

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA Cytomegalovirus (CMV) IgG de ZEUS es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgG contra el citomegalovirus en suero humano. Este sistema de pruebas está diseñado para la evaluación de evidencias serológicas de infección previa o primaria por CMV. Este producto no está homologado por la FDA (agencia estadounidense de alimentación y farmacia) para su uso en pruebas de detección selectiva de donantes de sangre o plasma. Esta prueba está concebida exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Las infecciones por citomegalovirus (CMV) son generalizadas y habitualmente asintomáticas; sin embargo, el virus puede persistir en el organismo en forma de infección latente o crónica (1). La incidencia relativamente alta y la naturaleza a menudo grave de la enfermedad en recién nacidos y pacientes inmunodeprimidos demuestran claramente que este agente es un patógeno importante en el ser humano (2-4). Los científicos clasifican las infecciones por CMV de la siguiente manera:

Congénitas	-	Adquiridas antes del nacimiento.
Perinatales	-	Adquiridas durante el nacimiento.
Posnatales	-	Adquiridas después del nacimiento.

El 95% de los recién nacidos con infección congénita por CMV no presenta enfermedad clínicamente manifiesta en el momento del nacimiento (5). En el 5% restante de lactantes infectados, las manifestaciones clínicas son variables, desde una enfermedad grave con ictericia, hepatoesplenomegalia, púrpura trombocitopénica, calcificación craneal y retraso del crecimiento, a neumonitis, hidrocefalia o microcefalia y defectos oculares (6). Los lactantes con manifestaciones graves de infección congénita por CMV pueden fallecer poco después del nacimiento debido a complicaciones secundarias; sin embargo, la mayoría sobrevive con secuelas neurológicas (2).

Los profesionales sanitarios deben proceder con cautela al realizar pronósticos en los lactantes con infección congénita que están asintomáticos en el momento del nacimiento. Del 10% al 25% de los lactantes pueden desarrollar posteriormente hipoacusia (7). Del 5% al 10% de los lactantes pueden mostrar diversos grados de retraso mental y trastornos motores del sistema nervioso central (5). Los estudios indican que la incidencia de infección congénita por CMV es del 0,5% al 2,5%. Por lo tanto, es importante documentar meticulosamente los efectos a largo plazo de la infección intrauterina (8).

Los lactantes con infección perinatal comienzan a excretar CMV de 3 a 12 semanas después del parto y, con raras excepciones, permanecen asintomáticos (9). La adquisición de las infecciones posnatales por CMV puede tener lugar por estrecho contacto con personas que eliminan el virus (2). Se ha aislado el CMV en la saliva, la orina, la leche materna, las secreciones cervicales y el semen. Por consiguiente, la transmisión del virus puede producirse por diversos mecanismos (6 - 8). La transmisión sexual del virus parece contribuir a la adquisición del virus por adultos jóvenes (10). Aunque la edad a la que se adquiere la infección por CMV varía con el estado socioeconómico, sólo del 10% al 15% de los niños de Estados Unidos son seropositivos. Sin embargo, a los 35 años de edad cerca del 50% de la población es seropositiva (2 - 4).

La mayoría de las personas que contraen infecciones posnatales por CMV permanecen asintomáticas (2 - 4). En un pequeño porcentaje de sujetos se desarrollará un síndrome de mononucleosis infecciosa con anticuerpos heterófilos negativos. La mononucleosis por CMV se caracteriza por fiebre, letargo y linfocitosis atípica, mientras que en la mononucleosis infecciosa inducida por el virus de Epstein-Barr las características clínicas más destacadas son faringitis, adenopatía linfática y esplenomegalia (11 - 12).

En los pacientes inmunodeprimidos, las infecciones por CMV son frecuentes, a menudo por reactivación de una infección latente, y pueden poner en peligro la vida (2 - 4). Pertenecen a este grupo de pacientes los receptores de aloinjertos, los pacientes con cáncer y los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (4, 13 y 15). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad por CMV en pacientes inmunodeprimidos son variables, desde una mononucleosis por CMV a neumonía, hepatitis, pericarditis y encefalitis (4).

Las infecciones por CMV pueden desarrollarse después de transfusiones sanguíneas, y el riesgo de infección aumenta con el número de donantes y el volumen de sangre transfundido (4). Los receptores seronegativos pueden contraer la infección primaria a través de la sangre de un donante seropositivo. En receptores seropositivos puede reactivarse una infección latente. La mayoría de las infecciones por CMV adquiridas por transfusión son subclínicas o se caracterizan por una mononucleosis por CMV (2 - 4). Sin embargo, en grupos específicos de pacientes, la infección primaria por CMV adquirida por transfusión puede causar una morbilidad y una mortalidad considerables. Se trata de pacientes inmunodeprimidos entre los que se encuentran los lactantes prematuros, las mujeres embarazadas, los pacientes con cáncer y los receptores de trasplantes (4 - 14). En estos pacientes, las infecciones por CMV adquiridas por transfusión pueden prevenirse transfundiéndole únicamente sangre de donantes seronegativos a receptores seronegativos (4 - 14).

Los procedimientos serológicos que determinan los anticuerpos IgG contra el CMV pueden facilitar el diagnóstico de infección por CMV si se analizan al mismo tiempo sueros en fase aguda y en fase de convalecencia y se demuestra seroconversión o una elevación significativa del título de anticuerpos (15). Además, los procedimientos serológicos pueden facilitar la prevención de la infección por CMV adquirida por transfusión al evaluar el estado serológico de los donantes y los receptores (4 - 14).

La prueba ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) fue descrita por primera vez por Engvall y Perlman (19,20). Desde entonces, los científicos han desarrollado sistemas de pruebas ELISA para la detección de numerosos antígenos y anticuerpos diferentes, entre ellos los anticuerpos contra el CMV (16,17 y 21). Además de la prueba ELISA, se han diseñado otros diversos procedimientos serológicos para la detección de anticuerpos contra el CMV. Entre ellos se encuentran la fijación del complemento (16, 18), la inmunofluorescencia indirecta (18), la hemaglutinación indirecta (18, 22) y la aglutinación del látex (22). En comparación con otras pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra el CMV, la prueba ELISA puede ser un método muy específico, sensible y fiable para detectar anticuerpos contra el CMV (16, 17 y 18). El procedimiento ELISA permite una determinación objetiva del estado de los anticuerpos en una sola dilución de la muestra de la prueba y es adecuado para analizar grandes cantidades de muestras de pacientes.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA CMV IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra CMV en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígeno de CMV. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuban la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo de tipo IgG inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVE Diluent®.**

Componente		Σ_{96}	Σ_{480}	Descripción
PLATE		1	5	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno desactivado del citomegalovirus (cepa AD169). Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ		1	5	Conjugado: anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (específica de la cadena Fc) en frasco(s) de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL	+	1	2	Control positivo (suero humano): vial(es) de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL		1	4	Calibrador (suero humano): vial(es) de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL	-	1	2	Control negativo (suero humano): vial(es) de 0,35 ml con tapón verde.
DIL	SPE	1	4	Diluyente SAVE Diluent®: frasco(s) de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVE Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
SOLN	TMB	1	5	TMB: frasco(s) de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN	STOP	1	3	Solución para detener la reacción: frasco(s) de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF	10X	1	5	Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Frasco(s) de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.

NOTAS:

- Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVE Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
- El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

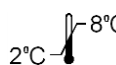
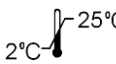
- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
- Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
- Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (9).
- Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
- Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
- El diluyente SAVE Diluent®, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
- La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
- La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
- La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
- Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
- Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
- No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
- Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
- Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
- No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
- No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.

26. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
2. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
3. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
4. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
5. Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Probeta graduada de un litro.
8. Pipetas serológicas.
9. Puntas de pipeta desechables.
10. Toallas de papel.
11. Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
12. Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente SAVE Diluent® sin abrir	
	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C
	Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C.
	Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

1. ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
2. Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
3. Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (8, 9). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
4. Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8° C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (27).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
2. Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

3. Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVE Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVE Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
4. A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
5. Añada 100 µl de diluyente SAVE Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
6. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - a. **Procedimiento de lavado manual:**
 1. Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 2. Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 3. Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 4. Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - b. **Procedimiento de lavado automático:**

Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.

8. Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
9. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
10. Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
11. Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
12. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
13. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
14. Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
3. \longrightarrow Incube durante 25 ± 5 minutos.
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
6. \longrightarrow Incube durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
9. \longrightarrow Incube durante 10 - 15 minutos.
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
11. LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
2. Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

	<u>Intervalo de DO</u>
Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
- b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
- c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
6. Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- a. *Factor de corrección:* El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- b. *Límite de referencia de la DO:* Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
($FC \times \text{media de DO del calibrador} = \text{límite de referencia de la DO}$)
- c. *Valores índice/cocientes de DO:* Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

Ejemplo: DO media del calibrador	= 0,793
Factor de corrección (FC)	= 0,25
Límite de referencia de la DO	= 0,793 x 0,25 = 0,198
DO de muestra desconocida	= 0,432
Valor índice/cociente de DO de la muestra	= 0,432/0,198 = 2,18

2. **Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	<u>Valor índice/cociente de DO</u>
Muestras negativas	≤ 0,90
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	≥ 1,10

- a. Un cociente de DO ≤ 0,90 indica que no se ha detectado una cantidad significativa de anticuerpos de tipo IgG contra CMV. Un resultado negativo indica que no hay, ni hubo, una infección anterior por CMV. Se presupone que tales individuos son susceptibles de sufrir una infección primaria. No obstante, las muestras que se obtienen demasiado temprano durante una infección primaria pueden no tener niveles detectables de anticuerpos IgG. Si el profesional sanitario sospecha de la existencia de una infección primaria, deberá volver a tomar otra muestra transcurridos 8-14 días para someterla a prueba en el mismo ensayo junto con la muestra original, a fin de determinar la seroconversión.

- b. Un cociente de DO $\geq 1,10$ indica que se han detectado anticuerpos de tipo IgG específicos contra CMV. Un valor positivo indica una infección actual o anterior por CMV. Se considera que estas personas tienen riesgo de transmitir la infección por CMV, pero no son necesariamente contagiosas en el momento actual.
- c. Las muestras con cociente de DO en el margen de resultado dudoso (0,91-1,09) deberán volver a analizarse por duplicado. Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la evaluación de las muestras dudosas utilizando un método serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.
- d. Para evaluar los sueros por pares (suero de paciente agudo y suero de convaleciente), deberá utilizar el mismo ensayo para realizar las pruebas. Si la muestra del paciente agudo es negativa y la del convaleciente es positiva, se ha producido seroconversión, lo que indica la existencia de una infección primaria por CMV.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. La presencia de anticuerpos IgG frente al CMV no garantiza necesariamente la protección frente a infecciones futuras por CMV.
2. El título de anticuerpos de una sola muestra de suero no se puede usar para determinar una infección reciente. Para demostrar la seroconversión será necesario recolectar y analizar simultáneamente muestras por pares (de paciente agudo y de convaleciente).
3. Interprete los resultados de la prueba para demostrar la seroconversión de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
4. Las muestras que contienen anticuerpos contra antígenos nucleares (como los que se encuentran en pacientes con lupus eritematoso sistémico) pueden producir resultados positivos falsos en el sistema de pruebas ELISA CMV IgG de ZEUS.
5. Las muestras que se recolecten demasiado temprano en la evolución de una infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En tales casos, tome una segunda muestra transcurridas de dos a siete semanas y analícela simultáneamente con la muestra original para detectar la seroconversión.
6. Interprete con precaución un resultado positivo en pruebas de IgG anti-CMV en neonatos, ya que los anticuerpos maternos adquiridos de forma pasiva pueden persistir hasta 6 meses (25). Una prueba de anticuerpos IgG negativa en el neonato puede ayudar a excluir una infección congénita (15). El diagnóstico más definitivo de la infección activa por CMV requiere el aislamiento viral.
7. Los resultados de esta prueba son cualitativos y deberán considerarse positivos o negativos en lo que respecta a la presencia de anticuerpos tipo IgG anti-CMV.

RESULTADOS ESPERADOS

La incidencia de infección por CMV varía con la edad, el lugar geográfico y el estado socioeconómico (2). En Estados Unidos, del 10% al 30% de los niños son seropositivos para el CMV a la edad de 10 años (2). A los 35 años de edad, cerca del 50% de la población es seropositiva. Los estudios han demostrado que la tasa de seropositividad entre los varones homosexuales es superior al 90% (15,17).

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo

Se ha realizado un estudio comparativo para comparar el sistema de pruebas ELISA CMV IgG de ZEUS con otro procedimiento ELISA comercial. Se analizó un total de 96 muestras de donantes de sangre normales del nordeste de Estados Unidos con los dos métodos. Los resultados se resumen a continuación:

Sistema de pruebas ELISA CMV IgG de ZEUS		ELISA CMV IgG de referencia		
		Positivo	Negativo	Dudoso
	Positivo	54	2	2
	Negativo	2	31	2
	Dudoso	1	2	0

Cuando se comparó con otro procedimiento ELISA de determinación de IgG de CMV, el sistema de pruebas ELISA CMV IgG de ZEUS mostró una sensibilidad del 96,4% (54/56), una especificidad del 93,9% (31/33) y una concordancia global del 95,3% (85/89).

2. Reproducibilidad

Con objeto de evaluar la variación intraensayo e interensayos, varios técnicos analizaron cuatro muestras: dos muestras positivas fuertes, una muestra cerca de la zona límite y una muestra negativa baja. En cada uno de tres días, un técnico analizó cada muestra una vez al día, ocho veces cada una, dando lugar a 24 puntos de prueba. Un responsable calculó el cociente de DO medio y el coeficiente de variación de los datos resultantes. A continuación se presenta un resumen de los resultados del experimento.

	Intraensayo (n=8)						Interensayos (n=3)	
	Serie 1		Serie 2		Serie 3		Cociente medio	% CV
	Cociente medio	% CV	Cociente medio	% CV	Cociente medio	% CV		
Suero 1	4,62	8,9	3,6	6,8	4,01	6,3	4,07	10,0
Suero 2	2,53	4,8	2,46	7,0	2,13	11,8	2,37	7,4
Suero 3	1,13	10,8	1,33	14,7	1,17	6,6	1,21	7,1
Suero 4	0,23	10,1	0,35	16,1	0,25	14,1	0,27	18,9

3. Reactividad cruzada

En un estudio de reactividad cruzada se analizaron 10 muestras negativas en el sistema de pruebas ELISA CMV IgG de ZEUS mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos de tipo IgG específicos del virus de la varicela-zóster (VZV), el antígeno de la cápside viral (VCA) del virus de Epstein-Barr (VCA-EBV) y el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1). Las 10 muestras fueron positivas para IgG contra el VCA-EBV y contra el VHS-1, y dos de las diez muestras fueron positivas para IgG anti-VZV. Estos resultados indican que el sistema de pruebas ELISA CMV IgG de ZEUS no presenta reactividad cruzada con anticuerpos frente a otros virus herpéticos.

REFERENCIAS

1. Jordon MC: Latent infection and the elusive cytomegalovirus. Rev. Infect. Dis. 5:205-215, 1983.
2. Starr SE: Cytomegalovirus. Ped. Clin. N. Am. 26:282-293, 1979.
3. Weller TH: Clinical spectrum of cytomegalovirus infection. In: Nahmias AJ, Dowdle WR, and Schinazi RF, eds. The Human Herpes Viruses, an interdisciplinary perspective. Elsevier/North Holland Publishing Co., New York, pp. 20-30, 1980.
4. Adler SP: Transfusion-associated cytomegalovirus infections. Rev. Infect. Dis. 5:977-993, 1983.
5. Melish ME and Hanshaw JB: Congenital cytomegalovirus infection: Development progress of infants detected by routine screening. Am. J. Dis. Child. 126:190-194, 1973.
6. Reynolds DW, Stagno S, and Alford CA: Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. In: Lennette EH and Schmidt NJ, eds. Diagnostic Procedures for Viral, rickettsial, and Chlamydial Infections, 5th ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1979.
7. Nankervis G: Long term follow-up of cytomegalic inclusion disease of infancy, Pediatrics 46:403-410, 1970.
8. Stagno S, Reynolds DW, Huang ES, Thames SD, Smith RJ, and Alford CA: Congenital cytomegalovirus infections: Occurrence in an immune population. N. Engl. J. Med. 296:1254-1258, 1978.

9. Stern H: Isolation of cytomegalovirus and clinical manifestations of infection at different ages. Br. Med. J. 1:665-669, 1968.
10. Handsfield HH, Chandler SH, Caine VA, Meyers JD, Corey L, Medeiros E, and McDougall JK: Cytomegalovirus infection in sex partners: Evidence for sexual transmission. J. Infect. Dis. 151:344-348, 1985.
11. Jordan MC, Rousseau WE, Noble GR, Stewart JA, Noble CR, and Chin TDY: Spontaneous cytomegalovirus mononucleosis. Ann. Intern. Med. 79:153-160, 1973.
12. Umetsu M, Chiba Y, Horino K, Chiba S, and Kakao T: Cytomegalovirus-mononucleosis in a newborn infant. Arch. Dis. Child. 50:396-398, 1975.
13. Simmons RL, Matas AJ, Rattazzi LC, Balfour HH, Howard RJ, and Najarian JS: Clinical characterization of the lethal cytomegalovirus infection following renal transplantation surgery. Surgery 82:537-546, 1977.
14. Yeager AS, Grumet FC, Hafleigh EB, Arvin AM, Bradley JS, and Prober CG: Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. J. Pediatrics 98:281-287, 1981.
15. Drew WL: Diagnosis of cytomegalovirus infection. Rev. Infect. Dis. 10:5468-5475, 1988.
16. Booth JC, Hannington G, Bakin TMF, Stern H, Kangro H, Griffiths PD, and Heath RB: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, complement fixation, anticomplement immunofluorescence and passive hemagglutination techniques for detecting cytomegalovirus IgG antibody. J. Clin. Pathol. 35:1345-1348, 1982.
17. Dylewski JS, Rasmussen L, Mills J, and Merigan TC: Large scale serological screening for cytomegalovirus antibodies in homosexual males by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Micro. 19:200-203, 1984.
18. Phipps PH, Gregoire L, Rossier E, and Perry E: Comparison of five methods of cytomegalovirus antibody screening of blood donors. J. Clin. Micro. 18:1296-1300, 1983.
19. Engvall E, and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem. 8:871-874, 1971.
20. Engvall E and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109:129-135, 1972.
21. Voller A, Bartlett A, and Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J. Clin. Pathol. 31:507-520, 1978.
22. Adler SP, McVoy M, Biro VG, Britt WJ, Hider P, and Marshall D: Detection of cytomegalovirus antibody with latex agglutination. J. Clin. Micro. 22:68-70, 1985.
23. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second Edition; Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
24. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
25. Starr SE, and Friedman HM: Human cytomegalovirus. Manual of Clin. Microbio. 4th edition, ch. 65, pp. 711-719, 1985.
26. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
27. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA y SAVE Diluent[®] son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.
 Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 ©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

EC	REP	EMERGO EUROPE Prinsessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands
-----------	------------	--