

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA Cytomegalovirus (CMV) IgM de ZEUS es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgM contra el citomegalovirus (CMV) en suero humano. El sistema de pruebas está diseñado para la evaluación de evidencias serológicas de infección primaria o reactivada 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.

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 producción de los anticuerpos de clase IgM comienza durante las 2 - 3 primeras semanas de la infección por el CMV y sólo están presentes de forma transitoria en la mayoría de los pacientes (16, 17). Los procedimientos serológicos que determinan la presencia de anticuerpos IgM permiten diferenciar las infecciones primarias de las recidivantes. En estas últimas es rara la presencia de anticuerpos IgM (16).

Los anticuerpos de alta afinidad de tipo IgG antiCMV que estén presentes en una muestra pueden interferir en la detección de anticuerpos específicos de tipo IgM (18,23). Debido a su alta afinidad, los anticuerpos de tipo IgG pueden tener preferencia para fijarse al antígeno del CMV, lo que puede producir resultados negativos falsos de anticuerpos de tipo IgM (18). Además, si está presente el factor reumatoide junto con IgG específica del antígeno, ambos pueden fijarse entre sí, lo que produciría resultados positivos falsos de anticuerpos de tipo IgM (19). Estos dos problemas pueden evitarse si se elimina la inmunoglobulina IgG de la muestra antes de analizarla para detectar la presencia de anticuerpos de tipo IgM (20-23). Los científicos han utilizado varios métodos diferentes para separar los anticuerpos de tipo IgG. Entre dichos métodos se incluye el filtrado mediante gel (20), la absorción con proteína A (21), la cromatografía de intercambio de iones (22), y la precipitación de la inmunoglobulina IgG con suero de anti-IgG humana (23).

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA CMV IgM de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgM 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 IgM del CMV. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba se diluyen con el diluyente de muestra que se proporciona. El diluyente de muestra contiene anti-IgG humana, la cual precipita y elimina la IgG y el factor reumatoide de la muestra, de forma que la IgM pueda reaccionar libremente con el antígeno inmovilizado. Durante la incubación de la muestra, los anticuerpos de tipo IgM específicos del antígeno presentes 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-IgM humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo de tipo IgM inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no se haya fijado.
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 diluyente para muestras.**

PLATE	1.	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con péptido de cápside 125 kD a partir de células inducidas P3-HR1. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	2.	Conjugado: anti-IgM humana (específica de la cadena μ) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	3.	Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	4.	Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5.	Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.
DIL SPE	6.	Diluyente de la muestra: un frasco de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Solución de color púrpura. Listo para usar.
SOLN TMB	7.	TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN STOP	8.	Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF 10X	9.	Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco 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:

1. 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.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

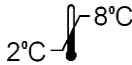
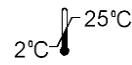
PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. 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.
3. 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.
4. 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 (36).
5. 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.
6. 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.
7. El diluyente para muestras, 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.
8. 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.
9. La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
10. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
11. 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).
12. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
13. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
14. 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.
15. Nunca pipete con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
16. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
17. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
18. Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
19. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
20. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
21. 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.
22. 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.
23. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
24. No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
25. 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 para muestras 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 (31, 32). 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 (24).

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.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	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 para muestras) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente.
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 para muestras 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 x media de DO del calibrador = 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 - 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 IgM contra CMV. Un resultado negativo indica que no hay infección actual ni reactivada por CMV. No obstante, las muestras que se obtienen demasiado temprano durante una infección primaria pueden no tener niveles detectables de anticuerpos IgM. Si el profesional sanitario sospecha de la existencia de una infección primaria, deberá volver a tomar otra muestra transcurridos siete 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 ≥ 1,10 indica que se han detectado anticuerpos de tipo IgM específicos contra CMV. Un resultado positivo de la prueba indica una infección primaria o reactivada por el 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 procedimiento serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Un resultado negativo no descarta una infección primaria o reactivada por CMV.
- Dado que los anticuerpos IgM específicos del CMV no suelen desarrollarse hasta que el paciente ha presentado signos clínicos de la enfermedad durante una semana o más, las muestras obtenidas demasiado pronto en el curso de una infección primaria pueden no tener niveles detectables de IgM (33).
- En pacientes inmunocomprometidos, la capacidad de producir una respuesta de los anticuerpos de tipo IgM puede verse dificultada, y los anticuerpos de tipo IgM específicos contra el CMV pueden producir resultados negativos falsos durante una infección activa (15, 34).
- Los anticuerpos de tipo IgM específico contra el CMV pueden reaparecer durante la reactivación de la infección por CMV (15, 17 y 33).
- Los resultados del sistema de pruebas ELISA CMV IgM de ZEUS no constituyen un diagnóstico por sí mismos. Interprete los resultados de forma conjunta con la situación clínica del paciente y con los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
- Los pacientes pueden continuar produciendo anticuerpos IgM específicos del CMV durante seis a nueve meses después de una infección primaria (15, 27 y 33).
- El aislamiento del CMV en la orina o la presencia de anticuerpos IgM antiCMV durante la primera semana de vida suele proporcionar un diagnóstico fiable de infección congénita por CMV (35). Las muestras recogidas para aislamiento viral o para la detección de IgM antiCMV transcurrida la primera semana después del nacimiento no deben utilizarse para diferenciar las infecciones congénitas de las adquiridas en el nacimiento o poco después del mismo (35).
- Los anticuerpos de tipo IgG específico contra el CMV pueden competir con los anticuerpos de tipo IgM por los sitios de unión al antígeno y provocar resultados negativos falsos. Si está presente el factor reumatoide junto con los anticuerpos de tipo IgG específicos del CMV pueden producirse resultados positivos falsos. La etapa de incubación con absorción permite eliminar más del 99% de la IgG de las muestras de la prueba y reduce significativamente la incidencia de resultados falsos.
- Pueden producirse respuestas de anticuerpos IgM heterotípicos en pacientes infectados por el virus de Epstein-Barr que produzcan resultados positivos falsos en los sistemas de pruebas CMV IgM ELISA.

RESULTADOS ESPERADOS

La incidencia de infección por CMV varía con la edad, el lugar geográfico, la conducta sexual y el estado socioeconómico (33). Sin embargo, el CMV es la causa más frecuente de infección viral congénita (16, 33). En Estados Unidos, las infecciones en el momento del nacimiento afectan aproximadamente al 1% de los lactantes (16, 33). La IgM específica del CMV suele desarrollarse después de que el paciente ha presentado signos clínicos de la enfermedad durante al menos una semana o más (33). La mayoría (83%) de los pacientes produce IgM de forma transitoria en las 16 semanas siguientes a la seroconversión (16). No obstante, algunos pacientes pueden continuar produciendo IgM durante seis a nueve meses después de la seroconversión (15 - 17).

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo

Se ha realizado un estudio para comparar el sistema de pruebas ELISA CMV IgM de ZEUS con otro sistema de pruebas ELISA comercial para la detección de anticuerpos IgM anti-CMV. Se analizó un total de 101 muestras de suero, obtenidas de un laboratorio de referencia, mediante los dos métodos. Los resultados se resumen a continuación:

Sistema de pruebas ELISA CMV IgM de ZEUS	ELISA de referencia				
	Positivo	Negativo	Dudoso*		
Positivo	25	1	2		
Negativo	2	66	2		
Dudoso*	3	0	0		
Especificidad = 98,5% (66/67)		Sensibilidad = 92,5% (25/27)		Concordancia = 96,8% (91/94)	
*Los resultados dudosos no se han incluido en los cálculos de sensibilidad, especificidad y concordancia					

Los resultados obtenidos con los dos procedimientos para las tres muestras no concordaron. Estas muestras se analizaron de nuevo mediante un tercer procedimiento ELISA comercial para la detección de anticuerpos IgM y los resultados concordaron con los del sistema de pruebas ELISA de ZEUS.

2. Reproducibilidad

Con objeto de evaluar la variación intraensayo e interensayos, varios técnicos analizaron seis muestras: dos muestras positivas fuertes, dos muestras cerca de la zona límite y dos muestras negativas bajas. 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	6,48	3,7	7,68	3,1	5,82	4,7	6,66	11,6
Suero 2	7,27	4,3	8,92	1,7	6,88	4,4	7,69	11,5
Suero 3	2,73	6,0	3,19	7,7	2,69	4,0	2,87	7,9
Suero 4	1,30	3,2	1,54	7,3	1,20	5,7	1,35	10,8
Suero 5	0,55	7,2	0,66	12,2	0,55	8,3	0,59	9,1
Suero 6	0,67	7,1	0,77	5,6	0,56	5,6	0,67	13,1

3. Reactividad cruzada

Se realizaron estudios para evaluar la posible interferencia con el método analítico por sueros que contienen factor reumatoide o anticuerpos antinucleares (ANA). Se analizaron diez sueros positivos para el factor reumatoide con títulos de aglutinación de látex entre 1:80 y 1:640 mediante el procedimiento ELISA CMV IgM de ZEUS. Después de un pretratamiento con absorbente, los diez sueros fueron negativos con el procedimiento ELISA CMV IgM de ZEUS. Se analizaron diez sueros positivos para ANA con títulos de IFA de 1:80 a 1:1280 mediante el procedimiento ELISA CMV IgM de ZEUS, de los cuales nueve fueron negativos. Un suero con un título de ANA de 1:1280 fue débilmente positivo, pero también fue positivo con otro procedimiento CMV IgM ELISA. Estos estudios indican que la interferencia del factor reumatoide y de los anticuerpos antinucleares con el procedimiento de la prueba es mínima. Se analizaron sueros con títulos de IFA de IgM contra el virus del herpes simple (VHS) (1:8 - 1:640) y contra el virus de la varicela-zóster (VVZ) (1:10 - 1:80) para valorar una posible reactividad cruzada con el sistema de pruebas ELISA CMV IgM. Ninguno de los cinco sueros positivos para IgM anti-VHS y sólo uno de los nueve sueros positivos para IgM anti-VVZ fueron positivos con el sistema de pruebas ELISA CMV IgM.

REFERENCIAS

- Jordon MC: Latent infection and the elusive cytomegalovirus. Rev. Infect. Dis. 5:205-215, 1983.
- 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. Stagno S, Tinker MK, Elrod C, Fuccillo DA, Cloud G, and O'Beirne AJ: Immuno-globulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmuno-assay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. *J. Clin. Micro.* 21:930-935, 1985.
 17. Charnesky MA, Ray CG, and Smith TF: Laboratory diagnosis of viral infections. *Cumitech 15*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1982.
 18. Fraser KB, Shirodaria PV, and Stanford CF: Fluorescent staining and human IgM. *Br. Med. J.* 3:707, 1971.
 19. Salonen E-M, Vaheri A, Suni J, and Wager O: Rheumatoid factor in acute viral infections: Interference with determination of IgM, IgG, and IgA antibodies in an enzyme immunoassay. *J. Infect. Dis.* 142:250-255, 1980.
 20. Pyndiah N, Krech U, Price P, and Wilhelm J: Simplified chromatography separation of immunoglobulin M from G and its application to Toxoplasma indirect immunofluorescence. *J. Clin. Micro.* 9:170-174, 1979.
 21. Sumaya CV, Ench Y, and Pope RM: Improved test for IgM antibody to Epstein-Barr virus using an absorption step with Staphylococcus aureus. *J. Infect. Dis.* 146:518-523, 1982.
 22. Johnson RB and Libby R: Separation of immunoglobulin M (IgM) essentially free of IgG from serum for use in systems requiring assay of IgM-type antibodies without interference from rheumatoid factor. *J. Clin. Micro.* 12:451-454, 1980.
 23. Joassin L and Reginster M: Elimination of nonspecific cytomegalovirus immunoglobulin M activities in the enzyme-linked immunosorbent assay by using anti-human immunoglobulin G. *J. Clin. Micro.* 23:576-581, 1984.
 24. Engvall E and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:871-874, 1971.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Voller A, Bartlett A, and Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* 31:507-520, 1978.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: Second Edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
 32. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
 33. Drew WJ: Herpesviridae: Cytomegalovirus. In: A Balows, WJ Hausler, and EH Lennette, eds. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases*, Vol II. Springer-Verlag, New York, pp. 247-260, 1988.
 34. Rasmussen L, Kelsall D, Nelson R, Carney W, Hirsch M, Winston D, Preiksaitis and Merigan TC: Virus-specific IgG and IgM antibodies in normal and immunocompromised subjects infected with cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 145:191-199, 1982.
 35. Stagno S, Pass RF, Reynolds DW, Moore MA, Nahmias AJ, and Alford CA: Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 65:251-257, 1980.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. *Fed. Register* 56:64175-64182, 1991.



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.

