

Fevereiro de 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Folheto informativo



O teste de IFN- γ no sangue total que mede as respostas aos antígenos peptídicos do citomegalovírus humano



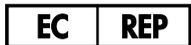
Para uso em diagnóstico in vitro



0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, EUA + 1-800-426-8157



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANHA

1075110PT-BR Rev. 01



www.QuantiFERON.com



Conteúdo

Uso previsto	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	6
Tempo necessário para realizar o ensaio	7
Materiais fornecidos	8
Conteúdo do kit	8
Materiais necessários, mas não fornecidos	9
Avisos e precauções	9
Informações de segurança	11
Armazenamento e manuseio de reagentes	12
Coleta e manuseio de espécimes	13
Procedimento	16
Estágio 1: Incubação de sangue e coleta de plasma	16
Estágio 2: QuantiFERON-CMV ELISA para IFN- γ humano	17
Cálculos e interpretação de testes	22
Geração da curva de solução padrão (se o QF-CMV Analysis Software não for usado)	22
Controle de qualidade do teste	23
Interpretação dos resultados	24
Limitações	25
Valores esperados	25
Características de desempenho	28

Desempenho clínico.....	28
Limiar do ensaio.....	29
Estudos clínicos	29
Especificidade	30
Sensibilidade.....	30
Estudos destacando a utilidade clínica.....	31
Diretrizes de consenso internacional sobre o manejo do citomegalovírus no transplante de órgãos sólidos	36
Características do desempenho do ensaio.....	37
Informações técnicas.....	39
Resultados indeterminados	39
Amostras de plasma coaguladas.....	39
Guia de solução de problemas	40
Referências	42
Símbolos	44
Informações de contato	45
Procedimento de teste ELISA abreviado.....	46
Estágio 1: Incubação de sangue	46
Estágio 2: IFN- γ ELISA.....	46
Histórico de revisões do manual.....	49

Uso previsto

O QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) é um ensaio in vitro que usa um coquetel de peptídeos que simula proteínas de citomegalovírus humano (CMV) para estimular células no sangue total heparinizado. A detecção de interferon gama (IFN- γ) por ensaio imunoenzimático (ELISA) é usada para quantificar respostas in vitro aos antígenos peptídicos associados ao controle imune da infecção por CMV. A perda dessa função imune pode estar associada ao desenvolvimento da doença por CMV. O uso pretendido do QF-CMV é monitorar o nível de imunidade anti-CMV de um paciente.

O QF-CMV não é um teste para determinar a infecção por CMV e não deve ser usado para excluir a infecção por CMV.

Resumo e explicação

O CMV é um vírus de herpes que infecta entre 50% e 85% dos adultos da população. É uma complicação frequente da imunossupressão, principalmente após o transplante, e pode contribuir significativamente para a morbidade e mortalidade nos receptores de transplante. As terapias imunossupressoras atuais usadas para evitar a rejeição de um órgão transplantado têm efeitos prejudiciais sobre os linfócitos T e as respostas imunes mediadas por células (Cell-Mediated Immune, CMI), resultando em maior suscetibilidade a infecções virais pós-transplante. A importância da função das células T na supressão da replicação do CMV também é realçada pelo fato de que os linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos para CD8⁺ CMV podem se proteger contra a patogênese associada ao vírus. A enumeração de CTLs específicos para CD8⁺ CMV em pacientes imunossuprimidos e a produção de IFN- γ podem prever o risco de desenvolvimento da doença por CMV. A produção de IFN- γ pode ser uma substituta funcional para a identificação de CTLs específicos para CMV.

QF-CMV é um ensaio para respostas CMI a antígenos peptídicos que simulam proteínas de CMV. Os peptídeos do CMV são projetados para direcionar células T CD8⁺, incluindo A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 e haplótipos HLA Classe I Cw6 (A30, B13) abrangendo >98% da população humana. Indivíduos infectados com CMV geralmente têm linfócitos CD8⁺ no sangue que reconhecem esses antígenos. Este processo de reconhecimento envolve a geração e secreção da citocina, IFN- γ . A detecção e subsequente quantificação de IFN- γ constitui a base deste teste.

Princípio do procedimento

O teste QF-CMV é realizado em dois estágios. Primeiramente, o sangue total é coletado em cada um dos QF-CMV Blood Collection Tubes, que incluem um tubo de controle Nil, um tubo CMV Antigen e um tubo Mitogen.

O tubo Mitogen é usado no teste QF-CMV como controle positivo. Isso pode ser especialmente assegurado quando houver dúvidas quanto ao estado imunológico do indivíduo. O tubo Mitogen também pode servir como controle para um manuseio e uma incubação corretos do sangue.

Os tubos devem ser incubados a 37°C o mais rápido possível e dentro de 16 horas após a coleta. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é removido e a quantidade de IFN- γ (UI/ml) é medida pelo QF-CMV ELISA.

A quantidade de IFN- γ nas amostras de plasma dos tubos CMV Antigen e Mitogen pode, em geral, estar acima dos limites superiores da maioria dos leitores de ELISA, mesmo quando os indivíduos estão moderadamente imunossuprimidos. Para resultados qualitativos, use os valores calculados para plasma puro. Para resultados quantitativos, em que são necessários valores reais de UI/ml, as amostras de plasma devem ser diluídas na proporção de 1:10 no Diluente verde e testadas no ELISA juntamente com plasma puro.

Nota: Para as amostras que estejam dentro do intervalo do QF-CMV ELISA (ou seja, até 10 UI/ml), deve ser usado o resultado obtido com a amostra de plasma puro. Para essas concentrações de IFN- γ , os valores obtidos usando a diluição de 1:10 das amostras de plasma podem ser imprecisos.

Um teste é considerado reativo para uma resposta de IFN- γ quando o tubo CMV Antigen exibe um valor significativamente acima do valor de UI/ml de IFN- γ de Nil. A amostra de plasma estimulado pelo Mitogen serve como um controle positivo de IFN- γ para cada espécime testado. Uma resposta baixa ao Mitogen indica um resultado indeterminado quando uma amostra de sangue também tem uma resposta não reativa aos antígenos de CMV. Esse padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido ao manuseio inadequado do espécime, enchimento/mistura incorreta do tubo do Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- γ – como com pacientes recém-transplantados. A amostra Nil se ajusta ao IFN- γ de base ou não específico nas amostras de sangue. O nível de IFN- γ do tubo Nil é subtraído do nível de IFN- γ para o tubo CMV Antigen e o tubo Mitogen (consulte "Interpretação dos resultados" na página 24 deste folheto informativo sobre uma descrição de como os resultados do QF-CMV são interpretados).

Tempo necessário para realizar o ensaio

O tempo necessário para realizar o ensaio QF-CMV está estimado abaixo; o tempo de teste de várias amostras quando em lote também é indicado:

Incubação a 37°C de tubos de sangue:	16–24 horas
ELISA:	Aproximadamente 3 horas para uma placa de ELISA
	Menos de 1 hora de trabalho
	Adicione 10 a 15 minutos para cada placa adicional

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
Ref.	0192-0301
Número de preparações	1
QuantifERON Nil Control (tampa cinza)	1 tubo
QuantifERON CMV Antigen (tampa azul)	1 tubo
QuantifERON Mitogen Control (tampa roxa)	1 tubo
Folheto informativo dos QF-CMV Blood Collection Tubes	1

QuantifERON-CMV ELISA	2-Plate Kit ELISA
Ref.	0350-0201
Microplate Strips (Tiras de microplacas) (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ humano-murino	2 conjuntos de tiras de microplacas de 12 x 8 poços
Human IFN- γ Standard (Solução padrão de IFN- γ humano), liofilizada (contém IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, 0,01% w/v de Timersal)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Dilúente verde) (contém caseína bovina, soro de camundongo normal, 0,01% w/v de Timersal)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado 100x concentrado), liofilizado (HRP de anti-IFN- γ humano-murino, contém 0,01% w/v de Timersal)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampão de lavagem 20x concentrado) (pH 7,2, contém 0,05% v/v de ProClin [®] 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato enzimático) (contém H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' tetrametilbenzindina)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de parada enzimática) (contém 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Folheto informativo do QF-CMV ELISA	1

*Contém ácido sulfúrico. Consulte a página 9 sobre precauções.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

- Incubadora a 37°C; CO₂ não necessário
- Pipetas de volume variável calibradas para administração de 10–1000 µl com pontas descartáveis
- Pipeta multicanal calibrada com capacidade para administrar 50 e 100 µl com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas
- 2 litros de água deionizada ou destilada
- Lavadora de microplacas (lavadora automatizada recomendada)
- Leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm a 650 nm

Avisos e precauções

Para uso em diagnóstico in vitro

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF (conveniente e compacto) em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit da QIAGEN® e para cada componente do kit.

CUIDADO



Manuseie o sangue humano como se fosse potencialmente infeccioso. Observe as diretrizes relevantes de manuseio de sangue.

As advertências de perigo e precaução a seguir se aplicam aos componentes do QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Contém: ácido sulfúrico. Aviso! Pode ser corrosivo para metais. Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Aviso! Causa irritação leve da pele. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Green Diluent



Contém: 5-hidroxi-1-(4-sulfonil)-4-(4-sulfonilazo)pirazole-3-carboxilato trissódico. Contém: tartrazina. Aviso! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contém: ProClin 300. Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Evite liberar no meio ambiente.

Informações de segurança

Mais informações

- Divergências em relação ao folheto informativo do QF-CMV podem gerar resultados incorretos. Leia as instruções com atenção antes do uso.
- Não use o kit se algum frasco de reagente apresentar sinais de danos ou vazamentos antes do uso.
- **Importante:** Inspeccione os frascos antes do uso. Não use frascos de Conjugado ou Solução padrão de IFN- γ que apresentem sinais de danos ou se a vedação de borracha tiver sido comprometida. Não manuseie frascos quebrados. Tome as precauções de segurança apropriadas para os descartar com segurança.
Recomendação: Use um deslacrador de frascos para abrir os frascos de Conjugado ou Solução padrão de IFN- γ , a fim de minimizar o risco de ferimentos causados pelo laque metálico.
- Não misture nem use as Tiras de microplacas, a Solução padrão de IFN- γ humano, o Diluente verde ou o Conjugado 100x concentrado de lotes diferentes do kit QF-CMV. Os outros reagentes (Tampão de lavagem 20x concentrado, Solução de substrato enzimático e Solução de parada enzimática) podem ser trocados entre kits, desde que os reagentes estejam dentro dos prazos de validade e que os detalhes do lote sejam registrados.
- Descarte os reagentes e as amostras biológicas não usados em conformidade com os regulamentos locais, estaduais e federais.
- Não use os QF-CMV Blood Collection Tubes ou os kits QF-CMV ELISA após a data de validade.
- Certifique-se de que equipamentos de laboratório, como lavadoras e leitores de placas, tenham sido calibrados/validados para uso.

Armazenamento e manuseio de reagentes

Tubos de coleta de sangue

- Armazene os QF-CMV Blood Collection Tubes entre 4°C e 25°C.
- Os QF-CMV Blood Collection Tubes devem estar entre 17°C e 25°C no momento do enchimento do sangue.
- A vida útil dos QF-CMV Blood Collection Tubes é de, no máximo, 15 meses a partir da data de fabricação, quando armazenados entre 4°C e 25°C.

Reagentes do kit ELISA

- Armazene o kit entre 2°C e 8°C.
- Mantenha a Solução de substrato enzimático sempre protegida da luz solar direta.

Reagentes reconstituídos e não usados

Para obter instruções sobre como reconstituir os reagentes, consulte "Estágio 2: QuantiFERON-CMV ELISA para IFN- γ humano" (etapas 3 e 5 nas páginas 17 e 19).

- A Solução padrão de IFN- γ humano reconstituída pode ser mantida por até 3 meses, se armazenado entre 2°C e 8°C.

Anote a data na qual a Solução padrão de IFN- γ humano foi reconstituída.

- Após a reconstituição, o Conjugado 100x concentrado não usado tem de ser novamente armazenado entre 2°C e 8°C e tem de ser usado dentro de 3 meses.

Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.

- O conjugado na concentração de trabalho deve ser usado no período de 6 horas após o preparo.
- O tampão de lavagem na concentração de trabalho deve ser armazenado em temperatura ambiente (22°C \pm 5°C) por até duas semanas.

Coleta e manuseio de espécimes

O QF-CMV usa os seguintes tubos de coleta de sangue:

- Nil Control (tampa cinza)
- CMV Antigen (tampa azul)
- Mitogen Control (tampa roxa)

Os antígenos ficam secos na parede interna dos tubos de coleta de sangue, de modo que é essencial que o conteúdo dos tubos seja completamente misturado ao sangue. Os tubos devem ser transferidos para uma incubadora a 37°C o mais rápido possível e dentro de 16 horas após a coleta.

Os seguintes procedimentos devem ser seguidos para obter os melhores resultados:

1. De cada indivíduo, colete 1 ml de sangue por punção venosa diretamente em cada um dos QF-CMV Blood Collection Tubes. Este procedimento deve ser realizado por um flebotomista treinado.

Os QF-CMV Blood Collection Tubes podem ser usados até uma altitude de 810 metros.

Se usar os QF-CMV Blood Collection Tubes a uma altitude superior a 810 metros ou caso ocorra um baixo volume de coleta de sangue, poderá coletar o sangue usando uma seringa e transferir imediatamente 1 ml para cada um dos três tubos. Por razões de segurança, recomenda-se que tal procedimento seja realizado removendo a agulha da seringa, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos três QF-CMV Blood Collection Tubes e adicionando 1 ml de sangue a cada um (até a marca preta na lateral do rótulo do tubo). Recoloque as tampas dos tubos firmemente e misture conforme descrito abaixo. Como os tubos de 1 ml coletam o sangue de forma relativamente lenta, mantenha o tubo na agulha por 2 a 3 segundos depois que o enchimento do tubo parecer ter sido concluído, para garantir que o volume correto seja coletado.

A marca preta na lateral dos tubos indica o volume de enchimento de 1 ml. Os QF-CMV Blood Collection Tubes foram validados para volumes que variam de 0,8 a 1,2 ml. Se o nível de sangue em qualquer tubo não estiver próximo da marca indicadora, deverá ser obtida uma nova amostra de sangue.

Se for usada uma agulha borboleta para coletar sangue, deverá ser usado um tubo de "purga" para garantir que a tubulação esteja cheia de sangue antes de usar os QF-CMV Blood Collection Tubes.

Alternativamente, o sangue pode ser coletado em um único tubo genérico de coleta de sangue contendo heparina de lítio como anticoagulante e depois transferido para os QF-CMV Blood Collection Tubes. Use apenas heparina de lítio como anticoagulante sanguíneo, uma vez que outros anticoagulantes interferem no ensaio. Encha um tubo de coleta de sangue (volume mínimo de 5 ml) e misture delicadamente invertendo o tubo várias vezes para dissolver a heparina. Este procedimento deve ser realizado por um flebotomista treinado. O sangue deve ser mantido em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de ser transferido para os QF-CMV Blood Collection Tubes para incubação, que tem de ser iniciada dentro de 16 horas após a coleta de sangue.

2. Imediatamente após encher os QF-CMV Blood Collection Tubes, agite-os 10 vezes com firmeza suficiente para garantir que toda a superfície interna do tubo fique coberta de sangue, a fim de dissolver os antígenos nas paredes dos tubos.

Os tubos devem ser mantidos entre 17°C e 25°C no momento do enchimento do sangue. Uma agitação excessivamente vigorosa pode causar a ruptura do gel e levar a resultados anormais.

Se o sangue tiver sido coletado em um tubo de heparina de lítio, as amostras deverão ser misturadas uniformemente antes de serem dispensadas nos QF-CMV Blood Collection Tubes. Certifique-se de que o sangue seja bem misturado por inversão suave imediatamente antes da dispensação. Dispense alíquotas de 1 ml (uma por QF-CMV Blood Collection Tube) em um tubo Nil, CMV Antigen e Mitogen. Tal deve ser realizado assepticamente (garantindo os procedimentos de segurança adequados) removendo as tampas dos três QF-CMV Blood Collection Tubes e adicionando 1 ml de sangue a cada

um (até a marca preta na lateral do rótulo do tubo). Recoloque as tampas dos tubos firmemente e misture conforme descrito acima.

3. Rotule os tubos adequadamente.

Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, CMV Antigen, Mitogen) seja identificável pelo rótulo ou por outros meios.

4. Após o enchimento, a agitação e a rotulagem, os tubos tem de ser transferidos para uma incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ o mais rápido possível e dentro de 16 horas após a coleta. Antes da incubação, mantenha os tubos em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Não refrigere ou congele as amostras de sangue.

Procedimento

Estágio 1: Incubação de sangue e coleta de plasma

1. Incube os tubos na VERTICAL a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16–24 horas. A incubadora não necessita de CO_2 nem de umidificação.

Importante: Se o sangue não for incubado imediatamente após a coleta, misture novamente os tubos invertendo-os 10 vezes antes da incubação.

Após a incubação, os tubos de coleta de sangue podem ser mantidos entre 4°C e 27°C por até 3 dias antes da centrifugação.

2. Após a incubação dos tubos a 37°C , a coleta de plasma é facilitada centrifugando os tubos por 15 minutos a 2000–3000 RCF (g). O tampão de gel separará as células do plasma. Se isso não ocorrer, os tubos devem ser centrifugados novamente.

É possível coletar o plasma sem centrifugação, mas é necessário cuidado adicional para remover o plasma sem perturbar as células.

3. Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma por qualquer meio antes da coleta. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

Importante: As amostras de plasma devem ser coletadas apenas usando uma pipeta.

As amostras de plasma podem ser carregadas diretamente dos tubos de coleta de sangue centrifugados na placa QF-CMV ELISA, inclusive quando são usadas estações de trabalho ELISA automatizadas.

As amostras de plasma podem ser armazenadas em QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugados por até 28 dias entre 2°C e 8°C ou, se coletadas, abaixo de -20°C (preferencialmente, abaixo de -70°C) por períodos prolongados.

Para obter amostras de teste adequadas, colete pelo menos 150 μl de plasma.

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

Consulte "Conteúdo do kit", página 8 e "Materiais necessários, mas não fornecidos", página 9, sobre os materiais necessários para executar o ELISA.

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o Conjugado 100x concentrado, têm de ser colocadas à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de serem usadas. Aguarde, pelo menos, 60 minutos para alcançar o equilíbrio.
2. Remova as tiras de placa de ELISA que não sejam necessárias na estrutura, vede novamente na bolsa de papel alumínio e retorne ao refrigerador para armazenamento até ser necessária.
Deixe, pelo menos, uma tira para as soluções padrão QF-CMV ELISA e tiras suficientes para o número de pacientes sendo testados. Após o uso, conserve a estrutura e a tampa para usar com as tiras restantes.
3. Reconstitua a Solução padrão de IFN- γ humano com o volume de água deionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir uma total ressolubilização. A reconstituição da Solução padrão de IFN- γ para o volume correto produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.

Nota: O volume de reconstituição da Solução padrão de IFN- γ humano (solução padrão do kit) será diferente entre lotes.

Usando a solução padrão reconstituída, prepare uma série de diluições de quatro concentrações de IFN- γ no Diluente verde (Green Diluent, GD) (Figura 1, próxima página). S1 (Solução padrão 1) contém 4,0 UI/ml, S2 (Solução padrão 2) contém 1,0 UI/ml, S3 (Solução padrão 3) contém 0,25 UI/ml e S4 (Solução padrão 4) contém 0 UI/ml (apenas GD). As soluções padrão devem ser testadas, pelo menos, em duplicado. Prepare novas diluições da solução padrão do kit para cada sessão do ELISA.

Exemplo de procedimento para soluções padrão duplicadas

Exemplo de procedimento para soluções padrão duplicadas	
A	Rotule quatro tubos: S1, S2, S3, S4
B	Adicione 150 µl de GD a S1, S2, S3, S4
C	Adicione 150 µl da solução padrão do kit a S1 e misture bem
D	Transfira 50 µl de S1 para S2 e misture bem
E	Transfira 50 µl de S2 para S3 e misture bem
F	O GD sozinho serve como padrão zero (S4)

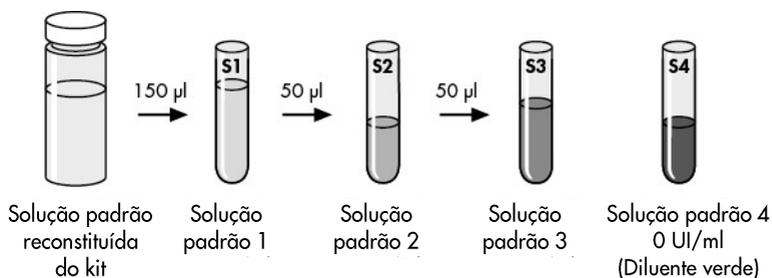


Figura 1. Preparação da curva-s de solução padrão por diluição em série.

4. Reconstitua o Conjugado 100x concentrado liofilizado com 0,3 ml de água deionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir uma total solubilização do conjugado.

O conjugado na concentração de trabalho é preparado diluindo a quantidade necessária de Conjugado 100x concentrado reconstituído no Diluente verde (consulte a Tabela 1, próxima página).

Misture bem e com cuidado para evitar a formação de espuma.

Retorne qualquer Conjugado 100x concentrado não usado a uma temperatura entre 2°C a 8°C imediatamente após o uso.

Use apenas o Diluente verde.

Tabela 1. Preparação do conjugado na concentração de trabalho

Número de tiras	Volume de Conjugado 100x concentrado	Volume de Diluente 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. Para as amostras de plasma coletadas de tubos de coleta de sangue e subsequentemente congeladas ou armazenadas por mais de 24 horas antes do ensaio, misture bem antes de adicionar ao poço de ELISA.

Importante: Se as amostras de plasma forem adicionadas diretamente dos QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugados, deverá ser evitada qualquer mistura do plasma. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Se forem necessários resultados quantitativos, dilua os plasmas de CMV e Mitogen 1/10 no Diluente verde (10 µl de plasma + 90 µl de GD). O plasma de Nil não deve ser diluído.

Recomenda-se que as seguintes amostras sejam testadas em paralelo:

Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)

No entanto, as seguintes opções de amostra do paciente também são suportadas pelo QuantiFERON-CMV Analysis Software:

Nil, CMV Antigen, Mitogen

Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)

Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10)

Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen

7. Adicione 50 µl de conjugado na concentração de trabalho recém-preparado aos poços de ELISA necessários usando uma pipeta multicanal.
8. Adicione 50 µl de amostras de plasma testadas aos poços apropriados. Finalmente, adicione 50 µl de cada um das soluções padrão 1 a 4 aos poços apropriados. As soluções padrão devem ser testadas, pelo menos, em duplicado.
9. Cubra a placa de ELISA e misture bem o conjugado e as amostras/soluções padrão de plasma usando um agitador de microplacas por 1 minuto a 500–1000 rpm. Evite salpicos.
10. Cubra a placa de ELISA e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) por 120 ± 5 minutos.

Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta. Divergências em relação ao intervalo de temperatura especificado podem levar a resultados incorretos.

11. Durante a incubação, prepare o tampão de lavagem na concentração de trabalho. Dilua uma parte do Tampão de lavagem 20x concentrado em 19 partes de água deionizada ou destilada e misture bem. É fornecido Tampão de lavagem 20x concentrado suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem na concentração de trabalho.
12. Quando a incubação da placa de ELISA estiver concluída, lave os poços com 400 µl de tampão de lavagem na concentração de trabalho por, pelo menos, seis ciclos. Recomenda-se uma lavadora automática de placas.

Importante: Uma lavagem meticulosa é muito importante para a realização do ensaio. Verifique se cada poço está completamente cheio tampão de lavagem na parte superior do poço para cada ciclo de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.

Deve ser adicionado desinfetante laboratorial padrão ao reservatório de efluentes e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

-
13. Bata as placas com a face para baixo na toalha absorvente e sem fiapos para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de Solução de substrato enzimático a cada poço, cubra a placa com uma tampa e misture bem usando um agitador de microplacas por 1 minuto a 500–1000 rpm.
 14. Cubra cada placa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) por 30 minutos.
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta.
 15. Após a incubação de 30 minutos, adicione 50 µl de Solução de parada enzimática a cada poço na mesma ordem em que o substrato foi adicionado e misture bem a 500–1000 rpm usando um agitador de microplacas.
 16. Meça a densidade óptica (Optical Density, OD) de cada poço no prazo de 5 minutos após a interrupção da reação usando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e com um filtro de referência de 620 a 650 nm. Os valores de densidade óptica (Optical Density, OD) são usados para calcular os resultados.

Cálculos e interpretação de testes

O QuantiFERON-CMV Analysis Software, para a análise de dados brutos e o cálculo de resultados, é disponibilizado pela QIAGEN em www.QuantiFERON.com. Verifique se é usada a versão mais recente do QF-CMV Analysis Software.

O software realiza uma avaliação de controle de qualidade do ensaio, gera uma curva de solução padrão e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado em "Interpretação dos resultados" na página 24. O software relata a menor diluição que gera um resultado dentro do intervalo do QF-CMV ELISA, levando em consideração o fator de diluição.

Como alternativa ao uso do QF-CMV Analysis Software, os resultados podem ser determinados de acordo com o método a seguir.

Geração da curva de solução padrão (se o QF-CMV Analysis Software não for usado)

Determine os valores médios de densidade óptica (Optical Density, OD) das réplicas de solução padrão do kit em cada placa.

Construa uma curva de solução padrão de \log_{10} - \log_{10} traçando o \log_{10} da densidade óptica (Optical Density, OD) média (eixo Y) em relação ao \log_{10} da concentração de IFN- γ das soluções padrão em UI/ml (eixo X), omitindo desses cálculos a solução padrão zero. Calcule a linha de melhor ajuste para a curva de solução padrão por análise de regressão.

Use a curva de solução padrão para determinar a concentração de IFN- γ (UI/ml) para cada uma das amostras de plasma de teste, usando o valor de densidade óptica (Optical Density, OD) de cada amostra.

Esses cálculos podem ser realizados usando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas e com o software de folha de cálculo ou estatístico padrão (como o

Excel® Microsoft®). Recomenda-se que sejam usados esses pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (coefficient of variation, %CV) para as soluções padrão e o coeficiente de correlação (r) da curva de solução padrão.

O resultado relatado deve ser obtido da menor diluição que gera um resultado dentro do intervalo do QF-CMV ELISA, para garantir que o fator de diluição seja levado em consideração quando aplicável.

Controle de qualidade do teste

A precisão dos resultados de teste depende da geração de uma curva de solução padrão precisa. Portanto, os resultados derivados das soluções padrão devem ser examinados antes que os resultados das amostras de teste possam ser interpretados.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de densidade óptica (optical density, OD) médio da Solução padrão 1 deve ser $\geq 0,600$.
- O %CV dos valores de densidade óptica (optical density, OD) replicados da Solução padrão 1 e da Solução padrão 2 tem de ser $< 15\%$.
- Os valores de densidade óptica (optical density, OD) replicados das Soluções padrão 3 e 4 não podem variar mais do que 0,040 unidades de densidade óptica em relação a sua média.
- O coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorbância das soluções padrão tem de ser $\geq 0,98$.

O QF-CMV Analysis Software calcula e relata esses parâmetros de controle de qualidade. Se os critérios acima não forem atendidos, a execução será inválida e deverá ser repetida.

O valor de densidade óptica (Optical Density, OD) da solução padrão zero (Diluyente verde) deve ser $\leq 0,150$. Se o valor de densidade óptica (Optical Density, OD) médio for $> 0,150$, o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

Interpretação dos resultados

Os resultados do QuantiFERON-CMV são interpretados usando os critérios na Tabela 2.

Tabela 2. Interpretação dos resultados do QuantiFERON-CMV

Nil (UI/ml)	CMV menos Nil (UI/ml)	Mitogen menos Nil (UI/ml)*	Resultado do QF-CMV	Relato/Interpretação
≤ 8,0	≥0,20 e ≥25% de Nil	Qualquer um	Reativo†	Imunidade anti-CMV detectada
	<0,20 OU ≥0,20 e <25% de Nil	≥0,5	Não reativo	Imunidade anti-CMV NÃO detectada
		<0,5	Indeterminado†	Os resultados são indeterminados para a responsividade ao CMV
>8,0§	Qualquer um	Qualquer um	Indeterminado†	Os resultados são indeterminados para a responsividade ao CMV

* As respostas ao controle positivo do Mitogen (e, ocasionalmente, antígenos de CMV) podem estar, com frequência, fora do intervalo do leitor de microplacas. Isso não afeta os resultados do teste.

† Quando não há suspeita de infecção por citomegalovírus, os resultados inicialmente reativos podem ser confirmados pelo reteste das amostras de plasma originais em duplicado no QF-CMV ELISA. Se a repetição do teste de uma ou das duas réplicas for positiva, o resultado do teste do indivíduo deve ser considerado reativo.

‡ Consulte "Guia de solução de problemas" (página 40) para possíveis causas.

Em estudos clínicos (1), um resultado indeterminado entre pacientes transplantados de órgãos sólidos, em que um doador é reativo para CMV, mas o controle de Mitogen estava abaixo de 0,5 UI/ml, demonstrou ser clinicamente relevante. Esses pacientes têm o maior risco de desenvolver CMV.

§ Nos estudos clínicos, menos de 0,25% dos participantes apresentaram níveis de IFN- γ de >8,0 UI/ml para o valor de Nil.

Nota: O nível de IFN- γ medido deve ser usado em conjunto com a apresentação clínica, o histórico médico e outras avaliações de diagnóstico ao estabelecer a resposta imune aos antígenos de CMV. O QF-CMV não é um teste para determinar a infecção por CMV e não deve ser usado para excluir a infecção por CMV.

Limitações

Os resultados dos testes QuantiFERON-CMV têm de ser usados em conjunto com o histórico epidemiológico de cada indivíduo, o estado médico atual e outras avaliações de diagnóstico.

Poderão ocorrer resultados não confiáveis ou indeterminados devido a:

- Divergências em relação ao procedimento descrito no folheto informativo do QuantiFERON-CMV ELISA
- Níveis excessivos de IFN- γ no tubo de controle
- Mais de 16 horas entre a coleta do espécime de sangue e a incubação a 37°C.

Valores esperados

Os valores esperados de IFN- γ usando o QuantiFERON-CMV foram obtidos testando 591 amostras de indivíduos saudáveis. 343 amostras testadas soropositivas e 248 amostras testadas soronegativas para CMV IgG. O estado sorológico para CMV era desconhecido no momento do teste QF-CMV. Nas 248 amostras de indivíduos soronegativos para CMV, 100% (248/248) das amostras testadas não foram reativas em relação ao QF-CMV ELISA, produzindo respostas de IFN- γ de <0,2 UI/ml ao tubo CMV Antigen (Nil subtraído). É mostrada a distribuição das respostas de IFN- γ ao tubo CMV Antigen (Nil subtraído) para os 343 indivíduos soropositivos para CMV (Figura 2).

Número de amostras

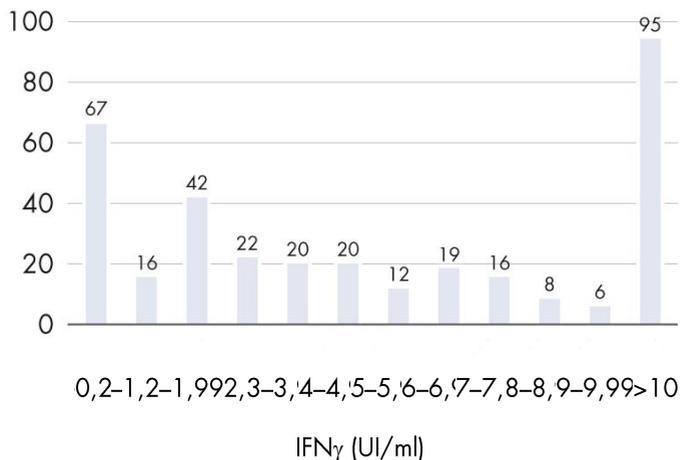


Figura 2. Distribuição das respostas de QF-CMV IFN γ (Nil subtraído) em indivíduos saudáveis soropositivos (n = 343).

A distribuição das respostas de IFN γ ao Mitogen (Nil subtraído) foi determinada usando 733 amostras de indivíduos adultos saudáveis usando o QF-CMV ELISA, independentemente da sorologia para CMV IgG (Figura 3). Um resultado de Mitogen (Nil subtraído) de menos de 0,5 UI/ml indica falha no teste ou que o indivíduo está em um estado imunocomprometido. Em uma população saudável, apenas 2/733 resultados se enquadram nessa categoria.

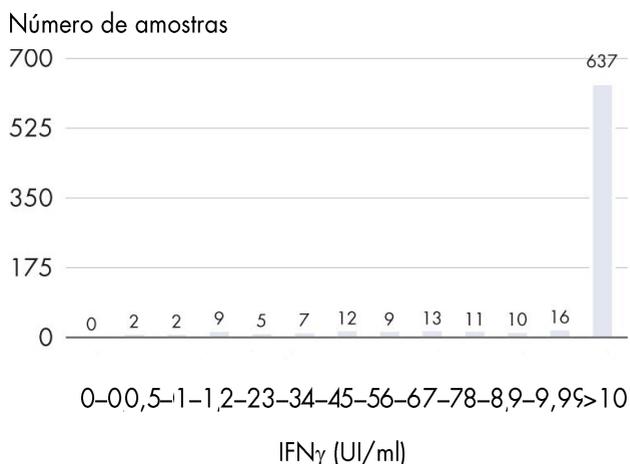


Figura 3. Distribuição das respostas de IFN- γ ao Mitogen (Nil subtraído) em indivíduos saudáveis (n=733).

A distribuição das respostas de IFN- γ aos tubos Nil foi determinada usando 1020 amostras de plasma de indivíduos saudáveis usando o QF-CMV ELISA, independentemente da sorologia para CMV IgG (Figura 4).

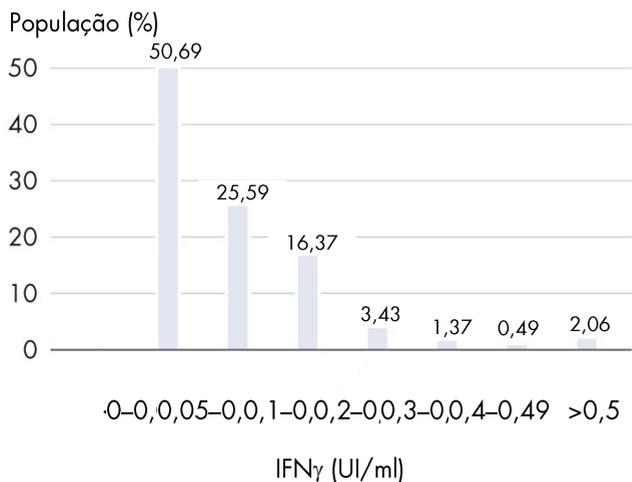


Figura 4. Distribuição das respostas de IFN- γ aos tubos Nil em indivíduos saudáveis (n = 1020) expressas como uma porcentagem da população.

Características de desempenho

Desempenho clínico

Foi estabelecido um limiar de teste para detectar a exposição prévia ao CMV usando o QF-CMV após a análise dos resultados de um grupo de indivíduos saudáveis (n = 223) em que os resultados do QF-CMV foram comparados aos resultados sorológicos de CMV IgG. Uma análise ROC determinou que um limiar de teste de 0,04 UI/ml (após subtração de Nil) forneceu valores preditivos positivos e negativos ótimos para QF-CMV (área abaixo da curva = 0,9679 [IC de 95%: 0,9442–0,9915, p<0,0001]) e, portanto, representou o limiar no qual este ensaio realizou seu uso pretendido com mais eficiência em uma população saudável.

O desempenho do ensaio QF-CMV foi comparado com o teste sorológico SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). O ensaio QF-CMV mostrou 95% (294/310 indivíduos) de concordância com o teste sorológico para CMV IgG em indivíduos saudáveis, com nenhum dos 149 doadores soronegativos mostrando qualquer reatividade em relação ao QF-CMV. 145 de 161 doadores soropositivos demonstraram uma resposta reativa ao QF-CMV. A concordância positiva geral foi de 90%, com um valor de concordância negativa de 100%. O nível de concordância em indivíduos saudáveis entre as respostas ao QF-CMV e o estado sorológico do CMV IgG é mostrado em Tabela 3.

Tabela 3. Concordância entre o teste sorológico QuantiFERON-CMV e o CMV IgG em indivíduos saudáveis

		Sorologia para CMV		Total
		Positivo	Negativo	
QuantiFERON-CMV	Reativo	145	0	145 (46,8%)
	Não reativo	16	149	165 (53,2%)
	Total	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Limiar do ensaio

O limiar de teste clínico recomendado para este ensaio é de 0,2 UI/ml no tubo CMV Antigen (Nil subtraído), embora possam ser validados limiares diferentes para diferentes contextos clínicos.

Estudos clínicos

Como não existe um padrão definitivo para confirmar ou excluir o diagnóstico de infecção por citomegalovírus, uma estimativa de sensibilidade e especificidade para QF-CMV não pode ser praticamente avaliada. A especificidade e a sensibilidade do QF-CMV foram aproximadas através da avaliação do nível de concordância entre as respostas ao QF-CMV e o estado sorológico do CMV IgG em indivíduos saudáveis.

A especificidade do QF-CMV foi aproximada através da avaliação de taxas falso-positivas (resposta reativa ao QF-CMV) em amostras de doadores saudáveis, sem evidência de exposição prévia ao CMV (indivíduos soronegativos para CMV IgG). A sensibilidade foi aproximada através da avaliação da responsividade ao QF-CMV em amostras de doadores saudáveis com evidência de exposição prévia ao CMV (indivíduos soropositivos para CMV IgG). O QF-CMV usa um grande número de epítomos específicos do CMV de diferentes proteínas de CMV e, portanto, fornece ampla cobertura da população com diversos haplótipos HLA Classe I (aproximadamente 98% da população). Como os haplótipos HLA de indivíduos testados em relação à sorologia para CMV eram desconhecidos, esperava-se que uma pequena porcentagem de indivíduos positivos para sorologia não respondesse aos QF-CMV Blood Collection Tubes.

Especificidade

Em um estudo de 591 amostras de indivíduos saudáveis, nenhum resultado falso-positivo do QF-CMV foi detectado em indivíduos com teste soronegativo para CMV IgG com 248/248 amostras com teste não reativo em relação ao QF-CMV ELISA e negativo em relação ao teste sorológico CMV IgG. Portanto, os resultados obtidos com o QF-CMV e o teste sorológico CMV IgG mostraram 100% de concordância.

Em todas as outras avaliações de especificidade realizadas em receptores de transplantes de órgãos sólidos (1–8), receptores de transplantes de células-tronco hematopoiéticas (9,10) e pacientes infectados por HIV (11), a concordância entre a sorologia QF-CMV e CMV IgG também demonstrou ser de 100%.

Sensibilidade

Em um estudo realizado em 343 amostras de indivíduos saudáveis com teste soropositivo para CMV IgG, o nível de concordância entre as respostas de QF-CMV e os resultados sorológicos de CMV IgG foi de 80,5%, com 276/343 amostras com teste reativo ao QF-CMV e positivo ao teste sorológico CMV IgG. A discordância observada talvez se deva à sorologia falso-positiva para CMV ou à ausência de tipos de HLA responsivos nos indivíduos testados.

Os níveis de concordância nas avaliações de sensibilidade realizadas em receptores de transplante de órgãos sólidos (1–8), receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas (9, 10) e pacientes infectados por HIV (11), mostraram-se mais baixos e talvez se devam à sorologia falso-positiva para CMV, ausência de tipos de HLA responsivos nos indivíduos testados ou ausência de células T reativas nesses pacientes devido à sua imunossupressão.

Estudos destacando a utilidade clínica

Tanto a sorologia para CMV IgG quanto o QF-CMV descrevem o uso pretendido como algo que permite a detecção de imunidade ao CMV. Dentro de um cenário de transplante, a sorologia para CMV é amplamente usada no pré-transplante para estabelecer o risco de complicações do CMV no pós-transplante do receptor, mas tem seu próprio valor limitado após o transplante. Como alternativa, o QF-CMV pode ser usado em receptores de transplante para avaliar o nível de imunidade ao CMV naqueles pacientes em risco de desenvolver infecção sintomática por CMV e/ou doença devido à imunossupressão (12–15).

Vários estudos clínicos publicados em várias coortes de transplantes demonstraram a utilidade do QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

Em um grande estudo com 108 receptores de transplante de órgão sólido (4), pacientes com resultado reativo ao QF-CMV na conclusão da profilaxia anti-CMV apresentaram uma taxa significativamente mais baixa de doença subsequente por CMV (3,3% ou 1/30; usando um limiar de 0,2 UI/ml) em comparação com pacientes com um resultado não reativo ao QF-CMV (21,8% ou 17/78, $p = 0,044$) (Figura 5).

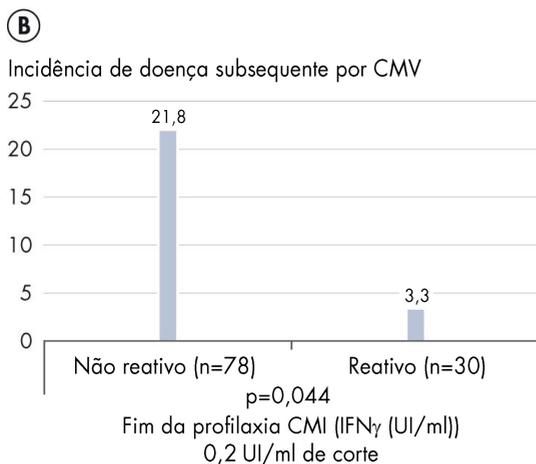
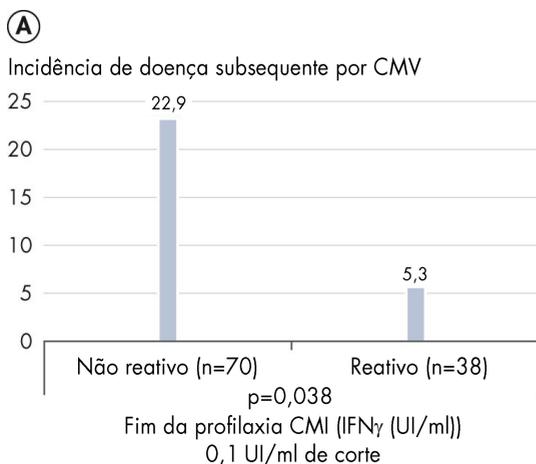


Figura 5. Taxas de doença por CMV de início tardio em pacientes com resultado reativo ao QuantiFERON-CMV em comparação com um resultado não reativo ao QuantiFERON-CMV ao final da profilaxia. Dados subjacentes encontrados em Kumar et al. (4).

Além disso, os receptores de transplante soronegativo para CMV que recebem um órgão de um doador positivo para CMV (D+R-) com um resultado reativo para QF-CMV após a conclusão da profilaxia permaneceram livres da doença por CMV com mais frequência e por mais tempo, indicando que o QF-CMV pode ser usado para identificar aqueles com risco de desenvolver a doença por CMV de início tardio.

Este estudo também destacou que nesta coorte de pacientes transplantados com maior risco de desenvolver doença por CMV (D+/R-), um resultado reativo a qualquer momento após a profilaxia foi associado a uma maior chance de permanecer livre da doença por CMV.

Em um estudo com 37 pacientes transplantados com órgãos sólidos (6), a avaliação das respostas de células-T CD8+ específicas do CMV em relação ao QF-CMV ajudou a prever a liberação viral espontânea em comparação com a progressão da doença por CMV, após elevações na viremia por CMV. Neste estudo, 24/26 pacientes (92,3%) com resultado reativo ao QF-CMV (usando um limiar de teste de IFN- γ $\geq 0,2$ UI/ml), eliminaram espontaneamente o vírus CMV enquanto apenas 5/11 (45,5%) pacientes com um resultado não reativo ao QF-CMV tiveram o mesmo resultado.

Um estudo com 67 receptores de transplante de pulmão avaliando episódios de viremia por CMV pós-transplante (7) observou que 18/25 (72%) episódios de viremia por CMV foram precedidos por um resultado não reativo ao QF-CMV, contra 4/16 (25%) episódios que foram precedidos por uma resposta reativa ao QF-CMV (teste exato de Fisher, $p = 0,0046$; (Figura 6).

Episódios de DNAemia de HCMV com carga viral >1000 cópias/ml (%)

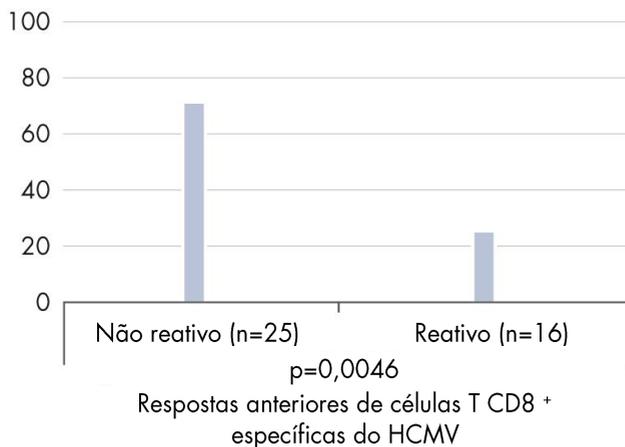


Figura 6. Análise estatística das respostas de células T CD8+ específicas do CMV detectadas pelo QuantiFERON-CMV e o desenvolvimento de viremia por CMV (teste exato de Fisher, $p=0,0046$). Dados subjacentes encontrados em Weseslindtner et al (7).

Um grande estudo prospectivo multicêntrico de 127 pacientes doadores de transplante de órgãos sólidos soronegativos para CMV a recipientes soropositivos para CMV (8), todos tendo recebido profilaxia antiviral, mostrou que pacientes com resultado reativo ao QF-CMV (usando um limiar de teste de 0,1 UI/ml) em qualquer momento após a conclusão da profilaxia anti-CMV apresentavam uma taxa significativamente mais baixa de doença de início tardio aos 12 meses após o transplante (6,4%), em comparação com aqueles que apresentavam resultado não reativo ao QF-CMV (22,2%) e um resultado indeterminado (58,3%, $p < 0,001$). Ao classificar resultados indeterminados como também "não reativos", a incidência de doença subsequente por CMV foi de 6,4% em comparação com 26,8%, $p = 0,024$. Os valores preditivos positivos e negativos de QF-CMV para proteção contra a doença por CMV foram relatados em 0,90 (IC de 95% 0,74–0,98) e 0,27 (IC de 95% 0,18–0,37), respectivamente. Este estudo constatou que o QF-CMV pode ser útil para prever se os pacientes apresentam risco baixo, intermediário ou alto quanto ao desenvolvimento de doença subsequente por CMV após a profilaxia.

Em um estudo prospectivo de 55 receptores de transplante de órgão sólido (8) no qual foi analisada a relação entre os resultados do QF-CMV pré-transplante e os episódios de replicação do CMV pós-transplante, verificou-se uma maior incidência de replicação do CMV pós-transplante em receptores soropositivos para CMV com um resultado de QF-CMV pré-transplante não reativo (usando um limiar de teste de 0,2 UI/ml) (7/14 ou 50%), em comparação com aqueles receptores soropositivos para CMV com um resultado de QF-CMV pré-transplante reativo (4/30 ou 13,3%, $p = 0,021$).

Este estudo descobriu que os receptores com uma resposta não reativa ao QF-CMV pré-transplante que receberam um órgão de um doador soropositivo para CMV tiveram um risco dez vezes maior de replicação do CMV em comparação com aqueles que receberam uma resposta reativa ao QF-CMV pré-transplante (OR ajustado de 10,49, IC de 95% 1,88–58,46). Portanto, um ensaio QF-CMV pré-transplante pode ser útil na previsão do risco de replicação do CMV após o transplante e, assim, permitir a individualização do manejo da infecção por CMV após o transplante de órgão sólido.

Vários outros estudos que investigaram a detecção de respostas de células T CD8⁺ específicas do CMV em relação ao QF-CMV em uma coorte de receptores de transplante foram concluídos (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) ou estão atualmente em andamento em todo o mundo.

Diretrizes de consenso internacional sobre o manejo do citomegalovírus no transplante de órgãos sólidos

A importância do monitoramento imunológico específico do CMV foi reconhecida e publicada nas *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (12). Essas diretrizes internacionais, desenvolvidas por um painel de especialistas em CMV e transplante de órgãos sólidos, convocadas pela Seção de doenças infecciosas da Transplantation Society, representam evidências e diretrizes de consenso baseadas em opiniões de especialistas sobre o manejo do CMV, incluindo: diagnóstico, imunologia, prevenção e tratamento.

Essas diretrizes concluíram que "o monitoramento imunológico das respostas de células T específicas do CMV pode prever indivíduos com risco de doença por CMV após o transplante e pode ser útil para orientar a profilaxia e as terapias preventivas" (12).

Além disso, as diretrizes também forneceram recomendações sobre os atributos do ensaio de monitoramento imune ideal, que incluiu:

- Capacidade de avaliar a quantidade e função das células T CD4⁺ e CD8⁺ de um receptor de transplante
- Capacidade de medir IFN- γ
- Simples de executar, econômico e reproduzível
- Ter um tempo de resposta rápido
- Permitir que os espécimes sejam facilmente transportados para laboratórios de referência especializados

O QF-CMV atende praticamente a todos os critérios especificados por essas diretrizes e representa o único ensaio padronizado de monitoramento imunológico capaz de detectar IFN- γ , específico do CMV.

Características do desempenho do ensaio

O QF-CMV ELISA usa a solução padrão de IFN- γ humano recombinante, que foi testada com uma preparação de IFN- γ de referência (Ref NIH: Gxg01-902-535). Os resultados das amostras de teste são relatados em Unidades Internacionais (UI) relativas a uma curva de solução padrão preparada testando a diluição da solução padrão secundária fornecida com o kit.

Sabe-se que os anticorpos heterófilos (por exemplo, anti-camundongo humano) no soro ou plasma de certos indivíduos causam interferência nos imunoenaios. O efeito de anticorpos heterófilos no QF-CMV ELISA é minimizado pela adição de soro normal de camundongo ao Diluente verde e pelo uso de fragmentos de anticorpo monoclonal F(ab')₂ como o anticorpo de captura de IFN- γ no revestimento dos poços da microplaca.

O limite de detecção do QF-CMV ELISA é de 0,065 UI/ml e não há evidências de um efeito (prozona) gancho de alta dose (prozona) com concentrações de IFN- γ até 10.000 UI/ml. Os anticorpos QF-CMV ELISA demonstraram não reagir de forma cruzada com todas as citocinas testadas, incluindo IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 e IL12.

Demonstrou-se que o QF-CMV ELISA é linear colocando aleatoriamente cinco réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- γ na placa de ELISA. A linha de regressão linear tem uma inclinação de $1,002 \pm 0,011$ e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 7).

Nível determinado de IFN- γ

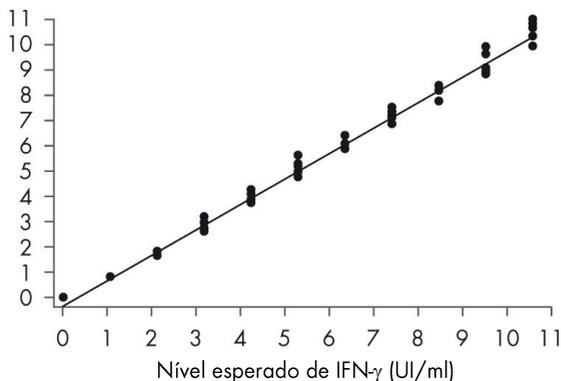


Figura 7. Perfil de linearidade do QF-CMV ELISA, determinado com base no teste de cinco réplicas de 11 amostras de plasma de concentrações conhecidas de IFN- γ .

A reprodutibilidade do QF-CMV ELISA foi estimada testando 20 amostras de plasma com concentrações variáveis de IFN- γ em réplicas de três, em três laboratórios, em três dias não consecutivos e por três operadores. Assim, cada amostra foi testada 27 vezes, em nove corridas de ensaio independentes. Uma amostra era um controle de tubo de Nil e tinha uma concentração calculada de IFN- γ de 0,08 (IC de 95% 0,07–0,09) UI/ml. Das 19 amostras restantes de plasma, o intervalo de concentrações foi de 0,33 (IC de 95% 0,31–0,34) a 7,7 UI/ml (IC de 95% 7,48–7,92).

A imprecisão intracorrida ou intraensaio foi estimada por meio do cálculo da média de %CVs para cada amostra de plasma testada contendo IFN- γ de cada corrida de placa ($n = 9$) e variou de 4,1 a 9,1% de CV. O %CV médio intracorrida (IC de $\pm 95\%$) foi de 6,6% \pm 0,6%. O plasma de IFN- γ zero atingiu um CV médio de 14,1%.

A imprecisão total ou interensaio foi determinada por meio da comparação de 27 concentrações calculadas de IFN- γ para cada amostra de plasma e variou entre 6,6 e 12,3% de CV. O %CV médio geral (IC de $\pm 95\%$) foi de 8,7% \pm 0,7%. O plasma de IFN- γ zero apresentou um CV de 26,1%. Esse nível de variação deve ser esperado porque a concentração calculada de IFN- γ é baixa e a variação em torno de uma estimativa baixa de concentração será maior do que isso para concentrações mais elevadas.

Informações técnicas

Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados podem estar relacionados ao estado imunológico do indivíduo sendo testado, mas também podem estar relacionados a vários fatores técnicos:

- Mais de 16 horas desde a coleta de sangue até a incubação a 37°C
- Armazenamento de sangue fora do intervalo de temperatura recomendada ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)
- Mistura insuficiente de tubos de coleta de sangue
- Lavagem incompleta da placa de ELISA

Se suspeitar de problemas técnicos com a coleta ou o manuseio das amostras de sangue, repita todo o teste QF-CMV com novos espécimes de sangue. É possível repetir o teste ELISA de plasmas estimulados se houver suspeita de qualquer desvio de procedimento com o teste ELISA. Não se espera que os resultados indeterminados (a partir de baixos valores de Mitogen) se alterem com a repetição, a menos que tenha ocorrido um erro no teste ELISA.

Amostras de plasma coaguladas

Caso ocorram coágulos de fibrina com o armazenamento a longo prazo de amostras de plasma, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte também as Informações técnicas fornecidas em www.QuantiFERON.com. Para informações de contato, consulte a contracapa.

Comentários e sugestões

Leituras de baixa densidade óptica das soluções padrão

- | | |
|---|--|
| a) Erro de diluição da solução padrão | Certifique-se de que as diluições da solução padrão do kit sejam preparadas corretamente, de acordo com o folheto informativo do QF-CMV ELISA. |
| b) Erro de pipetagem | Verifique se as pipetas estão calibradas e se são usadas de acordo com as instruções do fabricante. |
| c) Temperatura de incubação muito baixa | A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| d) Tempo de incubação muito curto | A incubação da placa com o conjugado, com as soluções padrão e com as amostras deve durar 120 ± 5 minutos. A Solução de substrato enzimático é incubada na placa durante 30 minutos. |
| e) Filtro incorreto de leitor de placas usado | A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm. |
| f) Os reagentes estão muito frios | Todos os reagentes, com exceção do Conjugado 100x concentrado, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva aproximadamente uma hora. |
| g) O kit/componentes venceram | Garanta que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de 3 meses a partir da data de reconstituição. |

Desenvolvimento inespecífico de cores

- | | |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, seis vezes com 400 μl /poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, a depender da lavadora sendo usada. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos. |
| b) Contaminação cruzada de poços de ELISA | Tome cuidado ao pipetar e misturar amostras para minimizar os riscos. |

Comentários e sugestões

- | | |
|--|--|
| c) Kit/componentes vencidos | Garanta que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de 3 meses a partir da data de reconstituição. |
| d) A Solução de substrato enzimático está contaminada | Descarte o substrato se apresentar coloração azul. Certifique-se de que sejam usados reservatórios limpos de reagente. |
| e) Mistura de plasma em tubos de centrifugação antes da coleta | Certifique-se de que as amostras de plasma sejam cuidadosamente coletadas por cima do gel, sem pipetar para cima e para baixo, tomando cuidado para não perturbar o material na superfície do gel. |

Fundo alto

- | | |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, seis vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, a depender da lavadora sendo usada. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos. |
| b) Temperatura de incubação muito alta | A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente (22°C ± 5°C). |
| c) Kit/componentes vencidos | Garanta que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de 3 meses a partir da data de reconstituição. |
| d) A Solução de substrato enzimático está contaminada | Descarte o substrato se apresentar coloração azul. Certifique-se de que sejam usados reservatórios limpos de reagente. |

Curva de solução padrão não linear e variabilidade duplicada

- | | |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, seis vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, a depender da lavadora sendo usada. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos. |
| b) Erro de diluição da solução padrão | Certifique-se de que as diluições da solução padrão do kit sejam preparadas corretamente, de acordo com este folheto informativo. |
| c) Mistura mal efetuada | Misture bem os reagentes por inversão ou vórtice suave antes da adição à placa. |
| d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio | A adição de amostra e solução padrão deve ser realizada de maneira contínua. Todos os reagentes devem ser preparados antes do início do ensaio. |

As informações dos produtos e os guias técnicos são disponibilizados gratuitamente pela QIAGEN, através do seu fornecedor, ou visitando www.QuantiFERON.com.

Referências

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

Os seguintes símbolos podem aparecer na embalagem e nos rótulos:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	Marca CE
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Referência
	Número de lote
	Número de material
	Número global de item comercial
	Limites de temperatura
	Não reutilizar
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Consultar as instruções de uso
	Fabricante
	Representante autorizado na Comunidade Europeia

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site www.qiagen.com/Support, ligue 00800-22-44-6000 ou entre em contato com um dos Departamentos de Serviço Técnico da QIAGEN ou distribuidores locais (consulte a contracapa ou acesse www.qiagen.com).

Procedimento de teste ELISA abreviado

Estágio 1: Incubação de sangue

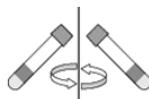
1. Colete o sangue do paciente nos tubos de coleta de sangue e misture agitando os tubos dez (10) vezes com firmeza suficiente para garantir que toda a superfície interna do tubo fique coberta de sangue, a fim de dissolver os antígenos nas paredes do tubo.



2. Incube os tubos na vertical a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16–24 horas.



3. Após a incubação, centrifugue os tubos por 15 minutos a 2000–3000 RCF (g) para separar o plasma e as hemácias.



4. Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma por qualquer meio antes da coleta. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.



Estágio 2: IFN- γ ELISA

1. Coloque os componentes do ELISA, com exceção do Conjugado 100x concentrado, em temperatura ambiente por, pelo menos, 60 minutos.



2. Reconstitua a solução padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou deionizada. Prepare quatro (4) diluições de solução padrão.



3. Reconstitua o Conjugado 100x concentrado liofilizado com água deionizada ou destilada.

4. Prepare o conjugado na concentração de trabalho no Diluente verde e adicione 50 µl a todos os poços.



5. Adicione 50 µl de amostras de plasma testadas e 50 µl de soluções padrão aos poços apropriados. Misture com o agitador.



6. Incube em temperatura ambiente por 120 minutos.



7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem.



8. Adicione 100 µl de Solução de substrato enzimático aos poços. Misture com o agitador.



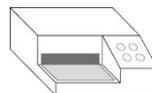
9. Incube em temperatura ambiente por 30 minutos.



10. Adicione 50 µl de Solução de parada enzimática a todos os poços. Misture com o agitador.



11. Leia os resultados a 450 nm com um filtro de referência de 620 a 650 nm.



12. Analise os resultados.



Histórico de revisões do manual

Documento	Alterações	Data
L1075110-R5	Adição de informações de segurança sobre frascos quebrados Atualizações à Tabela 2, Interpretação dos resultados do QF-CMV, página 24.	Fevereiro de 2018
L1075110-R5	Atualização das informações do GHS, página 10.	Fevereiro de 2018

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

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

Acordo de licença limitada do QuantiFERON-CMV ELISA

O uso deste produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, dos seguintes termos:

1. O produto só pode ser usado conforme os protocolos facultados com o mesmo e este manual e apenas com componentes contidos no painel. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo da sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes incluídos neste painel com quaisquer componentes não incluídos neste painel, exceto conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, este manual e quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infringem os direitos de terceiros.
2. A não ser em relação às licenças expressamente indicadas, a QIAGEN não garante que este painel e/ou seu(s) uso(s) não infringem os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, à exceção das expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença exclusivo em qualquer tribunal e recuperar todas as custas processuais, incluindo os encargos com os advogados, em qualquer ação para fazer cumprir o Acordo de licença exclusivo ou quaisquer direitos de propriedade intelectual relacionados com o painel e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Fev.18 © 2018 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Suporte Técnico support.qiagen.com | Site www.qiagen.com