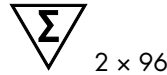


Fevereiro 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Bula



Respostas do teste de medição do interferão-gama (IFN- γ) aos antígenos peptídicos do citomegalovírus humano no sangue total

IVD Para utilização em diagnóstico *in vitro*



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

1075110PT Rev. 05



www.QuantiFERON.com



Índice

Utilização prevista	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	6
Tempo necessário para execução do 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 software de análise QF-CMV não for utilizado) ...	22
Controlo de qualidade do teste	23
Interpretação dos resultados	24
Limitações	25
Valores previstos	25
Características de desempenho	28
Desempenho clínico.....	28

Limite do ensaio	29
Estudos clínicos	29
Especificidade	30
Sensibilidade	30
Estudos que realçam a utilidade clínica.....	31
Diretrizes de consenso internacional para a gestão do citomegalovírus em transplantes de órgãos sólidos	36
Características de desempenho dos ensaios	37
Informações técnicas	39
Resultados indeterminados	39
Amostras de plasma coaguladas.....	39
Guia de resolução de problemas.....	40
Bibliografia.....	42
Símbolos	44
Informações de contacto.....	45
Procedimento abreviado do teste ELISA.....	46
Fase 1: Incubação do sangue.....	46
Fase 2: IFN- γ ELISA.....	46
Histórico de revisões do documento.....	49

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 (cytomegalovirus, 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 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) é utilizada para quantificar respostas *in vitro* a esses antígenos peptídicos, que estão associados ao controlo imunológico da infeção pelo CMV. A perda desta 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 infeção por CMV, portanto não deve ser utilizado para excluir a infeção por CMV.

Resumo e explicação

O CMV é um herpesvírus que infecta entre 50 a 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 (cell-mediated immune, CMI) e nos linfócitos T, resultando em maior suscetibilidade a infeções virais após o transplante. A importância da função das células T na supressão da replicação do CMV é realçada também pelo facto de os linfócitos T citotóxicos (LTc) CD8⁺ específicos para o CMV poderem proteger contra a patogénese associada ao vírus. A enumeração de LTc CD8⁺ específicos para o CMV em doentes imunossuprimidos e a produção de IFN- γ pode ser uma boa ferramenta de previsão do risco de 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 antígenos peptídicos que mimetizam as proteínas do CMV. Os peptídeos 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 infetados pelo CMV normalmente apresentam linfócitos CD8⁺ no sangue que reconhecem estes antígenos. 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 Zero, um tubo com o antígeno do CMV e um tubo com o mitógeno.

O tubo com o mitógeno 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 de mitógeno poderá também servir de controlo para um manuseamento e incubação corretos do sangue.

Os tubos devem, logo que possível, ser incubados a 37 °C, 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 antígeno e do mitógeno do CMV 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 de IFN- γ quando o tubo de antígeno do CMV apresenta uma leitura significativamente superior ao valor Zero de IFN- γ em UI/ml. A amostra de plasma estimulada pelo mitógeno serve como controlo positivo de IFN- γ para cada amostra testada. Uma resposta baixa ao mitógeno indica um resultado indeterminado, em que uma amostra de sangue também tem uma resposta não reativa aos antígenos do CMV. Este padrão poderá ocorrer por insuficiência de linfócitos, atividade reduzida dos linfócitos devido a um manuseamento incorreto das amostras, enchimento/mistura incorretas do tubo do mitógeno ou incapacidade de os linfócitos do doente produzirem IFN- γ , como acontece com doentes com transplante recente. A amostra Zero ajusta-se ao fundo ou ao IFN- γ não específico das amostras de sangue. O nível de IFN- γ do tubo Zero é subtraído do nível de IFN- γ no tubo de antígeno do CMV e ao tubo do mitógeno (consulte “Interpretação dos resultados” na página 24 da presente bula, para um resumo de como os resultados do QF-CMV são interpretados).

Tempo necessário para execução do 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 a 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 (Single Patient Pack)	
Ref.º	0192-0301
Número de preparações	1
QuantiFERON Nil Control (Controlo Zero QuantiFERON) (tampa cinzenta)	1 tubo
QuantiFERON CMV Antigen (Antigénio do CMV QuantiFERON) (tampa azul)	1 tubo
QuantiFERON Mitogen Control (Controlo Mitógeno QuantiFERON) (tampa roxa)	1 tubo
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Bula dos tubos de colheita de sangue QF-CMV)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Kit ELISA de 2 placas
Ref.º	0350-0201
Tiras de microplaca (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ humano murino	2 conjuntos de 12 tiras de microplaca de 8 poços
Human IFN- γ Standard, lyophilized (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 (Dilúente Verde) (contém caseína bovina, soro normal de rato, Timerosal a 0,01% p/v)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (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 20x concentrado) (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 (Bula do QF-CMV ELISA)	1

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

Materiais necessários, mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponíveis no 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 (recomendada lavadora automática)
- Leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm a 650 nm

Avisos e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro

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

PRECAUÇÃO



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

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

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



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

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Atenção! Causa uma irritação suave da pele. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

QuantiFERON Green Diluent



Contém: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Contém: tartrazine. Atenção! Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

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

Informações de segurança

Informações adicionais

- O não cumprimento rigoroso das instruções constantes da bula do QF-CMV 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:** Inspeccione os frascos antes da utilização. Não utilize os frascos de conjugado ou de 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 destampador de frascos para abrir os frascos de conjugado ou de padrão de IFN- γ , para minimizar o risco de ferimentos com a tampa metálica.
- Não misture nem utilize tiras de microplaca, 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 em conformidade com a legislação em vigor.
- Não utilize os tubos de colheita de sangue QF-CMV 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/homologado para utilização.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Tubos de colheita de sangue

- Armazene os tubos de colheita de sangue QF-CMV entre 4-25 °C.
- Os tubos de colheita de sangue QF-CMV devem estar a uma temperatura entre 17–25 °C aquando do enchimento.
- A vida útil prevista em armazenamento dos tubos de colheita de sangue do QF-CMV 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 “Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA para o IFN- γ humano” (passos 3 e 5, nas páginas 17 e 19).

- O padrão de IFN- γ humano reconstituído pode ser armazenado até 3 meses a uma temperatura entre 2-8 °C.
Tome nota da data em que o padrão de IFN- γ humano foi reconstituído.
- 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 no prazo de 6 horas após a preparação.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado à temperatura ambiente (22 \pm 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 Zero (tampa cinzenta)
- Antígeno do CMV (tampa azul)
- Controlo Mitógeno (tampa roxa)

Os antígenos 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, 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 tubos de colheita de sangue QF-CMV. Este procedimento deve ser efetuado por um flebotomista qualificado.

Os tubos de colheita de sangue de QF-CMV podem ser utilizados até uma altitude de 810 metros.

Se utilizar os tubos de colheita de sangue do QF-CMV 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 3 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 tubos QF-CMV 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 tubos de colheita de sangue QF-CMV 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 tubos de colheita de sangue QF-CMV.

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 tubos QF-CMV. 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 ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) antes de ser transferido para os tubos QF-CMV para incubação, que tem de ser iniciada no máximo 16 horas após a colheita do sangue.

2. Agite firmemente os tubos de colheita de sangue QF-CMV 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 devem ser bem misturadas antes de serem transferidas para os tubos QF-CMV. Certifique-se de que o tubo é bem misturado, invertendo-o suavemente imediatamente antes da transferência. Transfira alíquotas de 1 ml (uma por tubo QF-CMV) para os respetivos tubos Zero, de

antigénio do CMV e de mitógeno. Recomenda-se a execução em condições assépticas, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos três tubos QF-CMV 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 (Zero, Antigénio do CMV, Mitógeno) é identificável pelo rótulo ou por outro meio.

4. Após o enchimento, a agitação e a rotulagem, os tubos devem, 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 $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 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 $4\text{--}27\text{ °C}$ até 3 dias antes da centrifugação.

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

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

3. Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma por qualquer meio antes da recolha do mesmo. 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 tubos de colheita de sangue QF-CMV até 28 dias, a uma temperatura entre $2\text{--}8\text{ °C}$ 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 $150\text{ }\mu\text{l}$ de plasma.

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

Consulte a secção "Conteúdo do kit", página 8 e "Materiais necessários, mas não fornecidos", página 9, para saber quais os materiais necessários para realizar um ELISA.

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente (22 ± 5 °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 o padrão de IFN- γ 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 do padrão de IFN- γ com o volume declarado produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.

Nota: o volume de reconstituição do 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 do 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 μ l de GD a S1, S2, S3, S4
C	Adicionar 150 μ l do padrão do kit a S1 e misturar bem
D	Transferir 50 μ l de S1 para S2 e misturar bem
E	Transferir 50 μ l de S2 para S3 e misturar bem
F	GD serve apenas como padrão Zero (S4)

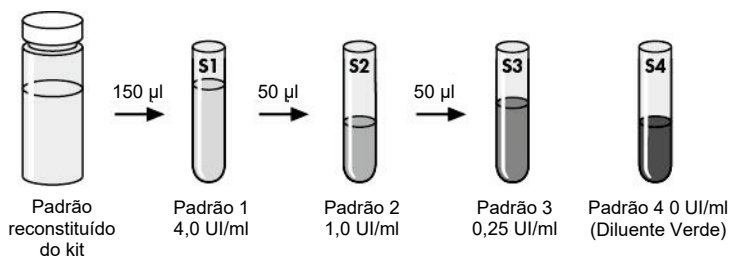


Figura 1. Preparação da curva padrão por diluição em série.

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 Diluente Verde (consultar 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 Diluente Verde.

Tabela 1. Preparação do conjugado funcional

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

5. 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 tubos QF-CMV centrifugados, deve evitar misturar, seja de que 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 Mitógeno numa proporção de 1/10 em Diluente Verde (GD) (10 µl de plasma misturado com 90 µl de GD). O plasma Zero não deve ser diluído.

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

Zero, antigénio do CMV, Mitógeno, antigénio do CMV (1/10), Mitógeno (1/10)

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

Zero, Antígeno de CMV, Mitógeno

Zero, Antígeno de CMV (1/10), Mitógeno (1/10)

Zero, Antígeno de CMV, Mitógeno, Antígeno de CMV (1/10)

Zero, Antígeno de CMV (1/10), Mitógeno

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. Os padrões devem ser testados, 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 a 1000 rpm. Evite salpicos.
10. Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 errôneos.

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 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 infeccioso.

-
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 com uma tampa e misture bem, utilizando um agitador de microplacas durante 1 minuto, entre 500 a 1000 rpm num agitador de microplacas.
 14. Cubra cada placa e incube à temperatura ambiente ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) 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 (Optical Density, OD) de cada poço no prazo de 5 minutos após a paragem da reação, utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e com um filtro de referência de 620 nm a 650 nm. Os valores de OD são utilizados para calcular os resultados.

Cálculos e interpretação do teste

O software de análise QuantiFERON-CMV, 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 software de análise QuantiFERON-CMV.

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 dos resultados” na página 24. O software de análise 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 software de análise QF-CMV, os resultados podem ser determinados de acordo com o método a seguir descrito.

Geração de curva padrão (se o software de análise QF-CMV não for utilizado)

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

Construa uma curva padrão de $\log_{(e)}-\log_{(e)}$, traçando o $\log_{(e)}$ da OD média (eixo Y) de em função do $\log_{(e)}$ 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 OD 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) dos padrões 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 decorrentes das soluções padrão devem ser examinados antes de se poder interpretar os resultados das amostras do teste.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de OD médio do Padrão 1 tem de ser $\geq 0,600$.
- O %CV dos valores de OD replicados do Padrão 1 e do Padrão 2 tem de ser $< 15\%$.
- Os valores OD da réplica para as soluções padrão 3 e 4 não devem 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 dos padrões tem de ser $\geq 0,98$.

O software de análise QF-CMV 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 OD médio do Padrão Zero (Dilute Verde) deve ser $\leq 0,150$. Se o valor de OD médio for $> 0,150$, o procedimento de lavagem da placa deve ser investigado.

Interpretação dos resultados

Os resultados de QuantiFERON-CMV são interpretados utilizando os critérios da Tabela 2.

Tabela 2. Interpretação dos resultados do QuantiFERON-CMV

Zero (UI/ml)	CMV menos Zero (UI/ml)	Mitógeno menos Zero (UI/ml)*	Resultado do QF-CMV	Relatório/Interpretação
≤ 8,0	≥ 0,20 e ≥ 25% do Zero	Qualquer	Reativo†	Imunidade anti-CMV detetada
	< 0,20 OU ≥ 0,20 e < 25% do Zero	≥ 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 mitógeno (e, ocasionalmente, do antígeno do CMV) podem ficar normalmente fora do alcance do leitor de microplacas. Isso não tem qualquer impacto nos resultados do teste.

† Quando não houver suspeitas de infeção 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 a secção “Guia de resolução de problemas” (página 40) para saber quais são as causas prováveis.

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 do mitógeno 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 Zero.

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 infeção por CMV, portanto não deve ser utilizado para excluir a infeção por CMV.

Limitações

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

Podem ocorrer resultados duvidosos ou indeterminados devido a:

- Divergências em relação ao procedimento descrito na bula do QuantiFERON-CMV ELISA
- 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 (Zero subtraído). A distribuição de respostas ao IFN- γ para o tubo de antigénio do CMV (Zero subtraído) dos 343 indivíduos seropositivos para o CMV é apresentada (Figura 2).

Número de amostras

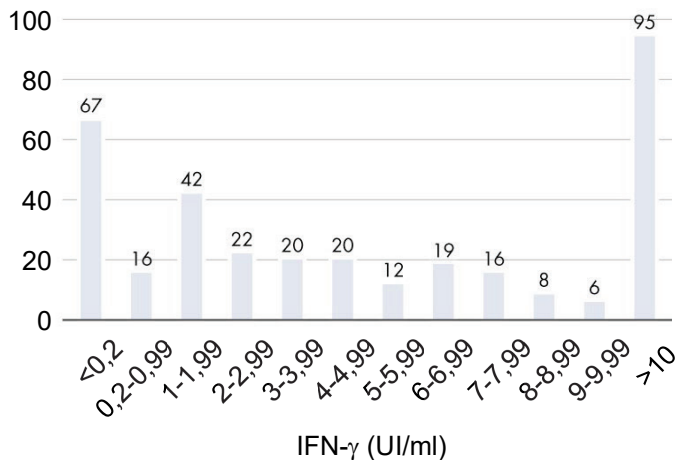


Figura 2. Distribuição de respostas de IFN- γ (Zero subtraído) pelo QF-CMV em indivíduos saudáveis seropositivos (n = 343).

A distribuição de respostas de IFN- γ para o Mitógeno (Zero subtraído) 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 Mitógeno (Zero subtraído) 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.

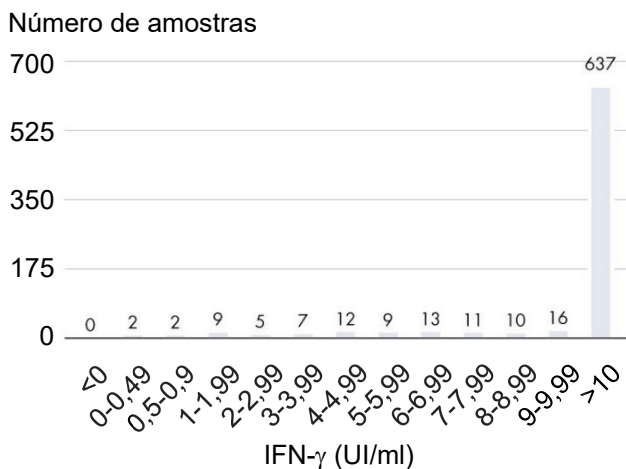


Figura 3. Distribuição de respostas de IFN- γ para o Mitógeno (Zero subtraído) em indivíduos saudáveis (n = 733).

A distribuição de respostas de IFN- γ para tubos de Zero 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).

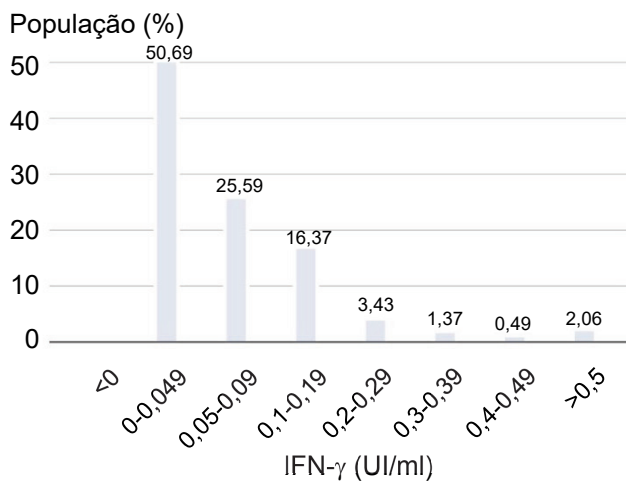


Figura 4. Distribuição de respostas de IFN- γ para o Zero em indivíduos saudáveis (n = 1020) expressa em percentagem da população.

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 do Zero) 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%. O nível de concordância em indivíduos saudáveis entre respostas com o QF-CMV e o estado serológico do IgG do CMV é apresentado na Tabela 3.

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

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

Limite do ensaio

O limite recomendado do teste clínico para este ensaio é de 0,2 UI/ml no tubo de antígeno do CMV (Zero 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 doadores 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 doadores saudáveis com evidência de anterior exposição ao CMV (indivíduos seropositivos para o IgG do CMV). O QF-CMV utiliza um elevado número de epítomos 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 tubos de colheita de sangue do QF-CMV.

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 IgG do CMV demonstraram uma concordância de 100%.

Em todas as outras avaliações de especificidade realizadas em recetores de transplantes de órgãos sólidos (1-8), recetores de transplantes de células estaminais hematopoiéticas (9,10) e doentes infetados pelo HIV (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 poderá dever-se a uma serologia falsa positiva do CMV ou a ausência de tipos não responsivos de HLA nos indivíduos testados.

Os níveis de concordância em avaliações da sensibilidade realizadas em recetores de transplantes de órgãos sólidos (1-8), recetores de transplantes de células estaminais hematopoiéticas (9, 10) e doentes infetados pelo HIV (11), mostraram ser mais baixos, o que poderá dever-se a uma serologia 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 realçam 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 recetores de transplantes para avaliar o nível de imunidade ao CMV nos doentes em risco de desenvolver infeção 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 recetores 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).

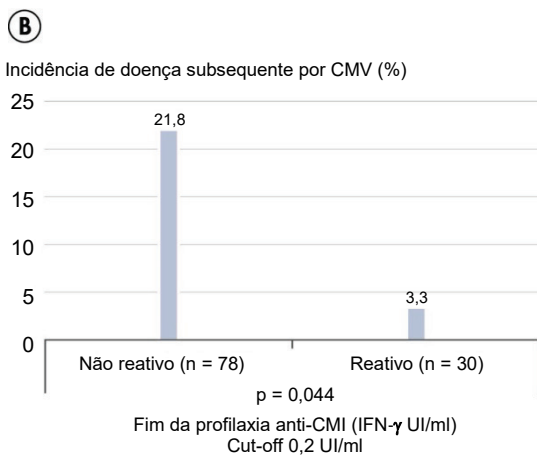
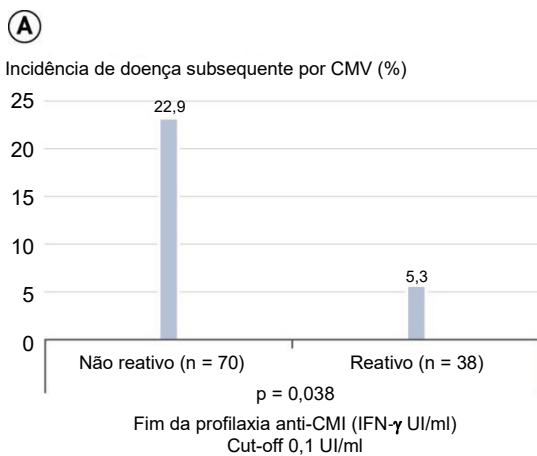


Figura 5. Taxas de início retardado de doença por CMV em doentes com um resultado reativo com o QuantiFERON-CMV *versus* um resultado não reativo com o QuantiFERON-CMV no fim da profilaxia. Dados subjacentes disponíveis em Kumar *et al.* (4).

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 estava associado a uma maior probabilidade de permanecer sem a doença por CMV.

Num estudo a 37 doentes com transplante de um órgão sólido (6), a avaliação das respostas das células T-CD8⁺ específicas para o CMV utilizando o QF-CMV ajudou na previsão da 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 com o QF-CMV (utilizando um limite de teste para o IFN- γ de $\geq 0,2$ UI/ml), eliminaram espontaneamente o vírus CMV, enquanto apenas 5/11 (45,5%) doentes com um resultado não reativo com o QF-CMV tiveram 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, $p = 0,0046$; Figura 6).

% de episódios de HCMV DNAemia com uma carga viral > 1000 cópias/ml

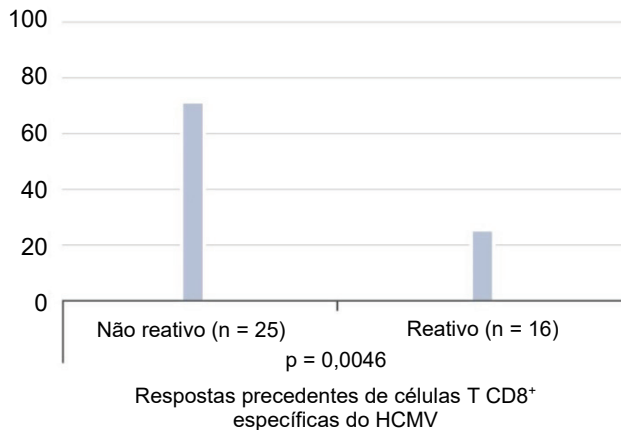


Figura 6. Análise estatística das respostas das células T CD8⁺ específicas para o CMV conforme detetadas pelo QuantiFERON-CMV e o desenvolvimento de viremia CMV (teste exato de Fisher, p = 0,0046). Dados subjacentes disponíveis em Weseslindtner *et al.* (7).

Num amplo estudo prospetivo multicêntrico de 127 dadores seropositivos do CMV, doentes recetores 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 era 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 prospetivo realizado a 55 recetores 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 recetores 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 recetores 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 recetores 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 recetores 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 da infeção 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 para o CMV pelo QF-CMV em grupos de recetores 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 em CMV e transplante de órgãos sólidos, convocados pelo departamento de doenças infecciosas 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 para o 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 para avaliar a quantidade e função das células T CD4⁺ e CD8⁺ de um recetor de transplante
- Capacidade para medir o IFN- γ
- Simples de realizar, económico e reprodutível
- 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 um 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 anti-rato humano) em soro ou plasma de certos indivíduos são uma causa conhecida de interferência com imunoenaios. O efeito dos anticorpos heterófilos no QF-CMV ELISA é minimizado pela adição de soro normal de rato no 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 da microplaca.

O limite de detecção 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 ELISA QF-CMV é linear colocando aleatoriamente 5 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).

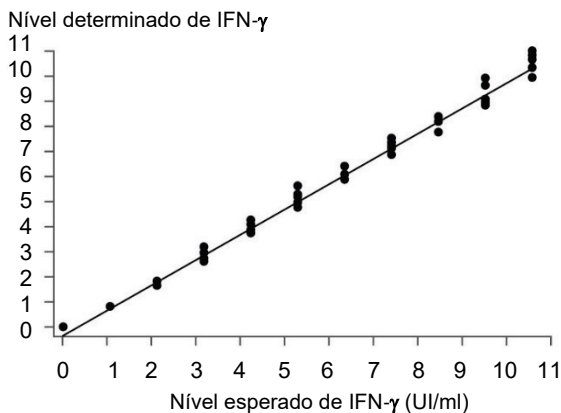


Figura 7. O perfil de linearidade do QF-CMV ELISA determinado pelo teste de 5 réplicas de 11 amostras de plasma com concentrações de IFN- γ conhecidas.

A reprodutibilidade do QF-CMV ELISA foi estimada testando 20 amostras de plasma com concentrações variáveis de IFN- γ em réplicas de 3, em 3 laboratórios, em 3 dias não consecutivos e realizados por 3 operadores. Assim, cada amostra foi testada 27 vezes, em 9 ensaios independentes. Uma amostra era um controlo Zero 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 intraensaio 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 $6,6 \pm 0,6\%$. O plasma IFN- γ Zero apresentou uma média de 14,1% de CV.

A imprecisão total ou inter-ensaio 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 com zero IFN- γ 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 desde a colheita do sangue até à incubação a 37 °C
- Armazenamento do sangue fora do intervalo de temperaturas recomendado (22 °C \pm 5 °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 Mitógeno) 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 qualquer problema que possa 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 baixas da absorvância dos padrões

- | | |
|--|---|
| e) Erro de diluição do padrão | Certifique-se de que as diluições do padrão do kit são preparadas corretamente conforme a bula do QF-CMV ELISA. |
| 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 ± 5 °C). |
| d) Tempo de incubação demasiado curto | A incubação da placa com o conjugado, com os padrões 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 de leitor de placas incorreto | A placa deverá ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm. |
| f) Os reagentes estão demasiados 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) O prazo de validade do kit/componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Conjugado concentrado 100x são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição. |

Desenvolvimento cromático não específico

- | | |
|---|--|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de 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) O prazo de validade do kit/componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Conjugado concentrado 100x são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição. |
| d) A solução de substrato de enzimas está 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 centrifugação antes da colheita | Certifique-se de que as amostras de plasma são cuidadosamente colhidas de cima do gel sem pipetar para cima e para baixo, tendo cuidado para não perturbar o material na superfície do gel. |

Plano de fundo alto

- | | |
|---|--|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Temperatura de incubação demasiado elevada | A incubação do ELISA deve ser efetuada a temperatura ambiente (22 ± 5 °C). |
| c) O prazo de validade do kit/componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Conjugado concentrado 100x são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição. |
| d) A solução de substrato de enzimas está 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, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Erro de diluição do padrão | Certifique-se de que as diluições do padrão do kit são preparadas corretamente conforme a presente bula. |
| 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 padrões 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.















Bibliografia

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

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

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer na embalagem e nas etiquetas:

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

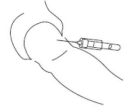
Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Procedimento abreviado do teste ELISA

Fase 1: Incubação do sangue

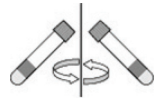
1. Colha o sangue do paciente para dentro de tubos de colheita de sangue e misture, agitando os tubos dez (10) vezes após os encher de forma a garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue, para dissolver os antígenos da parede do tubo.



2. Incubar os tubos na vertical a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.



Fase 2: IFN- γ ELISA

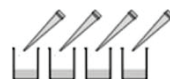
1. Elevar a temperatura dos componentes do ELISA até à temperatura ambiente, à exceção do Conjugado concentrado 100x, durante pelo menos 60 minutos.



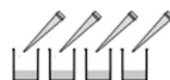
2. Reconstitua o padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições padrão.



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



4. Prepare conjugado funcional em Diluente Verde e adicione 50 µl a todos os poços.

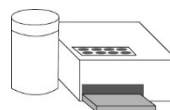


5. Adicione 50 µl de amostras de plasma de teste e 50 µl de padrão aos poços adequados. Misture utilizando um agitador.



6. Incubar durante 120 minutos à temperatura ambiente.

7. Lavar os poços, pelo menos, 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.



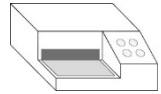
9. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.



10. Adicione 50 μ l de solução de parada 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 documento

Documento	Alterações	Data
L1075110-R5	Informação de segurança adicional, relativa a frascos partidos Atualizações da Tabela 2, Interpretação dos resultados do QF-CMV, página 24.	Fevereiro 2018
L1075110-R5	Informação GHS atualizada, página 10.	Fevereiro 2018

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 licenciamento limitado 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 de 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 kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores 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 kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringam os direitos de terceiros.
3. Este kit e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados 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 kit 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 de tribunal 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 kit e/ou aos seus componentes.

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

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

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