

Outubro de 2019

Folheto informativo do QuantiFERON®-CMV ELISA



As respostas de medição do teste de IFN- γ em sangue total aos
antigénios peptídicos do citomegalovírus humano

IVD

Para utilização em diagnóstico in vitro

CE

REF

0350-0201



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

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, ALEMANHA

1075110 Rev. 06



www.QuantiFERON.com

Sample to Insight



Índice

Utilização prevista	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 manuseamento de reagentes.....	12
Colheita e manuseamento de amostras	13
Procedimento	16
Fase 1: Incubação do sangue e colheita de plasma	16
Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA para o IFN- γ humano	17
Cálculos e interpretação do teste.....	22
Geração de curva-padrão (se o QF-CMV Analysis Software não for utilizado)	22
Controlo de qualidade do teste.....	23
Interpretação de resultados.....	25
Limitações.....	26
Valores previstos	26
Características de desempenho	29
Desempenho clínico.....	29

Limites do ensaio	30
Estudos clínicos	30
Especificidade	31
Sensibilidade	31
Estudos que destacam a utilidade clínica	32
Diretrizes de consenso internacional para a gestão do citomegalovírus em transplantes de órgãos sólidos	37
Características de desempenho dos ensaios	39
Informações técnicas	42
Resultados indeterminados	42
Amostras de plasma coaguladas.....	42
Guia de resolução de problemas.....	43
Referências	45
Símbolos	47
Informações de contacto.....	48
Procedimento abreviado do teste ELISA.....	49
Fase 1: Incubação do sangue.....	49
Fase 2: IFN- γ ELISA.....	49
Histórico de revisões do manual.....	52

Utilização prevista

O QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) é um ensaio in vitro que utiliza um cocktail de péptidos que mimetizam as proteínas do citomegalovírus (CMV) humano para estimular células em sangue total tratado com heparina. A deteção do interferão-gama (IFN- γ) através de um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é utilizada para quantificar respostas in vitro a esses抗ígenos peptídicos, que estão associados ao controlo imunológico da infecção pelo CMV. A perda deste função imunitária poderá estar associada ao desenvolvimento da doença por CMV. A utilização prevista do QF-CMV destina-se a monitorizar o nível de imunidade anti-CMV de um doente.

O QF-CMV não é um teste para determinar a existência de infecção por CMV, portanto não deve ser utilizado para excluir a infecção por CMV.

Resumo e explicação

O CMV é um herpesvírus que infeta entre 50 e 85% da população adulta. É uma complicação frequente da imunossupressão, principalmente após transplante, e pode contribuir significativamente para a morbidade e mortalidade em receptores de transplante. As terapias de imunossupressão atuais utilizadas para evitar a rejeição de um órgão transplantado têm consequências nocivas nas respostas imunes mediadas por células (CMI) e nos linfócitos T, resultando em maior suscetibilidade a infecções virais após o transplante. A importância das células T na supressão da replicação do CMV é também realçada pelo facto de que os linfócitos T citotóxicos (LTc) CD8+ específicos do CMV poderem proteger contra patogénese associada ao vírus. A enumeração de LTc CD8+ específicos do CMV em doentes imunossuprimidos e a produção de IFN- γ pode ser uma boa ferramenta de previsão do risco para desenvolver a doença por CMV. A produção de IFN- γ pode ser um substituto funcional para a identificação de LTc específicos para o CMV.

O QF-CMV é um ensaio das respostas CMI aos抗igenos peptídicos que mimetizam as proteínas do CMV. Os péptidos do CMV foram concebidos para visar células T CD8+, incluindo haplótipos HLA Classe I A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 e Cw6 [A30, B13] abrangendo >98% da população humana. Os indivíduos afetados pelo CMV normalmente apresentam linfócitos CD8+ no sangue que reconhecem estes抗igenos. Este processo de reconhecimento envolve a produção e secreção da citocina IFN- γ . A deteção e subsequente quantificação de IFN- γ constitui a base deste teste.

Princípio do procedimento

O teste QF-CMV é realizado em duas etapas. Primeiro, o sangue total é colhido para dentro de cada um dos tubos de colheita de sangue do QF-CMV, que incluem um tubo com o controlo de Nil, um tubo com o抗igeno do CMV e um tubo Mitogen.

O tubo Mitogen é utilizado no teste QF-CMV como controlo positivo. Isso poderá ser especialmente necessário caso existam dúvidas quanto ao estado imunitário do indivíduo. O tubo Mitogen poderá também servir de controlo para um manuseamento e incubação corretos do sangue.

Os tubos devem, logo que possível, ser incubados a 37 °C após, no máximo, 16 horas depois da colheita. 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 de抗igeno do CMV e Mitogen pode muitas vezes ser superior aos limites superiores da maioria dos leitores de ELISA, mesmo tratando-se de indivíduos com imunossupressão moderada. Para obter resultados qualitativos, utilize os valores calculados para plasma puro. Para obter resultados quantitativos, em que são necessários valores reais em UI/ml, as amostras de plasma devem ser diluídas numa proporção de 1/10 em Green Diluent (diluente verde) e testadas por ELISA juntamente com plasma puro.

Nota: Nas amostras que se encontrem na gama de resultados do QF-CMV ELISA (ou seja, até 10 UI/ml), deve utilizar-se o resultado obtido com a amostra de plasma puro. Para estas concentrações de IFN- γ , os valores obtidos utilizando a diluição na proporção de 1/10 das amostras de plasma poderão ser inexatos.

Um teste é considerado reativo para uma resposta IFN- γ quando o tubo de抗igénio do CMV apresenta uma leitura significativamente superior ao valor de Nil IFN- γ UI/ml. A amostra de plasma estimulada por Mitogen serve como um controlo positivo de IFN- γ para cada amostra testada. Uma resposta baixa ao Mitogen indica um resultado indeterminado, em que uma amostra de sangue também tem uma resposta não reativa aos抗igénios do CMV. Este padrão poderá ocorrer por insuficiência de linfócitos, atividade reduzida dos linfócitos devido a um manuseamento incorreto das amostras, enchimento/mistura incorrectas do tubo Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do doente produzirem IFN- γ , como acontece com doentes com transplante recente. A amostra de Nil ajusta-se ao fundo ou a IFN- γ não específico em amostras de sangue. O nível de IFN- γ do tubo de Nil é subtraído do nível de IFN- γ para o tubo de抗igénio do CMV e do tubo Mitogen (consultar "Interpretação de resultados" na página 25 deste folheto informativo para obter um resumo de como os resultados do QF-CMV são interpretados).

Tempo necessário para realizar o ensaio

O tempo necessário para realizar o ensaio QF-CMV é calculado abaixo; o tempo para testar várias amostras quando colocadas em lote é também indicado:

Incubação a 37 °C de tubos de sangue: 16–24 horas

ELISA:
Aprox. 3 horas para uma placa ELISA
Menos de 1 hora de trabalho
Adicionar 10 a 15 minutos para cada placa extra

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

Blood Collection Tubes (embalagem individual para paciente)	
N.º de catálogo	0192-0301
N.º de preparações	1
QuantiFERON Nil Control (tampa cinzenta)	1 tubo
QuantiFERON CMV Antigen (tampa azul)	1 tubo
QuantiFERON Mitogen Control (tampa roxa)	1 tubo
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Kit ELISA de 2 placas
N.º de catálogo	0350-0201
Tiras da microplaca (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN-γ humano murino	2 conjuntos de 12 tiras da microplaca de 8 poços
Solução-padrão de IFN-γ humano, liofilizado (contém IFN-γ humano recombinante, caseína bovina, timerosal a 0,01% p/v)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (diluente verde) (contém caseína bovina, soro normal de rato, timerosal a 0,01% p/v)	1 x 30 ml
Conjugado concentrado 100x, liofilizado (HRP de anti-IFN-γ humano murino, contém timerosal a 0,01% p/v)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampão de lavagem concentrado 20x) (pH 7,2, contém 0,05% v/v de ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato de enzimas) (contém H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de paragem de enzimas) (contém 0,5 M de H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert	1

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

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

- Incubadora a 37 °C; CO₂ não necessário
- Pipetas calibradas de volume variável para fornecimento de 10–1000 µl com pontas descartáveis
- Pipeta multicanal calibrada, capaz de distribuir 50 e 100 µl com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas
- Água desionizada ou destilada, 2 litros
- Lavadora de microplacas (lavadora automatizada recomendada)
- Leitor de microplacas equipado com filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 a 650 nm
- Tampa de placa

Avisos e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro

Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF prático e compacto em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a FDS de cada kit QIAGEN® e dos componentes do kit.

CUIDADO



Manuseie o sangue humano como se se tratasse de sangue potencialmente infecioso. Cumpra todas as diretrizes relevantes para o manuseamento de sangue.

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

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Contém: ácido sulfúrico. Aviso! Pode ser corrosivo para os metais. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Aviso! Provoca uma leve irritação da pele. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Green Diluent



Contém: 5-Hidroxi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-(sulfofenil)azo)pirazole-3-carboxilato de trissódio. Contém: tartrazina. Aviso! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Conteúdo: ProClin 300. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Evitar a liberação para o ambiente.

Informações de segurança

Informações adicionais

- O não cumprimento rigoroso das instruções constantes do QF-CMV Package Insert poderá originar resultados errados. Leia as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- Não utilize o kit se qualquer um dos frascos de reagente apresentar sinais de dano ou fuga antes da utilização.
- Importante: Inspecione os frascos antes da utilização. Não utilize os frascos de conjugado ou de solução-padrão de IFN- γ que apresentem sinais de danos ou se o vedante de borracha não estiver em perfeitas condições. Não manuseie frascos partidos. Tome as precauções adequadas para eliminar os frascos em segurança. Recomendação: Utilize um dispositivo próprio para abrir os frascos de conjugado ou de solução padrão de IFN- γ , para minimizar o risco de ferimentos com a tampa metálica.
- Não misture nem utilize tiras da microplaca, solução padrão de IFN- γ humano, diluente verde ou conjugado concentrado 100x de diferentes lotes de kits QF-CMV. Os outros reagentes (concentrado 20x de tampão de lavagem, solução de substrato de enzimas e solução de paragem de enzimas) podem ser trocados entre kits, contanto que os reagentes estejam dentro do seu período de validade e que os detalhes do lote sejam registados.
- Elimine os reagentes e as amostras biológicas não utilizados de acordo com os regulamentos locais, estaduais e federais.
- Não utilize os QF-CMV Blood Collection Tubes ou os kits QF-CMV ELISA após o prazo de validade.
- Certifique-se de que o equipamento laboratorial, por exemplo, as lavadoras e os leitores de placas, se encontra calibrado/validado para utilização.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Tubos de colheita de sangue

- Armazene os QF-CMV Blood Collection Tubes entre 4–25 °C.
- Os QF-CMV Blood Collection Tubes devem estar a uma temperatura entre 17–25 °C aquando do enchimento.
- A vida útil prevista em armazenamento dos QF-CMV Blood Collection Tubes é, no máximo, 15 meses a partir da data de fabrico, quando armazenados a uma temperatura entre 4–25 °C.

Reagentes do kit ELISA

- Conserve o kit entre 2–8 °C.
- Mantenha a Solução de substrato de enzimas sempre protegida da luz solar direta.

Reagentes reconstituídos e não utilizados

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

- A solução-padrão de IFN- γ humano reconstituída pode ser mantida até 3 meses se conservada a 2–8 °C. Observe a data em que a solução padrão de IFN- γ humano foi reconstituída.
- Uma vez reconstituído, o conjugado concentrado 100x não utilizado tem de ser novamente armazenado entre 2–8 °C e tem de ser utilizado no prazo de 3 meses.
Anote a data em que o conjugado foi reconstituído.
- O conjugado funcional tem de ser utilizado num prazo de 6 horas após a preparação.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado à temperatura ambiente (22 ± 5 °C) durante um máximo de 2 semanas.

Colheita e manuseamento de amostras

O QF-CMV utiliza os seguintes tubos de colheita de sangue:

- Controlo de Nil (tampa cinzenta)
- Antigénio do CMV (tampa azul)
- Controlo de Mitogen (tampa roxa)

Os antigénios foram desidratados e afixados à parede interna dos tubos de colheita de sangue, de modo que é essencial que o conteúdo dos tubos seja bem misturado com o sangue. Os tubos devem, logo que possível, ser transferidos para uma incubadora a 37 °C após, no máximo, 16 horas depois da colheita.

Para resultados otimizados, devem ser respeitados os seguintes procedimentos:

1. Colha 1 ml de sangue por indivíduo, através de punção venosa, diretamente para dentro de cada um dos QF-CMV Blood Collection Tubes. Este procedimento deve ser efetuado por um flebotomista qualificado.

Os QF-CMV Blood Collection Tubes podem ser utilizados até uma altitude de 810 metros (2650 pés).

Se utilizar os QF-CMV Blood Collection Tubes a uma altitude superior a 810 metros, ou se ocorrer um baixo volume de colheita de sangue, é possível colher sangue utilizando uma seringa e transferindo imediatamente 1 ml para cada um dos três tubos. Por motivos de segurança, esta ação tem mais êxito retirando a agulha da seringa, tendo em atenção os procedimentos de segurança adequados, retirando as tampas dos três QF-CMV Blood Collection Tubes e adicionando 1 ml de sangue a cada um (até à marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas dos tubos em segurança e misture conforme descrito em baixo. Dado que os tubos de 1 ml extraem o sangue de uma forma relativamente lenta, mantenha o tubo na agulha durante 2 a 3 segundos depois de o tubo parecer estar completamente cheio, de modo a garantir que é extraído o volume correto.

A marca preta na parte lateral do tubo indica o volume de 1 ml. Os QF-CMV Blood Collection Tubes foram validados para volumes entre 0,8 e 1,2 ml. Se o nível de sangue em qualquer tubo estiver fora do intervalo da marca indicadora, deve ser obtida uma nova amostra de sangue.

Se for utilizada uma agulha tipo borboleta para colher o sangue, deverá ser utilizado um tubo de "purga" para garantir que o tubo é enchido com sangue antes de se utilizarem os QF-CMV Blood Collection Tubes.

Em alternativa, o sangue pode ser colhido num só tubo de colheita de sangue genérico com heparina de lítio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os QF-CMV Blood Collection Tubes. Utilize apenas a heparina de lítio como anticoagulante sanguíneo, uma vez que os outros anticoagulantes interferem com o ensaio. Encha um tubo de colheita de sangue (volume mínimo de 5 ml) e misture suavemente invertendo o tubo várias vezes para dissolver a heparina. Este procedimento deve ser efetuado por um flebotomista qualificado. O sangue deve ser conservado à temperatura ambiente (22 ± 5 °C) antes de ser transferido para os QF-CMV Blood Collection Tubes para incubação, que tem de ser iniciada no máximo 16 horas após a colheita do sangue.

2. Agite firmemente os QF-CMV Blood Collection Tubes 10 vezes imediatamente depois de os encher, para garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue, para dissolver os antigénios nas paredes do tubo.

Os tubos devem ser mantidos a uma temperatura entre 17 e 25 °C no momento do enchimento.

Uma agitação demasiado vigorosa poderá causar rutura do gel e levar a resultados anómalos.

Se o sangue tiver sido colhido num tubo de heparina de lítio, as amostras têm de ser bem misturadas antes de serem transferidas para os QF-CMV Blood Collection Tubes. Certifique-se de que o tubo é bem misturado, invertendo-o suavemente imediatamente antes da transferência. Transfira alíquotas de 1 ml (uma por tubo de colheita de sangue QF-CMV) para os respetivos tubos de Nil, de antigénio do CMV e de Mitogen. Recomenda-se a execução em condições assépticas, 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 à marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas dos tubos em segurança e misture conforme descrito em cima.

3. Rotule os tubos adequadamente.

Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, Antigénio do CMV, Mitogen) é identificável pelo rótulo ou por outro meio.

4. Após o enchimento, a agitação e a rotulagem, os tubos têm de, logo que possível, ser transferidos para uma incubadora a 37 ± 1 °C, no máximo 16 horas depois da colheita. Antes da incubação, conserve os tubos à temperatura ambiente (22 ± 5 °C). Não refrigerar ou congelar as amostras de sangue.

Procedimento

Fase 1: Incubação do sangue e colheita de plasma

1. Incubar os tubos na VERTICAL a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO_2 nem de humidificação.

Importante: se o sangue não for incubado imediatamente após a colheita, é necessário efetuar uma nova mistura dos tubos, invertendo-os 10 vezes, antes da incubação.

Após a incubação, os tubos de colheita de sangue poderão ser conservados entre $4\text{--}27^{\circ}\text{C}$ até 3 dias antes da centrifugação.

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

É possível colher o plasma sem centrifugação, mas são necessários cuidados adicionais para remover o plasma sem perturbar as células.

3. Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma, seja de que modo for, antes da colheita. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

Importante: as amostras de plasma só devem ser recolhidas utilizando uma pipeta.

As amostras de plasma podem ser diretamente carregadas a partir de tubos de colheita de sangue centrifugado para a placa QF-CMV ELISA, inclusive quando são utilizadas estações de trabalho ELISA automatizadas.

As amostras de plasma podem ser armazenadas em QF-CMV Blood Collection Tubes até 28 dias, a uma temperatura entre $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ ou, se colhidas, inferior a -20°C (de preferência a menos de -70°C), durante períodos mais prolongados.

Para obter amostras de teste adequadas, colha no mínimo 150 μl de plasma.

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

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

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o Conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de serem utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico.

2. Remova da estrutura as tiras de placa ELISA que não são necessárias, volte a selar a bolsa de alumínio e volte a colocar no frigorífico para conservação até serem necessárias.

Deixe, pelo menos, uma tira para as soluções padrão QF-CMV ELISA e tiras suficientes para o número de doentes que serão testados. Após a utilização, conserve a estrutura e a tampa para utilizar com as tiras restantes.

3. Reconstitua a solução-padrão de IFN- γ humano com o volume de água desionizada 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 com 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 (padrão do kit) será diferente de lote para lote.

Utilizando o padrão reconstituído, prepare uma série de diluição de quatro concentrações de IFN- γ em Diluente Verde (Green Diluent, GD) (Figura 1, próxima página). S1 (Padrão 1) contém 4,0 UI/ml, S2 (Padrão 2) contém 1,0 UI/ml, S3 (Padrão 3) contém 0,25 UI/ml e S4 (Padrão 4) contém 0 UI/ml (apenas GD). Os padrões devem ser testados, pelo menos, em duplicado. Prepare novas diluições da solução-padrão do kit para cada sessão do ELISA.

Exemplo do procedimento para padrões em duplicado

Exemplo do procedimento para padrões em duplicado

- A Rotular quatro tubos: S1, S2, S3, S4
- B Adicionar 150 µl de GD a S1, S2, S3, S4
- C Adicionar 150 µl da solução-padrão do kit a S1 e misturar bem
- D Transferir 50 µl de S1 para S2 e misturar bem
- E Transferir 50 µl de S2 para S3 e misturar bem
- F Apenas GD serve como solução-padrão zero (S4)

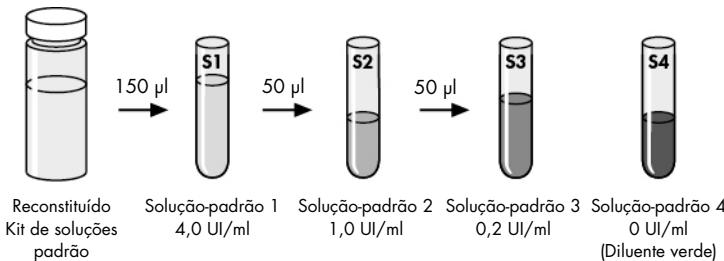


Figura 1. Preparação da curva-padrão por diluição em série.

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

O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de Conjugado concentrado 100x reconstituído em Green Diluent (diluente verde) (consultar a Tabela 1, próxima página).

Misture bem mas suavemente para evitar a formação de espuma.

Volte a colocar qualquer conjugado concentrado 100x não utilizado a 2–8 °C imediatamente após a utilização.

Utilize apenas Green Diluent (Diluente verde).

Tabela 1. Preparação do conjugado funcional

Número de tiras	Volume de Conjugado concentrado 100x	Volume de Green Diluent (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. Relativamente às amostras de plasma colhidas dos tubos de colheita de sangue e subsequentemente congeladas ou armazenadas durante mais de 24 horas antes do ensaio, misture-as bem antes de adicionar ao poço ELISA.

Importante: Se pretender adicionar as amostras de plasma diretamente a partir dos QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugados, deve evitar misturar, seja de forma for, o plasma. Tome cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Se forem necessários resultados quantitativos, dilua amostras de plasma de CMV e de Mitogen numa proporção de 1/10 em Green Diluent (Diluente verde, GD) (10 µl de plasma misturado com 90 µl de GD). O plasma de Nil não deve ser diluído.

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

Nil, Antigénio de CMV, Mitogen, Antigénio do CMV (1/10), Mitogen (1/10)

No entanto, as seguintes opções de amostras de doentes também são suportadas pelo QuantiFERON-CMV Analysis Software:

Nil, Antigénio do CMV, Mitogen

Nil, Antigénio do CMV (1/10), Mitogen (1/10)

Nil, Antigénio do CMV, Mitogen, Antigénio de CMV (1/10)

Nil, Antigénio do CMV (1/10), Mitogen

7. Adicione 50 µl de conjugado funcional recém-preparado aos poços ELISA necessários utilizando uma pipeta multicanal.
8. Adicione 50 µl de amostras de plasma de teste aos poços adequados. Por fim, adicione 50 µl a cada um dos Padrões 1 a 4 aos poços adequados. As soluções-padrão devem ser testadas, pelo menos, em duplicado.
9. Cubra cada placa ELISA com uma tampa e misture muito bem o conjugado e as amostras/padrões de plasma, utilizando um agitador de microplacas durante 1 minuto entre 500 e 1000 rpm. Evite salpicos.
10. Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 120 ± 5 minutos.
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta. Desvios do intervalo de temperaturas especificado podem dar origem a resultados errados.
11. Durante a incubação, prepare o tampão de lavagem funcional. Dilua uma parte do tampão de lavagem concentrado 20x com 19 partes de água desionizada ou destilada, e misture bem.
É fornecido tampão de lavagem concentrado 20x suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem funcional.
12. Quando a incubação das placas de ELISA estiver concluída, lave os poços com 400 µl de tampão de lavagem funcional durante, pelo menos, seis ciclos. Recomenda-se uma lavadora de placas automática.

Importante: A lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada um dos poços está completamente cheio com tampão de lavagem até ao topo do poço em cada um dos ciclos de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo.

Deve ser adicionado desinfetante normal de laboratório ao reservatório de efluente, e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infecioso.

13. Bata nas placas, viradas para baixo sobre uma toalha absorvente e sem fiapos, para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de solução de substrato de enzimas, cubra a placa e misture bem, utilizando um agitador de microplacas durante 1 minuto, entre 500 e 1000 rpm num agitador de microplacas.
14. Cubra cada placa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 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 da Solução de paragem de enzimas a cada poço, pela mesma ordem de adição do substrato, e misture bem entre 500 e 1000 rpm, utilizando um agitador de microplacas.
16. Meça a densidade ótica (DO) de cada poço até no máximo 5 minutos após a paragem da reação utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e um filtro de referência de 620 a 650 nm. Os valores de DO são utilizados para calcular os resultados.

Cálculos e interpretação do teste

O QuantiFERON-CMV Analysis Software, para a análise de dados não processados e cálculo de resultados, é disponibilizado pela QIAGEN, em www.QuantiFERON.com. Certifique-se de que é utilizada a versão mais recente do QF-CMV Analysis Software.

O software executa uma avaliação de controlo de qualidade do ensaio, gera uma curva-padrão e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado na secção "Interpretação de resultados" na página 25. O software indica a diluição mais baixa que gera um resultado dentro do intervalo do QF-CMV ELISA, considerando o fator de diluição.

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

Geração de curva-padrão (se o QF-CMV Analysis Software não for utilizado)

Determine os valores médios de DO das réplicas de padrão do kit de cada placa.

Construa uma curva-padrão de \log_{10} - \log_{10} traçando o \log_{10} da DO média (eixo Y) de encontro ao \log_{10} da concentração de IFN- γ dos padrões em UI/ml (eixo X), omitindo destes cálculos o padrão zero. Calcule a linha de correlação da curva-padrão através de análise de regressão.

Utilize a curva-padrão para determinar a concentração de IFN- γ (UI/ml) de cada uma das amostras de plasma do teste, utilizando o valor de DO de cada amostra.

Estes cálculos podem ser efetuados utilizando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas e com o software de folha de cálculo ou estatístico (tal como o Microsoft® Excel®). Recomendamos que sejam utilizados estes pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (Coefficient of Variation, %CV) das soluções-padrão e o coeficiente de correlação (r) da curva-padrão.

O resultado reportado deve ser obtido a partir da diluição mais baixa que gera um resultado dentro do intervalo do QF-CMV ELISA, assegurando que o fator de diluição é tido em consideração, quando aplicável.

Controlo de qualidade do teste

A exatidão dos resultados de teste está dependente da geração de uma curva-padrão precisa. Por conseguinte, os resultados derivados das soluções-padrão têm de ser examinados antes de se poder interpretar os resultados das amostras do teste.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de DO média da Solução-padrão 1 tem de ser $\geq 0,600$.
- O %CV dos valores de DO replicados da Solução-padrão 1 e da Solução-padrão 2 tem de ser $< 15\%$.
- Os valores de DO da réplica para as Soluções-padrão 3 e 4 não podem variar mais de 0,040 unidades de densidade ótica da respetiva média.
- O coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorvância das soluções-padrão tem de ser $\geq 0,98$.

O QF-CMV Analysis Software calcula e relata estes parâmetros de controlo de qualidade. Se os critérios acima não forem satisfeitos, a execução é inválida e tem de ser repetida.

O valor de DO média da Solução-padrão zero (Green Diluent [diluente verde]) deve ser $\leq 0,150$. Se o valor de DO média for $>0,150$, o procedimento de lavagem da placa deve ser investigado.

Interpretação de resultados

Os resultados de QuantiFERON-CMV são interpretados utilizando os critérios da 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	Relatório/Interpretação
≤8,0	≥0,20 e ≥25% de Nil	Qualquer	Reativo [†]	Imunidade anti-CMV detetada
	<0,20 OU ≥0,20 e <25% de Nil	≥0,5	Não reativo	Imunidade anti-CMV NÃO detetada
		<0,5	Indeterminado [‡]	Resultado indeterminado para a capacidade de resposta do CMV
>8,0 [§]	Qualquer	Qualquer	Indeterminado [‡]	Resultado indeterminado para a capacidade de resposta do CMV

* As respostas do controlo positivo de Mitogen (e, ocasionalmente, do antígeno do CMV) podem ficar normalmente fora do alcance do leitor de microplacas. Isto não tem qualquer impacto nos resultados do teste.

† Quando não houver suspeitas de infecção por citomegalovírus, é possível confirmar resultados inicialmente positivos, voltando a testar as amostras originais de plasma em duplicado no QF-CMV ELISA. Se o teste de repetição de um ou mais duplicados for positivo, o indivíduo deve ser considerado como tendo testado positivo.

‡ Consulte o "Guia de resolução de problemas" (página 43) para veras causas possíveis.

Em estudos clínicos (1), tem sido demonstrado como clinicamente relevante um resultado indeterminado entre doentes com transplantes de órgãos sólidos, onde um dador é reativo para CMV embora o controlo de Mitogen fosse inferior a 0,5 UI/ml. Esses doentes apresentam um risco superior de desenvolverem CMV.

§ Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos indivíduos possuíam níveis de IFN-γ >8,0 UI/ml do valor de Nil.

Nota: O nível determinado de IFN-γ deve ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica, a história clínica e outras avaliações de diagnóstico, ao estabelecer o estado imunológico de resposta aos antígenos do CMV. O QF-CMV não é um teste para determinar a existência de infecção por CMV, portanto não deve ser utilizado para excluir a infecção por CMV.

Limitações

Os resultados do teste QuantiFERON-CMV têm de ser utilizados em conjunto com o historial epidemiológico de cada indivíduo, estado clínico atual e outras avaliações de diagnóstico.

Poderão ocorrer resultados não fiáveis ou indeterminados devido a:

- Divergências em relação ao procedimento descrito no QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert
- Níveis excessivos de IFN- γ no tubo de controlo
- Mais de 16 horas entre a colheita da amostra sanguínea e a incubação a 37 °C.

Valores previstos

Os valores esperados do IFN- γ com a utilização do QuantiFERON-CMV foram obtidos através do teste de 591 amostras de indivíduos saudáveis. 343 amostras testadas eram seropositivas e 248 amostras testadas eram seronegativas para o IgG do CMV. O estado serológico do CMV era desconhecido na altura dos testes com o QF-CMV. Nas 248 amostras de indivíduos seronegativos para o CMV, 100% (248/248) das amostras testadas foram não reativas com o QF-CMV ELISA, produzindo respostas de IFN- γ de <0,2 UI/ml para o tubo de antigénio do CMV (Nil subtraído). É indicada na Figura 2 a distribuição de respostas de IFN- γ para o tubo de antigénio do CMV (Nil subtraído) dos 343 indivíduos seropositivos para o CMV (Figura 2).

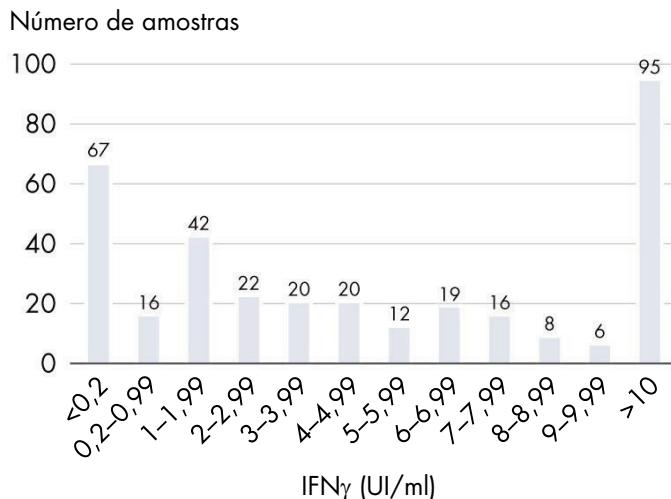


Figura 2. Distribuição de respostas de IFN- γ (Nil substraído) pelo QF-CMV em indivíduos saudáveis seropositivos ($n = 343$).

A distribuição de respostas de IFN- γ para o Mitogen (Nil substraído) foi determinada a partir de 733 amostras de indivíduos adultos saudáveis utilizando o QF-CMV ELISA, independentemente da serologia do IgG do CMV (Figura 3). Um resultado de Mitogen (Nil substraído) inferior a 0,5 UI/ml indica uma falha do teste ou que o indivíduo se encontra num estado imunocomprometido. Numa população saudável, apenas 2/733 resultados se inseriram nesta categoria.

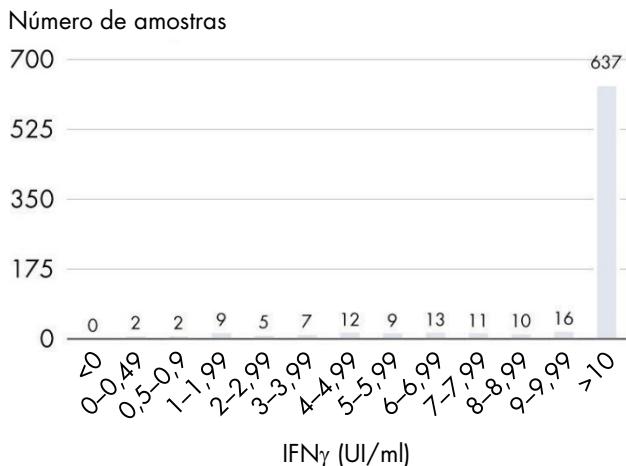


Figura 3. Distribuição de respostas de IFN- γ para o Mitogen (Nil subtraído) em indivíduos saudáveis ($n = 733$).

A distribuição de respostas de IFN- γ para tubos de Nil foi determinada a partir de 1020 amostras de plasma de sujeitos saudáveis utilizando o QF-CMV ELISA, independentemente da serologia do IgG do CMV (Figura 4).

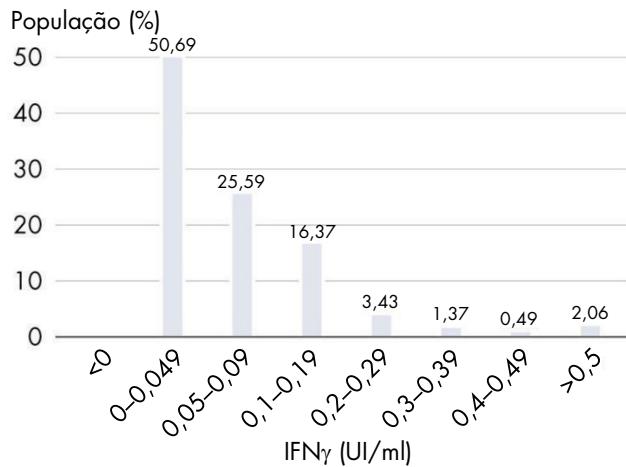


Figura 4. Distribuição de respostas de IFN- γ para o Nil em indivíduos saudáveis ($n = 1020$) expressa em percentagem da população.

Características de desempenho

Desempenho clínico

Foi estabelecido um limite de teste para detetar exposição anterior ao CMV utilizando o QF-CMV, após a análise de resultados de um grupo de indivíduos saudáveis ($n = 223$) em que os resultados do QF-CMV foram comparados com os resultados serológicos do IgG do CMV. Uma análise ROC determinou que um limite de teste de 0,04 UI/ml (após a subtração de Nil) providenciou os valores preditivos positivos e negativos ótimos para o QF-CMV (área abaixo da curva = 0,9679 [95% IC: 0,9442–0,9915, $p<0,0001$]), e portanto, representou o limite no qual este ensaio realiza a sua utilização prevista do modo mais eficiente, numa população saudável.

O desempenho do ensaio QF-CMV foi comparado com o teste de serologia SeraQuest™ do IgG do CMV (Quest International). O ensaio QF-CMV demonstrou uma concordância de 95% (294/310 indivíduos) com o teste serológico do IgG do CMV em indivíduos saudáveis, sendo que nenhum dos 149 dadores seronegativos demonstrou qualquer reatividade pelo QF-CMV. 145 dos 161 dadores seropositivos demonstraram uma resposta reativa com o QF-CMV. A concordância positiva geral foi de 90% com um valor de concordância negativa de 100%. A Tabela 3 mostra o nível de concordância em indivíduos saudáveis entre respostas ao QF-CMV e o estado serológico do CMV IgG.

Tabela 3. Concordância entre o QuantiFERON-CMV e o teste serológico do IgG do CMV, em indivíduos saudáveis

		Serologia do CMV		Total
		Positive (Positivo)	Negative (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%)

Limite do ensaio

O limite recomendado do teste clínico para este ensaio é de 0,2 UI/ml no tubo de antígeno do CMV (Nil subtraído), embora possam ser validados diferentes limites para diferentes situações clínicas.

Estudos clínicos

Uma vez que não existe um padrão definitivo para confirmar ou excluir o diagnóstico de infecção por citomegalovírus, na prática, não se pode avaliar uma estimativa de sensibilidade e especificidade para o QF-CMV. A especificidade e sensibilidade do QF-CMV foram calculadas aproximadamente, avaliando o nível de concordância entre respostas ao QF-CMV e o estado serológico do IgG do CMV de indivíduos saudáveis.

A especificidade do QF-CMV foi calculada aproximadamente, avaliando as taxas de falsos-positivos (resposta reativa ao QF-CMV) em amostras de dadores saudáveis sem evidência de exposição anterior ao CMV (indivíduos seronegativos para o IgG do CMV). A sensibilidade foi calculada aproximadamente, avaliando a capacidade de resposta do QF-CMV em amostras de dadores saudáveis com evidência de anterior exposição ao CMV (indivíduos seropositivos para o IgG do CMV). O QF-CMV utiliza um elevado número de epítópos específicos para o CMV de diferentes proteínas do CMV, proporcionando assim uma ampla cobertura da população com diversos haplótipos HLA de Classe I (aproximadamente 98% da população). Uma vez que os haplótipos HLA dos indivíduos testados contra serologia do CMV eram desconhecidos, esperava-se que uma pequena percentagem de indivíduos serologicamente positivos não apresentasse resposta aos QF-CMV Blood Collection Tubes.

Especificidade

Num estudo de 591 amostras de indivíduos saudáveis, não foi detetado qualquer resultado falso-positivo com o QF-CMV em indivíduos que eram seronegativos para o IgG do CMV, com 248/248 amostras com resultados não reativos pelo QF-CMV ELISA e negativos pelo teste serológico do IgG do CMV. Por conseguinte, os resultados obtidos utilizando o QF-CMV e o teste serológico do CMV IgG demonstraram uma concordância de 100%.

Em todas as outras avaliações de especificidade realizadas em receptores de transplantes de órgãos sólidos (1–8), receptores de transplantes de células estaminais hematopoiéticas (9,10) e doentes infetados pelo VIH (11), a concordância entre o QF-CMV e o teste serológico do IgG do CMV foi também demonstrada como sendo de 100%.

Sensibilidade

Num estudo realizado em 343 amostras de indivíduos saudáveis seropositivos para o IgG do CMV, o nível de concordância entre respostas ao QF-CMV e os resultados do teste serológico do IgG do CMV foi de 80,5%, com 276/343 amostras com resultados reativos com o QF-CMV e positivos com o teste serológico do IgG do CMV. A discordância observada pode ser devida à sorologia falso-positiva para CMV ou à ausência de tipos de HLA responsivos nos indivíduos testados.

Os níveis de concordância em avaliações da sensibilidade realizadas em receptores de transplantes de órgãos sólidos (1–8), receptores de transplantes de células estaminais hematopoiéticas (9, 10) e doentes infetados pelo VIH (11), mostraram ser mais baixos, o que poderá dever-se a uma sorologia falsa-positiva do CMV, a ausência de tipos não responsivos de HLA nos indivíduos testados ou à ausência de células T reativas nestes doentes devido à sua imunossupressão.

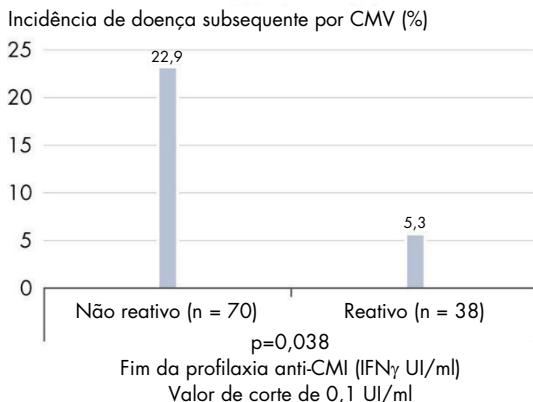
Estudos que destacam a utilidade clínica

Tanto a serologia do IgG do CMV como o QF-CMV descrevem a utilização prevista como permitindo a deteção de imunidade ao CMV. Num cenário de transplante, a serologia do CMV é amplamente utilizada antes do transplante para estabelecer o risco de complicações de CMV que podem ocorrer pós-transplante no recetor, mas tem um valor limitado após o transplante. Como alternativa, o QF-CMV pode ser utilizado em receptores de transplantes para avaliar o nível de imunidade ao CMV nos doentes em risco de desenvolver infecção sintomática por CMV e/ou doença devido a imunossupressão (12–15).

Vários estudos clínicos publicados sobre numerosos grupos submetidos a transplantes demonstram a utilidade do QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

Num amplo estudo de 108 receptores de transplantes de órgãos sólidos (4), os doentes com um resultado reativo com o QF-CMV no final da profilaxia anti-CMV, apresentaram uma taxa significativamente mais baixa de doença subsequente por CMV (3,3% ou 1/30, utilizando um limite de teste de 0,2 UI/ml), quando comparados com doentes com um resultado não reativo com o QF-CMV (21,8% ou 17/78, $p = 0,044$) (Figura 5).

(A)



(B)

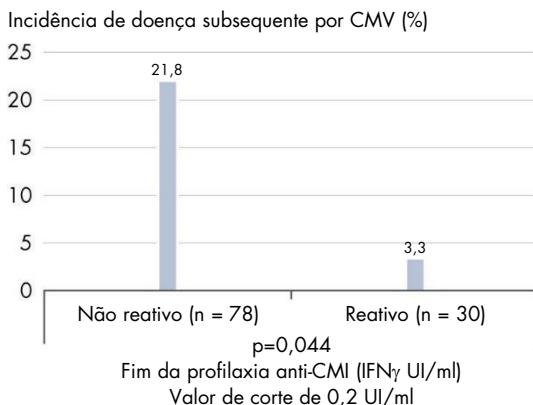


Figura 5. Taxas de início retardado de doença por CMV em doentes com um resultado reativo com o QuantiFERON-CMV versus um resultado não reativo com o QuantiFERON-CMV no fim da profilaxia. Dados subjacentes disponíveis em Kumar et al. (4).

Além disso, os receptores de transplantes seronegativos para o CMV que receberam um órgão de um dador positivo para o CMV (D+R-) com um resultado reativo com o QF-CMV ao concluir a profilaxia, continuaram sem doença por CMV com mais frequência e durante mais tempo, o que indica que o QF-CMV pode ser utilizado para identificar quem está em risco de desenvolver início retardado de doença por CMV.

Este estudo também indicou que neste grupo de doentes transplantados com maior risco de desenvolver doença por CMV (D+/R-), um resultado reativo em qualquer momento após a profilaxia, era associado a uma maior probabilidade de permanecer sem a doença por CMV.

Num estudo a 37 doentes transplantados com órgão sólido (6), a avaliação das respostas das células T CD8⁺ específicas do CMV no QF-CMV ajudaram na previsão de eliminação espontânea do vírus comparada com a progressão da doença por CMV, na sequência de aumentos na viremia do CMV. Neste estudo, 24/26 doentes (92,3%) com um resultado reativo no QF-CMV (utilizando um limite de teste de IFN- γ $\geq 0,2$ UI/ml), eliminaram espontaneamente o vírus CMV ao passo que apenas 5/11 (45,5%) doentes com um resultado não reativo no QF-CMV apresentaram o mesmo resultado.

Num estudo efetuado a 67 receptores de transplante do pulmão onde foram avaliados episódios de viremia CMV após o transplante (7), verificou-se que 18/25 (72%) dos episódios de viremia CMV foram precedidos por um resultado não reativo com o QF-CMV, contra 4/16 (25%) episódios que foram precedidos por uma resposta reativa com o QF-CMV (teste exato de Fisher, p = 0,0046, consulte a Figura 6).

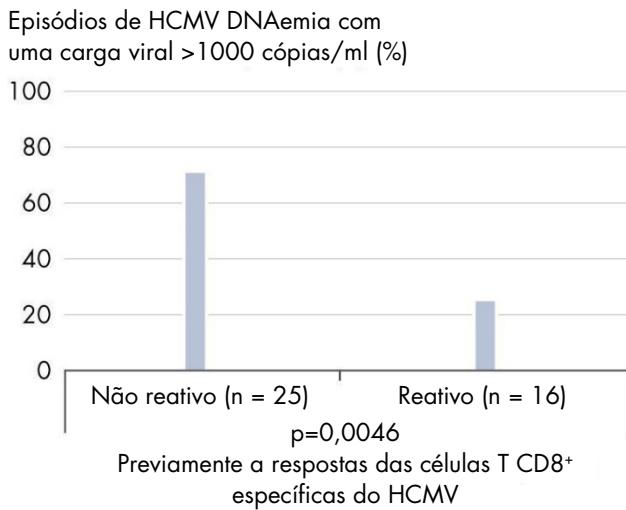


Figura 6. Análise estatística das respostas das células T CD8⁺ específicas para o CMV conforme detetadas pelo QuantiFERON-CMV e o desenvolvimento de viremia CMV (teste exato de Fisher, $p = 0,0046$). Dados subjacentes disponíveis em Weseslindtner et al. (7).

Num amplo estudo prospetivo multicêntrico de 127 dadores seropositivos do CMV, doentes receptores de transplante de órgão sólido seronegativos do CMV (8), tendo todos recebido profilaxia antiviral, foi indicado que os doentes com um resultado reativo com o QF-CMV (utilizando um limite de teste de 0,1 UI/ml) a qualquer momento após a conclusão da profilaxia anti-CMV, apresentavam uma taxa significativamente inferior de início retardado da doença aos 12 meses após o transplante (6,4%), em comparação com os que apresentavam um resultado não reativo (22,2%) com o QF-CMV e um resultado indeterminado (58,3%, $p <0,001$). Quando os resultados indeterminados são classificados como sendo também "não reativos", a incidência de doença por CMV subsequente foi de 6,4% versus 26,8%, $p = 0,024$. Os valores preditivos positivos e negativos do QF-CMV para a proteção contra a doença por CMV foram de 0,90 (IC de 95% 0,74–0,98) e 0,27 (IC de 95% 0,18–0,37), respetivamente. Este estudo estimou que o QF-CMV pode ser útil para prever se os doentes apresentam um risco reduzido, intermédio ou elevado de desenvolver doença por CMV subsequente após a profilaxia.

Num estudo prospectivo realizado a 55 receptores de transplantes de órgãos sólidos (8) em que a relação entre os resultados do QF-CMV pré-transplante e os episódios de replicação do CMV pós-transplante foram analisados, foi observada uma maior incidência de replicação do CMV pós-transplante em receptores seropositivos do CMV com um resultado pré-transplante não reativo (utilizando um limite de teste de 0,2 UI/ml) com o QF-CMV (7/14 ou 50%), em comparação com os receptores seropositivos do CMV com um resultado pré-transplante reativo com o QF-CMV (4/30 ou 13,3%, $p = 0,021$).

Este estudo indicou que os receptores com uma resposta não reativa com o QF-CMV pré-transplante que receberam um órgão de um dador seropositivo para o CMV tinham um risco dez vezes maior de replicação do CMV, em comparação com os receptores com uma resposta reativa com o QF-CMV pré-transplante (ajustado OU 10,49, IC de 95% 1,88–58,46). Por conseguinte, um ensaio QF-CMV pré-transplante poderá ser útil na previsão do risco de replicação do CMV após o transplante, e assim possibilitar uma gestão individual de infecção por CMV depois do transplante de um órgão sólido.

Vários outros estudos em que se investiga a deteção de respostas das células T CD8⁺ específicas do CMV pelo QF-CMV em grupos de receptores de transplantes foram concluídos (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) ou estão atualmente em curso em todo o mundo.

Diretrizes de consenso internacional para a gestão do citomegalovírus em transplantes de órgãos sólidos

A importância da monitorização da imunidade específica para o CMV foi reconhecida e publicada em *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Diretrizes de consenso internacional atualizadas para a gestão do citomegalovírus em transplantes de órgãos sólidos) (12). Estas diretrizes internacionais, desenvolvidas por um painel de peritos em assuntos do CMV e de transplante de órgãos sólidos, convocados pelo departamento de doenças infeciosas da sociedade de transplantação, representam a evidência e as diretrizes consensuais com base na opinião de peritos sobre a gestão do CMV, incluindo: diagnóstico, imunologia, prevenção e tratamento.

Estas diretrizes permitiram concluir que "a monitorização imunológica das respostas das células T específicas do CMV podem prever quais os indivíduos em risco de contrair a doença por CMV após o transplante e podem ser úteis para orientar a profilaxia e terapias preventivas" (12).

Além disso, as diretrizes também fornecem recomendações relativamente aos atributos de um ensaio de monitorização ideal, que incluem:

- Capacidade de avaliar a quantidade e a função das células T CD4⁺ e CD8⁺ de um receptor de transplante
- Capacidade para medir o IFN-γ
- Simples de realizar, económico e reproduzível
- Tem um tempo de resposta rápido
- Permite que as amostras sejam expedidas facilmente para laboratórios de referência especializados

O QF-CMV satisfaz praticamente todos os critérios especificados por estas diretrizes e representa o único ensaio de monitorização imunológica estandardizado que consegue detetar o IFN- γ , específico para o CMV.

Características de desempenho dos ensaios

O QF-CMV ELISA utiliza uma solução-padrão de IFN- γ humano recombinante, que tenha sido testado em relação a uma preparação de IFN- γ de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535). Os resultados das amostras de teste são indicados em Unidades Internacionais (UI) relativamente a uma curva-padrão preparada testando a diluição do padrão secundário fornecido com o kit.

Anticorpos heterófilos (por ex., anticorpo antirrato humano) em soro ou plasma de certos indivíduos são uma causa conhecida de interferência com imunoensaios. O efeito dos anticorpos heterófilos no QF-CMV ELISA é minimizado pela adição de soro normal de rato no Green Diluent (Diluente verde) e a utilização de fragmentos de anticorpo monoclonal F(ab')2 como o anticorpo de captura do IFN- γ no revestimento dos poços de microplacas.

O limite de deteção do QF-CMV ELISA é de 0,065 UI/ml, não existindo evidências de um efeito de prozona com concentrações de IFN- γ até 10 000 UI/ml. Os anticorpos do QF-CMV ELISA mostraram não ter reação cruzada com quaisquer citocinas testadas, incluindo as 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 regressão linear possui um declive de $1,002 \pm 0,011$ e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 7).

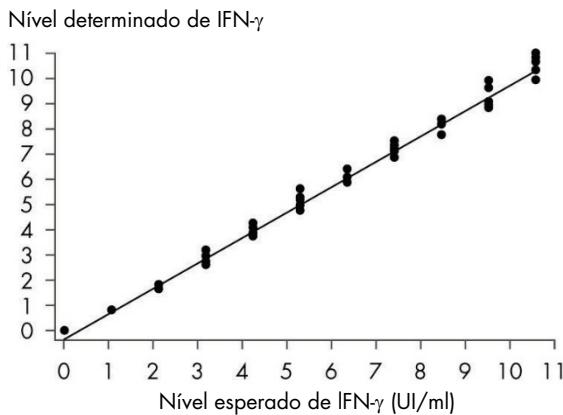


Figura 7. O perfil de linearidade do QF-CMV ELISA determinado pelo teste de cinco réplicas de 11 amostras de plasma com concentrações de IFN- γ conhecidas.

A reproducibilidade 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 realizados por três operadores. Assim, cada amostra foi testada 27 vezes, em nove ensaios independentes. Uma amostra era um controlo Nil e tinha uma concentração de IFN- γ calculada de 0,08 UI/ml (IC de 95% 0,07–0,09). Das restantes 19 amostras 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 dentro da execução ou intraensaios foi estimada calculando a média de %CV para cada teste de plasma contendo IFN- γ de cada execução de placa ($n = 9$) e variou entre 4,1 e 9,1% de CV. A %CV média dentro da corrida (\pm IC de 95%) foi de $6,6 \pm 0,6\%$. A média de plasma IFN- γ zero foi de 14,1% CV.

A imprecisão total ou interensaio foi determinada comparando as 27 concentrações calculadas de IFN- γ para cada amostra de plasma e variaram entre 6,6 e 12,3% de CV. A %CV média geral (IC de $\pm 95\%$) foi de $8,7 \pm 0,7\%$. O plasma IFN- γ zero apresentou 26,1% CV. Este nível de variação é expectável uma vez que a concentração calculada de IFN- γ é baixa e a variação em torno de uma estimativa baixa de concentração será maior de que para concentrações mais altas.

Informações técnicas

Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados podem estar relacionados com o estado imunitário do indivíduo a ser testado, mas pode também estar relacionado com vários fatores técnicos:

- Período superior a 16 horas deste a colheita do sangue até à incubação a 37 °C
- Armazenamento do sangue fora do intervalo de temperaturas recomendado ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Mistura insuficiente dos tubos de colheita de sangue
- Lavagem incompleta da placa ELISA

Se se suspeitar de problemas técnicos na colheita ou manuseamento de amostras de sangue, repetir todo o teste QF-CMV com novas amostras de sangue. Os testes ELISA de amostras de plasma estimulado podem ser repetidos caso se suspeitar de qualquer desvio no processo realizado com o teste ELISA. Os resultados indeterminados (de valores baixos de Mitogen) não deveriam mudar na repetição, a não ser que tenha ocorrido um erro durante o teste ELISA.

Amostras de plasma coaguladas

Se ocorrerem coágulos de fibrina nas amostras de plasma de armazenamento de longo prazo, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para mais informações, consulte também as informações técnicas disponibilizadas em www.QuantiFERON.com. Para informações de contacto, consulte a contracapa.

Comentários e sugestões

Leituras de densidade ótica baixas para as soluções-padrão

- a) Erro de diluição de solução padrão Certifique-se de que as diluições da solução-padrão do kit são preparadas corretamente conforme o QF-CMV ELISA Package Insert.
- b) Erro de pipetagem Certifique-se de que as pipetas estão calibradas e de que são utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.
- c) Temperatura de incubação demasiado baixa A incubação do ELISA deve ser efetuada a temperatura ambiente ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$).
- d) Tempo de incubação demasiado 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 de enzimas é incubada na placa durante 30 minutos.
- e) Utilizado um filtro do leitor de placas errado A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm.
- f) Reagentes demasiado frios Todos os reagentes, excetuando o Conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva, aproximadamente, 1 hora.
- g) Kit/componentes fora do prazo de validade Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução-padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de 3 meses a contar a partir da data de reconstituição.

Desenvolvimento cromático não específico

- a) Lavagem incompleta da placa Lave a placa, no mínimo, seis vezes com 400 μl /poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
- b) Contaminação cruzada dos poços ELISA Tome cuidado ao pipetar e a misturar as amostras para minimizar os riscos.

Comentários e sugestões

- | | |
|--|--|
| c) Kit/componentes fora do prazo de validade | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução-padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de 3 meses a contar a partir da data de reconstituição. |
| d) Solução de substrato de enzimas contaminada | Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos. |
| e) Mistura do plasma em tubos de centrífuga antes da recolha | Certifique-se de que as amostras de plasma são cuidadosamente colhidas de acima do gel sem pipetar para cima e para baixo, tendo cuidado para não perturbar o material na superfície do gel. |

Fundo elevado

- | | |
|--|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, seis vezes com 400 pl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Temperatura de incubação demasiado alta | A incubação do ELISA deve ser efetuada à temperatura ambiente ($22 \pm 5^\circ\text{C}$). |
| c) Kit/componentes fora do prazo de validade | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução-padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de 3 meses a contar a partir da data de reconstituição. |
| d) Solução de substrato de enzimas contaminada | Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos. |

Curva-padrão não linear e variabilidade de duplicados

- | | |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, seis vezes com 400 pl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Erro de diluição de solução padrão | Certifique-se de que as diluições da solução-padrão do kit são preparadas corretamente conforme o presente folheto informativo. |
| c) Mistura mal efetuada | Misture bem os reagentes, invertendo ou misturando suavemente em vórtex, antes de os adicionar à placa. |
| d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio | A adição de amostras e de soluções-padrão deve ser efetuada de um modo contínuo. Todos os reagentes devem ser preparados antes de iniciar o 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. Infect. 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 poderão aparecer na embalagem e nos rótulos:

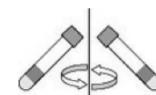
Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Prazo de validade
	Marcação CE
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número do material
	Número de artigo de comércio global
	Limites de temperatura
	Não reutilizar
	Manter afastado da luz solar
	Consulte as instruções de utilização
	Fabricante
	Representante autorizado na Comunidade Europeia

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de apoio técnico em www.qiagen.com/Support, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos dos Serviços de Assistência ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte a contracapa ou visite-nos em www.qiagen.com).

Procedimento abreviado do teste ELISA

Fase 1: Incubação do sangue

1. Colha o sangue do doente para dentro de tubos de colheita de sangue e misture, agitando os tubos dez (10) vezes após os encher de forma a garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue, para dissolver os抗igénios da parede do tubo.
2. Incube os tubos na vertical a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 24 horas.
3. Após a incubação, centrifugue os tubos durante 15 minutos a 2000–3000 RCF (g) para separar o plasma e os glóbulos vermelhos.
4. Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

Fase 2: IFN- γ ELISA

1. Coloque os componentes do ELISA, à exceção de Conjugado concentrado 100x, à temperatura ambiente durante, no mínimo, 60 minutos.



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



3. Reconstitua o Conjugado concentrado 100x lyophilizado com água destilada ou desionizada.



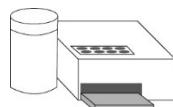
4. Prepare conjugado funcional em Green Diluent (Diluente verde) e adicione 50 µl a todos os poços.



5. Adicione 50 µl de amostras de plasma de teste e 50 µl de padrão aos poços adequados. Misture utilizando um agitador.



6. Incube durante 120 minutos à temperatura ambiente.



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



8. Adicione 100 µl de solução de substrato de enzimas aos poços. Misture utilizando um agitador.

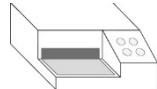


9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.

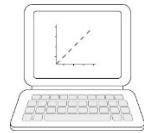
10. Adicione 50 μ l de solução de paragem de enzimas a todos os poços. Misture utilizando um agitador.



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-R06	Materiais necessários mas não fornecidos, tampas de placas adicionadas, página 9	Outubro de 2019

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

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

Acordo de Licença Limitada para o QuantiFERON-CMV ELISA

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva dos componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste painel com qualquer componente não incluído neste painel, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns destes protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores de produtos QIAGEN para utilizadores de produtos QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este painel e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionalos ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do painel concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas judiciais e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao painel e/ou aos seus componentes.

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

© 2019 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Assistência técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com
