

Октомври 2019 г.

Листовка за QuantiFERON[®]-CMV ELISA



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



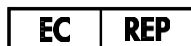
За инвитро диагностика



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ГЕРМАНИЯ

1075110 Ред. 06



www.QuantiFERON.com

Съдържание

Предназначение	5
Кратко изложение и обяснение	5
Принцип на процедурата	6
Време, необходимо за извършване на анализа	7
Предоставени материали	8
Съдържание на набора.....	8
Необходими, но непредоставени материали	9
Предупреждения и предпазни мерки	9
Информация за безопасността	11
Съхранение и боравене с реактиви	12
Вземане и работа с проби.....	13
Процедура.....	16
Етап 1: Инкубиране на кръвта и събиране на плазмата	16
Етап 2: QuantiFERON-CMV ELISA за човешки IFN- γ	17
Изчисления и интерпретация на теста	22
Генериране на стандартна крива (ако не се използва софтуерът за анализ на QF-CMV)	22
Качествен контрол на теста.....	23
Интерпретиране на резултатите	24
Ограничения	25
Очаквани стойности	25
Работни характеристики	28
Клинични работни характеристики.....	28
Праг на анализа.....	29

Клинични проучвания	29
Специфичност	30
Чувствителност.....	30
Проучвания, подчертаващи клиничната приложимост.....	31
Международни консенсусни насоки относно контролирането на цитомегаловирус при трансплантация на солиден орган	36
Характеристики на ефективността на анализа	37
Техническа информация	39
Неопределени резултати.....	39
Плазмени проби със съсиреци.....	39
Ръководство за отстраняване на проблеми	40
Цитирани източници	42
Символи	44
Информация за контакт	45
Съкратена процедура на теста ELISA	46
Етап 1: Инкубиране на кръвта	46
Етап 2: IFN- γ ELISA.....	46
Хронология на редакциите на ръководството	49

Предназначение

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) представлява инвитро анализ, 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 инвитро отговорите към тези пептидни антигени, които се свързват с имунния контрол на инфекцията със CMV. Загубата на тази имунна функция може да бъде свързана 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 (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 анализ 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 с 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.

Принцип 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.

Кръвта трябва да се инкубира 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 разредят 1/10 в зелен разредител и да се анализират 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 плазмена проба. 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 nereактивен 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 скорошна 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. 24 в тази листовка за информация относно интерпретирането на QF-CMV резултатите).

Време, необходимо за извършване на анализа

Приблизителното време, необходимо за извършване на анализа 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 до 15 минути за всяка допълнителна плака

Предоставени материали

Съдържание на набора

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Епруветки за вземане на кръв (пакет за употреба при един пациент))	
Каталожен №	0192-0301
Брой подготовки	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 x 8 ямки), покрити с мише античовешко IFN- γ моноклонално антитяло	2 комплекта ленти микроплаки с 12 x 8 ямки
IFN- γ Standard (IFN- γ стандарт), лиофилизиран (съдържа рекомбинантен човешки IFN- γ , говежди казеин, 0,01% w/v тимерозал)	1 x флакон (8 IU/ml в разтворено състояние)
Green Diluent (Зелен разрежител) (съдържа говежди казеин, нормален миши серум, 0,01% w/v тимерозал)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Конюгат 100x концентрат, лиофилизиран) (миши античовешки IFN- γ -HRP, съдържа 0,01% w/v тимерозал)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Промивен буфер 20x концентрат) (pH 7,2, съдържа 0,05% v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Разтвор на ензимен субстрат) (съдържа H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' тетраметилбензидин)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопиращ разтвор) (съдържа 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Листовка за QF-CMV ELISA	1

* Съдържа сярна киселина. Вижте страница 9 относно предпазните мерки.

Необходими, но непредоставени материали

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS), предлагани от доставчика на продукта.

- 37 °C инкубатор; CO₂ не се изисква
- 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
- Капак за плаки

Предупреждения и предпазни мерки

За инвитро диагностика

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Тези листове са на разположение онлайн в удобен и компактен PDF формат на адрес **www.qiagen.com/safety**, където можете да намерите, прегледате и разпечатате ИЛБ за всеки набор и компонент от набор на QIAGEN®.

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: сярна киселина. Предупреждение! 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

Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. 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: тартразин. Предупреждение! 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 с реактиви е с признаци на повреда или утечка.
- **Важно:** Преди употреба огледайте флаконите. Не използвайте флаконите с конюгат или IFN- γ стандарт, ако забележите признаци на повреда или ако гумената запушалка е повредена. Не работете със счупени флакони. Прилагайте подходящите предпазни мерки за безопасност с оглед на безопасното изхвърляне на флаконите.

Препоръка: Използвайте инструмент за отстраняване на метална обкатка за отваряне на флаконите с конюгат или IFN- γ стандарт с цел свеждане до минимум на риска от нараняване от металната обкатка.

- Не смесвайте и не използвайте ленти микроплаки, човешки IFN- γ стандарт, зелен разрежител или конюгат 100x концентрат от различни партиди на набора на QF-CMV. Другите регенти (промивен буфер 20x концентрат, разтвор на ензимен субстрат и ензимен стопиращ разтвор) могат да бъдат разменяни между наборите, при условие че реактивите не са с изтекъл срок на годност и данните на партидата отговарят на регистрираните.
- Изхвърлете неизползваните реактиви 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 боравене с реактиви

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.

Реактиви 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 реактиви

За указания как да разтворите реактивите вижте „Етап 2: QuantiFERON-CMV ELISA за човешки IFN- γ “ (стъпки 3 и 5 на страници 17 и 19).

- 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 човешкият IFN- γ стандарт.
- След като бъде разтворен, неизползваният конюгат 100x 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 на епруветките 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 бъртерфлай, 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 анализа. 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 ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), 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 $17\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 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-горе.

3. Обозначете епруветките по подходящ начин.

Уверете се, че всяка епруетка (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 заредят 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 8 и „Необходими, но непредоставени материали“, страница 9, за материали, необходими за извършване на ELISA.

1. Преди употреба всички плазмени проби и реактиви, с изключение на конюгат 100х концентрат, трябва да се темперират до стайна температура ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). 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.

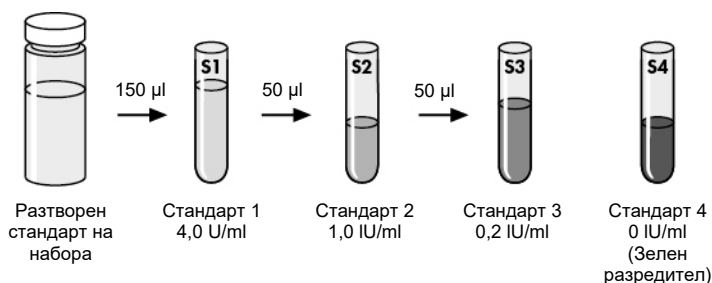
3. Разтворете стандарта с човешки IFN- γ с обема дейонизирана или дестилирана вода, посочен на етикета на флакона. Смесвайте внимателно за избягване на образуването на пяна и гарантиране на пълно повторно разтваряне. При разтварянето на стандарта IFN- γ до посочения обем ще се получи разтвор с концентрация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

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

Като използвате разтворения стандарт, пригответе разреждени серии с четири концентрации на IFN- γ в зелен разредител (Green Diluent, GD) (Фигура 1 на следващата 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 анализират поне двукратно. Подгответе пресни разреждания на стандарта на набора за всяка сесия на ELISA.

Примерна процедура за двойни стандарти

Примерна процедура за двойни стандарти	
A	Означете четирите епруветки: S1, S2, S3, S4
B	Добавете 150 µl от GD в S1, S2, S3, S4
C	Добавете 150 µl от стандарта на набора в S1 и смесете щателно
D	Прехвърлете 50 µl от S1 в S2 и смесете щателно
E	Прехвърлете 50 µl от S2 в S3 и смесете щателно
F	GD самостоятелно служи като нулев стандарт (S4)



Фигура 1. Генериране на стандартна крива чрез серийно разреждане

- Разтворете лиофилизирания конюгат 100x 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 100x концентрат в зелен разредител (вижте Таблица 1 на следващата страница).

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

Върнете неизползвания конюгат 100X 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 конюгат 100x концентрата	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 анализа, 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 анализират 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 ефективността на анализа. 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 наkisване 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 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 ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 (OD) за всяка ямка в рамките на 5 минути от спирането на реакцията, като използвате четеща 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 анализа, генерира стандартна крива и предоставя резултат от анализа за всеки индивид, както е описано подробно в раздела „Интерпретиране на резултатите“ на страница 24. 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 репликите 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 концентрацията на IFN- γ на стандартите в IU/ml (оста x), като пропуснете нулевия стандарт от тези изчисления. Изчислете правата линия на най-добро съответствие за стандартната крива чрез регресионен анализ.

Използвайте стандартната крива за определяне на концентрацията на IFN- γ (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 на аликвотната част да могат да бъдат интерпретирани.

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 разрежител) 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

Nil (IU/ml)	CMV минус нулевата (IU/ml)	Mitogen минус Nil (IU/ml)*	Резултат от QF-CMV	Съобщаване/интерпретация
≤ 8,0	≥ 0,20 и ≥ 25% от нулевата	Всяка	Реактивен†	Открит е анти-CMV имунитет
	< 0,20 или ≥ 0,20 и < 25% от нулевата	≥ 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 четеца 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 двете копия е положително, трябва да се смята, че индивидът е реагирал на теста.

‡ Вижте „Ръководство за отстраняване на проблеми“ (страница 40) 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 стойност Nil.

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 инфекцията със CMV и не трябва да се използва за изключване на инфекцията 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.

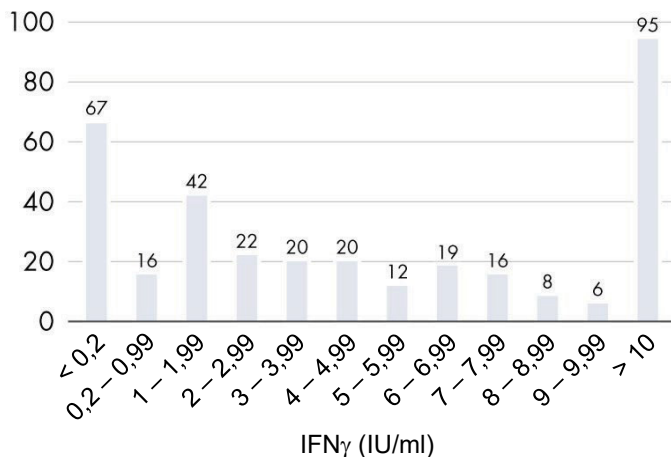
Ненадеждни или неопределени резултати могат да се получат поради:

- 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 с CMV антиген (нулевата извадена) за 343 CMV сероположителни участници (Фигура 2).

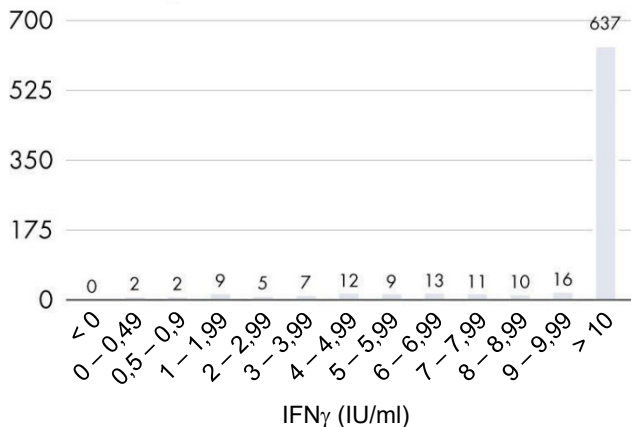
Брой на аликувотните части



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

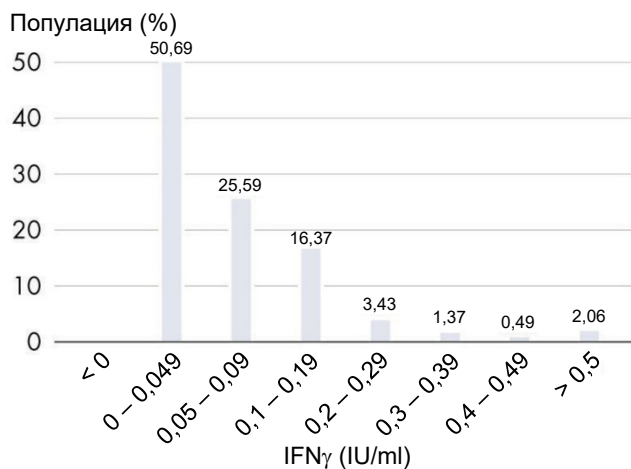
Разпределението на IFN- γ отговорите към митоген (нулевата извадена) е определено с използване на 733 проби от здрави възрастни участници с помощта на QF-CMV ELISA, независимо от серологичните изследвания за CMV IgG (Фигура 3). Резултатът за митоген (нулевата извадена), по-малък от 0,5 IU/ml, посочва 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.

Брой на аликувотните части



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 анализ изпълнява предназначението си най-ефективно в популация от здрави участници.

Характеристиките на анализа QF-CMV са сравнени със серологичния тест SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). Анализът 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 анализа

Препоръваният клиничен праг за този анализ 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 положителна CMV серологични резултати или на липса на реактивни HLA типове при изследваните лица.

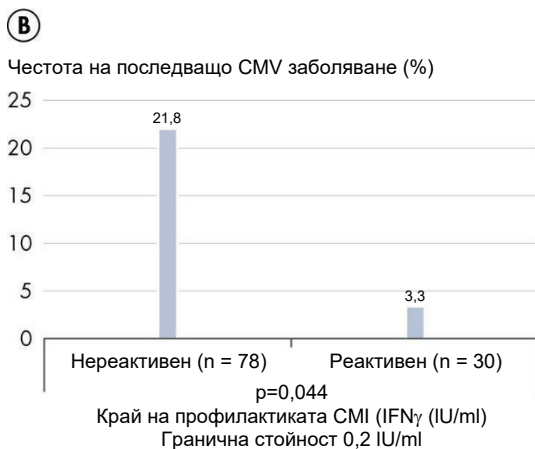
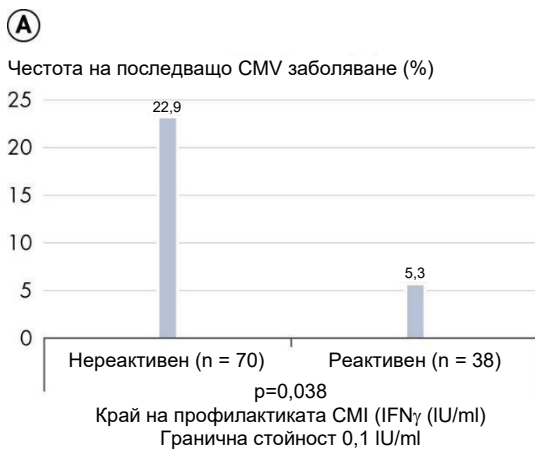
Доказано е, че нивата на съответствие при оценките на чувствителността, проведени при получатели на трансплантати на солиден орган (1–8), получатели на трансплантати на хемопоеични стволови клетки (9, 10) и HIV-инфектирани пациенти (11), са по-ниски и вероятно се дължат на фалшиво положителни CMV серологични 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).

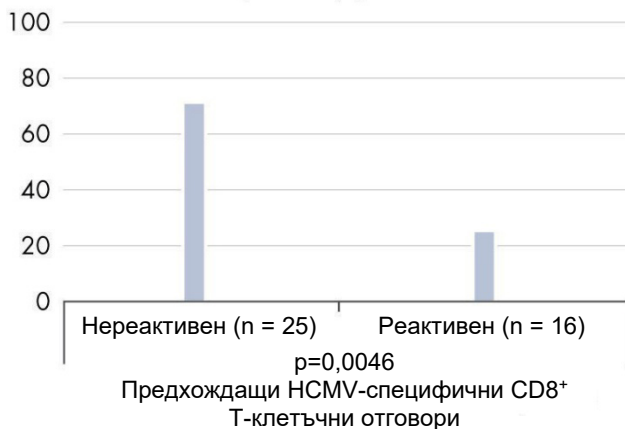
Освен това при CMV сероотрицателните получатели на трансплантати, получили орган от CMV положителен донор (Д+P-), с реактивен резултат от теста QF-CMV, при завършването на профилактиката по-често се запазва състоянието без CMV заболяване, както и за по-дълго време, което посочва, че QF-CMV може да се 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 $\text{IFN-}\gamma \geq 0,2 \text{ IU/ml}$) 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).

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 вiremия (точен тест на Fisher, $p = 0,0046$). Основните данни са от Weseslindtner et al (7).

В голямо, многоцентрово, проспективно проучване със 127 CMV серонегативни 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 реципиентите 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 реципиенти преди трансплантацията (коригирано съотношение на вероятностите 10,49; 95% CI 1,88–58,46). Поради това анализът 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⁺ Т-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 анализ 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 анализ за мониториране на имунитета, предоставящ възможност за откриване на IFN- γ , специфичен за CMV.

Характеристики на ефективността на анализа

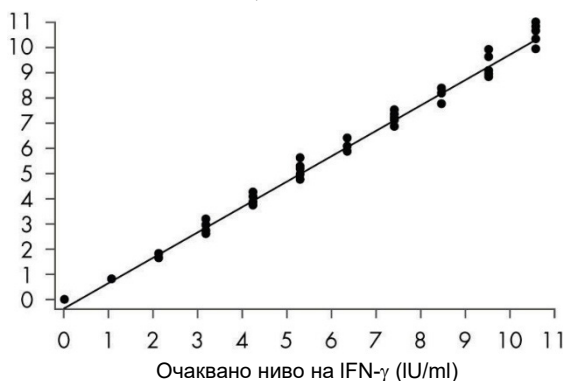
QF-CMV ELISA използва рекомбинантен човешки IFN- γ стандарт, който е анализиран спрямо референтен IFN- γ продукт (NIH реф.: Gxg01-902-535). Резултатите от тестовите проби се докладват в международни единици (International Units, IU) в сравнение със стандартна крива, генерирана чрез тестване на разреждане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

Известно е, че хетерофилните (напр. човешки антимиши) антитела в серума или плазмата на определени лица предизвикват интерференция с имунологични анализи. 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. Линеината регресионна линия е с наклон $1,002 \pm 0,011$ и корелационен коефициент 0,99 (Фигура 7).

Установено ниво на IFN- γ



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 анализа. 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 $6,6 \pm 0,6\%$. Нулевата IFN- γ плазма е със среден коефициент на вариация 14,1%.

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 °C ± 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 бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. 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 пипетиране | Уверете се, че пипетите са калибрани и се използват съгласно инструкциите на производителя. |
| в) Температурата на инкубиране е прекалено ниска | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| г) Времето на инкубиране е твърде кратко | Инкубирането на плаките с конюгат, стандарти и аликутни части 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) Реактивите са твърде студени | Всички реактиви, с изключение на конюгат 100x концентрата, трябва да се темперират до стайна температура преди започване на анализа. 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 100x концентрата се използват в рамките на 3 месеца сред 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 наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Кръстосано замърсяване на ямките за ELISA | Внимавайте при пипетирането и смесването на аликутната част 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 100x концентрата се използват в рамките на 3 месеца след 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 реактиви. |
| 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 на капване, 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 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 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 °C ± 5 °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 100x концентрата се използват в рамките на 3 месеца след 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 реактиви. |

Нелинейна стандартна крива и променливост на двойните проби

- | | |
|---|--|
| 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 наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Грешка при разреждането на стандарта | Уверете се, че разрежданията на стандартния комплект са приготвени правилно, както е описано в тази листовка. |
| в) Лошо смесване | Смесвайте добре реактивите чрез обръщане или леко разбъркване преди прибавянето им към плаката. |
| г) Непостоянна техника на пипетиране или прекъсване по време на извършване на анализа | Прибавянето на аликвотната част и стандарта трябва да се извършва без прекъсване. Всички реактиви трябва да бъдат приготвени преди началото на анализа. |

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

Цитирани 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	Описание на символа
	Съдържа достатъчно реактиви за <N> реакции
	Използвайте до
	СЕ маркировка
	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	Каталожен номер
	Номер на партида
	Номер на материала
	Глобален номер на търговска единица
	Температурни ограничения
	Да не се използва повторно
	Пазете от слънчева светлина
	Направете справка с инструкциите за употреба
	Производител
	Упълномощен представител в Европейската общност

Информация за контакт

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

Съкратена процедура на теста ELISA

Етап 1: Инкубиране на кръвта

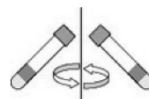
1. Вземете кръв от пациента в епруветките за вземане на кръв и ги смесете, като разклатите епруветките десет (10) пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв, за да се разтворят антигените по стените на епруветката.



2. Инкубирайте епруветките изправени при $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 на капване 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 100x 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.

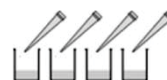


3. Разтворете лиофилизирания конюгат 100x концентрат с дестилирана или дейонизирана вода.

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



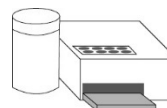
5. Добавете 50 µl от тестовите плазмени проби и 50 µl стандарти в съответните ямки. Смесете с шейкър.



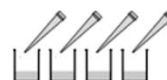
6. Инкубирайте за 120 минути при стайна температура.



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.



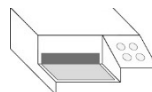
9. Инкубирайте за 30 минути при стайна температура.



10. Добавете 50 μ l ензимен стопиращ 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-R06	Необходими, но непредоставени материали, добавени капацити за плаки, страница 9	Октомври 2019 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 QuantiFERON-CMV ELISA

Употребата на това изделие означава, че всеки купувач или потребител на изделието приема следните условия:

1. Продуктът може да се използва само по протоколите, предоставени с продукта и този наръчник, и само с компонентите, съдържащи се в набора. QIAGEN не предоставя лиценз по никакви права върху своята интелектуална собственост за употребата или включването на приложените компоненти на този набор с компоненти, които не са включени в този набор, освен както е описано в протоколите, предоставени с изделието, този наръчник и допълнителните протоколи, които може да се изтеглят от уебсайта www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са тествани щателно или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от отговорност за всякакви други лицензи – явни или подразбиращи се – освен изрично посочените.
5. Купувачът и потребителят на набора се съгласяват да не предприемат и да не позволяват на други лица да предприемат стъпки, които могат да успеят или да доведат до някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разноски, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

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

© 2019 QIAGEN, всички права запазени.

