

Febrero 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Prospecto



Prueba de IFN- γ en sangre para medir las respuestas a los antígenos peptídicos del citomegalovirus humano

IVD Para uso diagnóstico in vitro



REF 0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, EE. UU. +1-800-426-8157

EC **REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANIA

1075110ES Rev. 05



www.QuantiFERON.com



Contenido

Uso previsto	5
Resumen y explicación	5
Principio del procedimiento	6
Tiempo necesario para la realización del ensayo	8
Materiales suministrados	9
Contenido del kit.....	9
Materiales requeridos pero no suministrados	10
Advertencias y precauciones.....	10
Información de seguridad.....	12
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	13
Obtención y manipulación de muestras	14
Procedimiento	17
Fase 1: Incubación de la sangre y obtención de plasma	17
Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA para IFN- γ humano	18
Cálculos e interpretación del ensayo.....	23
Generación de curva estándar (si no se utiliza el software de análisis de QF-CMV)	23
Control de calidad del ensayo	24
Interpretación de los resultados	25
Limitaciones	26
Valores esperados	26

Características de rendimiento	30
Rendimiento clínico.....	30
Umbral del ensayo	31
Estudios clínicos	31
Especificidad	32
Sensibilidad.....	32
Estudios que destacan la utilidad clínica	33
Directrices internacionales de consenso sobre la conducta aplicable al citomegalovirus en el trasplante de vísceras macizas	38
Características del rendimiento del ensayo	39
Información técnica.....	41
Resultados indeterminados	41
Muestras de plasma coaguladas	41
Guía de resolución de problemas.....	42
Referencias	44
Símbolos	46
Información de contacto	47
Procedimiento de prueba ELISA abreviado	48
Fase 1: Incubación de sangre	48
Fase 2: ELISA para IFN- γ	48
Historial de revisiones del manual	51

Uso previsto

QuantifERON-CMV ELISA (QF-CMV) es un ensayo *in vitro* que utiliza una mezcla de peptídicos que simula las proteínas del citomegalovirus (cytomegalovirus, CMV) humano para estimular las células presentes en sangre heparinizada. La detección del interferón gamma (interferon-gamma, IFN- γ) mediante el ensayo de inmunoadsorción enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) se utiliza para cuantificar *in vitro* las respuestas a estos antígenos peptídicos asociadas al control inmunitario de la infección por el CMV. La pérdida de esta función inmunitaria puede asociarse al desarrollo de enfermedad por el CMV. El uso previsto del ensayo QF-CMV es realizar un seguimiento del nivel de inmunidad anti-CMV del paciente.

El ensayo QF-CMV no es una prueba para determinar la infección por el CMV y no debe utilizarse para descartar dicha infección.

Resumen y explicación

El CMV es un virus herpético que infecta al 50-85 % de los adultos de la población. La infección por el CMV es una complicación frecuente de la inmunodepresión, especialmente después de un trasplante, y puede contribuir de manera significativa a la morbilidad y mortalidad en los receptores de trasplantes. Los tratamientos inmunodepresores utilizados actualmente para prevenir el rechazo de un órgano trasplantado tienen efectos nocivos sobre los linfocitos T y sobre las respuestas de inmunidad celular (cell-mediated immune, CMI), dando lugar a un aumento de la propensión a contraer infecciones virales después del trasplante. La importancia de la función de los linfocitos T en la supresión de la replicación del CMV también se refleja en el hecho de que los linfocitos T citotóxicos (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) CD8⁺ específicos del CMV pueden proporcionar protección frente a la patogenia asociada a virus. El recuento de CTL CD8⁺ específicos del CMV en pacientes inmunodeprimidos y la producción de IFN- γ pueden ser factores pronósticos del riesgo de

contraer la enfermedad por el CMV. La producción de IFN- γ puede ser un marcador indirecto funcional para la identificación de CTL específicos del CMV.

QF-CMV es un ensayo para estudiar las respuestas de CMI a antígenos peptídicos que simulan proteínas del CMV. Los péptidos del CMV tienen como diana los linfocitos T CD8⁺, incluidos los haplotipos HLA de clase I A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 y Cw6 (A30, B13), que abarcan > 98 % de la población humana. Las personas infectadas por el CMV suelen tener en la sangre linfocitos CD8⁺ que reconocen estos antígenos. Este proceso de reconocimiento implica la generación y secreción de la citocina, IFN- γ . La detección y posterior cuantificación de IFN- γ constituyen la base de este ensayo.

Principio del procedimiento

El ensayo QF-CMV se realiza en dos etapas. En la primera se recoge sangre en cada uno de los tubos de recogida de sangre QF-CMV: el tubo de control nulo, el tubo de antígenos del CMV y el tubo de mitógeno.

El tubo de mitógeno se utiliza en el ensayo QF-CMV como control positivo. Esto se justifica sobre todo en los casos en que existen dudas respecto al estado inmunológico del individuo. El tubo de mitógeno también puede servir como control para asegurar una correcta manipulación e incubación de la sangre.

Los tubos deben incubarse a 37 °C lo antes posible en las 16 horas siguientes a la recogida. Tras un período de incubación de 16 a 24 horas, se centrifugan los tubos, se extrae el plasma y se mide la cantidad de IFN- γ (IU/ml) con el kit QF-CMV ELISA.

La cantidad de IFN- γ presente en las muestras de plasma de los tubos de antígenos del CMV y de mitógeno a menudo puede estar por encima de los límites superiores de la mayoría de los lectores de ELISA, incluso cuando los pacientes presentan una inmunodepresión

moderada. Para los resultados cualitativos, utilice los valores calculados para el plasma puro. Para los resultados cuantitativos, para los que se requieren valores de unidades internacionales por mililitro (IU/ml) reales, las muestras de plasma deben diluirse a 1/10 en diluyente verde y analizarse mediante ELISA junto con plasma puro.

Nota: Para las muestras que se encuentren dentro del intervalo del kit QF-CMV ELISA (es decir, hasta 10 IU/ml) debe utilizarse el resultado obtenido con la muestra de plasma puro. Para esas concentraciones de IFN- γ , los valores obtenidos con la dilución de 1/10 de las muestras de plasma pueden ser inexactos.

Una prueba se considera reactiva para una respuesta de IFN- γ cuando la lectura del tubo de antígenos del CMV es significativamente superior al valor de IU/ml de IFN- γ del tubo de medición de nulos. La muestra de plasma estimulado con mitógeno sirve de control positivo de IFN- γ para cada muestra analizada. Una respuesta baja al mitógeno indica un resultado indeterminado cuando una muestra de sangre también presenta una respuesta no reactiva a los antígenos del CMV. Este patrón puede producirse en situaciones de linfocitos insuficientes, disminución de la actividad de los linfocitos por manipulación incorrecta de las muestras, llenado/mezclado incorrectos del tubo de mitógeno o incapacidad de los linfocitos del paciente para producir IFN- γ , como en el caso de los pacientes que se han sometido recientemente a un trasplante. La muestra de control nulo permite realizar un ajuste en función del IFN- γ inespecífico o de fondo de las muestras de sangre. El nivel de IFN- γ del tubo de medición de nulos se resta del nivel de IFN- γ del tubo de antígenos del CMV y del tubo de mitógeno (en el apartado "Interpretación de los resultados", en la página 25 de este prospecto del envase, se presenta un resumen de cómo interpretar los resultados del ensayo QF-CMV).

Tiempo necesario para la realización del ensayo

A continuación se presenta la estimación del tiempo necesario para realizar el ensayo QF-CMV; también se indica el tiempo de análisis conjunto de varias muestras:

Tubos de sangre para la incubación a 37 °C:	16-24 horas
ELISA:	Aprox. 3 horas para una placa de ELISA Menos de 1 hora de trabajo Añadir 10-15 minutos para cada placa adicional

Materiales suministrados

Contenido del kit

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
N.º de referencia	0192-0301
Número de preparaciones	1
QuantIFERON Nil Control (Tubo de medición de nulos QuantIFERON, tapa gris)	1 tubo
QuantIFERON CMV Antigen (Antígeno del CMV QuantIFERON, tapa azul)	1 tubo
QuantIFERON Mitogen Control (Tubo de control de mitógeno QuantIFERON, tapa morada)	1 tubo
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Prospecto de los tubos de recogida de sangre QF-CMV)	1

QuantIFERON-CMV ELISA	
N.º de referencia	Kit ELISA para 2 placas 0350-0201
Tiras de microplacas (12 x 8 pocillos) revestidas con anticuerpos monoclonales murinos anti-humano IFN- γ	2 conjuntos de tiras de microplacas para 12 x 8 pocillos
Human IFN- Standard, lyophilized (Estándar de IFN- γ humano y liofilizado, contiene IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, 0,01 % p/v de timerosal)	1 x vial (8 IU/ml después de su reconstitución)
Green Diluent (Diluyente verde, contiene caseína bovina, suero de ratón normal, 0,01% p/v de timerosal)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Conjugado 100x concentrado y liofilizado, IFN- γ HRP murino anti-humano, contiene 0,01 % p/v de timerosal)	1 x 0,3 ml
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' tetrametilbencidina)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solución enzimática de parada contiene 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (Prospecto de QF-CMV ELISA)	1

* Contiene ácido sulfúrico. Consulte la página 10 para conocer las precauciones necesarias.

Materiales requeridos pero no suministrados

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 sobre seguridad (safety data sheets, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Incubador a 37 °C; no se necesita CO₂
- Pipetas calibradas de volumen variable para dispensación de 10-1000 µl con puntas desechables
- 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 con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm a 650 nm

Advertencias y precauciones

Para uso 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 SDS correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety donde también podrá encontrar, consultar e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN®.

PRECAUCIÓN



Manipule la sangre humana como material potencialmente infeccioso. Siga las correspondientes directrices relativas a la manipulación de sangre.

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

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



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

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

QuantiFERON Green Diluent



Contiene: 5-hidroxi-1-(4-sulfonil)-4-(4-sulfonilazo)pirazol-3-carboxilato de trisodio. Contiene: tartrazina. Atención! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contiene: ProClin 300. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Evitar su liberación al medio ambiente.

Información de seguridad

Más información

- Las desviaciones respecto del prospecto del envase del ensayo QF-CMV pueden generar resultados erróneos. Lea las instrucciones atentamente antes de realizar el ensayo.
- No utilice el kit si algún frasco de reactivo muestra signos de estar dañado o perder líquido.
- **Importante:** Inspeccione los viales antes de utilizarlos. No utilice viales del conjugado o del estándar de IFN- γ 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: Use un destaponador de vial para abrir los viales de conjugado o estándar de IFN- γ a fin de minimizar el riesgo de lesiones producidas por las tapas metálicas de rosca.

- No mezcle ni utilice tiras de microplacas, estándar de IFN- γ humano, diluyente verde o conjugado 100x concentrado de diferentes lotes del kit QF-CMV. 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 y las muestras biológicas de acuerdo con la normativa local, regional y nacional correspondiente.
- No utilice los tubos de recogida de sangre QF-CMV ni los kits QF-CMV ELISA después de la fecha de caducidad.
- Compruebe que el equipo del laboratorio (por ejemplo, el lavador y el lector de placas) haya sido calibrado y validado para el uso.

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Tubos de recogida de sangre

- Conserve los tubos de recogida de sangre QF-CMV a 4-25° C.
- Los tubos de recogida de sangre QF-CMV se deben encontrar a una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C en el momento de llenarlos de sangre.
- El período de validez sin abrir de los tubos de recogida de sangre QF-CMV es de un máximo de 15 meses desde la fecha de fabricación si se conservan a una temperatura comprendida entre 4 y 25° C.

Reactivos del kit ELISA

- Guarde el kit a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
- Proteja en todo momento la solución enzimática de sustrato de la luz directa del sol.

Reactivos reconstituidos sin utilizar

Si desea ver instrucciones acerca de cómo reconstituir los reactivos, consulte el apartado “Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA para IFN- γ humano” (pasos 3 y 5 en las páginas 18 y 20).

- El estándar reconstituido de IFN- γ humano 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 de IFN- γ humano.
- 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.
- El tampón de lavado listo para el uso puede almacenarse a temperatura ambiente (22°C \pm 5 °C) un máximo de 2 semanas.

Obtención y manipulación de muestras

El ensayo QF-CMV utiliza los siguientes tubos de recogida de sangre:

- Tubo de medición de nulos (tapa gris)
- Antígenos del CMV (tapa azul)
- Tubo de control de mitógeno (tapa morada)

Los antígenos se secan y adhieren a la pared interior del tubo de recogida de sangre, por lo que es imprescindible mezclar cuidadosamente el contenido de los tubos con la sangre. Los tubos deben colocarse en un incubador a 37 °C lo antes posible en las 16 horas siguientes a la recogida.

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

1. Para cada sujeto, obtenga 1 ml de sangre mediante venopunción directamente en uno de los tubos de recogida para QF-CMV. Esta operación debería ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado.

Los tubos de recogida de sangre QF-CMV se pueden utilizar hasta los 810 m de altitud.

Si se utilizan tubos de recogida de sangre QF-CMV a una altitud superior a los 810 metros, o si se obtienen volúmenes de muestras más reducidos, la sangre se puede recoger mediante una jeringa y transfiriendo después 1 ml de sangre a cada uno de los tres tubos. Por razones de seguridad, el método óptimo para ello es retirar la aguja de la jeringa, asegurarse de que se siguen los procedimientos de seguridad apropiados, retirar las tapas de los tres tubos de recogida de sangre QF-CMV y añadir 1 ml de sangre a cada uno de ellos (hasta la marca negra existente en el lateral de la etiqueta del tubo). Vuelva a colocar los taponeros y mezcle tal como se describe más abajo. Dado que la extracción de sangre en los tubos de 1 ml es relativamente lenta, mantenga el

tubo acoplado a la aguja durante 2-3 segundos una vez que el tubo parezca estar completamente lleno para asegurarse de extraer el volumen correcto.

La marca negra del lateral de los tubos indica un volumen de llenado de 1 ml. Los tubos de recogida de sangre QF-CMV se han validado para volúmenes de 0,8 ml a 1,2 ml. Si el nivel de sangre de un tubo no está cerca de la marca indicativa, debería extraerse una muestra de sangre nueva.

Si se utiliza una aguja de mariposa para extraer sangre, debe usarse un tubo de "purgado" para asegurarse de que este se llene de sangre antes de utilizar los tubos de recogida de sangre QF-CMV.

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 a los tubos de recogida de sangre QF-CMV. Utilice solo heparina de litio como anticoagulante sanguíneo, ya que los demás anticoagulantes interfieren en el ensayo. Llene un tubo de recogida de sangre (volumen mínimo 5 ml) y mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo varias veces para disolver la heparina. Esta operación debería ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado. La sangre se debe mantener a temperatura ambiente (entre $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de transferirla a los tubos de recogida de sangre QF-CMV para su incubación, que debe iniciarse durante las 16 horas siguientes a la extracción de la sangre.

2. Inmediatamente después de llenar los tubos de recogida de sangre QF-CMV, agítelos 10 veces aplicando únicamente la fuerza necesaria para que toda la superficie interna del tubo esté cubierta de sangre a fin de solubilizar el antígeno en las paredes del mismo. Los tubos se deben encontrar a una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C en el momento de llenarlos de sangre.

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

Si la sangre se extrae en un tubo con heparina de litio, mezcle las muestras uniformemente invirtiendo con cuidado el tubo antes de transferirlas a los tubos de recogida de sangre QF-CMV. Asegúrese de mezclar bien la sangre invirtiendo con

cuidado los tubos inmediatamente antes de la dispensación. Dispense alícuotas de 1 ml (una por cada tubo de recogida de sangre QF-CMV) en el tubo de medición de nulos, de antígeno de CMV y de mitógeno adecuado. La mejor forma de realizar este procedimiento debería ser de forma aséptica y tomando las precauciones oportunas para quitar los tapones de los tres tubos de recogida de sangre QF-CMV y añadir 1 ml de sangre a cada uno (hasta llegar a la marca negra del lateral de la etiqueta del tubo). Vuelva a colocar los tapones y mezcle tal como se ha descrito más arriba.

3. Coloque las etiquetas correspondientes en los tubos.

Asegúrese de que cada tubo (medición de nulos, antígenos CMV y mitógenos) se pueda identificar por su etiqueta o por otros medios.

4. Tras el llenado, la agitación y el etiquetado, coloque los tubos en el incubador a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ lo antes posible, y siempre durante las 16 horas siguientes a la obtención de la sangre. Antes de la incubación, mantener los tubos a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). No refrigere ni congele las muestras de sangre.

Procedimiento

Fase 1: Incubación de la sangre y obtención de plasma

1. Incube los tubos EN POSICIÓN VERTICAL a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante un periodo comprendido entre 16 y 24 horas. El incubador no requiere CO_2 ni humidificación.
Importante: Si la sangre no se coloca en el incubador inmediatamente después de su obtención, vuelva a mezclar los tubos invirtiéndolos 10 veces antes de la incubación.
Tras la incubación, los tubos de recogida de sangre pueden conservarse entre 4 y 27 °C durante 3 días antes de centrifugarlos.
2. Después de la incubación de los tubos a 37 °C, centrifúgelos durante 15 minutos a una velocidad comprendida entre 2000 y 3000 RCF (g) para obtener el plasma. El tapón de gelatina separa las células del plasma. Si esto no ocurre, vuelva a centrifugar los tubos.
Es posible obtener el plasma sin centrifugar, pero es necesario extremar la precaución al máximo para retirar el plasma sin alterar las células.
3. 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.
Importante: La muestra de plasma solo se debe extraer usando una pipeta.
Las muestras de plasma pueden cargarse directamente desde los tubos de recogida de sangre centrifugados en la placa de QF-CMV ELISA, incluso cuando se utilizan estaciones de trabajo de ELISA automatizadas.
Las muestras de plasma pueden almacenarse en tubos de recogida de sangre centrifugados QF-CMV durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C o, después de la extracción del plasma, por debajo de -20°C (preferiblemente a menos de -70 °C) durante periodos más largos.
Se necesita un volumen mínimo de 150 µl de plasma para garantizar la idoneidad de las muestras.

Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA para IFN- γ humano

Consulte el apartado “Contenido del kit”, en la página 9 y el apartado “Materiales requeridos pero no suministrados” en la página 10 para obtener información sobre los materiales necesarios para realizar el ensayo ELISA.

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 de la placa de ELISA innecesarias del bastidor, vuelva a cerrar la bolsita de aluminio y colóquela de nuevo en la nevera donde quedará almacenada hasta que se necesite.

Deje al menos una tira para los estándares de QF-CMV ELISA y tiras suficientes para el número de pacientes que vaya a analizar. Después, guarde el bastidor y la tapa para usarlos con el resto de las tiras.

3. Reconstituya el estándar IFN- γ añadiendo el volumen de agua desionizada o destilada que se indica en la etiqueta del frasco del vial. Mezcle suavemente para reducir al mínimo la formación de espuma y asegúrese de que la resolubilización es completa. Después de reconstituir el estándar de IFN- γ con el volumen correcto se obtiene una solución con una concentración de 8,0 IU/ml.

Nota: El volumen para reconstitución del estándar de IFN- γ humano (estándar del kit) varía de un lote a otro.

Utilice el estándar reconstituido para preparar una serie de dilución de cuatro concentraciones de IFN- γ en diluyente verde (Green Diluent, GD) (Ilustración 1, en la próxima página) El S1 (estándar 1) contiene 4,0 IU/ml, el S2 (estándar 2) contiene 1,0 IU/ml, el S3 (estándar 3) contiene 0,25 IU/ml y el S4 (estándar 4) contiene 0 IU/ml (solamente GD). Los estándares deben analizarse al menos por duplicado. Prepare diluciones nuevas del estándar del kit para cada sesión de ELISA.

Ejemplo de procedimiento para estándares duplicados

Ejemplo de procedimiento para estándares duplicados	
A	Etiquete cuatro tubos: S1, S2, S3, S4
B	Añada 150 μ l de GD a S1, S2, S3 y S4
C	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	El GD por sí solo sirve como estándar cero (S4)

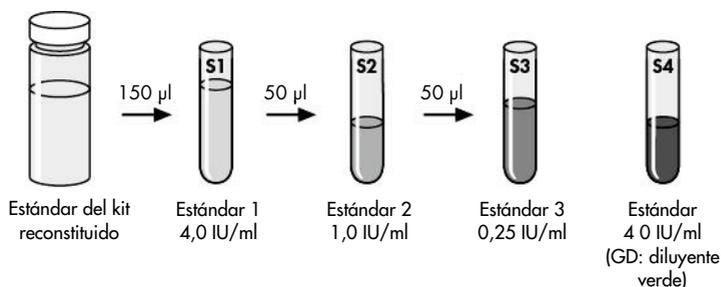


Ilustración 1. Preparación de la curva estándar mediante dilución en serie.

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 (consulte Tabla 1 en la página siguiente).

Mezcle bien pero con suavidad para evitar la formación de espuma.

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 listo para el uso

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 durante más de 24 horas antes del ensayo antes de verterlas en el pocillo ELISA.

Importante: Si las muestras de plasma se añaden directamente desde los tubos de recogida de sangre QF-CMV centrifugados, evite mezclar el plasma. Siempre tenga cuidado de no interferir con el material de la superficie del gel.

6. Si se requieren resultados cuantitativos, diluya el plasma de los tubos de antígenos del CMV y de mitógeno a 1/10 en diluyente verde (10 µl de plasma + 90 µl de GD). El plasma del tubo de medición de nulos no debe diluirse.

Se recomienda analizar las siguientes muestras en paralelo:

Nulos, antígeno CMV, mitógeno, antígeno CMV (1/10) y mitógeno (1/10)

No obstante, el software de análisis QuantiFERON-CMV también admite las siguientes opciones de muestras de pacientes:

Nulos, antígeno CMV y mitógeno

Nulos, antígeno CMV (1/10) y mitógeno (1/10)

Nulos, antígeno CMV, mitógeno y antígeno CMV (1/10)

Nulos, antígeno CMV (1/10) y mitógeno

7. Añada 50 µl de conjugado recién preparado listo para usar a los pocillos de ELISA mediante una pipeta multicanal.
8. Añada 50 µl de las muestras de plasma del ensayo a los pocillos correspondientes. Por último, añada 50 µl de cada uno de los estándares 1 a 4 a los pocillos correspondientes. Los estándares deben analizarse por duplicado como mínimo.
9. Tape la placa ELISA y mezcle bien el conjugado y las muestras de plasma/estándares durante 1 minuto en un agitador de microplacas a 500-1000 rpm. Evite las salpicaduras.
10. Cubra la placa ELISA con una tapa e incúbela a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 120 ± 5 minutos.

No exponga las placas a la luz directa del sol durante la incubación. Una desviación respecto del rango de temperatura especificado puede dar lugar a resultados erróneos.
11. Durante la incubación, prepare el tampón de lavado listo para utilizar. Diluya una parte de tampón de lavado concentrado 20x 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.
12. Cuando finalice la incubación de la placa ELISA, lave los pocillos con 400 µl de tampón de lavado listo para utilizar para al menos seis ciclos. Se recomienda utilizar un lavador de placas automático.

Importante: 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 hasta el borde antes de iniciar cada ciclo de lavado. Se recomienda un período de remojo de al menos 5 segundos entre cada ciclo.

Añada 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 que no deje pelusas 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 la placa y mezcle bien con un agitador de microplacas durante 1 minuto a 500-1000 rpm con un agitador de microplacas.
 14. Tape cada una de las placas e incúbelas a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos.
No exponga las placas a la luz directa del sol durante la incubación.
 15. Luego de 30 minutos de incubación, añada 50 µl de solución enzimática de parada a cada pocillo en el mismo orden en el que se añadió el sustrato y mezcle bien a una velocidad entre 500 y 1000 rpm con un agitador de microplacas.
 16. Mida la densidad óptica (Optical Density, OD) de cada pocillo en los 5 minutos siguientes a la detención de la reacción utilizando un lector de microplacas con un filtro de 450 nm y un filtro de referencia de 620 nm a 650 nm. Los valores de OD se utilizan para calcular los resultados.

Cálculos e interpretación del ensayo

El software de análisis QuantiFERON-CMV de QIAGEN, para el análisis de los datos brutos y el cálculo de los resultados, está disponible en www.QuantiFERON.com. Asegúrese de utilizar la versión más actualizada del software de análisis de QF-CMV.

El software 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" en la página 25. El software indica la dilución más baja capaz de generar un resultado dentro del rango del ensayo QF-CMV ELISA, teniendo en cuenta el factor de dilución.

Como alternativa al uso del software de análisis de QF-CMV los resultados pueden determinarse por medio del método siguiente.

Generación de curva estándar (si no se utiliza el software de análisis de QF-CMV)

Determine los valores OD 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 OD media (eje y) con relación al $\log_{(e)}$ de la concentración de IFN- γ en los estándares en IU/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 (IU/ml) en cada una de las muestras de plasma, utilizando para ello el valor de OD 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 usar estos paquetes para calcular el análisis de regresión, el coeficiente de variación (coefficient of variation, %CV) de los estándares y el coeficiente de correlación (r) de la curva patrón.

El resultado indicado debería corresponder a la dilución más baja capaz de generar un resultado dentro del rango del ensayo QF-CMV ELISA (lo que garantiza de que el factor de dilución se tiene en cuenta cuando corresponda).

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 de OD medio para el estándar 1 debe ser $\geq 0,600$.
- El %CV de los valores OD de las réplicas del estándar 1 y el estándar 2 debe ser $\leq 15\%$.
- Los valores de OD de los duplicados de los estándares 3 y 4 no deben presentar una variación superior a 0,040 unidades de densidad óptica respecto de 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 software de análisis de QF-CMV 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 de OD medio para el estándar cero (diluyente verde) debería ser $\leq 0,150$. Si el valor de OD medio es $> 0,150$, debería revisarse el procedimiento de lavado de placas.

Interpretación de los resultados

Los resultados del ensayo QuantiFERON-CMV se interpretan aplicando los criterios de Tabla 2.

Tabla 2. Interpretación de los resultados de QuantiFERON-CMV

Nulo (IU/ml)	CMV menos Nulo (IU/ml)	Mitógeno menos Nulo (IU/ml)*	Resultado del ensayo QF-CMV	Informe/Interpretación
≤8,0	≥ 0,20 y ≥ 25 % de Nulo	Cualquiera	Reactivo [†]	Inmunidad anti-CMV detectada
	<0,20 O ≥0,20 y <25 % de Nulo	≥ 0,5	No reactivo	Inmunidad anti-CMV NO detectada
<0,5		Indeterminado [‡]	Resultados indeterminados para la respuesta al a CMV	
> 8,0 [§]	Cualquiera	Cualquiera	Indeterminado [‡]	Resultados indeterminados para la respuesta al a CMV

* Las reacciones al control positivo del mitógeno (y en ocasiones a los antígenos CMV) suelen estar fuera del rango del lector de microplacas. Esto no afecta a los resultados.

[†] Si no se sospecha una infección por citomegalovirus, un resultado inicialmente reactivo puede confirmarse volviendo a analizar por duplicado las muestras de plasma originales con el ensayo QF-CMV ELISA. Si el análisis duplicado de una o de ambas réplicas da positivo, se considerará que el individuo ha dado reactivo en el ensayo.

[‡] Consulte el apartado "Guía de resolución de problemas" (página 42) para conocer las posibles causas.

En estudios clínicos (1) un resultado indeterminado entre pacientes receptores de trasplantes de vísceras macizas donde un donante es reactivo para CMV pero el control de mitógeno estaba por debajo de 0,5 IU/ml no ha demostrado ser clínicamente relevante. Dichos pacientes presentan el riesgo más alto de desarrollar CMV.

[§] En estudios clínicos, menos del 0,25 % de los sujetos presentaron niveles de IFN- γ de > 8,0 IU/ml para el valor de Nulo.

Nota: El nivel medido de IFN- γ debe utilizarse junto con presentaciones clínicas, historiales médicos y otras evaluaciones de diagnóstico al establecer la respuesta inmunitaria a los antígenos de CMV. El ensayo QF-CMV no es una prueba para determinar la infección por el CMV y no debe utilizarse para descartar dicha infección.

Limitaciones

Los resultados del análisis QuantiFERON-CMV deben completarse con la historia epidemiológica del sujeto, el estado físico actual y otras pruebas médicas.

Pueden darse resultados poco fiables o indeterminados si:

- Se producen desviaciones respecto al procedimiento descrito en el prospecto de QuantiFERON-CMV ELISA.
- Niveles excesivos de IFN- γ en el tubo de control.
- Han pasado más de 16 horas desde la obtención de la muestra de sangre y su incubación a 37 °C.

Valores esperados

Se obtuvieron los valores de IFN- γ esperados con QuantiFERON-CMV al analizar 591 muestras de sujetos sanos. 343 muestras arrojaron resultados seropositivos y 248 muestras arrojaron resultados seronegativos para el IgG del CMV. En el momento de realizar el análisis QF-CMV, se desconocía el estado serológico del CMV. En las 248 muestras de sujetos seronegativos para el CMV, el 100 % (248/248) de las muestras analizadas fueron no reactivas mediante el ensayo QF-CMV ELISA y generaron respuestas de IFN- γ < 0,2 IU/ml en el tubo de antígenos del CMV (menos el valor del tubo de medición de nulos). Se muestra la distribución de las respuestas de IFN- γ en el tubo de antígenos del CMV (menos el valor del tubo de medición de nulos) para los 343 sujetos seropositivos para el CMV (Ilustración 2).

Número de muestras

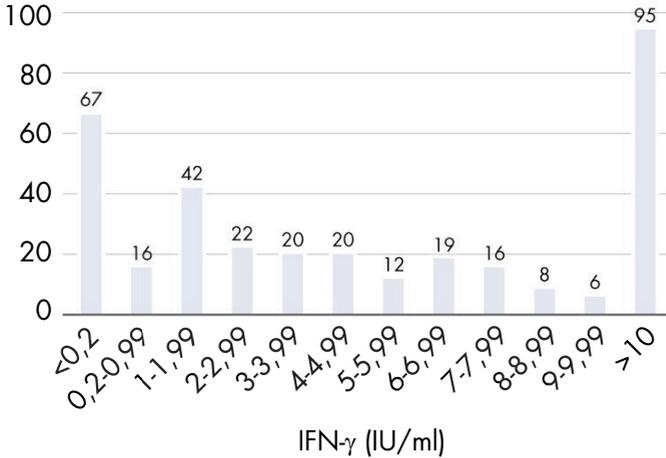


Ilustración 2. Distribución de las respuestas de QF-CMV IFN- γ (menos el valor del tubo de medición de nulos) en sujetos sanos seropositivos (n = 343).

La distribución de las respuestas de IFN- γ en el tubo de mitógeno (menos el valor del tubo de medición de nulos) se determinó a partir de 733 muestras provenientes de sujetos adultos sanos mediante el ensayo QF-CMV ELISA, con independencia de la prueba serológica de IgG del CMV (Ilustración 3). Un resultado de tubo de mitógeno (menos el valor del tubo de medición de nulos) inferior a 0,5 IU/ml indica un fallo en la prueba o que el sujeto presenta un estado de inmunodepresión. En una población sana, únicamente 2/733 resultados se encuadraron en esta categoría.

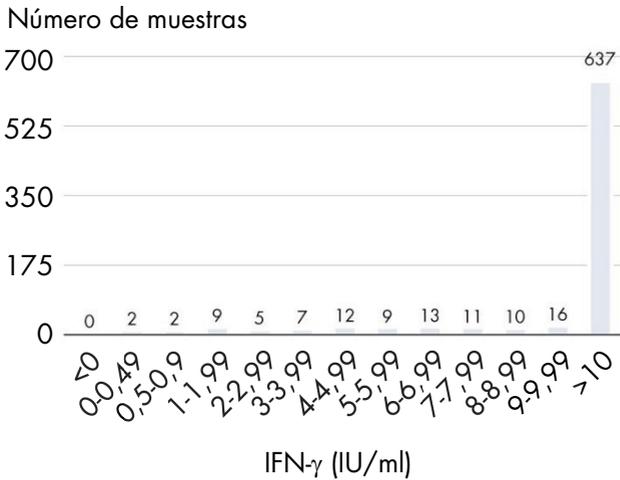


Ilustración 3. Distribución de las respuestas de IFN- γ del tubo de mitógeno (menos el valor del tubo de medición de nulos) en sujetos sanos (n = 733).

La distribución de las respuestas de IFN- γ en los tubos de medición de nulos se determinó a partir de 1020 muestras de plasma provenientes de sujetos sanos mediante el ensayo QF-CMV ELISA, con independencia de la prueba serológica de IgG del CMV (Ilustración 4).

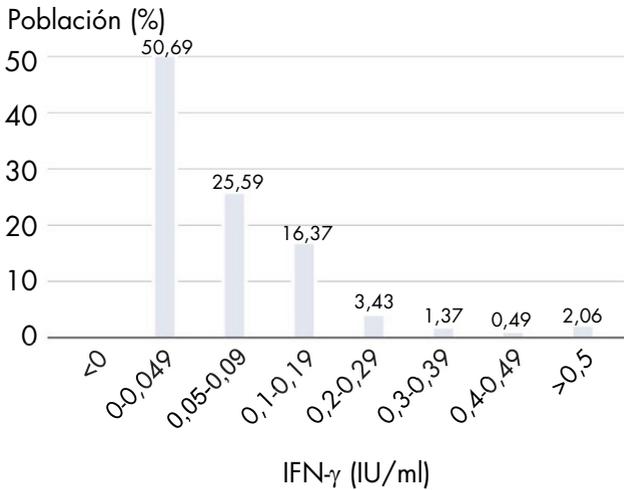


Ilustración 4. Distribución de las respuestas de Nil IFN- γ del tubo de medición de nulos en sujetos sanos (n = 1020) expresada como un porcentaje de población.

Características de rendimiento

Rendimiento clínico

Se estableció un umbral de análisis para detectar la exposición previa al CMV con el ensayo QF-CMV tras el análisis de resultados de un grupo de sujetos sanos ($n = 223$), de manera que se compararon los resultados del ensayo QF-CMV con resultados serológicos de IgG del CMV. Un análisis ROC determinó que un umbral de análisis de 0,04 IU/ml (después de restar el tubo de medición de nulos) ofrecía valores predictivos positivos y negativos óptimos para QF-CMV (área debajo de la curva = 0,9679 [IC del 95 %: 0,9442-0,9915, $p < 0,0001$]) y por lo tanto representaba el umbral en el cual este ensayo logró su uso previsto con mayor efectividad en una población sana.

El rendimiento del ensayo QF-CMV se comparó con la prueba serológica SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). El ensayo QF-CMV mostró una concordancia del 95 % (294/310 sujetos) con la prueba serológica de IgG del CMV en sujetos sanos, de manera que ninguno de los 149 donantes seronegativos mostró reactividad con el ensayo QF-CMV. 145 de 161 donantes seropositivos mostraron una respuesta reactiva con el ensayo QF-CMV. La concordancia positiva global fue del 90 %, con un valor de concordancia negativa del 100 %. En Tabla 3 se muestra el nivel de concordancia en sujetos sanos entre las respuestas del ensayo QF-CMV y el estado serológico de IgG del CMV.

Tabla 3. Concordancia entre QuantiFERON-CMV y la prueba serológica de IgG del CMV en pacientes sanos

		Prueba serológica del CMV		Total
		Positiva	Negativa	
QuantiFERON-CMV	Reactivo	145	0	145 (46,8 %)
	No reactivo	16	149	165 (53,2 %)
	Total	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Umbral del ensayo

El umbral de análisis clínico recomendado para este ensayo es de 0,2 IU/ml en el tubo de antígenos del CMV (menos el valor del tubo de medición de nulos), aunque pueden validarse umbrales diferentes para contextos clínicos diferentes.

Estudios clínicos

Dado que no existe un método definitivo para confirmar o descartar el diagnóstico de infección por el citomegalovirus, no puede valorarse de forma práctica una estimación de la sensibilidad y la especificidad del ensayo QF-CMV. La especificidad y la sensibilidad del ensayo QF-CMV se calcularon de forma aproximada evaluando el nivel de concordancia entre las respuestas de QF-CMV y el estado serológico de IgG del CMV de sujetos sanos.

La especificidad del ensayo QF-CMV se calculó de forma aproximada evaluando las tasas de falsos positivos (respuesta reactiva con QF-CMV) en muestras de donantes sanos sin signos de exposición previa al CMV (sujetos seronegativos para IgG del CMV). La sensibilidad se calculó de forma aproximada evaluando la respuesta del ensayo QF-CMV en muestras de donantes sanos con signos de exposición previa al CMV (sujetos seropositivos para IgG del CMV). El ensayo QF-CMV utiliza un gran número de epítomos específicos del CMV de diferentes proteínas del virus, lo cual proporciona una amplia cobertura de la población con diversos haplotipos HLA de clase I (aproximadamente el 98 %). Dado que no se conocían los haplotipos HLA de los sujetos analizados mediante serología del CMV, cabía prever que un pequeño porcentaje de sujetos con una prueba serológica positiva no presentara respuesta con los tubos de recogida de sangre QF-CMV.

Especificidad

En un estudio de 591 muestras realizado en sujetos sanos, no se detectaron resultados de falsos positivos con el ensayo QF-CMV en sujetos seronegativos para IgG del CMV, con 248/248 muestras no reactivas mediante el ensayo QF-CMV ELISA y negativas mediante la prueba serológica de IgG del CMV. Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir del ensayo QF-CMV y la prueba serológica de IgG del CMV presentaron una concordancia del 100 %.

En todas las demás evaluaciones de la especificidad realizadas en receptores de trasplantes de vísceras macizas (1-8), receptores de células madre hematopoyéticas (9,10) y pacientes infectados por el VIH (11), la concordancia entre el ensayo QF-CMV y la prueba serológica de IgG del CMV también ha sido del 100 %.

Sensibilidad

En un estudio realizado en 343 muestras obtenidas de sujetos sanos seropositivos para IgG del CMV, el nivel de concordancia entre las respuestas del ensayo QF-CMV y los resultados de la prueba serológica de IgG del CMV fue del 80,5 % con 276/343 muestras reactivas en el ensayo QF-CMV y positivas en la prueba serológica de IgG del CMV. La discordancia observada puede deberse a falsos positivos en la prueba serológica del CMV o a la ausencia de tipos de HLA que presenten reacción en los sujetos incluidos en el ensayo.

Se ha observado que los niveles de concordancia en las evaluaciones de la sensibilidad realizadas en receptores de trasplantes de vísceras macizas (1-8), receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas (9, 10) y pacientes infectados por el VIH (11) son inferiores, lo que podría deberse a resultados de falsos positivos en la prueba serológica del CMV, a la ausencia de tipos de HLA que presenten reactividad en los sujetos del ensayo o a la ausencia de linfocitos T reactivos en estos pacientes debido a la inmunodepresión.

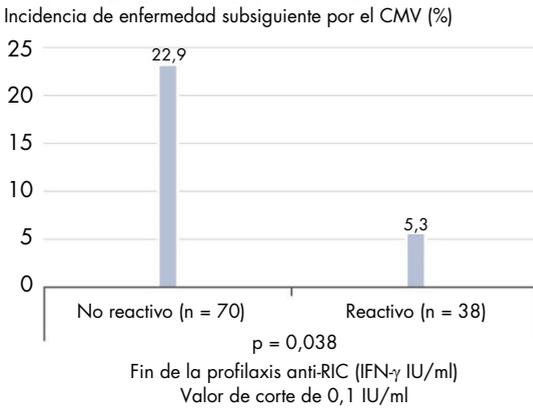
Estudios que destacan la utilidad clínica

El uso previsto descrito de la prueba serológica de IgG del CMV y el ensayo QF-CMV es permitir la detección de la inmunidad frente al CMV. En el contexto de los trasplantes, la serología del CMV se utiliza de forma extendida antes del trasplante para determinar el riesgo de complicaciones por CMV en el receptor después del trasplante, pero tiene una utilidad limitada por sí misma después del trasplante. De forma alternativa, el ensayo QF-CMV puede utilizarse en receptores de trasplantes para valorar el nivel de inmunidad frente al CMV en los pacientes que tienen riesgo de contraer una infección y/o una enfermedad sintomáticas por el CMV debido a la inmunodepresión (12-15).

Diversos estudios clínicos publicados con diversas cohortes de trasplante han demostrado la utilidad del ensayo QuantiFERON-CMV (1-11, 15, 16).

En un estudio extenso de 108 receptores de trasplantes de vísceras macizas (4), los pacientes con un resultado reactivo en el ensayo QF-CMV al final de la profilaxis anti-CMV mostraron una tasa significativamente menor de enfermedad subsiguiente por el CMV (3,3 % o 1/30; con un umbral de 0,2 IU/ml) que los pacientes con un resultado no reactivo en el ensayo QF-CMV (21,8 % o 17/78, $p = 0,044$) (Ilustración 5).

A



B

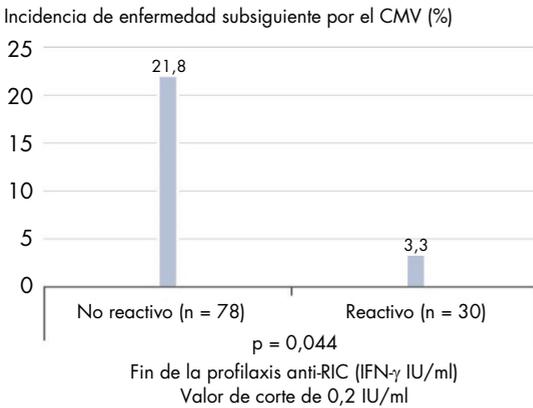


Ilustración 5. Tasas de enfermedad de aparición tardía por el CMV en pacientes con un resultado reactivo en el ensayo QuantiFERON-CMV frente a un resultado no reactivo en el ensayo QuantiFERON-CMV al final de la profilaxis. Datos subyacentes de Kumar et al. (4).

Además, los receptores de trasplantes seronegativos para el CMV que recibieron un órgano de un donante positivo para el CMV (D+/R-) con un resultado reactivo en el ensayo QF-CMV una vez finalizada la profilaxis se mantuvieron libres de la enfermedad por el CMV con mayor frecuencia y durante más tiempo, lo que indica que el ensayo QF-CMV puede utilizarse para identificar a los pacientes con riesgo de contraer la enfermedad de aparición tardía por el CMV.

Este estudio también resaltó que, en la cohorte de pacientes receptores de un trasplante con el riesgo más alto de contraer la enfermedad por el CMV (D+/R-), un resultado reactivo en cualquier momento después de la profilaxis estaba asociado a una probabilidad más alta de mantenerse libre de la enfermedad por el CMV.

En un estudio de 37 pacientes receptores de trasplantes de vísceras macizas (6), la evaluación de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ - específicos del CMV mediante el ensayo QF-CMV ayudó a predecir la depuración viral espontánea en comparación con la progresión de la enfermedad por el CMV tras las elevaciones de la viremia por CMV. En este estudio, 24/26 pacientes (92,3 %) con un resultado reactivo en el ensayo QF-CMV (con un umbral del análisis de IFN- γ \geq 0,2 IU/ml), experimentaron la desaparición espontánea del CMV, mientras que únicamente 5/11 (45,5 %) pacientes con un resultado no reactivo en el ensayo QF-CMV presentaron el mismo desenlace clínico.

Un estudio de 67 receptores de un trasplante de pulmón en el que se evaluaron los episodios de viremia por CMV después del trasplante (7) mostró que 18/25 (72 %) de los episodios de viremia por CMV estuvieron precedidos de un resultado no reactivo en el ensayo QF-CMV en comparación con 4/16 (25 %) episodios precedidos por una respuesta reactiva en el ensayo QF-CMV (prueba exacta de Fisher, $p = 0,0046$, Ilustración 6).

% de episodios de ADNemia del CMV humano con una carga viral de > 1.000 copias/ml

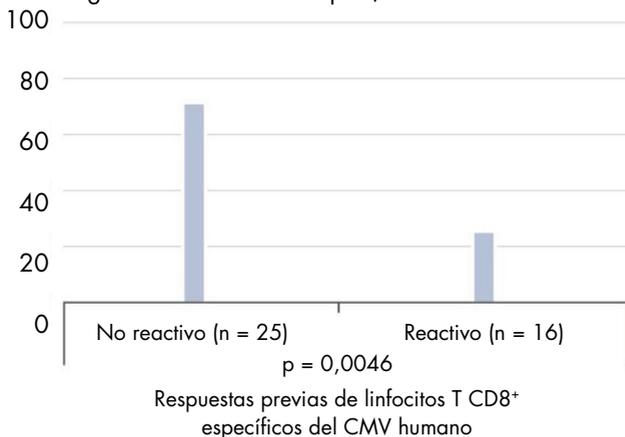


Ilustración 6. Análisis estadístico de las respuestas de linfocitos T CD8+ específicos del CMV detectadas mediante el ensayo QuantiFERON-CMV y desarrollo de viremia por CMV (prueba exacta de Fisher, $p = 0,0046$). Datos subyacentes de Weseslindtner et al (7).

En un exhaustivo estudio prospectivo multicéntrico de 127 pacientes seronegativos para el CMV receptores de trasplantes de vísceras macizas de donantes seropositivos para el CMV (8), todos los cuales recibieron profilaxis antiviral, se observó que los pacientes con un resultado reactivo en el ensayo QF-CMV (utilizando un umbral de análisis de 0,1 IU/ml) en cualquier punto temporal tras la finalización de la profilaxis anti-CMV mostraban una tasa significativamente menor de enfermedad de aparición tardía 12 meses después del trasplante (6,4 %) que los pacientes que tuvieron un resultado no reactivo en el ensayo QF-CMV (22,2 %) y un resultado indeterminado (58,3 %, $p < 0,001$). Al clasificar los resultados indeterminados como “no reactivos”, la incidencia de enfermedad subsiguiente por el CMV fue del 6,4 % frente al 26,8 %, $p = 0,024$. Los valores predictivos positivos y negativos del ensayo QF-CMV para la protección frente a la enfermedad por el CMV fueron de 0,90 (IC del 95 % 0,74-0,98) y 0,27 (IC del 95 % 0,18-0,37), respectivamente. Este estudio mostró que el ensayo QF-CMV puede ser útil para predecir si los pacientes tienen un riesgo bajo, intermedio o alto de contraer una enfermedad subsiguiente por el CMV después de la profilaxis.

En un estudio prospectivo de 55 receptores de trasplantes de vísceras macizas (8) en el que se analizó la relación entre los resultados del ensayo QF-CMV antes del trasplante y los episodios de replicación del CMV después del trasplante, se observó una incidencia mayor de replicación del CMV después del trasplante en los receptores seropositivos para el CMV con un resultado no reactivo (utilizando un umbral de análisis de 0,2 IU/ml) en el ensayo QF-CMV antes del trasplante (7/14 o 50 %) que en los receptores seropositivos para el CMV con un resultado reactivo en el ensayo QF-CMV antes del trasplante (4/30 o 13,3 %, $p = 0,021$).

Este estudio mostró que los receptores con resultados no reactivos en el ensayo QF-CMV antes del trasplante que recibieron un órgano de un donante seropositivo para el CMV presentaban un riesgo de replicación del CMV diez veces mayor que los receptores con resultados reactivos en el ensayo QF-CMV antes del trasplante (razón de posibilidades ajustada 10,49, IC del 95 % 1,88-58,46). Por lo tanto, realizar un ensayo QF-CMV antes del trasplante puede ser útil para predecir el riesgo de replicación del CMV después del trasplante y, por tanto, permitir individualizar el tratamiento de la infección por el CMV después del trasplante de una víscera maciza.

Otros estudios para investigar la detección de las respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicos del CMV mediante el ensayo QF-CMV en una cohorte de receptores de trasplantes han finalizado (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) o se encuentran actualmente en curso en todo el mundo.

Directrices internacionales de consenso sobre la conducta aplicable al citomegalovirus en el trasplante de vísceras macizas

La importancia de la monitorización inmunitaria específica del CMV ha sido reconocida y publicada en el documento *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (12). Estas directrices internacionales, desarrolladas por un grupo de expertos en el CMV y en el trasplante de vísceras macizas, reunidos por la sección Transplant Infectious Disease (Enfermedades infecciosas en trasplantes) de The Transplantation Society (TTS, Sociedad de Trasplantes), son directrices de consenso basadas en evidencias científicas y en la opinión de expertos sobre la conducta a seguir con respecto al CMV, que incluye el diagnóstico, la inmunología, la prevención y el tratamiento.

Estas directrices llegan a la conclusión de que “el seguimiento inmunitario de las respuestas de linfocitos T específicos del CMV puede predecir qué personas tienen riesgo de contraer la enfermedad por el CMV después del trasplante y puede ser útil como guía para la profilaxis y los tratamientos preventivos” (12).

Además, las directrices también proporcionan recomendaciones en relación con las características del ensayo ideal para la monitorización inmunitaria, tales como:

- Capacidad de valorar la cantidad y la función de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los receptores de trasplantes
- Capacidad de medir la concentración de IFN- γ
- Facilidad de realización, rentabilidad y reproducibilidad
- Tiempo corto hasta la obtención de los resultados
- Facilidad de envío de las muestras a laboratorios de referencia especializados

El ensayo QF-CMV cumple prácticamente todos los criterios especificados en estas directrices y es el único ensayo de monitorización inmunitaria normalizado capaz de detectar el IFN- γ específico para el CMV.

Características del rendimiento del ensayo

El ensayo QF-CMV ELISA utiliza estándar de IFN- γ humano recombinante, que se ha analizado comparándolo con una preparación de IFN- γ de referencia (ref. de NIH: Gxg01-902-535). Los resultados de las muestras de la prueba se indican en Unidades internacionales (International Units, IU) relativas a una curva estándar preparada mediante el análisis de la dilución del estándar secundario suministrado con el kit.

Se sabe que los anticuerpos heterófilos (p. ej., humanos antirratón) presentes en el suero o plasma de determinados sujetos causa interferencias con los inmunoensayos. El efecto de los anticuerpos heterófilos en el ensayo QF-CMV ELISA se minimiza mediante la adición de suero de ratón normal al diluyente verde y el uso de fragmentos de anticuerpos monoclonales F(ab')₂ como el anticuerpo de captura IFN- γ recubierto en los pocillos de microplaca.

El límite de detección del QF-CMV ELISA es de 0,065 IU/ml, y no se ha demostrado el efecto gancho a dosis altas (prozona) con concentraciones de IFN- γ de hasta 10 000 IU/ml. Se ha demostrado que los anticuerpos de QF-CMV ELISA no presentan reactividad cruzada con ninguna de las citocinas analizadas, como IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 y IL12.

Se ha demostrado la linealidad del ensayo QF-CMV ELISA mediante la colocación aleatoria de cinco réplicas de 11 grupos 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 7).

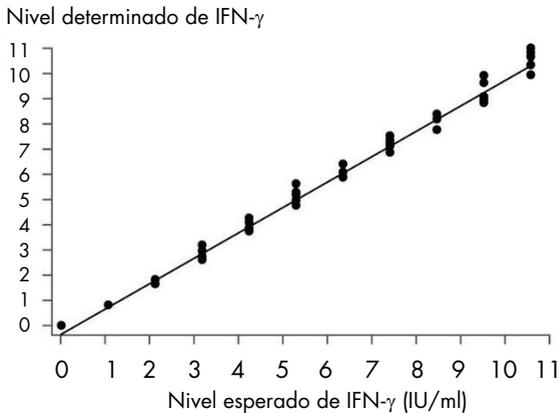


Ilustración 7. Perfil de linealidad de QF-CMV ELISA determinado mediante el análisis de cinco réplicas de 11 muestras de plasma con concentraciones conocidas de IFN- γ .

La reproducibilidad del ensayo QF-CMV ELISA se estimó mediante el análisis de 20 muestras de plasma con diferentes concentraciones de IFN- γ en réplicas de tres, en tres laboratorios, en tres días no consecutivos y con tres usuarios distintos. Por tanto, cada muestra se analizó 27 veces en nueve series analíticas independientes. Una muestra era una medición de nulos y tenía una concentración calculada de IFN- γ de 0,08 IU/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 (IC del 95 %: 7,48-7,92) IU/ml.

La imprecisión intraserie o intraensayo se calculó obteniendo el promedio de los valores de %CV de cada plasma de análisis que contenía IFN- γ de cada serie de la placa ($n = 9$) y el CV varió entre el 4,1 % y el 9,1 %. El promedio dentro del %CV de una misma serie (\pm IC del 95 %) fue de $6,6 \pm 0,6$ %. El valor medio del %CV del plasma sin IFN- γ fue del 14,1 %.

La imprecisión total o interensayo se determinó comparando las 27 concentraciones calculadas de IFN- γ para cada muestra de plasma y el CV varió entre el 6,6 % y el 12,3 %. 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

Resultados indeterminados

Los resultados indeterminados pueden estar relacionados con el estado inmunológico del individuo o con varios factores técnicos:

- Han pasado más de 16 horas desde que se extrae la muestra de sangre hasta que se incuba a 37 °C.
- La sangre se ha almacenado a una temperatura inferior o superior al rango recomendado (22 °C ± 5 °C).
- Los tubos de recogida de sangre no se han mezclado lo suficiente.
- La placa de ELISA no se ha lavado bien.

Si se sospecha que existen problemas técnicos con la recogida o con la manipulación de las muestras de sangre, repita todo el ensayo QF-CMV con muestras de sangre nuevas. Cuando el motivo puede deberse a que se han cometido errores de procedimiento, puede realizarse de nuevo el ensayo ELISA con plasmas estimulados. A no ser que se haya producido un error en el ensayo ELISA, no deberían obtenerse resultados indeterminados (de valores bajos del tubo de mitógeno).

Muestras de plasma coaguladas

Si en las muestras de plasma almacenadas durante mucho tiempo apareciesen coágulos de fibrina, habrá que centrifugarlas para que se sedimenten los coágulos, lo que facilita su paso por la pipeta.

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.

Comentarios y sugerencias

Valores bajos de densidad óptica para los estándares

- | | |
|--|--|
| a) Error de dilución del estándar | Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, de acuerdo con las instrucciones del prospecto de QF-CMV ELISA. |
| b) Error de pipeteado | Asegurarse de que las pipetas estén calibradas y de utilizarlas siguiendo las instrucciones del fabricante. |
| c) Temperatura de incubación demasiado baja | La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| d) Tiempo de incubación demasiado corto | La incubación de la placa del conjugado, estándares y muestras debe durar 120 ± 5 minutos. La solución de sustrato enzimático se incuba en la placa durante 30 minutos. |
| e) Filtro incorrecto para la lectura de placas | La placa debe leerse a 450 nm con un filtro de referencia entre 620 nm 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 1 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. |

Coloración indeterminada

- | | |
|--|---|
| a) Placa mal lavada | Lave la placa al menos seis veces con 400 μl de tampón de lavado por pocillo. Puede que sean necesarios más de seis ciclos de lavado dependiendo del lavador. Debe dejarse un período de remojo de al menos 5 segundos entre los ciclos. |
| b) Contaminación cruzada entre los pocillos de ELISA | Extreme la precaución durante el pipeteado y la mezcla de la muestra para minimizar el riesgo. |

Comentarios y sugerencias

-
- | | |
|---|--|
| 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) Mezclado del plasma en los tubos de la centrifugadora antes de la extracción del plasma. | Asegúrese de que las muestras de plasma se extraen con cuidado del gel situado por encima de él sin pipetear hacia arriba y hacia abajo, con cuidado de no alterar el material de la superficie del gel. |

Ruido de fondo elevado

- | | |
|--|--|
| a) Placa mal lavada | Lave la placa al menos seis veces con 400 µl de tampón de lavado por pocillo. Puede que sean necesarios más de seis ciclos de lavado dependiendo del lavador. Debe dejarse un período de remojo de al menos 5 segundos entre los ciclos. |
| b) Temperatura de incubación demasiado elevada | La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C). |
| 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. |

Curva estándar no lineal y variabilidad entre duplicados

- | | |
|--|--|
| a) Placa mal lavada | Lave la placa al menos seis veces con 400 µl de tampón de lavado por pocillo. Puede que sean necesarios más de seis ciclos de lavado dependiendo del lavador. Debe dejarse un período de remojo de al menos 5 segundos entre los ciclos. |
| b) Error de dilución del estándar | Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, 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

1. Manuel, O., et al. (2013) Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8⁺ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* 8, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* 9, 1214.
5. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8⁺ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* 82, 433.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

-
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4⁺ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
 12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
 13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
 14. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 735.
 15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
 16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

Símbolos

Los símbolos siguientes pueden aparecer en el embalaje y las etiquetas:

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Marca CE
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de referencia
	Número de lote
	Número de material
	Número mundial de artículo comercial
	Limitación de temperatura
	No reutilizar
	Mantener alejado de la luz solar
	Consulte las instrucciones de uso
	Fabricante
	Representante autorizado en la Comunidad Europea

Información de contacto

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

Procedimiento de prueba ELISA abreviado

Fase 1: Incubación de sangre

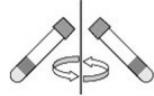
1. Recoja la sangre del paciente en los tubos de recogida de sangre y mezcle el contenido agitando los tubos diez (10) veces con la fuerza suficiente para que toda la superficie interna del tubo se cubra de sangre a fin de solubilizar los antígenos en sus paredes.



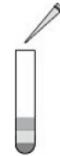
2. Incube los tubos en posición vertical a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 24 horas.



3. Después de la incubación, centrifugue los tubos durante 15 minutos a 2000-3000 RCF (g) 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. Equilibre los componentes del análisis ELISA, salvo el conjugado concentrado 100x, a temperatura ambiente durante al menos 60 minutos.



2. Reconstituya el estándar del kit hasta 8,0 IU/ml con agua desionizada o destilada. Prepare cuatro (4) diluciones de estándar.

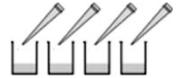


3. Reconstituya el conjugado 100x concentrado liofilizado con agua desionizada o destilada.

4. Prepare conjugado listo para usar con diluyente verde y añada 50 µl a cada uno de los pocillos.



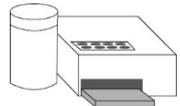
5. Añada 50 µl de las muestras de plasma de análisis y 50 µl de los estándares a los pocillos correspondientes. Mezcle con un agitador.



6. Deje incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente.



7. Lave los pocillos al menos 6 veces con 400 µl de tampón de lavado por pocillo.



8. Añada 100 µl de solución de sustrato enzimático a los pocillos. Mezcle con un agitador.



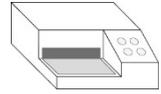
9. Deje incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.



10. Añada 50 µl de solución de detención enzimática a todos los pocillos. 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.



Historial de revisiones del manual

Documento	Cambios	Fecha
L1075110-R5	Adición de información de seguridad relacionada con viales rotos Actualizaciones en la Tabla 2, Interpretation de resultados de QF-CMV, página Error! Bookmark not defined..	Febrero 2018
L1075110-R5	Se actualizó la información sobre el SGA, página 11.	Febrero 2018

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantifERON® (Grupo QIAGEN); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.); SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

Acuerdo de licencia limitada para QuantifERON-CMV ELISA

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 panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, 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 usuarios de QIAGEN. 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 este panel y/o su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel 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 del panel 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 panel y/o con sus componentes.

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

Feb-18 © 2018 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com