazado del $\log_{(e)}$ de la DO media (eje y) con relación al $\log_{(e)}$ de la concentración de IFN- γ en los estándares en UI/ml (eje x), sin incluir el estándar cero en el cálculo. Calcule la línea que mejor se adapte a la curva estándar mediante análisis regresivo.

Utilice la curva estándar para determinar la concentración de IFN- γ (UI/ml) en cada una de las muestras de plasma, utilizando para ello el valor DO de cada muestra.

Estos cálculos pueden realizarse con diversos paquetes de software que existen en el mercado para lectores de microplacas, así como con hojas de cálculos o programas estadísticos habituales (como por ejemplo Microsoft® Excel®). Se recomienda utilizar estos paquetes para realizar el análisis de regresión, calcular el coeficiente de variación (%CV) de los estándares y el coeficiente de correlación (r) de la curva estándar.

El resultado indicado debería corresponder a la dilución más baja capaz de generar un resultado comprendido en el rango de QFM ELISA (teniendo en cuenta el factor de dilución) si el plasma sin diluir está por encima del rango de QFM ELISA.

Control de calidad del ensayo

La exactitud de los resultados del análisis dependerá de la precisión de la curva estándar que se genere. Por consiguiente, deben revisarse los resultados extraídos de los estándares antes de interpretar los resultados correspondientes a las muestras analizadas.

Para que el ensayo ELISA se considere válido:

- El valor DO medio para el estándar 1 debe ser $\geq 0,600$.
- El %CV de los valores DO de las réplicas del estándar 1 y el estándar 2 debe ser $\leq 15\%$.
- Los valores DO de las réplicas del estándar 3 y el estándar 4 no deben presentar una desviación mayor que 0,040 unidades DO respecto a su media.
- El coeficiente de correlación (r) calculado a partir de los valores medios de absorbancia de los estándares debe ser $\geq 0,98$.

El programa de análisis del QuantiFERON Monitor calcula y muestra los valores de estos parámetros de calidad.

Si no se cumplen los requisitos indicados, se considera que el análisis no es válido y es preciso repetirlo.

El valor DO medio para el estándar cero (diluyente verde) debería ser $\leq 0,150$. Si el valor DO medio es $> 0,150$, debería revisarse el procedimiento de lavado de placas.

Interpretación de los resultados

Los resultados de QFM deben interpretarse según la respuesta del IFN- γ a los estimulantes del sistema inmunitarios innato y adaptativo. El ensayo QFM permite realizar una medición cualitativa a la vez que cuantitativa de la función inmunitaria. En cambio, los resultados del ensayo QFM no permiten cuantificar directamente el nivel de supresión inmunitaria.

Importante: para determinar el estado inmunitario de un paciente, el nivel de IFN- γ medido debe valorarse junto con la presentación clínica, el historial médico y otros exámenes diagnósticos (tabla 2). El umbral del ensayo QFM puede variar en función del nivel de inmunosupresión del sujeto y de las condiciones de cada trasplante.

Tabla 2. Interpretación de los resultados

Resultado IFN- γ de QFM (UI/ml)	Clasificación	Interpretación
< 15	Bajo	El sujeto presenta una respuesta baja del IFN- γ frente a los estimulantes del sistema inmunitario innato y adaptativo.
15-1.000	Moderado	El sujeto presenta una respuesta moderada del IFN- γ frente a los estimulantes del sistema inmunitario innato y adaptativo.
> 1.000	Alto	El sujeto presenta una respuesta alta del IFN- γ frente a los estimulantes del sistema inmunitario innato y adaptativo.

Si el nivel de IFN- γ medido de una muestra de plasma sin diluir es inferior a 0,1 UI/ml:

- Asegúrese de que QFM LyoSphere se haya añadido a la muestra de sangre y de que el tubo se haya incubado tal como se indica en el prospecto.
- Asegúrese de que el resultado de IFN- γ se corresponde con el estado clínico actual del sujeto.

Si existen sospechas de que se hayan producido fallos o errores técnicos durante la recogida o manipulación de las muestras de sangre, habrá que repetir todo el análisis QFM con una muestra de sangre nueva. Repita el ensayo ELISA con las muestras de plasma estimulado si sospecha que el ensayo original no se ha realizado según el procedimiento descrito en este prospecto (consulte el apartado de control de calidad del ensayo para obtener más información).

El médico quizás desee repetir el ensayo si los resultados no responden al estado clínico actual del sujeto.

Limitaciones

Los resultados del análisis QFM deben completarse con el historial clínico del individuo, el estado físico actual y otras pruebas médicas. Asimismo, los laboratorios pueden establecer sus propios rangos para el ensayo.

Los laboratorios también pueden optar por analizar en paralelo con las muestras de paciente una muestra de control externa obtenida de un sujeto sano.

Los resultados poco fiables o imprecisos pueden producirse por las siguientes causas:

- No se utiliza el anticoagulante sanguíneo correcto: debe utilizarse únicamente heparina de litio, ya que otros anticoagulantes interfieren con el ensayo.
- No se siguen los pasos descritos en este prospecto.
- Existen volúmenes excesivos de IFN- γ en circulación o hay anticuerpos heterófilos.
- Han pasado más de 8 horas desde la obtención de la muestra de sangre y su incubación a 37 °C.
- Se ha producido un llenado escaso o excesivo de los tubos para QFM, fuera del rango 0,9-1,1 ml.

Características de rendimiento

Estudios clínicos

Se han realizado dos estudios clínicos para evaluar la respuesta de sujetos aparentemente sanos ($n = 114$) frente a la de pacientes trasplantados ($n = 30$). De los sujetos trasplantados, 18 se hallaban en el cohorte de postrasplante temprano (Post-Tx temprano, los 3 meses posteriores al trasplante) y 12 en el cohorte de postrasplante tardío o estable (Post-Tx tardío, > 12 meses después del trasplante).

- Se obtuvieron muestras hasta 5 veces de cada sujeto durante el periodo Post-Tx temprano (cohorte de postrasplante de 3 meses, $n = 64$ muestras).
- Se obtuvieron muestras 1 vez de cada sujeto durante el periodo Post-Tx tardío (cohorte de postrasplante tardío, $n = 12$ muestras).
- Se obtuvieron muestras 1 vez de cada sujeto del cohorte aparentemente sano ($n = 114$)

Las respuestas a QFM oscilaron entre baja y moderada para las muestras de los periodos Post-Tx temprano y Post-Tx tardío. El periodo Post-Tx temprano registró un porcentaje más alto (93,8%) de respuestas en el rango bajo, así como un porcentaje más bajo (6,3%) de respuestas en el rango moderado en comparación con las respuestas del periodo Post-Tx tardío, con un 25% de las respuestas en el rango bajo y un 66,7% en el rango moderado (tabla 3). No se obtuvieron respuestas del periodo Post-Tx temprano en el rango de respuesta alta, mientras que solamente 1 respuesta (8,3%) de las muestras del periodo Post-Tx tardío correspondió al rango de respuesta alta. Las respuestas a QFM del cohorte aparentemente sano se clasificaron básicamente en el rango moderado (83,3%) y alto (15,8%) (tabla 3).

Tabla 3. Comparación del rango de respuesta a QFM entre sujetos aparentemente sanos y sujetos trasplantados

IFN- γ (UI/ml)	Categoría de resultados	% Post-Tx temprano* IC del 95% n	% Post-Tx tardío* IC del 95% n	% aparen- temente sanos* IC del 95% n	Resultados totales
< 15	Bajo	93,8% 85,0-97,5 n = 60	25,0% 8,9-53,2 n = 3	0,9% 0,2-4,8 n = 1	64
15-1.000	Moderado	6,3% 2,5-15,0 n = 4	66,7% 39,1-86,2 n = 8	83,3% 75,4-89,1 n = 95	107
> 1.000	Alto	0,0% 0-5,7 n = 0	8,3% 1,5-35,4 n = 1	15,8% 10,2-23,6 n = 18	19
Muestras totales		64	12	114	190

* Los porcentajes indican la proporción de muestras de cada cohorte de donantes clasificadas en cada rango de respuesta específico.

Valores esperados

La distribución de respuestas del IFN- γ a QFM en pacientes del periodo postrasplante temprano (primeros 3 meses de postrasplante) se determinó a partir de 64 muestras obtenidas de 18 destinatarios de trasplantes mediante QFM ELISA (ilustración 3).

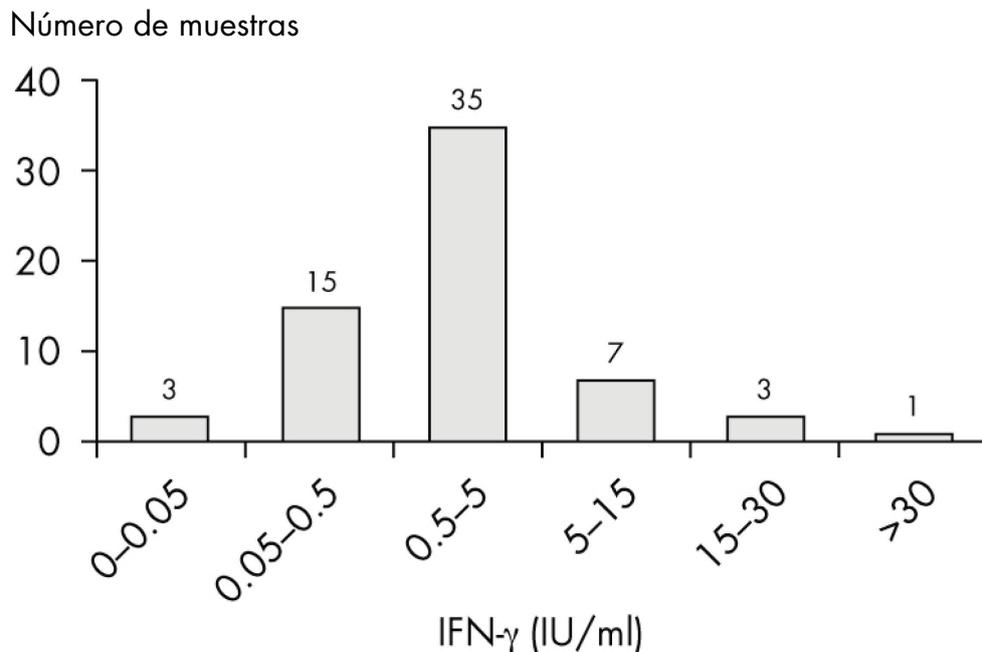


Ilustración 3. Distribución de respuestas del IFN- γ a QFM en pacientes del periodo postrasplante temprano (n = 64; mediana = 1,5 UI/ml)

La distribución de respuestas del IFN- γ a QFM en pacientes del periodo postrasplante tardío (> 12 meses de postrasplante) se determinó a partir de 12 muestras mediante QFM ELISA (ilustración 4).

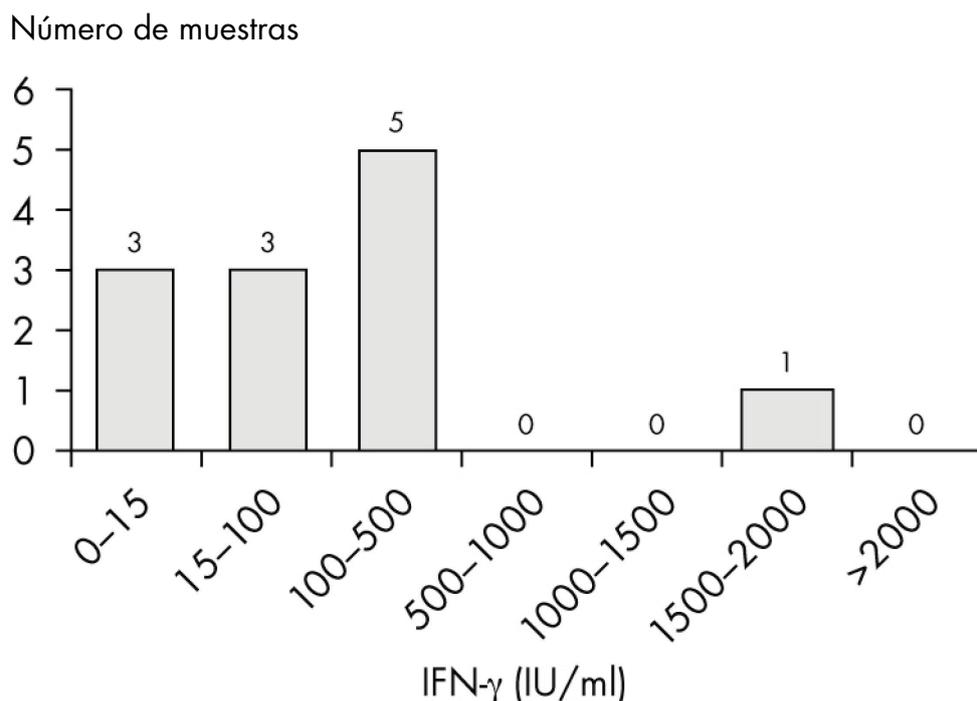


Ilustración 4. Distribución de respuestas del IFN- γ a QFM en pacientes del periodo postrasplante tardío (n = 12; mediana = 98,8 UI/ml)

La distribución de respuestas del IFN- γ a QuantiFERON Monitor en sujetos aparentemente sanos se determinó a partir de 114 muestras mediante QFM ELISA (Figure 5).

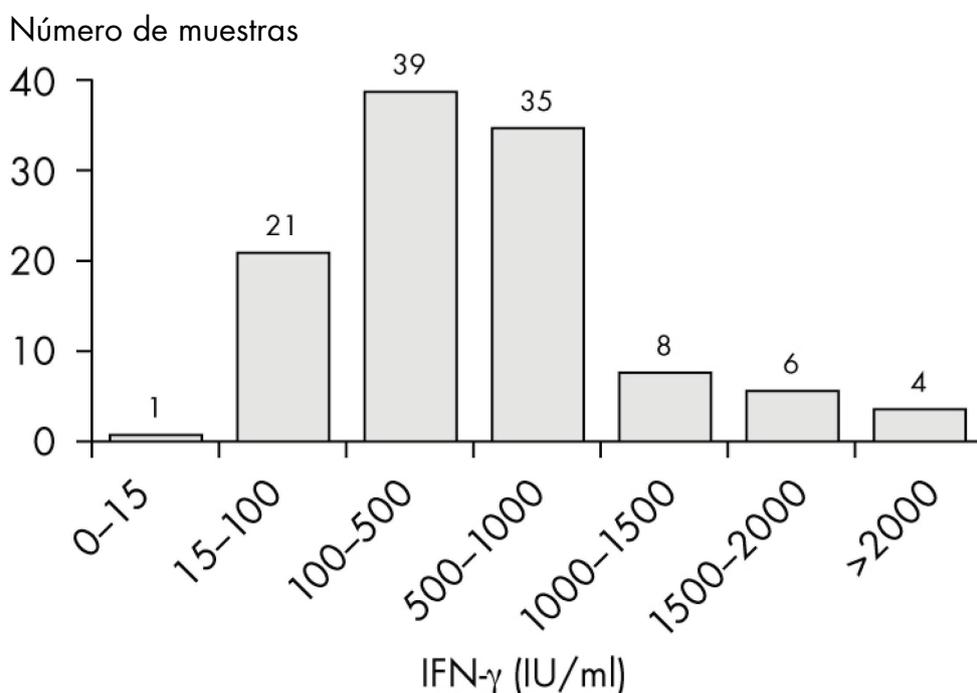


Ilustración 5. Distribución de respuestas del IFN- γ a QFM en sujetos aparentemente sanos (n = 114; mediana = 400,5 UI/ml)

Respuestas al QFM en pacientes trasplantados de órganos sólidos

El ensayo QFM se evaluó mediante un estudio transversal observacional de pacientes trasplantados de órganos sólidos (4). El estudio incluía: 212 sujetos sanos con un subgrupo de 30 sujetos para el grupo de control con igual edad y sexo, 30 pacientes pretrasplantados, 18 pacientes de postrasplante temprano (66 muestras; tiempo medio de postrasplante = 21 días) y 11 pacientes de postrasplante tardío (tiempo medio de postrasplante = 2.290 días). La producción media de IFN- γ fue de 555,2 UI/ml en el grupo de control sano y de 614,6 UI/ml en los grupos de control de igual edad y sexo. La producción media de IFN- γ fue significativamente menor tanto en pacientes del periodo pretrasplante (IFN- γ = 89,3 UI/ml) como en pacientes del periodo postrasplante temprano (IFN- γ = 3,76 UI/ml) en comparación con los grupos de control con igual sexo y edad ($p < 0,001$). Se observó restauración de la función inmunitaria en pacientes del periodo postrasplante tardío (media de IFN- γ = 256,1 UI/ml), restauración significativamente superior que en pacientes del periodo postrasplante temprano ($p < 0,05$). El estudio apunta la posibilidad de utilizar QFM como método para valorar la función inmunitaria mediada por células en la población trasplantada de órganos sólidos y con estado de inmunosupresión.

Características del rendimiento del ensayo

Se ha demostrado la linealidad del ensayo QFM ELISA mediante la colocación aleatoria de 5 réplicas de 11 pools de plasma de concentraciones conocidas de IFN- γ en la placa de ELISA. La línea de regresión lineal presenta una pendiente de $1,002 \pm 0,011$ y un coeficiente de correlación de 0,99 (ilustración 6).

El límite de detección del QFM ELISA es de 0,065 UI/ml, y no se ha demostrado el efecto gancho a dosis altas (prozona) con concentraciones de IFN- γ de hasta 10.000 UI/ml.

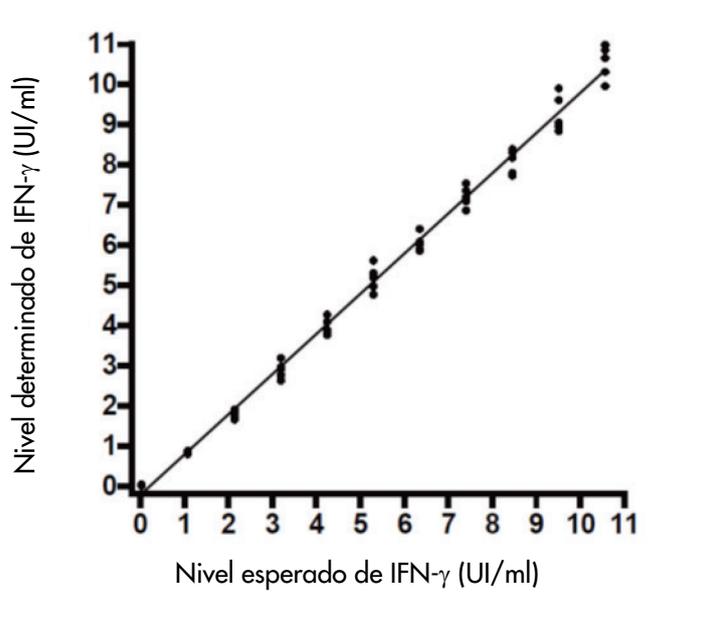


Ilustración 6. Perfil de linealidad de QFM ELISA determinado mediante el análisis de 5 réplicas de 11 muestras de plasma con concentraciones conocidas de IFN- γ .

La reproducibilidad del ensayo QFM (fase 1) se determinó con muestras de sangre procedentes de 20 sujetos sanos. Se valoraron tres usuarios distintos, lotes de QFM LyoSphere y conjuntos de equipos. El coeficiente promedio de la variación de los niveles de respuesta del IFN- γ determinados mediante QFM ELISA en los tres lotes de QFM LyoSpheres y las tres condiciones fue del 22,22% (IC del 95%: 17,20-27,25).

La repetibilidad del ensayo QFM (fase 1) se valoró a partir de la medición de la variabilidad obtenida de 5-6 estimulaciones con QFM LyoSphere de sangre del mismo donante en 14 sujetos. El promedio del coeficiente de variación entre los 14 sujetos analizados fue del 14,7% (IC del 95%: 10,2-19,2). El %CV para sujetos individuales fue inferior al 30%.

La reproducibilidad del ensayo QFM ELISA (fase 2) se estimó mediante el análisis de 20 muestras de plasma con diferentes concentraciones de IFN- γ en réplicas de 3, en 3 laboratorios, en 3 días no consecutivos y con 3 usuarios distintos. Todo ello supone un total 27 análisis por muestra, en 9 series analíticas distintas. Una de las muestras era un control de nulos con una concentración de IFN- γ calculada de 0,08 UI/ml (IC del 95%: 0,07-0,09). Para las 19 muestras de plasma restantes, el rango de concentraciones osciló entre 0,33 (IC del 95%: 0,31-0,34) y 7,7 UI/ml (IC del 95%: 7,48-7,92).

La estimación de la imprecisión dentro de la misma serie analítica o intraensayo se realizó con el promedio de los valores % CV de cada muestra de plasma con IFN- γ de cada placa para análisis ($n = 9$); el resultado para la imprecisión osciló entre un 4,1 y un 9,1% CV. El promedio dentro del %CV de una misma serie (\pm IC del 95%) fue de $6,6 \pm 0,6\%$. El promedio del plasma con cero IFN- γ fue de 14,1% CV.

La imprecisión total o interensayo se determinó mediante comparación de las 27 concentraciones calculadas de IFN- γ para cada muestra de plasma. La imprecisión interensayo osciló entre un 6,6 y un 12,3% CV. El promedio global de % CV (\pm IC del 95%) fue de $8,7 \pm 0,7\%$. El plasma con cero IFN- γ presentó un 26,1% CV. Cabe esperar este nivel de variación debido a la baja concentración calculada de IFN- γ , y la variación relativa a una estimación baja de concentración siempre será mayor que la de concentraciones superiores.

Información técnica

Muestras de plasma coaguladas

Si en las muestras de plasma almacenadas durante mucho tiempo aparecen coágulos de fibrina, centrifúguelas para sedimentar los coágulos y facilitar así el pipeteado del plasma.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Si desea obtener más información, también puede consultar la información técnica que encontrará en: www.QuantiFERON.com. Consulte la contracubierta para obtener la dirección de contacto.

Resolución de problemas para ELISA

Coloración indeterminada

Posible causa	Solución
a) Placa mal lavada	Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl/pocillo con tampón de lavado. Según el lavador utilizado, puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado. Deje escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
b) Contaminación cruzada entre los pocillos de ELISA	Extreme la precaución durante el pipeteado y la mezcla de la muestra para minimizar el riesgo.
c) Kit o componentes caducados	Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100x concentrado se utilizan durante los 3 meses siguientes a la fecha de reconstitución.
d) Solución enzimática de sustrato contaminada	Deseche el sustrato si presenta una coloración azul. Utilice depósitos de reactivos limpios.
e) Plasma mezclado en tubos para QFM antes de su recogida	Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de extraer la muestra. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.

Valores bajos de densidad óptica para los estándares

Posible causa	Solución
a) Error de dilución del estándar	Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, siguiendo las instrucciones de este prospecto.

Resolución de problemas para ELISA

- | | |
|--|---|
| b) Error de pipeteado | Compruebe que las pipetas estén calibradas y utilícelas según las instrucciones del fabricante. |
| c) Temperatura de incubación demasiado baja | La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente (entre 17 °C y 27 °C). |
| d) Tiempo de incubación demasiado corto | La incubación de la placa con el conjugado, los estándares y las muestras debe durar 120 ± 5 minutos. La incubación de la solución enzimática de sustrato en la placa debe ser de 30 minutos. |
| e) Filtro incorrecto para la lectura de placas | La placa debe leerse a 450 nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650 nm. |
| f) Reactivos demasiado fríos | Todos los reactivos, a excepción del conjugado 100x concentrado, deben estar a temperatura ambiente antes de empezar el ensayo. Este paso puede tardar una hora aproximadamente. |
| g) Kit o componentes caducados | Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100x concentrado se utilizan durante los 3 meses siguientes a la fecha de reconstitución. |

Ruido de fondo elevado

Posible causa

Solución

- | | |
|--|---|
| a) Placa mal lavada | Lave la placa al menos 6 veces con 400 μ l/pocillo con tampón de lavado. Según el lavador utilizado, puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado. Deje escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo. |
| b) Temperatura de incubación demasiado elevada | La incubación del ELISA deberá realizarse a temperatura ambiente (entre 17 y 27 °C). |

Resolución de problemas para ELISA

- | | |
|--|---|
| c) Kit o componentes caducados | Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100x concentrado se utilizan durante los tres meses siguientes a la fecha de reconstitución. |
| d) Solución enzimática de sustrato contaminada | Deseche el sustrato si presenta una coloración azul. Utilice depósitos de reactivos limpios. |

Curva estándar no lineal y variabilidad entre duplicados

Posible causa	Solución
a) Placa mal lavada	Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl/pocillo con tampón de lavado. Según el lavador utilizado, puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado. Deje escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
b) Error de dilución del estándar	Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar, siguiendo las instrucciones de este prospecto.
c) Mezclado mal hecho	Mezcle bien los reactivos mediante inversión o agitándolos con cuidado antes de dispensarlos en la placa.
d) Técnica de pipeteado no fluida o interrupción durante la preparación del ensayo	Las muestras deben mezclarse con los estándares de forma fluida, sin interrupciones. Todos los reactivos deben estar preparados antes de comenzar el ensayo.

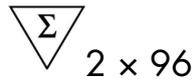
QIAGEN y sus distribuidores ponen a su disposición de forma gratuita toda la información del producto y las guías técnicas. También puede visitar www.QuantiFERON.com.

Referencias

En Gnowee, la biblioteca de referencias QuantiFERON disponible en www.gnowee.net, encontrará una lista completa de referencias sobre el ensayo QFM.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Sanders.
2. Fernández-Ruiz, M., Kumar, D., and Humar, A. (2014) Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin. Transl. Immunol.* 3, e12.
3. Sood, S. and Testro, A.G. (2014) Immune monitoring post liver transplant. *World J. Transplant.* 4, 30.
4. Sood, S. (2014) A novel biomarker of immune function and initial experience in a transplant population. *Transpl. J.* 97, e50.

Símbolos



Suficiente para la preparación de 2 x 96 muestras



Fabricante legal



Símbolo de marcado CE-IVD



Para uso de diagnóstico in vitro



Código de lote



Número de referencia



Fecha de caducidad



Limitación de temperatura



Consultar las instrucciones de uso



No reutilizar



Mantener alejado de la luz solar



Representante autorizado en la Comunidad Europea

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, llame al número gratuito 00800-22-44-6000, visite el Centro de servicio técnico en www.qiagen.com/contact o póngase en contacto con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN (consulte la contraportada o visite el sitio www.qiagen.com).

Resumen del procedimiento

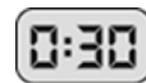
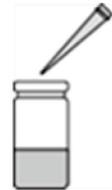
Fase 1: incubación de la sangre

1. Recoja la sangre del paciente en un tubo de recogida de sangre para QFM o en un tubo de recogida de sangre con heparina de litio. Etiquete los tubos con los detalles del paciente y la hora de recogida de la sangre y transpórtelos al laboratorio a temperatura ambiente durante las 8 horas posteriores a la extracción.
 - a. Si la sangre se recoge en un tubo de recogida de sangre con heparina de litio, transfiera una alícuota sanguínea de 1 ml a un tubo de recogida de sangre para QFM y etiquete el tubo con los detalles del paciente y la hora de recogida de la sangre.
2. Añada 1 QFM LyoSphere a cada tubo de recogida de sangre para QFM que contenga 1 ml de sangre, disuelva el sedimento LyoSphere y luego incube los tubos lo antes posible (durante las 8 horas posteriores a la recogida de la sangre) en posición vertical durante 16-24 horas a 37 °C.
3. Después de la incubación, centrifugue los tubos durante 15 minutos a $2.000-3.000 \times g$ (RCF) para separar el plasma de los glóbulos rojos.
4. Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de extraer la muestra. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.



Fase 2: ELISA para IFN- γ

1. Equilibrar los componentes de ELISA, excepto el concentrado 100x del conjugado, a temperatura ambiente al menos durante 60 minutos.
2. Reconstituya el estándar del kit hasta 8,0 UI/ml con agua destilada o desionizada. Prepare 4 diluciones de estándar.
3. Reconstituya el conjugado 100x concentrado liofilizado con agua desionizada o destilada.
4. Prepare conjugado listo para usar con diluyente verde y añada 50 μ l a cada uno de los pocillos.
5. Añada 50 μ l de muestras de plasma para analizar (sin diluir y diluciones de 1:10 y 1:100 según corresponda) y 50 μ l de estándares a los pocillos correspondientes. Mezcle con un agitador.
6. Deje incubar durante 120 ± 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Lave los pocillos al menos 6 veces con 400 μ l/pocillo con tampón de lavado.
8. Añada a los pocillos 100 μ l de solución enzimática de sustrato. Mezcle con un agitador.
9. Deje incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Añada a los pocillos 50 μ l de solución enzimática de parada. Mezcle con un agitador.
11. Lea los resultados a 450 nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650 nm.
12. Analice los resultados.



Notas

Modificaciones importantes

En la siguiente tabla se resumen los cambios significativos que incluye esta edición del prospecto de ELISA QuantiFERON Monitor® (QFM®):

Apartado	Página	Modificaciones
Precauciones	11	Nueva información sobre el SGA (Sistema Globalmente Armonizado)
Precauciones	12	Se añadieron instrucciones de seguridad relacionadas con los viales que tienen tapones de encapsulado.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (Grupo QIAGEN); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLyph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Acuerdo de licencia limitada para el kit QuantiFERON Monitor

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario de los kits aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

