

Octubre de 2019

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Package Insert



2 x 96

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



Para uso en diagnóstico in vitro



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANIA

1075110 Rev. 06



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	8
Contenido del kit.....	8
Materiales necesarios pero no suministrados	9
Advertencias y precauciones.....	10
Información de seguridad.....	12
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	13
Recogida y manipulación del material de muestra	14
Procedimiento	17
Fase 1: Incubación de la sangre y extracción de plasma	17
Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA para IFN- γ humano	18
Cálculos e interpretación de la prueba.....	23
Generación de curva estándar (si no se utiliza el QF-CMV Analysis Software).....	23
Control de calidad de la prueba	24
Interpretación de los resultados	25
Limitaciones	26
Valores esperados	26
Características del rendimiento	29

Rendimiento clínico.....	29
Umbral del ensayo	30
Estudios clínicos	30
Especificidad	31
Sensibilidad.....	31
Estudios que resaltan la utilidad clínica	32
Directrices internacionales de consenso sobre la conducta aplicable al citomegalovirus en el trasplante de vísceras macizas	37
Características del rendimiento del ensayo	38
Información técnica.....	40
Resultados indeterminados	40
Muestras de plasma coaguladas	40
Guía para la resolución de problemas	41
Referencias	43
Símbolos	45
Información de contacto	46
Resumen del procedimiento de la prueba ELISA	47
Fase 1: Incubación de sangre	47
Fase 2: ELISA PARA IFN- γ	47
Historial de revisiones del manual de uso	50

Uso previsto

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) es un ensayo in vitro que utiliza una mezcla de péptidos que simula las proteínas del citomegalovirus (cytomegalovirus, CMV) humano para estimular las células presentes en sangre total heparinizada. La detección del interferón gamma (interferon-gamma, IFN- γ) mediante el enzoinmunoanálisis de adsorción (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 la 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 (LTC) CD8⁺ específicos del CMV pueden proporcionar protección frente a la patología asociada a virus. El recuento de LTC 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 esta prueba.

Principio del procedimiento

El ensayo QF-CMV se realiza en dos etapas. En la primera se recoge sangre total en cada uno de los QF-CMV Blood Collection Tubes: el tubo de control Nil, el tubo de antígeno de CMV y el tubo Mitogen.

El tubo Mitogen 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 Mitogen 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 periodo de incubación de 16 a 24 horas, se centrifugan los tubos, se extrae el plasma y se mide la cantidad de IFN- γ (UI/ml) con el kit QF-CMV ELISA.

La cantidad de IFN- γ presente en las muestras de plasma de los tubos de antígeno de CMV y Mitogen 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 (UI/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 UI/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 antígeno de CMV es significativamente superior al valor de UI/ml de IFN- γ del tubo Nil. La muestra de plasma estimulado con Mitogen sirve de control positivo de IFN- γ para cada muestra analizada. Una respuesta baja a Mitogen indica un resultado indeterminado cuando una muestra de sangre también presenta una respuesta no reactiva a los antígenos de 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 Mitogen 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 Nil permite realizar un ajuste en función de la señal de fondo o del IFN- γ inespecífico de las muestras de sangre. El nivel de IFN- γ del tubo Nil se resta del nivel de IFN- γ del tubo de antígeno de CMV y del tubo Mitogen (consulte el apartado “Interpretación de los resultados” en la página 25 de este prospecto, donde 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 (Tubos de recogida de sangre) (envase de paciente individual)	
N.º de catálogo	0192-0301
Número de preparaciones	1
QuantiFERON Nil Control (Tubo de medición de nulos QuantiFERON, tapa gris)	1 tubo
QuantiFERON CMV Antigen (Antígeno de 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	Kit ELISA de 2 placas
N.º de catálogo	0350-0201
Tiras para microplacas (12 x 8 pocillos) revestidas con anticuerpos monoclonales murinos anti-humano IFN- γ	2 conjuntos de tiras para microplacas para 12 x 8 pocillos
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Estándar de IFN- γ humano y liofilizado, contiene IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, 0,01 % p/v de timerosal)	1 vial (8 UI/ml, después de la 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 necesarios pero no suministrados

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Incubador de 37 °C (no precisa 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 (se recomienda un lavador automatizado)
- Lector de microplacas con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm a 650 nm
- Tapa para la placa

Advertencias y precauciones

Para uso en diagnóstico in vitro

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Están disponibles en línea en un práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, donde puede encontrar, ver e imprimir la SDS de cada kit QIAGEN® y componente del kit.

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. ¡Advertencia! Puede ser corrosivo para los metales. Causa irritación de la piel. Provoca irritación ocular grave. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

QuantiFERON Green Diluent



Contiene: 5-hidroxi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo) pirazol-3-carboxilato de trisodio. Contiene: tartrazina. ¡Advertencia! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contiene: ProClin 300. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. Evitar su emisión en el medio ambiente.

Información de seguridad

Más información

- Las desviaciones respecto del QF-CMV Package Insert pueden generar resultados erróneos. Lea las instrucciones atentamente antes de proceder.
- 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 de conjugado o de 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 desechar los viales de forma segura. Recomendación: Use un destaponador de viales para abrir los viales de conjugado o de estándar de IFN- γ a fin de minimizar el riesgo de lesiones producidas por las tapas metálicas de rosca.
- No mezcle ni utilice tiras para 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 QF-CMV Blood Collection Tubes 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 QF-CMV Blood Collection Tubes a 4-25 °C.
- Los QF-CMV Blood Collection Tubes se deben encontrar a una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C en el momento de llenarlos de sangre.
- El periodo de validez sin abrir de los QF-CMV Blood Collection Tubes 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

Para obtener instrucciones sobre 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 comprendida entre 2 y 8 °C. Anote la fecha de reconstitución del estándar de IFN- γ .
- 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 utilizar debe utilizarse en las 6 horas siguientes a su preparación.
- El tampón de lavado listo para utilizar puede almacenarse a temperatura ambiente (22 °C \pm 5 °C) un máximo de 2 semanas.

Recogida y manipulación del material de muestra

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

- Control de Nil (tapa gris)
- Antígeno de CMV (tapa azul)
- Control de Mitogen (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 QF-CMV Blood Collection Tubes. Esta operación debe ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado.

Los QF-CMV Blood Collection Tubes se pueden utilizar hasta los 810 m de altitud.

Si se utilizan QF-CMV Blood Collection Tubes 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 QF-CMV Blood Collection Tubes 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 las tapas de los tubos bien cerradas y mezcle los tubos tal como se

describe más adelante. 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 existente en el lateral de los tubos indica el volumen de llenado de 1 ml. Los QF-CMV Blood Collection Tubes 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 QF-CMV Blood Collection Tubes.

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 QF-CMV Blood Collection Tubes. 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 debe ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado. La sangre se debe mantener a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de transferirla a los QF-CMV Blood Collection Tubes para su incubación, que debe iniciarse durante las 16 horas siguientes a la extracción de la sangre.

2. Inmediatamente después de llenar los QF-CMV Blood Collection Tubes, agítelos 10 veces aplicando únicamente la fuerza necesaria para que toda la superficie interna del tubo esté cubierta de sangre a fin de disolver el antígeno en sus paredes.

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 haber alteración del gel y dar lugar a resultados anómalos.

Si la sangre se extrae en un tubo con heparina de litio, mezcle las muestras uniformemente antes de transferirlas a los QF-CMV Blood Collection Tubes. Asegúrese

de mezclar bien la sangre invirtiendo con cuidado los tubos inmediatamente antes de la dispensación. Dispense alícuotas de 1 ml (una por cada QF-CMV Blood Collection Tube) en el tubo Nil, de antígeno de CMV y Mitogen 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 QF-CMV Blood Collection Tubes 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 las tapas y mezcle como se describe arriba.

3. Etiquete los tubos correctamente.

Asegúrese de que cada tubo (Nil, antígeno de CMV y Mitogen) 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, mantenga 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 extracción de plasma

1. Incube los tubos EN POSICIÓN VERTICAL a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 a una temperatura comprendida entre $4\text{ y }27\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 días antes de centrifugarlos.
2. Después de la incubación de los tubos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifúguelos durante 15 minutos a una velocidad comprendida entre 2000 y 3000 RCF (g) para extraer el plasma. El tapón de gel separará las células del plasma. Si esto no ocurre, vuelva a centrifugar los tubos.
Es posible extraer 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 la extracción. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel. **Importante:** Las muestras de plasma solo se deben 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 QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugados durante 28 días a una temperatura comprendida entre $2\text{ y }8\text{ }^{\circ}\text{C}$ o, después de la extracción del plasma, por debajo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (preferiblemente a menos de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante periodos más largos.

Se necesita un volumen mínimo de $150\text{ }\mu\text{l}$ de plasma para garantizar la idoneidad de las muestras.

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

Consulte los apartados “Contenido del kit”, en la página 8 y “Materiales necesarios pero no suministrados”, en la página 9, para saber cuáles son los materiales necesarios para llevar a cabo el procedimiento ELISA.

1. Todas las muestras de plasma y los reactivos, excepto el conjugado 100x concentrado, deben estar a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 de IFN- γ añadiendo el volumen de agua desionizada o destilada que se indica en la etiqueta del vial. Mezcle cuidadosamente para minimizar 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 UI/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) (Figura 1, en la próxima página) S1 (estándar 1) contiene 4,0 UI/ml, S2 (estándar 2) contiene 1,0 UI/ml, S3 (estándar 3) contiene 0,25 UI/ml y S4 (estándar 4) contiene 0 UI/ml (solamente GD). Los estándares deben analizarse al menos por duplicado. Prepare diluciones nuevas del estándar del kit para cada ensayo ELISA.

Ejemplo de procedimiento para estándares duplicados

Ejemplo de procedimiento para estándares duplicados	
A	Etiquete cuatro tubos: S1, S2, S3, S4
B	Añada 150 µl de GD a S1, S2, S3 y S4
C	Añada 150 µl del estándar del kit a S1 y mezcle bien
D	Transfiera 50 µl de S1 a S2 y mezcle bien
E	Transfiera 50 µl de S2 a S3 y mezcle bien
F	El GD por sí solo sirve como estándar cero (S4)

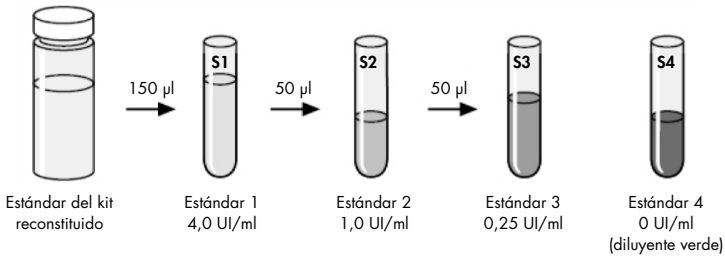


Figura 1. Preparación de la curva estándar mediante dilución en serie.

4. Reconstituya el conjugado 100x concentrado y liofilizado con 0,3 ml de agua desionizada o destilada. Mezcle cuidadosamente para minimizar la formación de espuma y asegúrese de que la solubilización del conjugado es completa.

El conjugado listo para utilizar se prepara diluyendo la cantidad necesaria de conjugado 100x concentrado reconstituido en diluyente verde (consulte la tabla 1, página siguiente).

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

Vuelva a guardar inmediatamente el conjugado 100x concentrado no utilizado a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

Utilice exclusivamente diluyente verde.

Tabla 1. Preparación del conjugado listo para utilizar

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

- 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 de ELISA. Importante: Si las muestras de plasma se añaden directamente desde los QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugados, evite mezclar el plasma. Siempre tenga cuidado de no interferir con el material de la superficie del gel.
- Si se requieren resultados cuantitativos, diluya el plasma de los tubos de antígeno de CMV y Mitogen a 1/10 en diluyente verde (10 µl de plasma + 90 µl de GD). El plasma del tubo Nil no debe diluirse.

Se recomienda analizar las siguientes muestras en paralelo:

Nil, antígeno de CMV, Mitogen, antígeno de CMV (1/10), Mitogen (1/10)

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

Nil, antígeno de CMV, Mitogen

Nil, antígeno de CMV (1/10), Mitogen (1/10)

Nil, antígeno de CMV, Mitogen, antígeno de CMV (1/10)

Nil, antígeno de CMV (1/10), Mitogen

7. Añada 50 µl de conjugado recién preparado listo para utilizar a los pocillos de ELISA mediante una pipeta multicanal.
8. Añada 50 µl de las muestras de plasma de análisis 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 de ELISA y mezcle bien el conjugado y las muestras de plasma/estándares durante 1 minuto con un agitador de microplacas a 500-1000 rpm. Evite las salpicaduras.
10. Tape la placa de ELISA e incúbela a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 120 ± 5 minutos. No deben exponerse las placas a la luz del sol directa 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 20x concentrado con 19 partes de agua desionizada o destilada y mezcle bien. Se incluye suficiente tampón de lavado 20x concentrado para preparar 2 litros de tampón de lavado listo para utilizar.
12. Cuando finalice la incubación de la placa de 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 automatizado.

Importante: Es muy importante lavar bien las placas para que el ensayo dé los resultados esperados. Asegúrese de que todos los pocillos estén totalmente llenos con tampón de lavado hasta el borde superior del pocillo para cada ciclo de lavado. Se recomienda un periodo 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 para microplacas durante 1 minuto a 500-1000 rpm.
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 deben exponerse las placas a la luz del sol directa 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 con un agitador de microplacas a 500-1000 rpm.
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 de la prueba

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

El software evalúa el control de calidad del ensayo, genera una curva estándar y proporciona un resultado para cada sujeto, 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 QF-CMV Analysis Software, los resultados pueden determinarse por medio del método siguiente.

Generación de curva estándar (si no se utiliza el QF-CMV Analysis Software)

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

Genere una curva estándar en escala $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ mediante el trazado del $\log_{(e)}$ de la densidad óptica media (eje y) con relación al $\log_{(e)}$ de la concentración de IFN- γ en los estándares en UI/ml (eje x), sin incluir el estándar cero en el cálculo. Calcule la línea del mejor ajuste de la curva estándar mediante un análisis de regresión.

Utilice la curva estándar para determinar la concentración de IFN- γ (UI/ml) en cada una de las muestras de plasma de análisis, utilizando para ello el valor de densidad óptica 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 cálculo o programas estadísticos (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 estándar.

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 que el factor de dilución se tiene en cuenta cuando corresponda).

Control de calidad de la prueba

La exactitud de los resultados de la prueba 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 de OD de las réplicas del estándar 1 y el estándar 2 debe ser $< 15\%$.
- Los valores de OD de las réplicas 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 QF-CMV Analysis Software calcula y muestra los valores de estos parámetros de calidad. Si no se cumplen los requisitos indicados arriba, 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 la tabla 2.

Tabla 2. Interpretación de los resultados de QuantiFERON-CMV

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

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

† 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 para la resolución de problemas” (página 41) 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 Mitogen estaba por debajo de 0,5 UI/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 UI/ml para el valor de Nil.

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.

Los resultados no fiables o indeterminados pueden deberse a:

- Se producen desviaciones respecto al procedimiento descrito en el QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert.
- 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 UI/ml en el tubo de antígeno de CMV (sustracción de Nil). Se muestra la distribución de las respuestas de IFN- γ en el tubo de antígeno de CMV (sustracción de Nil) para los 343 sujetos seropositivos para el CMV (Figura 2).

Número de muestras

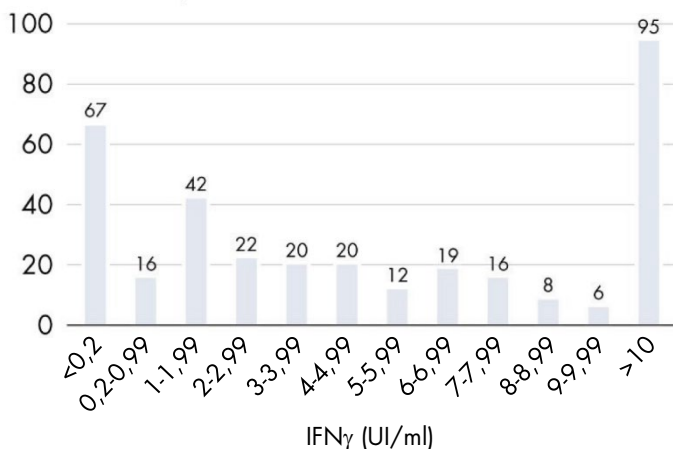


Figura 2. Distribución de las respuestas de QF-CMV IFN- γ (sustracción de Nil) en sujetos sanos seropositivos (n = 343).

La distribución de las respuestas de IFN- γ a Mitogen (sustracción de Nil) 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 (Figura 3). Un resultado de Mitogen (sustracción de Nil) inferior a 0,5 UI/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.

Número de muestras

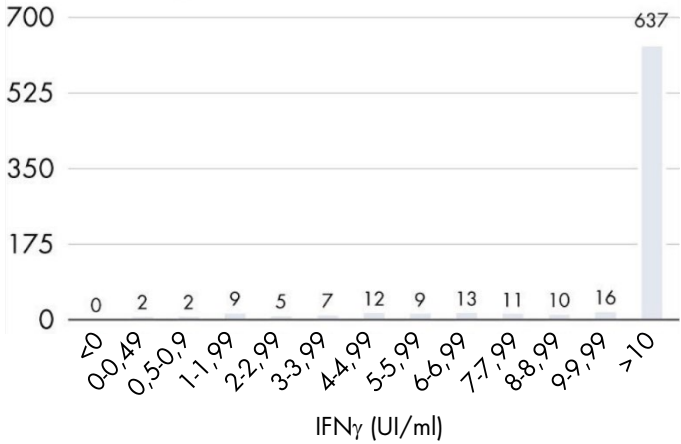


Figura 3. Distribución de las respuestas de Mitogen-IFN- γ (sustracción de Nil) en sujetos sanos (n = 733).

La distribución de las respuestas de IFN- γ a los tubos Nil 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 (Figura 4).

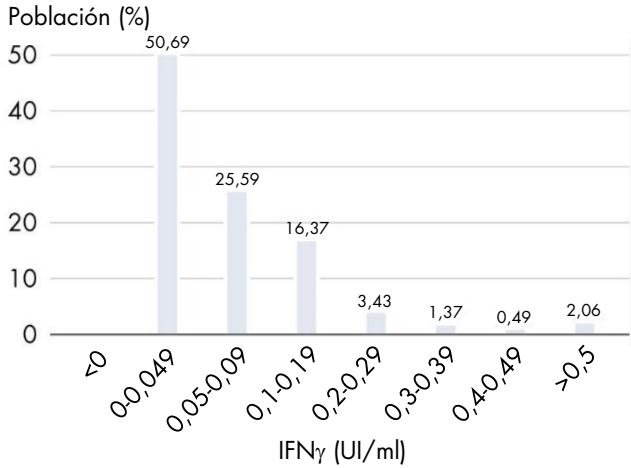


Figura 4. Distribución de las respuestas de Nil IFN- γ en sujetos sanos (n = 1020) expresada como un porcentaje de población.

Características del 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 UI/ml (tras la sustracción de Nil) 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 la 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
		Positivo	Negativo	
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 UI/ml en el tubo de antígeno de CMV (sustracción de Nil), 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 QF-CMV Blood Collection Tubes.

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 reactividad 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 resaltan 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 UI/ml) que los pacientes con un resultado no reactivo en el ensayo QF-CMV (21,8 % o 17/78, $p = 0,044$) (Figura 5).

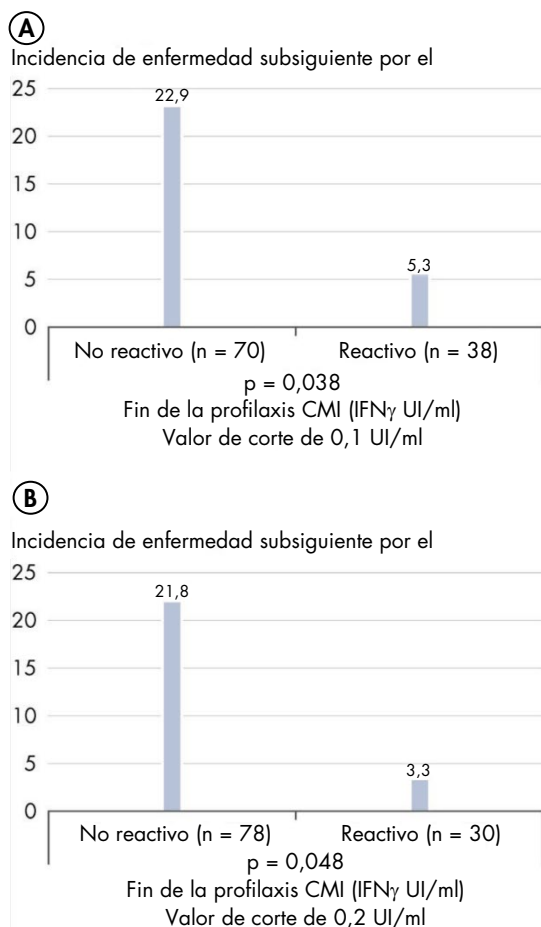


Figura 5. Tasas de enfermedad de aparición tardía por el CMV en pacientes con un resultado reactivo en el ensayo QuantiFERON-CMV frente a un resultado no reactivo en el ensayo QuantiFERON-CMV al final de la profilaxis. Datos subyacentes de Kumar et al. (4).

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 el aclaramiento viral espontáneo 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 $\geq 0,2$ UI/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, $p = 0,0046$, consulte la Figura 6).

Episodios de ADNemia del CMV humano con una carga vírica de >1000 copias/ml (%)

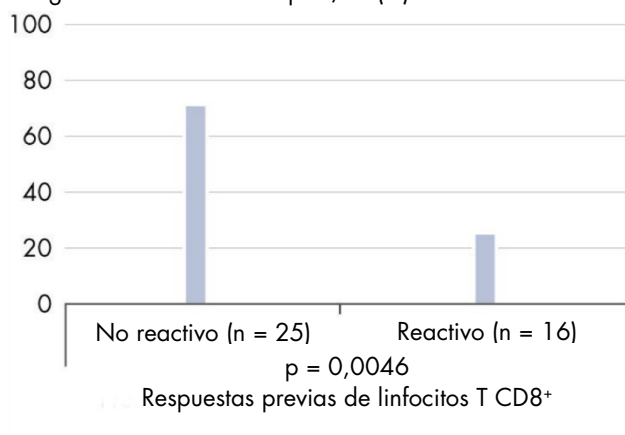


Figura 6. Análisis estadístico de las respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicos del CMV detectadas mediante el ensayo QuantiFERON-CMV y desarrollo de viremia por CMV (prueba exacta de Fisher, p = 0,0046). Datos subyacentes de Weseslindner et al (7).

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 UI/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 UI/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 “la monitorización inmunitaria de las respuestas de linfocitos T específicos del CMV puede predecir qué personas presentan riesgos 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 cuanto a 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 (UI) 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 microplacas.

El límite de detección del QF-CMV ELISA es de 0,065 UI/ml, y no se ha demostrado el efecto gancho a dosis altas (prozona) con concentraciones de IFN- γ de hasta 10.000 UI/ml. 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 (Figura 7).

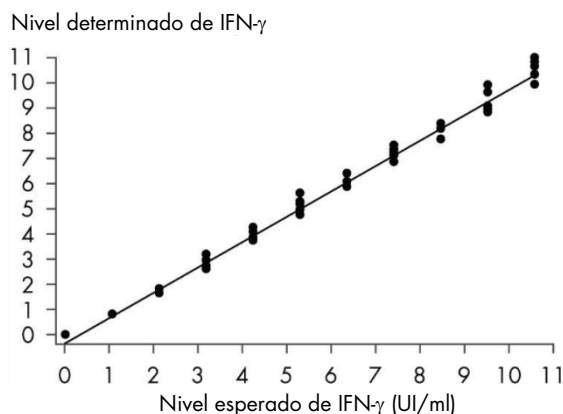


Figura 7. Perfil de linealidad de QF-CMV ELISA determinado mediante el análisis de cinco réplicas de 11 muestras de plasma con concentraciones conocidas de IFN-γ.

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 un control de Nil y tenía una concentración calculada de IFN-γ de 0,08 UI/ml (IC del 95 %: 0,07-0,09). Para las 19 muestras de plasma restantes, el rango de concentraciones osciló entre 0,33 (IC del 95 %: 0,31-0,34) y 7,7 UI/ml (IC del 95 %: 7,48-7,92).

La 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 osciló entre el 4,1 % y el 9,1 %. El promedio dentro del %CV de una misma serie (IC de ± 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 osciló entre el 6,6 % y el 12,3 %. El promedio global de %CV (IC de ± 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 ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$).
- 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 de Mitogen).

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 para la resolución de problemas

Esta guía para la 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 contraportada para obtener la información de contacto.

Comentarios y sugerencias

Valores bajos de densidad óptica para los estándares

- | | |
|---|---|
| a) Error al diluir el estándar | Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, de acuerdo con las instrucciones del QF-CMV ELISA Package Insert. |
| b) Error de pipeteo | Asegúrese de que las pipetas estén calibradas y se usen conforme a 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) Incubación demasiado corta | El tiempo de incubación de la placa con el conjugado, los estándares y las muestras debe ser de 120 ± 5 minutos. La solución enzimática de sustrato se incuba en la placa durante 30 minutos. |
| e) Filtros de lectura de placas incorrectos | La placa debe leerse a 450 nm con un filtro de referencia entre 620 nm y 650 nm. |
| f) Los reactivos están 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) El kit o los componentes ha(n) caducado | 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. Deberá dejarse remojar durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo. |
| b) Contaminación cruzada entre los pocillos de ELISA | Extreme la precaución durante el pipeteado y la mezcla de la muestra para minimizar el riesgo. |

Comentarios y sugerencias

c) El kit o los componentes ha(n) caducado	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) La solución enzimática de sustrato está 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 encima sin pipetear hacia arriba y hacia abajo, con cuidado de no alterar el material de la superficie del gel.

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. Deberá dejarse remojar durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
b) Temperatura de incubación demasiado elevada	La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
c) El kit o los componentes ha(n) caducado	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) La solución enzimática de sustrato está 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. Deberá dejarse remojar durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
b) Error al diluir el estándar	Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, siguiendo las instrucciones de este prospecto.
c) Mezclado mal realizado	Mezcle bien los reactivos mediante inversión o agitación vorticial suave 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.














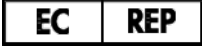
Referencias

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-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

En el envasado y en el etiquetado pueden aparecer los siguientes símbolos:

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Marcado CE
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material
	Número mundial de artículo comercial
	Limitación de temperatura
	No reutilizar el producto
	Mantener alejado de la luz solar
	Consultar 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 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).

Resumen del procedimiento de la prueba ELISA

Fase 1: Incubación de sangre

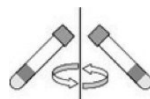
1. Recoja la sangre del paciente en los tubos de recogida de sangre y mezcle el contenido agitando los tubos diez (10) veces con la fuerza suficiente para que toda la superficie interna del tubo se cubra de sangre a fin de disolver los antígenos en sus paredes.



2. Incube los tubos en posición vertical a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 la extracción. 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 100x concentrado, a temperatura ambiente durante al menos 60 minutos.
2. Reconstituya el estándar del kit hasta 8,0 UI/ml con agua desionizada o destilada. Prepare cuatro (4) diluciones de estándar.

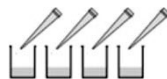


3. Reconstituya el conjugado 100x concentrado y liofilizado con agua desionizada o destilada.

4. Prepare el conjugado listo para utilizar en diluyente verde y añada 50 µl a todos los pocillos.



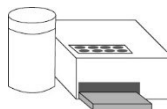
5. Añada 50 µl de las muestras de plasma de análisis y 50 µl de los estándares a los pocillos correspondientes. Mezcle con un agitador.



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 enzimática de sustrato a los pocillos. Mezcle con un agitador.



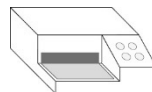
9. Deje incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.



10. Añada 50 µl de solución enzimática de parada 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 de uso

Documento	Cambios	Fecha
L1075110- R06	Materiales necesarios pero no suministrados, se han añadido tapas de placas, página 9	Octubre de 2019

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); 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 los han proporcionado 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 ni 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 toda responsabilidad respecto 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 gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este panel y/o con sus componentes.

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

© 2019 QIAGEN, todos los derechos reservados.

