

февруари 2018 г.

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Листовка



Интерферон-гама (IFN- γ) тест с цяла кръв, измерващ отговорите към пептидни антигени на човешки цитомегаловирус

IVD За ин витро диагностика



REF 0350-0201



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

EC **REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ГЕРМАНИЯ

1075110BG Изд. 05



www.QuantiFERON.com



Съдържание

Предназначение	5
Кратко изложение и обяснение	5
Принципи на процедурата	6
Време, необходимо за извършване на теста	8
Предоставени материали	9
Съдържание на набора	9
Необходими, но не предоставени материали	10
Предупреждения и предпазни мерки	11
Информация за безопасността	13
Съхранение и работа на реагентите	14
Вземане и работа с проби	15
Процедура	18
Етап 1: Инкубиране на кръвта и събиране на плазмата	18
Етап 2: QuantiFERON-CMV ELISA за човешки IFN-γ	19
Изчисления и интерпретация на теста	24
Генериране на стандартна крива (ако не се използва софтуерът за анализ на QF-CMV)	24
Качествен контрол на теста	25
Интерпретиране на резултатите	26
Ограничения	27
Очаквани стойности	27
Работни характеристики	30

Клинични работни характеристики.....	30
Праг на теста	31
Клинични проучвания.....	31
Специфичност	32
Чувствителност.....	32
Проучвания, подчертаващи клиничната приложимост.....	33
Международни консенсусни насоки относно контролирането на цитомегаловирус при трансплантация на солиден орган	38
Работни характеристики на теста	39
Техническа информация.....	41
Неопределени резултати.....	41
Плазмени проби със съсиреци.....	42
Ръководство за отстраняване на проблеми	43
Литературни източници	45
Символи	47
Информация за контакти	48
Съкратена процедура на теста ELISA	49
Етап 1: Инкубиране на кръвта	49
Етап 2: IFN- γ ELISA.....	49
Хронология на редакциите на ръководството	52

Предназначение

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) представлява ин витро тест, използващ пептиден коктейл, който симулира протеини на човешкия цитомегаловирус (cytomegalovirus, CMV) с цел стимулиране на клетки в хепаринизирана цяла кръв. Откриването на интерферон-гама (interferon-gamma, IFN- γ) чрез ензимно свързан имуносорбентен анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) се използва за количествено определяне на ин витро отговорите към тези пептидни антигени, които се свързват с имунния контрол на инфекцията със CMV. Загубата на тази имунна функция може да се свърже с развитието на CMV заболяване. Предназначението на QF-CMV е да мониторира нивото на анти-CMV имунитета на пациента.

QF-CMV не е тест за установяване на инфекция със CMV и не трябва да се използва за изключване на инфекция със CMV.

Кратко изложение и обяснение

CMV е херпес вирус, с който са заразени между 50 и 85% от възрастните в популацията. Заразяването с този вирус е често срещано усложнение при потисната имунна система, особено след трансплантация, и може да допринесе в значителна степен за заболяемостта и смъртността при получателите на трансплантат. Текущите имunosупресивни терапии, използвани за предотвратяване на отхвърлянето на трансплантирани органи, имат неблагоприятни ефекти върху Т-лимфоцитите и клетъчно-медираните имунни (cell-mediated immune, CMI) отговори, което води до повишаване на податливостта на вирусни инфекции след трансплантация. Важното значение на Т-клетъчната функция при потискането на CMV репликацията се подчертава и от факта, че CD8⁺ CMV-специфичните цитотоксични Т-лимфоцити (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) могат да осигуряват защита срещу развитие на заболявания, свързани с вируси. Преброяването на CD8⁺

CMV-специфичните CTL при имunosупресирани пациенти и производството на IFN- γ може да се използват за прогнозиране на риска от развитие на CMV заболяване. IFN- γ може да е заместителен (сурогатен) маркер за идентифицирането на CMV-специфични CTL.

QF-CMV е тест за CMI отговори към пептидни антигени, които симулират протеини на CMV. CMV пептидите са предназначени да се насочват към CD8⁺ Т-клетките, включително A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 и Cw6 (A30, B13) HLA клас I хаплотипове, обхващащи > 98% от човешката популация. В кръвта на лицата, инфектирани със CMV, обикновено има CD8⁺ лимфоцити, които разпознават тези антигени. Този процес на разпознаване включва образуване и секретирание на цитокина IFN- γ . Откриването и последващото количествено определяне на IFN- γ е в основата на този тест.

Принципи на процедурата

Тестът QF-CMV се извършва в два етапа. Първо, цяла кръв се взема във всяка от епруветките за вземане на кръв на QF-CMV, които включват епруветка с нулева контрола, епруветка със CMV антиген и епруветка с митоген.

Епруветката с митоген се използва в теста QF-CMV като положителна контрола. Това може да е особено приложимо в случаи на съмнение относно имунния статус на пациента. Епруветката с митоген може също така да служи като контрола за правилната работа с кръвта и инкубацията ѝ.

Епруветките трябва да се инкубират при температура 37 °C възможно най-скоро и до 16 часа след вземането. След инкубационен период от 16 до 24 часа епруветките се центрофугират, плазмата се отстранява и количеството на IFN- γ (IU/ml) се измерва чрез QF-CMV ELISA.

Количеството на IFN- γ в плазмените проби от епруветките със CMV антиген и митоген често може да е над горните граници на повечето четци за ELISA, дори когато имunosупресията при пациентите е умерена. За качествени резултати използвайте стойностите, изчислени за неразредена плазма. За количествени резултати, когато са необходими действителните IU/ml стойности, плазмените проби трябва да се разреждат 1/10 в зелен разредител и да се тестват в ELISA заедно с неразредената плазма.

Забележка: за пробите, които са в обхвата на QF-CMV ELISA (т.е. до 10 IU/ml), трябва да се използват резултатите, получени с неразредена плазма. За такива концентрации на IFN- γ стойностите, получени след разреждане на плазмените проби 1/10, може да са неточни.

Тестът се смята за реактивен за IFN- γ отговор, когато епруветката със CMV антиген е с резултат значително над нулевата IFN- γ IU/ml стойност. Митоген-стимулираната плазмена проба служи като IFN- γ положителна контрола за всяка тествана проба. Слабият отговор към митоген посочва неопределен резултат, когато кръвната проба също е с нереактивен отговор към CMV антигените. Това може да се получи при недостатъчно лимфоцити, намалена лимфоцитна активност поради неправилно обработване на пробата, неправилно напълване/смесване на епруветката с митоген или невъзможност на лимфоцитите на пациента да произведат IFN- γ , например при пациенти със скорозна трансплантация. Нулевата проба регулира фона или неспецифичния IFN- γ в кръвните проби. Нивото на IFN- γ в нулевата епруветка се изважда от IFN- γ нивото за епруветката със CMV антиген и епруветката с митоген (вижте „Интерпретиране на резултатите“ на стр. 26 в тази листовка за информация относно интерпретирането на QF-CMV резултатите).

Време, необходимо за извършване на теста

Приблизителното време, необходимо за извършване на теста QF-CMV, е представено по-долу. Посочено е и времето за тестване на множество проби, когато са групирани в партии:

Инкубиране на епруветките
с кръв при 37 °C:

16 – 24 часа

ELISA:

Около 3 часа за една плака за ELISA

Под 1 час работа

Добавете 10 – 15 минути за всяка
допълнителна плака

Предоставени материали

Съдържание на набора

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
Каталожен №	0192-0301
Брой елементи	1
QuantiFERON Nil Control (Нулева контрола QuantiFERON) (сива капачка)	1 епруветка
QuantiFERON CMV Antigen (CMV антиген QuantiFERON) (синя капачка)	1 епруветка
QuantiFERON Mitogen Control (Митоген контрола QuantiFERON) (лилава капачка)	1 епруветка
Листовка на епруветките за вземане на кръв за QF-CMV	1

Quantiferon-CMV ELISA		Набор за ELISA с 2 плаки
Каталожен №	0350-0201	
Ленти микроплаки (12 × 8 ямки), покрити с мише античовешко IFN- γ моноклонално антитяло	2 комплекта ленти микроплаки с 12 × 8 ямки	
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Човешки IFN- γ стандарт, лиофилизиран) (съдържа рекомбинантен човешки IFN- γ , говежди казеин, 0,01% w/v тимерозал)	1 × флакон (8 IU/ml в разтворено състояние)	
Green Diluent (Зелен разреждател) (съдържа говежди казеин, нормален миши серум, 0,01% w/v тимерозал)	1 × 30 ml	
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Конюгат 100x концентрат, лиофилизиран) (миши античовешки IFN- γ HRP, съдържа 0,01% w/v тимерозал)	1 × 0,3 ml	
Wash Buffer 20x Concentrate (Промивен буфер 20x концентрат) (pH 7,2, съдържа 0,05% v/v ProClin® 300)	1 × 100 ml	
Enzyme Substrate Solution (Разтвор на ензимен субстрат) (съдържа H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' тетраметилбензидин)	1 × 30 ml	
Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопиращ разтвор) (съдържа 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml	
Листовка за QF-CMV ELISA	1	

* Съдържа сярна киселина. Вижте страница 11 относно предпазните мерки.

Необходими, но непредоставени материали

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (safety data sheets, SDS), които можете да намерите при доставчика на продукта.

- 37 °C инкубатор; не се изисква CO₂
- Калибрирани пипети с променлив обем за пипетиране от 10 µl до 1000 µl с връхчета за еднократна употреба
- Калибрирани многоканални пипети с възможност за пипетиране на 50 µl и 100 µl с връхчета за еднократна употреба
- Шейкър за микроплаки
- Дейонизирана или дестилирана вода, 2 литра
- Промивно устройство за микроплаки (препоръчва се автоматично промивно устройство)
- Четец за микроплаки, снабден с филтър 450 nm и референтен филтър от 620 nm до 650 nm

Предупреждения и предпазни мерки

За ин витро диагностика

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (SDS). Тези листове са на разположение онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN® и компонент на набора.

ВНИМАНИЕ



Работете с човешка кръв като с потенциално заразна. Спазвайте приложимите указания за работа с кръв.

Следните предупреждения за опасност и предпазни мерки се отнасят за компонентите на QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Съдържа: sulfuric acid. Внимание! Може да бъде корозивно за металите. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Използвайте предпазни ръкавици/ предпазно облекло/ предпазни очила/ предпазна маска за лице.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Внимание! Причинява слабо кожно дразнене. Използвайте предпазни ръкавици/ предпазно облекло/ предпазни очила/ предпазна маска за лице.

QuantiFERON Green Diluent



Съдържа: тринатриев 5-хидрокси-1-(4-сулфофенил)-4-(4-сулфофенилазо)пиразол-3-карбоксилат. Съдържа: tartrazine. Внимание! Може да причини алергична кожна реакция. Използвайте предпазни ръкавици/ предпазно облекло/ предпазни очила/ предпазна маска за лице.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Съдържа: ProClin 300. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. Да се избягва изпускане в околната среда.

Информация за безопасността

Допълнителна информация

- Отклонения от указанията в листовката за QF-CMV могат да доведат до погрешни резултати. Прочетете внимателно инструкциите преди употреба.
- Не използвайте набора, ако преди употреба някоя от бутилките е с признаци на повреда или утечка.
- **Важно:** Преди употреба огледайте флаконите. Не използвайте стандартните флакони с конюгат или IFN- γ , ако забележите признаци на повреда или ако гумената запушалка е повредена. Не работете със счупени флакони. Прилагайте подходящи предпазни мерки за безопасност с оглед на безопасното им изхвърляне.

Препоръка: При отваряне на стандартните флакони с конюгат или IFN- γ използвайте уред за разгъване, за да намалите риска от нараняване вследствие на металната нагъната капачка.

- Не смесвайте и не използвайте ленти микроплаки, човешки IFN- γ стандарт, зелен разредител или конюгат 100 \times концентрат от различни партиди на набора на QF-CMV. Другите регенти (промивен буфер 20 \times концентрат, разтвор на ензимен субстрат и ензимен стопиращ разтвор) могат да бъдат разменяни между наборите, при условие че реагентите не са с изтекъл срок на годност и данните на партидата отговарят на регистрираните.
- Изхвърлете неизползваните реагенти и биологични проби в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.
- Не използвайте епруветките за вземане на кръв за QF-CMV или наборите на QF-CMV ELISA след изтичане на срока на годност.
- Уверете се, че лабораторното оборудване като например промивните устройства за плаки и четците са калибрирани/валидирани за употреба.

Съхранение и работа на реагентите

Епруветки за вземане на кръв

- Съхранявайте епруветките за вземане на кръв за QF-CMV при температура от 4 °C до 25 °C.
- Епруветките за вземане на кръв за QF-CMV трябва да са с температура от 17 до 25 °C по времето на напълване с кръв.
- Срокът на годност на епруветките за вземане на кръв QF-CMV е най-много 15 месеца от датата на производство, когато се съхраняват при температура от 4 °C до 25 °C.

Реагенти на набора за ELISA

- Съхранявайте набора при температура от 2 °C до 8 °C.
- Винаги предпазвайте разтвора на ензимния субстрат от пряка слънчева светлина.

Разтворени и неизползвани реагенти

За инструкции относно разтварянето на реагентите вижте „Етап 2: QuantiFERON-CMV ELISA за човешки IFN- γ “ (стъпки 3 и 5 на страници 19 и 21).

- Разтвореният човешки IFN- γ стандарт на набора може да се използва в срок до 3 месеца, ако се съхранява при температура от 2 °C до 8 °C.
Запишете датата на разтваряне на стандарта с човешки IFN- γ на набора.
- След като бъде разтворен, неизползваният конюгат 100 \times концентрат трябва да се върне на мястото за съхранение при температура 2 – 8 °C и да се използва в срок до 3 месеца.
Запишете датата на разтваряне на конюгата.

- Конюгатът с работна концентрация трябва да използва в рамките на 6 часа от приготвянето.
- Промивният буфер с работна концентрация трябва да се съхранява при стайна температура (22 ± 5 °C) за период до 2 седмици.

Вземане и работа с проби

За QF-CMV се използват следните епруветки за вземане на кръв:

- Nil Control (Нулева контрола) (сива капачка)
- CMV Antigen (CMV антиген) (синя капачка)
- Mitogen Control (Митоген контрола) (пилава капачка)

Антигените са изсушени по вътрешната стена на епруветките за вземане на кръв, затова е от съществено значение съдържанието на епруветката да се смеси щателно с кръв. Епруветките трябва да се прехвърлят в инкубатор при температура 37 °C възможно най-скоро и до 16 часа след вземането.

За оптимални резултати трябва да се спазват следните процедури:

1. За всеки индивид вземете 1 ml кръв чрез венепункция директно във всяка от епруветките за вземане на кръв за QF-CMV. Тази процедура трябва да се извършва от обучен флеботомист.

Епруветките за вземане на кръв за QF-CMV могат да се използват при височина до 810 метра над морското равнище.

Ако се използват епруветки за вземане на кръв на QF-CMV при надморска височина над 810 метра или ако обемът на изтеглената кръв е малък, кръвта може да се вземе със спринцовка и веднага да се прехвърли по 1 ml във всяка от трите епруветки. С оглед на безопасността това се извършва най-добре чрез

отстраняване на иглата на спринцовката, като се гарантират правилни процедури за безопасност, отстраняване на капачките от три епруветки за вземане на кръв за QF-CMV и добавяне на 1 ml кръв (до черния маркер отстрани на етикета на епруветката). Поставете обратно капачките плътно и смесете, както е описано по-долу. Тъй като в епруветките от 1 ml кръвта се събира относително бавно, задръжте епруветката на иглата за 2–3 секунди, след като епруветката изглежда изцяло напълнена, за да се гарантира вземането на правилен обем.

Черният маркер отстрани на епруветките посочва напълване с обем от 1 ml. Епруветките за вземане на кръв за QF-CMV са валидирани за обеми в диапазона от 0,8 до 1,2 ml. Ако нивото на кръвта в някоя епруветка не е близо до индикаторния маркер, трябва да се вземе нова кръвна проба.

Ако за вземане на кръв се използва игла тип бъттерфлай, трябва да се използва епруветка за „прочистване“, за да се гарантира, че тръбичките са запълнени, преди да се използват епруветките за вземане на кръв за QF-CMV.

Алтернативно кръвта може да се вземе в генерична епруветка за еднократно вземане на кръв с литиев хепарин като антикоагулант и след това да се прехвърли в епруветките за QF-CMV. Използвайте само литиев хепарин като кръвен антикоагулант, тъй като другите антикоагуланти смущават теста.

Напълнете епруветка за вземане на кръв (минимален обем 5 ml) и смесете внимателно чрез няколкократно обръщане на епруветката за разтваряне на хепарина. Тази процедура трябва да се извършва от обучен флеботомист. Кръвта трябва да се съхранява на стайна температура (22 ± 5 °C), преди да се прехвърли за инкубация в епруветките за вземане на кръв за QF-CMV, която трябва да се започне в рамките на 16 часа след вземането на кръв.

2. Веднага след напълване разклатете епруветките за вземане на кръв за QF-CMV 10 пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв, за да се разтворят антигените по стените на епруветката.

Епруветките трябва да се съхраняват при температура между 17–25 °C по време на напълването с кръв.

Твърде енергичното разклащане може да причини нарушаване на гела и да доведе до абнормни резултати.

Ако кръвта е взета в епруветка с литиев хепарин, пробите трябва да бъдат смесени равномерно преди разпределянето в епруветките за вземане на кръв за QF-CMV. Уверете се, че кръвта е смесена щателно чрез внимателно обръщане непосредствено преди разпределянето. Разпределете аликвоти по 1 ml (по една във всяка епруветка за вземане на кръв за QF-CMV) в съответните епруветки за нулева проба, CMV антиген и митоген. Това трябва да стане асептично, като се гарантират правилни процедури за безопасност, чрез отстраняване на капачките от трите епруветки за вземане на кръв за QF-CMV и добавяне на 1 ml кръв към всяка от тях (до черния маркер отстрани на етикета на епруветката). Поставете обратно капачките на епруветките плътно и смесете, както е описано по-долу.

3. Обозначете епруветките по подходящ начин.

Уверете се, че всяка епруветка (нулева, с CMV антиген и с митоген) може да бъде идентифицирана по етикета си или по други начини.

4. След напълването, разклащането и етикетирането епруветките трябва да се прехвърлят в инкубатор при температура 37 ± 1 °C възможно най-скоро и до 16 часа след вземането. Преди инкубацията съхранявайте епруветките на стайна температура (22 ± 5 °C). Не поставяйте в хладилник или фризер кръвните проби.

Процедура

Етап 1: Инкубиране на кръвта и събиране на плазмата

1. Инкубирайте епруветките ИЗПРАВЕНИ при $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 16 – 24 часа. Инкубаторът не изисква CO_2 или овлажняване.

Важно: Ако кръвта не се инкубира веднага след вземането, преди инкубирането смесете отново епруветките, като ги обърнете 10 пъти.

След инкубирането епруветките за вземане на кръв могат да се съхраняват при температура от 4 до $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ за период до 3 дни преди центрофугирането.

2. След като инкубирате епруветките при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, събирането на плазма се улеснява от центрофугиране на епруветките за 15 минути при 2000 до 3000 RCF (g). Запушалката от гел ще отдели клетките от плазмата. Ако това не се случи, епруветките трябва да се центрофугират отново.

Събирането на плазма може да се извърши и без центрофугиране, но е необходимо допълнително внимание за отстраняване на плазмата без нарушаване на клетките.

3. След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

Важно: Плазмените проби трябва да се събират само чрез използване на пипета.

Плазмените проби могат да се зарядят директно от центрофугирани епруветки за вземане на кръв в плака за QF-CMV ELISA, включително когато се използват автоматизирани работни станции за ELISA.

Плазмените проби могат да се съхраняват до 28 дни в центрофугирани епруветки за вземане на кръв за QF-CMV при температура $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ или, ако плазмата е събрана, под $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (за предпочитане под $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) за продължителни периоди.

За да имате достатъчно проби за теста, съберете най-малко 150 μl плазма.

Етап 2: QuantiFERON-CMV ELISA за човешки IFN- γ

Вижте „Съдържание на набора“, страница 9 и „Необходими, но непредоставени материали“, страница 10 за материалите, необходими за извършване на ELISA.

1. Преди употреба всички плазмени проби и реагенти, с изключение на конюгата 100 \times концентрат, трябва да се темперират до стайна температура (22 ± 5 °C). Отделете 60 минути за достигане на стайна температура.
2. Отстранете от рамката лентите в плаката за ELISA, които не са необходими, затворете отново фолиевата опаковка и ги върнете обратно в хладилника за съхранение, докато ви потрябват.

Оставете поне една лента за стандартите QF-CMV ELISA и достатъчно ленти за броя на пациентите, които се тестват. След употреба запазете рамката и капака за употреба с останалите ленти.

3. Разтворете стандарта с човешки IFN- γ с обема дейонизирана или дестилирана вода, посочен на етикета на флакона. Смесвайте внимателно за избягване на образуването на пяна и гарантиране на пълно повторно разтваряне. При разтварянето на стандарта IFN- γ до посочения обем ще се получи разтвор с концентрация 8,0 IU/ml.

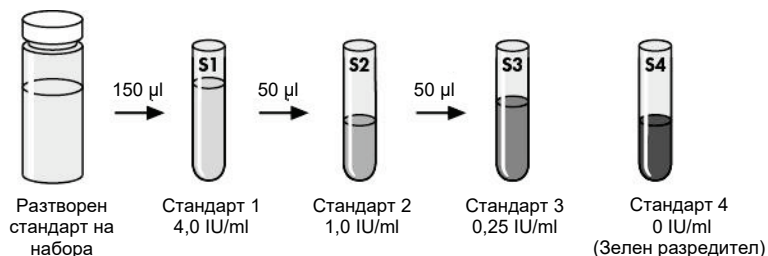
Забележка: Обемът за разтваряне на стандарта с човешки IFN γ на набора се различава при различните партиди.

Като използвате разтворения стандарт, пригответе разреждени серии с четири концентрации на IFN- γ в зелен разредител (Green Diluent, GD) (Фигура 1, следваща страница). S1 (Стандарт 1) съдържа 4,0 IU/ml, S2 (Стандарт 2) съдържа 1,0 IU/ml, S3 (Стандарт 3) съдържа 0,25 IU/ml, а S4 (Стандарт 4) съдържа 0 IU/ml (GD самостоятелно). Стандартите трябва да се тестват поне двукратно.

Подгответе пресни разреждания на стандарта на набора за всяка сесия на ELISA.

Примерна процедура за двойни стандарти

Примерна процедура за двойни стандарти	
А	Означете четирите епруветки: S1, S2, S3, S4
Б	Добавете 150 µl от GD в S1, S2, S3, S4
В	Добавете 150 µl от стандарта на набора в S1 и смесете щателно
Г	Прехвърлете 50 µl от S1 в S2 и смесете щателно
Д	Прехвърлете 50 µl от S2 в S3 и смесете щателно
Е	GD самостоятелно служи като нулев стандарт (S4)



Фигура 1 Генериране на стандартна крива чрез серийно разреждане

4. Разтворете лиофилизирания конюгат 100× концентрат с 0,3 ml дейонизирана или дестилирана вода. Смесвайте внимателно за намаляване до минимум на образуването на пяна и пълно разтваряне на конюгата.

Конюгатът с работна концентрация се приготвя чрез разреждане на необходимото количество разтворен конюгат 100× концентрат в зелен разредител (вижте Таблица 1, следваща страница).

Смесете щателно, но внимателно, за избягване на образуването на пяна.

Върнете неизползвания конюгат 100× концентрат на съхранение при температура от 2 до 8 °C веднага след употреба.

Използвайте само зелен разредител.

Таблица 1 Приготвяне на конюгата с работна концентрация

Брой на лентите	Обем на конюгата 100× концентрат	Обем на зеления разредител
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. Плазмени проби, взети в епруветки за вземане на кръв и впоследствие замразени или съхранявани за повече от 24 часа преди теста, трябва да се смесят добре преди добавянето в ямка за ELISA.

Важно: Ако плазмените проби се добавят директно от центрофугираните епруветки за вземане на кръв за QF-MV, всякакво смесване на плазма трябва да се избягва. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

6. Ако са необходими количествени резултати, разрежете плазмите със CMV и митоген 1/10 в зелен разредител (10 µl плазма + 90 µl GD). Нулевата плазма не трябва да се разрежда.

Препоръчва се да се тестват паралелно следните проби:

нулева, CMV антиген, митоген, CMV антиген (1/10), митоген (1/10)

Независимо от това, в софтуера за анализ на QuantiFERON-CMV се поддържат и следните опции за проби на пациента:

нулева, CMV антиген, митоген

нулева, CMV антиген (1/10), митоген (1/10)

нулева, CMV антиген, митоген, CMV антиген (1/10)

нулева, CMV антиген (1/10), митоген

7. Добавете 50 µl прясно приготвен конюгат с работна концентрация в необходимите ямки за ELISA, като използвате многоканална пипета.
8. Добавете 50 µl от тестовите плазмени проби в съответните ямки. Накрая добавете 50 µl от всеки стандарт от 1 до 4 в съответните ямки. Стандартите трябва да се тестват поне двукратно.
9. Покрийте плаката за ELISA и смесете конюгата и плазмените проби/стандартите щателно, като използвате шейкър за микроплаки за 1 минута при 500 до 1000 rpm. Да се избягват пръски.
10. Покрийте плаката за ELISA и инкубирайте при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) за 120 ± 5 минути.

Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането. Отклоненията от посочения температурен диапазон може да доведат до грешни резултати.

11. По време на инкубирането пригответе промивен буфер с работна концентрация. Разреждете една част промивен буфер 20x концентрат с 19 части дейонизирана или дестилирана вода и смесете щателно. Предоставен е достатъчно промивен буфер 20x концентрат за приготвянето на 2 литра промивен буфер с работна концентрация.
12. Когато инкубирането на плаката за ELISA завърши, промийте ямките с 400 µl промивен буфер с работна концентрация в продължение на поне шест цикъла. Препоръчва се автоматизирано промивно устройство за плаки.

Важно: Щателното промиване е много важно за функционирането на теста.

Уверете се, че всяка ямка е изцяло напълнена с промивен буфер до горната част на ямката за всеки цикъл на промиване. Препоръчва се период на накисване от поне 5 секунди между всеки цикъл.

Трябва да се добави стандартен лабораторен дезинфектант в резервоара за отпадните течности, както и да се спазват установените процедури за обеззаразяване на потенциално заразни материали.

13. Почукайте плаките с лицевата част надолу върху абсорбираща салфетка без мъх, за да отстраните остатъчния промивен буфер. Добавете 100 µl разтвор на ензимен субстрат във всяка ямка, покрийте плаката с капак и смесете щателно, като използвате шейкър за микроплаки в продължение на 1 минута при 500 до 1000 rpm.

14. Покрийте всяка плака и инкубирайте при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) за 30 минути.

Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.

15. След 30-минутното инкубиране добавете по 50 µl ензимен стопиращ разтвор във всяка ямка в последователността на добавяне на субстрата и смесете щателно при 500 до 1000 rpm, като използвате шейкър за микроплаки.

16. Измерете оптичната плътност (Optical Density, OD) за всяка ямка в рамките на 5 минути от спирането на реакцията, като използвате четеща за микроплаки, снабден с филтър за 450 nm и с референтен филтър за 620 nm до 650 nm. Стойностите на OD се използват за изчисляване на резултатите.

Изчисления и интерпретация на теста

Можете да намерите софтуера за анализ на QuantiFERON-CMV за анализиране на необработените данни и изчисляване на резултатите от QIAGEN на **www.QuantiFERON.com**. Уверете се, че използвате най-новата версия на този софтуер за анализ на QF-CMV.

Софтуерът извършва оценка за контрол на качеството на теста, генерира стандартна крива и предоставя резултат от теста за всеки индивид, както е описано подробно в раздела „Интерпретиране на резултатите“ на страница 26. Софтуерът докладва най-ниското разреждане, което генерира резултат в рамките на диапазона на QF-CMV ELISA, като взема предвид коефициента на разреждане.

Като алтернатива на използването на софтуера за анализ на QF-CMV резултатите могат да се определят и по следния метод.

Генериране на стандартна крива (ако не се използва софтуерът за анализ на QF-CMV)

Определете средните стойности на OD на репликатите на стандарта на набора за всяка плака.

Създайте $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ стандартна крива чрез нанасяне на $\log_{(e)}$ на средната OD (оста y) спрямо $\log_{(e)}$ на IFN- γ концентрацията на стандартите в IU/ml (оста x), като пропуснете нулевия стандарт от тези изчисления. Изчислете линията на най-добро съвпадение за стандартната крива чрез регресионен анализ.

Използвайте стандартната крива за определяне на IFN- γ концентрацията (IU/ml) за всяка от тестовите плазмени проби, като използвате OD стойността за всяка проба.

Тези изчисления могат да се извършват с помощта на софтуерните пакети, налични с четците за микроплаки, и стандартна електронна таблица или статистически софтуер (като Microsoft® Excel®). Препоръчва се тези пакети да се използват за изчисляване на регресионния анализ, коефициента на вариация (coefficient of variation, %CV) за стандартите и коефициента на корелация (r) на стандартната крива.

Докладваният резултат трябва да се получи от най-ниското разреждане, което генерира резултат в рамките на диапазона на QF-CMV ELISA, като се уверите, че се взема предвид коефициентът на разреждане.

Качествен контрол на теста

Точността на резултатите от теста зависи от генерирането на точна стандартна крива. Поради това резултатите, базирани на стандартите, трябва да се проверят, преди резултатите от теста да могат да се интерпретират.

За да е валиден ELISA:

- Средната стойност на OD за стандарт 1 трябва да е $\geq 0,600$.
- Коефициентът на вариация за стойностите на OD на копията на стандарт 1 и стандарт 2 трябва да е $< 15\%$.
- Стойностите на OD на копията на стандарти 3 и 4 не трябва да се различават с повече от 0,040 единици оптична плътност от тяхната средна стойност.
- Коефициентът на корелация (r), изчислен от средните стойности на абсорбция на стандартите, трябва да е $\geq 0,98$.

Софтуерът за анализ на QF-CMV изчислява и докладва тези параметри за качествен контрол. Ако горепосочените критерии не са удовлетворени, работният цикъл е невалиден и трябва да се повтори.

Средната стойност на OD за нулевия стандарт (зелен разредител) трябва да е $\leq 0,150$. Ако средната стойност на OD е $> 0,150$, трябва да се провери процедурата за промиване на плаката.

Интерпретиране на резултатите

Резултатите от QuantiFERON-CMV се интерпретират чрез използване на критериите в Таблица 2.

Таблица 2 Интерпретиране на резултатите от QuantiFERON-CMV

Нулева (IU/ml)	CMV минус нулевата (IU/ml)	Митоген минус нулевата (IU/ml)*	Резултат от QF-CMV	Докладване/интерпретация
$\leq 8,0$	$\geq 0,20$ и $\geq 25\%$ от нулевата	Всяка	Реактивен [†]	Открит е анти-CMV имунитет
	$< 0,20$ ИЛИ $\geq 0,20$ и $< 25\%$ от нулевата	$\geq 0,5$	Нереактивен	НЕ е открит анти-CMV имунитет
		$< 0,5$	Неопределен [‡]	Резултатите са неопределени за отговор към CMV
$> 8,0$ [§]	Всяка	Всяка	Неопределен [‡]	Резултатите са неопределени за отговор към CMV

* Отговорите към митоген-положителната контрола (и понякога към CMV антигените) често могат да са извън диапазона на четеща за микроплака. Това не оказва влияние върху резултатите от теста.

[†] Когато не се подозира инфекция с цитомегаловирус, първоначалните резултати от реакцията може да се потвърдят чрез повторно тестване на първоначалните плазмени проби, дублирани в QF-CMV ELISA. Ако повторното тестване на едното или и двете копия е положително, трябва да се смята, че индивидът е реагирал на теста.

[‡] Вижте раздела „Ръководство за отстраняване на проблеми“ (страница 43) за възможните причини.

В клинични проучвания (1) е установена клинична значимост на неопределен резултат при пациенти с трансплантат на солиден орган, когато донорът реагира на CMV, но митоген контролата Mitogen е под $0,5$ IU/ml. При тези пациенти има най-голям риск от развитие на CMV.

[§] В клинични проучвания по-малко от $0,25\%$ от участниците имат нива на IFN- γ $> 8,0$ IU/ml за нулевата стойност.

Забележка: Измереното ниво на IFN- γ трябва да се използва заедно с клиничните прояви, медицинската анамнеза и другите диагностични оценки при установяването на имунния отговор към CMV антигени. QF-CMV не е тест за установяване на инфекция със CMV и не трябва да се използва за изключване на инфекция със CMV.

Ограничения

Резултатите от теста QuantiFERON-CMV трябва да се използват заедно с епидемиологичната анамнеза на отделните участници, текущия медицински статус и други диагностични изследвания.

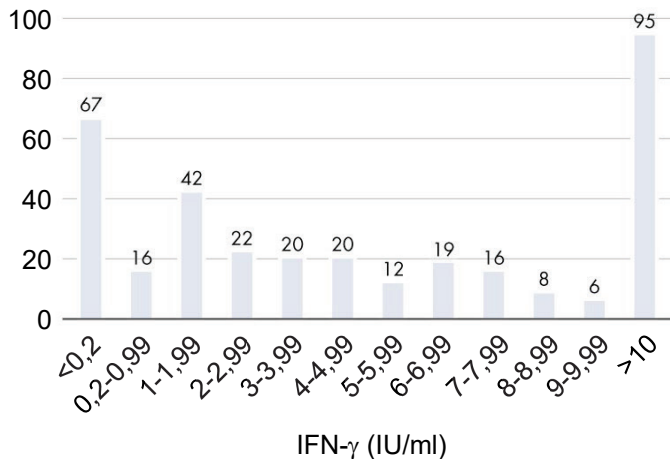
Ненадеждни или неопределени резултати могат да се получат поради:

- Отклонение от процедурите, описани в листовката за QuantiFERON-CMV ELISA
- Прекомерни нива на IFN- γ в епруветка с контрола
- Период над 16 часа от вземането на кръвната проба до инкубирането при 37 °C.

Очаквани стойности

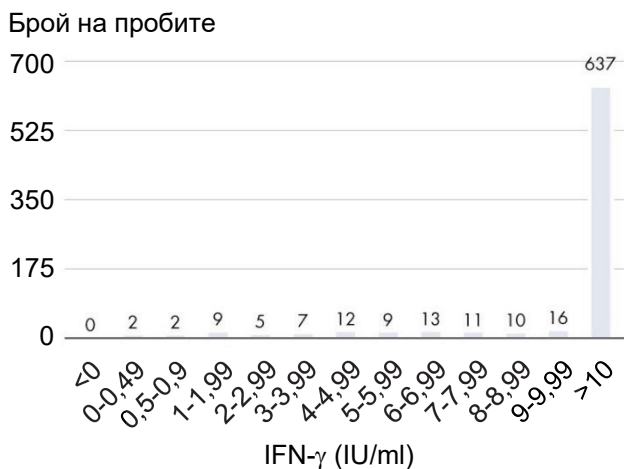
Очакваните стойности на IFN- γ при използване на QuantiFERON-CMV са получени чрез тестване на 591 проби от здрави участници. 343 проби са били сероотрицателни, а 248 – сероположителни към CMV IgG. Серологичният CMV статус е неизвестен по време на QF-CMV тестването. От 248-те проби от CMV сероотрицателни участници 100% (248/248) са нереактивни с QF-CMV ELISA, генерирайки IFN- γ отговори $< 0,2$ IU/ml към епруветката със CMV антиген (нулевата извадена). Показано е разпределението на IFN- γ отговорите към епруветката със CMV антиген (нулевата извадена) за 343 CMV сероположителни участници (Фигура 2).

Брой на пробите



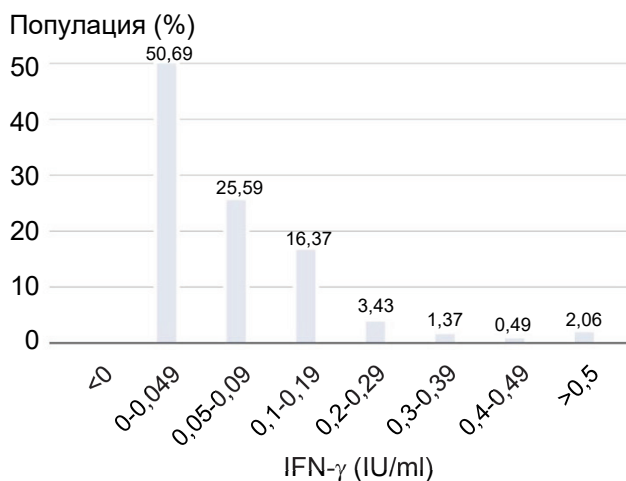
Фигура 2 Разпределение на QF-CMV IFN- γ отговорите (нулевата извадена) при сероположителни здрави участници (n = 343).

Разпределението на IFN- γ отговорите към митоген (нулевата извадена) е определено с използване на 733 проби от здрави възрастни участници с помощта на QF-CMV ELISA, независимо от серологичните изследвания за CMV IgG (Фигура 3). Резултатът за митоген (нулевата извадена), по-малък от 0,5 IU/ml, посочва или неуспешно извършване на теста, или състояние на компрометирана имунна система на участника. В популацията на здравите участници само 2/733 резултата попадат в тази категория.



Фигура 3 Разпределение на митоген-IFN- γ отговорите (нулевата извадена) при здрави участници (n = 733).

Разпределението на IFN- γ отговорите към нулевите епруветки е определено с използване на 1020 плазмени проби от здрави участници с помощта на QF-CMV ELISA, независимо от серологичните изследвания за CMV IgG (Фигура 4).



Фигура 4 Разпределение на нулевите IFN- γ отговори при здрави участници (n = 1020), представено като процент от популацията.

Работни характеристики

Клинични работни характеристики

Установен е праг на теста за откриване преди CMV експозиция чрез използване на QF-CMV след анализ на резултатите от група здрави участници (n = 223), където резултатите от QF-CMV са сравнени със серологичните резултати за CMV IgG. ROC анализ е установил, че тестовият праг 0,04 IU/ml (след изваждане на нулевата) осигурява оптимални положителни и отрицателни прогнозни стойности за QF-CMV (площ под кривата = 0,9679 [95%CI: 0,9442–0,9915, p<0,0001]) и така представлява прагът, при който този тест изпълнява предназначението си най-ефективно в популация от здрави участници.

Характеристиките на QF-CMV са сравнени със серологичния тест SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). Тестът QF-CMV показва 95% (294/310 лица) съответствие със серологичния тест за CMV IgG при здрави участници, като никой от 149-те серологично отрицателни донори не показва каквато и да е реактивност с QF-CMV. При 145 от 161 сероположителни донори се наблюдава реактивен QF-CMV отговор. Общото съответствие на положителните резултати е 90%, а стойността на съответствието на отрицателните резултати е 100%. Нивото на съответствие при здрави участници между QF-CMV отговорите и CMV IgG серологичния статус е показано в Таблица 3.

Таблица 3 Съответствие между QuantiFERON-CMV и серологичния тест за CMV IgG при здрави участници

	CMV серология		Общо	
	Положителен	Отрицателен		
QuantiFERON-CMV	Реактивен	145	0	145 (46,8%)
	Нереактивен	16	149	165 (53,2%)
	Общо	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Праг на теста

Препоръваният клиничен праг за този тест е 0,2 IU/ml в епруветката със CMV антиген (нулевата извадена), независимо че различни прагове могат да бъдат валидирани за различни клинични среди.

Клинични проучвания

Тъй като няма определен стандарт за потвърждаване или изключване на диагнозата за инфекция с цитомегаловирус, предвиждането за чувствителността и специфичността за QF-CMV не може да се оцени практически. Направена е приблизителна преценка на специфичността и чувствителността на QF-CMV чрез оценка на нивото на съответствие между QF-CMV отговорите и CMV IgG серологичния статус на здрави участници.

Специфичността на QF-CMV е преценена приблизително чрез оценка на процента на фалшиво положителните резултати (QF-CMV реактивни отговори) при проби от здрави донори без доказателства за предходна CMV експозиция (CMV IgG сероотрицателни лица). Чувствителността е преценена приблизително чрез оценка на QF-CMV отговорите при проби от здрави донори с доказателства за предходна експозиция на CMV (CMV IgG сероположителни лица). QF-CMV използва голям брой CMV-специфични епитопи от различни CMV протеини и по този начин предоставя широк обхват на популацията с различни HLA клас I хаплотипове (приблизително 98% от популацията). Тъй като HLA хаплотиповете на участниците, тествани спрямо CMV серологични изследвания, са неизвестни, очакваше се малък процент серологично положителни лица да са нереактивни към епруветките за вземане на кръв QF-CMV.

Специфичност

В проучване с 591 проби от здрави участници не са открити фалшиво положителни QF-CMV резултати при сероотрицателни лица за CMV IgG, като 248/248 проби са нереактивни с QF-CMV ELISA и отрицателни със серологичния тест за CMV IgG. Поради това резултатите, получени с QF-CMV и серологичния тест за CMV IgG, показват 100% съгласуваност.

При всички други оценки на специфичността, проведени при получатели на трансплантати на солиден орган (1–8), получатели на трансплантати на хемопоеични стволови клетки (9,10) и HIV-инфектирани пациенти (11), е доказано, че нивото на съгласуваност между QF-CMV и серологичните изследвания за CMV IgG също е 100%.

Чувствителност

В проучване, проведено с 343 проби от здрави участници със сероположителен резултат за CMV IgG, нивото на съответствие между QF-CMV отговорите и серологичните резултати за CMV IgG е 80,5%, като 276/343 проби са реактивни към QF-CMV и положителни към серологичния тест за CMV IgG. Наблюдаваното несъответствие може да се дължи на фалшиво положителни CMV серологични резултати или липса на реактивни HLA типове при изследваните лица.

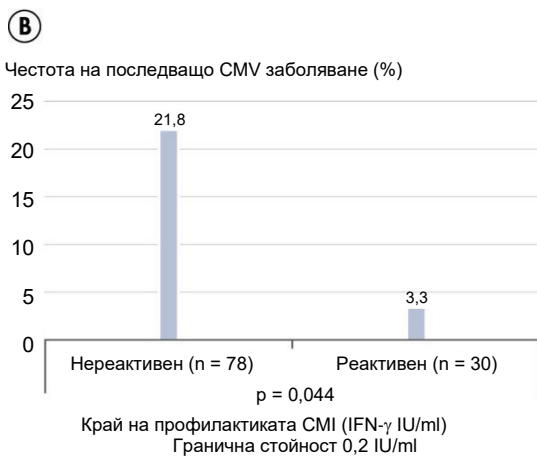
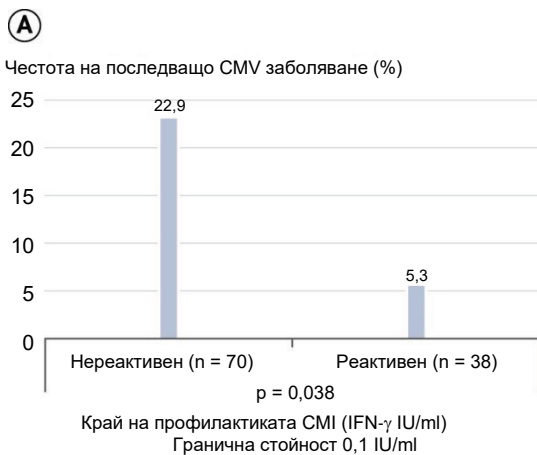
Доказано е, че нивата на съответствие при оценките на чувствителността, проведени при получатели на трансплантати на солиден орган (1–8), получатели на трансплантати на хемопоеични стволови клетки (9, 10) и HIV-инфектирани пациенти (11), са по-ниски и вероятно се дължат на фалшиво положителни CMV серологични резултати, липса на реактивни HLA типове при изследваните лица или липса на реактивни Т-клетки при тези пациенти поради потискането на имунната система.

Проучвания, подчертаващи клиничната приложимост

Както за серологичните изследвания за CMV IgG, така и за теста QF-CMV, описаното предназначение е предоставяне на възможност за откриване на CMV имунитет. В областта на трансплантациите CMV серологичните изследвания се използват широко преди трансплантирането за установяване на риска от CMV усложнения, появяващи се при получателите след трансплантацията, но са с ограничена стойност след трансплантацията. Алтернативно QF-CMV може да се използва при получатели на трансплантат за оценка на нивото на CMV имунитета при пациентите с риск от развитие на симптоматична CMV инфекция и/или заболяване поради имunosупресия (12–15).

Редица публикувани клинични проучвания при различни трансплантатни кохорти показват приложимостта на QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

В голямо проучване със 108 получатели на трансплантати на солиден орган (4) при пациентите с реактивен резултат от QF-CMV при завършването на анти-CMV профилактиката се наблюдава значително по-нисък процент на последващо CMV заболяване (3,3% или 1/30; с използване на праг от 0,2 IU/ml) в сравнение с пациентите с нереактивен резултат от QF-CMV (21,8% или 17/78, $p = 0,044$) (Фигура 5).



Фигура 5 Проценти на късно начало на CMV заболяване при пациенти с реактивен резултат от QuantiFERON-CMV спрямо нереактивен резултат от QuantiFERON-CMV в края на профилактиката. Основните данни са от Kumar et al. (4).

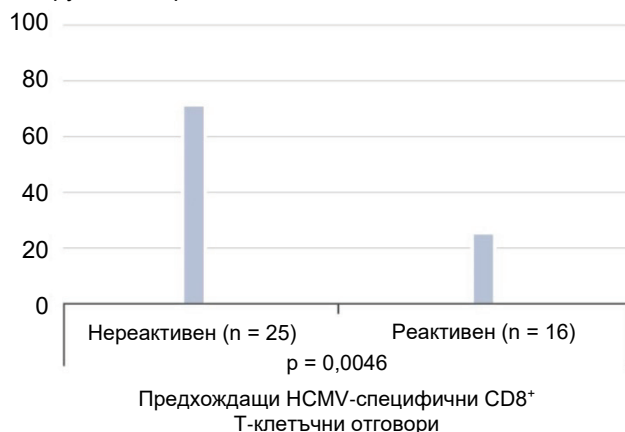
Освен това при CMV сероотрицателните получатели на трансплантати, получили орган от CMV положителен донор (Д+P-), с реактивен резултат от теста QF-CMV, при завършването на профилактиката по-често се запазва състоянието без CMV заболяване, както и за по-дълго време, което посочва, че QF-CMV може да се използва за идентифициране на пациентите, изложени на риск от късна поява на CMV заболяване.

Това проучване също така подчертава, че в тази кохорта на пациентите с трансплантация с най-висок риск от развитие на CMV заболяване (Д+/P-) реактивният резултат по което и да е време след профилактиката се свързва с по-висок шанс за запазване на състоянието без CMV заболяване.

В проучване на 37 пациенти с трансплантация на солиден орган (6) оценката на CMV специфичните CD8⁺ T-клетъчни отговори чрез QF-CMV подпомогна предвиждането на спонтанно вирусно изчистване в сравнение с прогресия на CMV заболяването след повишения на CMV вiremията. В това проучване при 24/26 пациенти (92,3%) с реактивен резултат от QF-CMV (с използване на праг на теста от IFN γ \geq 0,2 IU/ml) се наблюдава спонтанно изчистване от CMV вируса, докато само при 5/11 (45,5%) пациенти с нереактивен резултат от QF-CMV се наблюдава същият изход.

Проучване на 67 пациенти с трансплантация на бял дроб, оценяващо епизодите на CMV вiremия след трансплантацията (7), установява, че 18/25 (72%) епизоди на CMV вiremия се предхождат от нереактивен резултат от QF-CMV спрямо 4/16 (25%) епизода, предхождани от реактивен резултат от QF-CMV (точен тест на Fisher, $p = 0,0046$, Фигура 6).

% на епизоди на HCMV ДНК-емия
с вирусен товар > 1000 копия/ml



Фигура 6 Статистически анализ на CMV-специфични CD8⁺ Т-клетъчни отговори според установеното с QuantiFERON-CMV и развитие на CMV виремия (точен тест на Fisher, p = 0,0046). Основните данни са от Weseslindner et al (7).

В голямо, многоцентрово, проспективно проучване със 127 CMV сероотрицателни получатели на трансплантат на солиден орган от сероположителни донори (8), като всички пациенти са получили антивирусна профилактика, при пациентите с реактивен резултат от QF-CMV (чрез използване на праг на теста от 0,1 IU/ml) в който и да е момент след завършване на анти-CMV профилактиката се наблюдава значително по-нисък процент на късно начало на заболяването 12 месеца след трансплантацията (6,4%) в сравнение с пациентите с нереактивен резултат от QF-CMV (22,2%) и неопределен резултат (58,3%, p < 0,001). Когато неопределените резултати се класифицират също като „нереактивни“, честотата на последващо CMV заболяване е 6,4% спрямо 26,8%, p = 0,024. Положителните и отрицателните предиктивни стойности на QF-CMV за предпазване от CMV заболяване са докладвани като съответно 0,90 (95% CI 0,74–0,98) и 0,27 (95% CI 0,18–0,37). Това проучване установи, че QF-CMV може да е полезен за предвиждане дали пациентите са с нисък, среден или висок риск от развитие на последващо CMV заболяване след профилактиката.

В проспективно проучване с 55 получатели на трансплантат на солиден орган (8), където връзката между резултатите от QF-CMV преди трансплантацията и епизодите на CMV репликация след трансплантацията са анализирани, е установено, че по-висока честота на CMV репликация след трансплантацията се наблюдава при CMV сероположителните получатели с nereактивен резултат от QF-CMV преди трансплантацията (с използване на праг на теста от 0,2 IU/ml) (7/14 или 50%) в сравнение с получателите, които са CMV сероположителни с реактивен резултат от QF-CMV преди трансплантацията (4/30 или 13,3%, $p = 0,021$).

Това проучване установи, че получателите с nereактивен отговор от QF-CMV преди трансплантацията, които са получили орган от CMV сероположителен донор, са с десет пъти по-висок риск от CMV репликация в сравнение с реактивните според QF-CMV получатели преди трансплантацията (коригирано съотношение на вероятностите 10,49; 95% CI 1,88–58,46). Поради това тестът QF-CMV преди трансплантацията може да е полезен за предвиждане на риска от CMV репликация след трансплантацията и по този начин да даде възможност за индивидуален подход при контролирането на CMV инфекцията след трансплантация на солиден орган.

Множество други проучвания, изследващи откриването на CMV-специфични CD8⁺ T-клетъчни отговори с помощта на QF-CMV в кохорта на получатели на трансплантат, са завършени (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) или все още се провеждат в световен мащаб.

Международни консенсусни насоки относно контролирането на цитомегаловирус при трансплантация на солиден орган

Значението на мониторирането на CMV-специфичния имунитет е взето под внимание и са публикувани в „Актуализирани международни консенсусни насоки относно контролирането на цитомегаловирус при трансплантация на солиден орган“ (12). Тези международни насоки, разработени от група експерти по CMV и трансплантацията на солиден орган, свикана от отдела по инфекциозни заболявания на Организацията по трансплантации, представляват консенсусни насоки, базирани на доказателства и експертни оценки, относно контролирането на CMV, включително: диагностиката, имунологията, превенцията и лечението.

Тези насоки заключават, че „Мониторирането на имунитета по отношение на CMV-специфичните Т-клетъчни отговори може да предвиди кои пациенти са с риск от CMV заболяване след трансплантацията и може да е полезно за насочване на профилактиката и превантивните лечения“ (12).

Освен това насоките предоставят препоръки относно характеристиките на идеалния тест за мониториране на имунитета, които включват:

- Възможност за оценка на количеството и функционирането на CD4⁺ и CD8⁺ Т клетките на получателя на трансплантат
- Възможност за измерване на IFN- γ
- Лекота на извършване, рентабилност и възпроизводимост
- Кратко време на получаване на резултат
- Лесно изпращане на пробите до специализирани лаборатории

QF-CMV на практика отговаря на всичките критерии, указани в тези насоки, и представлява единственият стандартизиран тест за мониториране на имунитета, предоставящ възможност за откриване на IFN γ , специфичен за CMV.

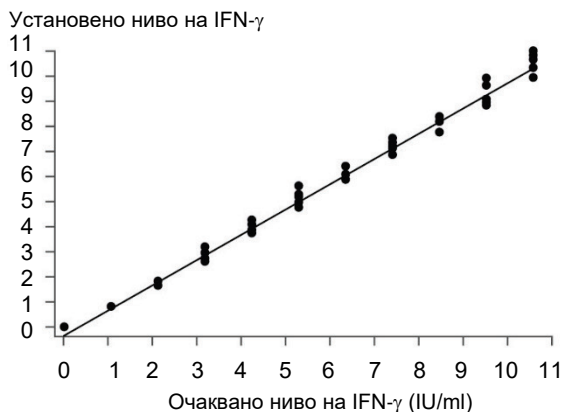
Работни характеристики на теста

QF-CMV ELISA използва рекомбинантен човешки IFN- γ стандарт, който е тестван спрямо референтен IFN- γ продукт (NIH реф.: Gxg01-902-535). Резултатите от тестовите проби се докладват в международни единици (International Units, IU) в сравнение със стандартна крива, генерирана чрез тестване на разреждане на вторичен стандарт, предоставен в набора.

Известно е, че хетерофилните (напр. човешки антимиши) антитела в серума или плазмата на определени лица предизвикват интерференция с имунни тестове. Ефектът на хетерофилните антитела в QF-CMV ELISA е намален до минимум чрез добавяне на нормален миши серум към зеления разредител и използването на F(ab')₂ фрагменти на моноклонално антитяло като IFN- γ захващащото антитяло, с което са покрити ямките на микроплаките.

Границата на откриване на QF-CMV ELISA е 0,065 IU/ml и няма доказателства за прозонов (Hook) ефект на висока концентрация при концентрации на IFN- γ до 10 000 IU/ml. Доказано е, че QF-CMV ELISA антителата не реагират кръстосано с който и да е от изследваните цитокини, включително IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 и IL12.

Доказано е, че QF-CMV ELISA е линеен чрез поставяне на 5 репликата на 11 сборни плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ на случаен принцип в плака за ELISA. Линейната регресионна линия е с наклон $1,002 \pm 0,011$ и корелационен коефициент 0,99 (фигура 7).



Фигура 7 Линеен профил на QF-CMV ELISA, установен чрез тестване на пет репликата на 11 плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ .

Възпроизводимостта на QF-CMV ELISA е оценена чрез изследване на 20 плазмени проби с различни концентрации на IFN- γ в три репликата, в три центъра, в три непоследователни дни от трима оператори. По този начин всяка проба е тествана 27 пъти в девет независими работни цикъла на теста. Една проба е нулевата контрола и е с изчислена концентрация на IFN- γ 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. При останалите 19 плазмени проби диапазонът на концентрациите е от 0,33 (95% CI 0,31–0,34) до 7,7 IU/ml (95% CI 7,48–7,92).

Неточността в рамките на работния цикъл или вътреаналитичната неточност е определена приблизително чрез усредняване на %CV за всяка тестова плазма, съдържаща IFN- γ от всеки работен цикъл на плаката ($n = 9$) и варира от 4,1 до 9,1% CV. Средният %CV в рамките на работния цикъл ($\pm 95\%$ CI) е $6,6 \pm 0,6\%$. Средната нулева IFN- γ плазма е 14,1% CV.

Общата или междуанализна неточност е определена чрез сравняване на 27 изчислени концентрации на IFN- γ за всяка плазмена проба и варира от 6,6 до 12,3% CV. Общият среден %CV ($\pm 95\%$ CI) е $8,7 \pm 0,7\%$. Нулевата IFN- γ плазма показва 26,1% CV. Това ниво на вариация е очаквано, тъй като изчислената концентрация на IFN- γ е ниска и вариацията около ниска приблизителна оценка ще е по-голяма от тази при по-високи концентрации.

Техническа информация

Неопределени резултати

Неопределените резултати може да са свързани с имунния статус на изследваното лице, но може и да са свързани с няколко технически фактора:

- Период над 16 часа от вземането на кръвта до инкубирането при 37 °C
- Съхраняване на кръвта извън рамките на препоръчвания температурен диапазон (22 ± 5 °C)
- Недостатъчно смесване на епруветките за вземане на кръв
- Непълно промиване на плаката за ELISA

При подозрения за технически проблеми при вземането или работата с кръвните проби повторете целия тест QF-CMV с нови кръвни проби. Повторното ELISA тестване на стимулирани плазми може да се извърши при подозрения за отклонения от процедурата на теста ELISA. Неопределените резултати (от ниски стойности на митоген) не се очаква да се променят при повторно тестване, освен при грешка в ELISA тестването.

Плазмени проби със съсиреци

Ако при продължително съхраняване на плазмените проби се появят фибринови съсиреци, пробите се центрофугират, за да се утаи съсиреният материал и да се улесни пипетирането на плазмата.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да е полезно при отстраняване на проблеми, които могат да възникнат. За повече информация вижте също техническата информация, предоставена на www.QuantiFERON.com. За информация за контакти вижте задната корица.

Коментари и предложения

Ниски отчитания на оптичната плътност за стандартите

- | | |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Грешка при разреждането на стандарта | Уверете се, че разрежданията на стандарта на набора са извършени правилно съгласно листовката за QF-CMV ELISA. |
| б) Грешка при пипетирането | Уверете се, че пипетите са калибрирани и се използват съгласно инструкциите на производителя. |
| в) Температурата на инкубиране е прекалено ниска | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (22 ± 5 °C). |
| г) Времето на инкубиране е твърде кратко | Инкубирането на плаките с конюгат, стандарти и проби трябва да е за 120 ± 5 минути. Разтворът на ензимния субстрат се инкубира в плаката за 30 минути. |
| д) Използван е неправилен филтър на четеца за плаки | Плаките трябва да се отчитат при 450 nm с референтен филтър между 620 и 650 nm. |
| е) Реагентите са твърде студени | Всички реагенти, с изключение на конюгата 100× концентрат, трябва да се темперират до стайна температура преди започване на теста. Това отнема около 1 час. |
| ж) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100× концентрат се използват в рамките на 3 месеца след датата на разтварянето. |

Неспецифично оцветяване

- | | |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от шест цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на на кисване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Кръстосано замърсяване на ямките за ELISA | Внимавайте при пипетирането и смесването на пробата за свеждане на риска до минимум. |

Коментари и предложения

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат $100\times$ концентрат се използват в рамките на 3 месеца сред датата на разтварянето. |
| г) Разтворът на ензимен субстрат е замърсен | Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реагенти. |
| д) Смесване на плазмата в епруветки за центрофугиране преди събирането ѝ | Уверете се, че плазмените проби са внимателно взети от материала над гела без изтегляне и накапване, като внимавате да не нарушавате материала по повърхността на гела. |

Висок фон

- | | |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с $400\ \mu\text{l}$ /ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от шест цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Температурата на инкубиране е твърде висока | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура ($22 \pm 5\ ^\circ\text{C}$). |
| в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат $100\times$ концентрат се използват в рамките на 3 месеца сред датата на разтварянето. |
| г) Разтворът на ензимен субстрат е замърсен | Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реагенти. |

Нелинейна стандартна крива и променливост на двойните проби

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с $400\ \mu\text{l}$ /ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от шест цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Грешка при разреждането на стандарта | Уверете се, че разрежданията на стандарта на набора са извършени правилно съгласно настоящата листовка. |
| в) Лошо смесване | Смесвайте добре реагентите чрез обръщане или леко разбъркване преди прибавянето им към плаката. |
| г) Непостоянна техника на пипетиране или прекъсване по време на извършване на теста | Прибавянето на пробата и стандарта трябва да се извършва без прекъсване. Всички реагенти трябва да бъдат приготвени преди началото на теста. |

Информация за продукта и технически справочници се предлагат безплатно от QIAGEN или чрез Вашия дистрибутор, или като посетите www.QuantiFERON.com.














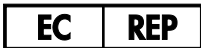
Литературни източници

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.

СИМВОЛИ

Върху опаковката и етикетите може да са изобразени следните символи:

Символ	Определение на символа
	Съдържа реагенти, достатъчни за <N> реакции
	Използвайте до
	СЕ маркировка
	Медицинско изделие за ин витро диагностика
	Каталожен номер
	Партиден номер
	Номер на материала
	Глобален номер на търговска единица
	Температурни ограничения
	Да не се използва повторно
	Да се пази от слънчева светлина
	Вижте инструкциите за употреба
	Производител
	Упълномощен представител в Европейската общност

Информация за контакти

За техническа помощ и повече информация вижте нашия център за техническа поддръжка на **www.qiagen.com/Support**, позвънете на безплатния телефон 00800-22-44-6000 или се свържете с един от отделите за техническа поддръжка на QIAGEN (вижте задната корица или посетете **www.qiagen.com**).

Съкратена процедура на теста ELISA

Етап 1: Инкубиране на кръвта

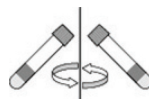
1. Вземете кръв от пациента в епруветките за вземане на кръв и ги смесете, като разклатите епруветките десет (10) пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв, за да се разтворят антигените по стените на епруветката.



2. Инкубирайте епруветките изправени при $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 16 до 24 часа.



3. След инкубирането центрофугирайте епруветките за 15 минути при 2000–3000 RCF (g) с цел разделяне на плазмата и еритроцитите.



4. След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.



Етап 2: IFN- γ ELISA

1. Темперирайте ELISA компонентите, с изключение на конюгата $100\times$ концентрат, до стайна температура за най-малко 60 минути.



2. Разтворете стандарта на набора до 8,0 IU/ml с дестилирана или дейонизирана вода. Подгответе четири (4) разреждания на стандарта.



3. Разтворете лиофилизирания конюгат 100× концентрат с дестилирана или дейонизирана вода.

4. Пригответе конюгат с работна концентрация в зеления разредител и добавете 50 µl във всяка ямка.



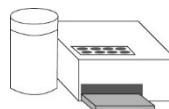
5. Добавете 50 µl от тестовите плазмени проби и 50 µl стандарти в съответните ямки. Смесете с шейкър.



6. Инкубирайте за 120 минути на стайна температура.



7. Промийте ямките най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер.



8. Добавете 100 µl разтвор на ензимен субстрат в ямките. Смесете с шейкър.



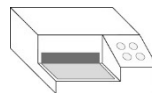
9. Инкубирайте за 30 минути на стайна температура.



10. Добавете 50 µl ензимен стопирац разтвор във всички ямки. Смесете с шейкър.



11. Отчетете резултатите при 450 nm с референтен филтър 620 до 650 nm.



12. Анализирайте резултатите.



Хронология на редакциите на ръководството

Документ	Промени	Дата
L1075110-R5	Добавяне на информация за безопасност относно счупени флакони Актуализации на таблица 2, Интерпретиране на резултатите от QF-CMV, страница 26.	февруари 2018 г.
L1075110-R5	Актуализиране на информацията за GHS, страница 12.	февруари 2018 г.

Тази страница умишлено е оставена празна

Тази страница умишлено е оставена празна

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

Ограничено лицензионно споразумение за набора QuantiFERON-CMV ELISA

Използването на продукта означава, че закупилите или използващите продукта лица приемат следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящото ръководство, както и само с компонентите, включени в панела. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този панел с каквито и да било компоненти, които не са включени в него, с изключение на описаните в протоколите, предоставени с продукта, ръководството и допълнителните протоколи, които можете да намерите на www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са щателно тествани или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN нито предоставя гаранция, нито заявява, че те не нарушават правата на други производители.
2. Освен изрично посочените лицензи QIAGEN не дава никаква гаранция, че този панел и/или неговата употреба(и) не нарушават права на други производители.
3. Този панел и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично отхвърля всички други лицензи, посочени или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на панела дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат каквито и да било стъпки, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензионно споразумение в който и да е съд и да е съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски хонорари, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензионно споразумение или някое от правата на интелектуална собственост, свързани с панела и/или неговите компоненти.

За актуални условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

фев-18 © 2018 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчване www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка support.qiagen.com | Уебсайт www.qiagen.com