

Octombrie 2019

Prospect QuantiFERON[®]-CMV ELISA



Testul pentru interferon gamma IFN- γ al sângelui integral cu măsurarea răspunsurilor la peptide cu rol de antigeni asociate cu virusul citomegalic uman



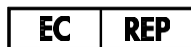
A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

1075110 Rev. 06



www.QuantiFERON.com

Cuprins

Domeniul de utilizare	5
Rezumatul și explicarea produsului	5
Principiul procedurii	6
Timpul necesar pentru efectuarea testului	7
Materiale furnizate	8
Conținutul kitului.....	8
Materiale necesare, dar nefurnizate	9
Avertismente și precauții	9
Informații de siguranță.....	11
Depozitarea și manipularea reactivilor.....	12
Recoltarea și manipularea eșantioanelor	13
Procedură.....	16
Etapa 1: Incubarea sângelui și recoltarea plasmei.....	16
Etapa 2: QuantiFERON-CMV ELISA pentru IFN- γ uman.....	17
Calculare și interpretarea testului	22
Generarea curbei standard (dacă nu se utilizează QF-CMV Analysis Software) ...	22
Controlul calității testului	23
Interpretarea rezultatelor	24
Limitări.....	25
Valori prognozate	25
Caracteristici de performanță	28
Performanță clinică	28
Valoarea prag a testului	29

Studii clinice	29
Specificitate.....	29
Sensibilitate.....	30
Studii care evidențiază utilitatea clinică.....	30
Îndrumări consensuale internaționale actualizate privind gestionarea virusului citomegalic în transplantul de organe solide	35
Caracteristicile de performanță ale testului.....	36
Informații tehnice	38
Rezultate neconcludente.....	38
Probe de plasmă coagulate	38
Ghid de depanare.....	39
Referințe.....	41
Simboluri	43
Date de contact	44
Procedura de testare ELISA pe scurt	45
Etapa 1: Incubarea sângelui.....	45
Etapa 2: IFN- γ ELISA	45
Istoricul revizuirilor manualului	48

Domeniul de utilizare

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) este un test de diagnosticare in vitro care utilizează un cocktail de peptide care simulează proteinele virusului citomegalic (cytomegalovirus, CMV) uman pentru a stimula celulele din sângele integral heparinizat. Detectarea interferonului gamma (interferon-gamma, IFN- γ) prin intermediul testului de măsurare imunoenzimatică utilizând un antigen adsorbit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) este utilizată pentru cuantificarea răspunsurilor in vitro la aceste peptide cu rol de antigeni asociate cu controlul imunologic al infecției cu CMV. Pierderea acestei funcții imunitare poate fi asociată cu dezvoltarea bolii induse de CMV. Domeniul de utilizare a testului QF-CMV este reprezentat de monitorizarea nivelului de imunitate anti-CMV al pacientului.

QF-CMV nu este un test destinat determinării infecției cu CMV și nu trebuie utilizat pentru a exclude infecția cu CMV.

Rezumatul și explicarea produsului

CMV este un virus herpetic care infectează între 50 % și 85 % din populația adultă. Aceasta este o complicație frecventă a imunosupresiei, care apare mai ales în urma unui transplant, și poate contribui semnificativ la morbiditatea și mortalitatea în rândul recipienților organelor transplantate. Terapiile curente cu imunosupresive folosite pentru a preveni respingerea unui organ transplantat au efecte negative asupra răspunsurilor imune ale limfocitelor T și celor mediate celular (cell-mediated immune, CMI), având drept rezultat creșterea susceptibilității la infecții virale post-transplant. Importanța funcției celulelor T în suprimarea replicării CMV este de asemenea subliniată prin faptul că limfocitele T citotoxice (LTC) CD8⁺ specifice CMV pot proteja împotriva patogenezei asociate virusului. Număratoarea LTC-urilor CD8⁺ specifice CMV la pacienții imunodeprimați și producția de IFN- γ pot avea caracter predictiv pentru riscul de dezvoltare a bolii induse de CMV. Producția de IFN- γ poate fi un substitut funcțional pentru identificarea LTC-urilor specifice CMV.

QF-CMV este un test pentru răspunsurile imune mediate celular (CMI) la peptidele cu rol de antigeni care simulează proteinele CMV. Peptidele CMV au rolul de a ținti celulele T CD8⁺, inclusiv haplotipurile HLA din Clasa I A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 și Cw6 (A30, B13) care acoperă >98 % din populația umană. Persoanele infectate cu CMV prezintă de obicei în sânge limfocite CD8⁺ care recunosc acești antigeni. Acest proces de recunoaștere implică producția și secreția citokinei IFN- γ . Detectarea și cuantificarea ulterioară a IFN- γ formează baza acestui test.

Principiul procedurii

Testul QF-CMV este efectuat în două etape. Mai întâi, sângele integral este recoltat în fiecare dintre tuburile QF-CMV de recoltare a sângelui, și anume un tub pentru Control Nil, un tub pentru Antigen CMV și un tub pentru Mitogen.

Tubul pentru Mitogen este utilizat în testul QF-CMV drept control pozitiv. Acesta poate fi util în special în cazul în care există un dubiu referitor la starea de imunitate a individului. Tubul Mitogen poate, de asemenea, fi utilizat cu rol de control pentru manipularea și incubarea corectă a sângelui.

Tuburile trebuie incubate la 37 °C cât mai curând posibil, în interval de 16 ore de la recoltare. După o perioadă de incubare de 16 până la 24 de ore, tuburile sunt centrifugate, plasma este îndepărtată, iar cantitatea de IFN- γ (UI/ml) este măsurată cu ajutorul testului QF-CMV ELISA.

Cantitatea de IFN- γ din probele de plasmă din tuburile pentru Antigen CMV și Mitogen poate depăși adesea limitele superioare ale celor mai multe cititoare ELISA, chiar dacă indivizii suferă de o imunosupresie moderată. Pentru rezultate calitative, utilizați valorile calculate pentru plasma nediluată. Pentru rezultate cantitative, unde sunt necesare valorile efective în UI/ml, probele de plasmă trebuie diluate 1/10 în Diluant verde și analizate în cititorul ELISA împreună cu plasma nediluată.

Notă: Pentru probele care se încadrează în intervalul testului QF-CMV ELISA (adică până la 10 UI/ml), trebuie utilizat rezultatul obținut cu proba de plasmă nediluată. Pentru astfel de concentrații ale IFN- γ valorile obținute folosind diluția de 1/10 a probelor de plasmă pot fi inexacte.

Se consideră că un test este reactiv pentru răspunsul IFN- γ atunci când valoarea indicată de tubul Antigen CMV depășește considerabil valoarea IFN- γ în UI/ml din tubul Nil. Proba de plasmă stimulată de Mitogen servește drept control pozitiv al IFN- γ pentru fiecare eșantion testat. O reacție slabă la Mitogen indică un rezultat neconcludent atunci când o probă de sânge are, de asemenea, un răspuns nereactiv la antigenii CMV. Acest model poate apărea în caz de limfocite insuficiente, activitate scăzută a limfocitelor ca urmare a manipulării necorespunzătoare a eșantionului, umplerii/omogenizării incorecte a tubului Mitogen sau a incapacității limfocitelor pacientului de a produce IFN- γ , cum este cazul pacienților care au suferit recent un transplant. Proba Nil se ajustează pentru fond sau IFN- γ nespecific din probele de sânge. Nivelul IFN- γ din tubul Nil este scăzut din nivelul IFN- γ din tubul Antigen CMV și tubul Mitogen (consultați „Interpretarea rezultatelor” de la pagina 24 a acestui prospect pentru descrierea modului de interpretare a rezultatelor testului QF-CMV).

Timpul necesar pentru efectuarea testului

Timpul necesar pentru efectuarea testului QF-CMV este estimat mai jos; durata testării probelor multiple atunci când acestea sunt prelucrate pe loturi este, de asemenea, indicată:

Incubarea tuburilor cu sânge la 37 °C:	16–24 de ore
ELISA:	Aprox. 3 ore pentru o placă ELISA
	Mai puțin de 1 oră de lucru
	Se adaugă 10–15 minute pentru fiecare placă suplimentară

Materiale furnizate

Conținutul kitului

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Tuburi de recoltare a sângelui (trusă pentru un pacient))	
Nr. de catalog	0192-0301
Număr de preparate	1
QuantIFERON Nil Control (Control Nil QuantIFERON) (capac gri)	1 tub
QuantIFERON CMV Antigen (Antigen CMV QuantIFERON) (capac albastru)	1 tub
QuantIFERON Mitogen Control (Control Mitogen QuantIFERON) (capac mov)	1 tub
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Prospect tuburi de recoltare a sângelui QF-CMV)	1

QuantIFERON-CMV ELISA		Kit ELISA cu 2 plăci
Nr. de catalog		0350-0201
Microplate strips (Stripuri de microplăci 12 × 8 godeuri) acoperite cu anticorpi monoclonali murini anti umani IFN- γ	2 seturi de stripuri de microplăci cu 12 × 8 godeuri	
Human IFN- γ Standard (Standard IFN- γ uman, liofilizat), (conține IFN- γ uman recombinant, cazeină bovină, timerosal 0,01 % m/v)	1 x flacon (8 U/ml după reconstituire)	
Green Diluent (Diluant verde; conține cazeină bovină, ser normal de șoarece, timerosal 0,01 % m/v)	1 x 30 ml	
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Conjugat concentrat 100x liofilizat) (HRP IFN- γ anti uman murin, conține timerosal 0,01 % m/v)	1 x 0,3 ml	
Wash Buffer 20x Concentrate (Soluție tampon pentru spălare concentrată 20x) (pH 7,2, conține ProClin® 300 0,05 % v/v)	1 x 100 ml	
Enzyme Substrate Solution (Soluție de substrat enzimatic) (conține H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5', tetrametilbenzidină)	1 x 30 ml	
Enzyme Stopping Solution (Soluție de inhibitor enzimatic) (conține H ₂ SO ₄ 0,5 M)*	1 x 15 ml	
QF-CMV ELISA Package Insert (Prospect QF-CMV ELISA)	1	

* Conține acid sulfuric. Consultați pagina 9 pentru precauții.

Materiale necesare, dar nefurnizate

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

- Incubator setat la 37 °C; CO₂ nu este necesar
- Pipete cu volum variabil calibrate pentru eliberarea a 10 până la 1.000 µl, cu vârfuri de unică folosință
- Pipete multicanal calibrate, capabile să elibereze 50 și 100 µl, cu vârfuri de unică folosință
- Agitator pentru microplăci
- Apă deionizată sau distilată, 2 litri
- Spălător pentru microplăci (este recomandat un spălător automat)
- Cititor de microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință între 620 și 650 nm
- Capac placă

Avertismente și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa **www.qiagen.com/safety**, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărui kit și componente a kitului QIAGEN®.

ATENȚIE



Manipulați sângele uman ca și cum ar avea potențial infecțios. Urmați îndrumările relevante referitoare la manipularea sângelui.

Următoarele avertizări cu privire la pericole și măsurile de precauție se aplică pentru componentele QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Conține: acid sulfuric. Avertisment! Poate fi coroziv pentru metale. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Avertisment! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

QuantiFERON Green Diluent



Conține: 5-hidroxi-1-(4-sulfonil)-4-(4-sulfonilazo)pirazol-3-carboxilat trisodic. Conține: tartrazină. Avertisment! Poate provoca o reacție alergică a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Conține: ProClin 300. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. A se evita aruncarea în mediul înconjurător.

Informații de siguranță

Informații suplimentare

- Abaterile de la QF-CMV Package Insert pot genera rezultate incorecte. Vă rugăm să citiți cu atenție instrucțiunile înainte de utilizare.
- Nu utilizați kitul dacă unul dintre flacoanele de reactivi prezintă semne de deteriorare sau scurgeri înainte de utilizare.
- **Important:** Inspectați flacoanele înainte de utilizare. Nu utilizați conjugat sau standard IFN- γ dacă flacoanele prezintă semne de deteriorare sau dacă sigiliul de cauciuc a fost compromis. Nu manipulați flacoanele sparte. Luați măsuri adecvate de precauție la eliminarea flacoanelor.

Recomandare: Deschideți flacoanele Conjugat sau Standard IFN- γ cu ajutorul unui clește de desigilare a flacoanelor pentru a reduce riscul de leziuni provocate de capacul cu sigiliu metalic.

- Nu amestecați și nu utilizați stripuri de microplăci, standard IFN- γ uman, Diluant verde sau conjugat concentrat 100x din kituri QF-CMV aparținând unor loturi diferite. Alți reactivi (soluția tampon de spălare concentrată 20x, soluția de substrat enzimatic și soluția de inhibitor enzimatic) pot fi interschimbați între kituri cu condiția ca reactivii să nu aibă termenul de valabilitate expirat și detaliile lotului să fie înregistrate.
- Eliminați reactivii neutilizați și probele biologice conform reglementărilor locale, naționale și federale.
- Nu utilizați QF-CMV Blood Collection Tubes sau kiturile QF-CMV ELISA după data de expirare.
- Asigurați-vă că echipamentele de laborator, precum spălătoarele și cititoarele de plăci au fost calibrate/validate pentru utilizare.

Depozitarea și manipularea reactivilor

Tuburi de recoltare a sângelui

- Păstrați QF-CMV Blood Collection Tubes la temperaturi cuprinse între 4 și 25 °C.
- QF-CMV Blood Collection Tubes trebuie să aibă temperatura între 17 și 25 °C în momentul umplerii cu sânge.
- Termenul de valabilitate al QF-CMV Blood Collection Tubes este de maximum 15 luni de la data fabricării, dacă sunt păstrate la temperaturi cuprinse între 4 și 25 °C.

Reactivii din kitul ELISA

- Păstrați kitul la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C.
- Protejați întotdeauna soluția de substrat enzimatic de lumina solară directă.

Reactivii reconstituiți și neutilizați

Pentru instrucțiuni despre modul de reconstituire a reactivilor, vă rugăm să consultați „Etapă 2: QuantiFERON-CMV ELISA pentru IFN- γ uman” (pașii 3 și 5 de la paginile 17 și 19).

- Standardul IFN- γ uman reconstituit poate fi păstrat cel mult 3 luni, dacă este păstrat la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C. Notați data la care a fost reconstituit standardul IFN- γ uman.
- Odată reconstituit, conjugatul concentrat 100 $\times$ neutilizat trebuie păstrat în continuare la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C și utilizat în cel mult 3 luni.
Notați data la care a fost reconstituit conjugatul.
- Conjugatul în concentrație de lucru trebuie utilizat în cel mult 6 ore de la preparare.
- Soluția tampon de spălare în concentrație de lucru poate fi păstrată la temperatura camerei (22 °C $\pm$ 5 °C) timp de cel mult 2 săptămâni.

Recoltarea și manipularea eșantioanelor

Testul QF-CMV utilizează următoarele tuburi de recoltare a sângelui:

- Nil Control (Control Nil) (capac gri)
- CMV Antigen (Antigen CMV) (capac albastru)
- Mitogen Control (Control Mitogen) (capac mov)

Antigenii sunt fixați prin uscare pe peretele interior al tuburilor de recoltare a sângelui, prin urmare este esențial ca sângele să fie bine omogenizat cu conținutul tuburilor. Tuburile trebuie transferate cât mai curând posibil într-un incubator setat la 37 °C, în cel mult 16 ore de la recoltare.

Pentru obținerea unor rezultate optime, trebuie respectate următoarele proceduri:

1. Pentru fiecare subiect, recoltați 1 ml de sânge prin puncție venoasă, direct în fiecare dintre QF-CMV Blood Collection Tubes. Această procedură trebuie efectuată de un flebotomist cu experiență.

QF-CMV Blood Collection Tubes pot fi utilizate la o altitudine maximă de 810 metri.

Dacă QF-CMV Blood Collection Tubes sunt utilizate la altitudini mai mari de 810 metri sau dacă volumul de sânge extras este redus, se poate recolta sânge cu ajutorul unei seringi și în fiecare dintre cele trei tuburi se transferă imediat câte 1 ml de sânge. Din motive de siguranță, este ideal ca această operațiune să fie efectuată scoțând acul seringii, urmând procedurile de siguranță corespunzătoare, îndepărtând capacele celor trei QF-CMV Blood Collection Tubes și adăugând câte 1 ml de sânge în fiecare tub (până la marcajul negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Montați la loc și fixați bine capacele tuburilor și omogenizați așa cum este descris mai jos. Întrucât sângele se recoltează relativ lent în tuburile de 1 ml, păstrați tubul pe ac timp de 2–3 secunde după ce tubul pare să se fi umplut, pentru a vă asigura că volumul recoltat este corect.

Marcajul negru de pe partea laterală a tuburilor indică nivelul de umplere corespunzător pentru 1 ml. QF-CMV Blood Collection Tubes au fost validate pentru volume de la 0,8 la 1,2 ml. Dacă nivelul de sânge din oricare tub nu se apropie de marcaj, trebuie recoltată o nouă probă de sânge.

Dacă pentru recoltarea sângelui se folosește un ac cu aripioare, trebuie utilizat un tub de purjare, pentru a vă asigura că tubul este umplut cu sânge înainte ca QF-CMV Blood Collection Tubes să fie utilizate.

Ca alternativă, sângele poate fi recoltat într-un singur tub universal de recoltare a sângelui cu litiu-heparină pe post de anticoagulant, după care poate fi transferat în QF-CMV Blood Collection Tubes. Utilizați doar litiu-heparină pe post de anticoagulant sanguin deoarece alți anticoagulanți pot interfera cu testul. Umpleți un tub de recoltare a sângelui (volum minim 5 ml) și amestecați ușor întorcând tubul de câteva ori pentru a dizolva heparina. Această procedură trebuie efectuată de un flebotomist cu experiență. Sângele trebuie păstrat la temperatura camerei ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) înainte de a fi transferat în QF-CMV Blood Collection Tubes pentru incubare, procedură care trebuie inițiată în decurs de 16 ore de la recoltarea sângelui.

2. Imediat după umplere, agitați QF-CMV Blood Collection Tubes de 10 ori cu suficientă fermitate ca să vă asigurați că întreaga suprafață interioară a tubului este acoperită cu sânge, pentru a dizolva antigenii de pe pereții tubului.

Tuburile trebuie să aibă temperatura cuprinsă între 17°C și 25°C în momentul umplerii cu sânge.

O scuturare prea puternică poate cauza distrugerea gelului și poate duce la rezultate aberante.

Dacă sângele a fost recoltat în tuburi cu litiu-heparină, probele trebuie amestecate uniform înainte de a fi transferate în QF-CMV Blood Collection Tubes. Asigurați-vă că sângele este bine amestecat întorcând tubul cu grijă imediat înaintea transferului. Transferați părți alicote de 1 ml (câte una pentru fiecare QF-CMV Blood Collection Tube) în tuburi corespunzătoare Nil, Antigen CMV și Mitogen. Această operațiune trebuie să fie efectuată aseptice, urmând procedurile de siguranță corespunzătoare, îndepărtând capacele celor trei QF-CMV Blood Collection Tubes și adăugând câte 1 ml de sânge în fiecare tub (până la marcajul negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Montați la loc și fixați bine capacele tuburilor și omogenizați așa cum este descris mai sus.

3. Etichetați tuburile în mod corespunzător.

Asigurați-vă că fiecare tub (Nil, Antigen CMV, Mitogen) este identificabil pe baza etichetei sau a altor metode.

4. După umplere, agitare și etichetare, tuburile trebuie transferate cât mai curând posibil într-un incubator setat la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, în cel mult 16 ore de la recoltare. Înaintea incubării, păstrați tuburile la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nu refrigerați și nu congelați probele de sânge.

Procedură

Etapa 1: Incubarea sângelui și recoltarea plasmei

1. Incubați tuburile în poziție VERTICALĂ la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 16 până la 24 de ore. Incubatorul nu necesită CO_2 sau umidificare.

Important: Dacă sângele nu este incubat imediat după recoltare, reamestecați tuburile prin răsturnarea acestora de 10 ori înainte de incubare.

După incubare, tuburile de recoltare a sângelui pot fi păstrate la temperaturi între $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de cel mult 3 zile înainte de centrifugare.

2. După incubarea tuburilor la $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, recoltarea plasmei este facilitată prin centrifugarea tuburilor timp de 15 minute la 2.000 până la 3.000 RCF (*g*). Dopul de gel va separa celulele de plasmă. În caz contrar, tuburile trebuie centrifugate din nou.

Recoltarea plasmei fără centrifugare este posibilă, însă este necesară o atenție sporită pentru îndepărtarea plasmei fără afectarea celulelor.

3. După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

Important: Probele de plasmă trebuie recoltate exclusiv cu pipeta.

Probele de plasmă pot fi încărcate din tuburile de recoltare a sângelui centrifugate direct pe placa QF-CMV ELISA, inclusiv atunci când se utilizează stații de lucru automate ELISA.

Probele de plasmă pot fi păstrate în QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugate cel mult 28 de zile la temperaturi cuprinse între $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$, sau, dacă au fost recoltate, la temperaturi sub $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (de preferat, mai mici de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) pe perioade de timp îndelungate.

Pentru a obține probe de sânge adecvate, recoltați cel puțin 150 μl de plasmă.

Etapa 2: QuantiFERON-CMV ELISA pentru IFN- γ uman

Consultați „Conținutul kitului”, pagina 8 și „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 9, pentru materialele necesare pentru efectuarea testului ELISA.

1. Toate probele de plasmă și toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100 $\times$, trebuie aduse la temperatura camerei (22 °C $\pm$ 5 °C) înainte de utilizare. Lăsați-le cel puțin 60 de minute pentru aclimatizare.
2. Scoateți de pe suport stripurile de plăci ELISA care nu sunt necesare, ambalați-le la loc în punga de protecție și păstrați-le în frigider cât timp este necesar.

Alocați cel puțin o bandă pentru standardele QF-CMV ELISA și benzi suficiente pentru numărul de pacienți supuși testării. După utilizare, păstrați suportul și capacul în vederea utilizării împreună cu stripurile rămase.

3. Reconstituiți standardul IFN- γ uman cu volumul de apă deionizată sau distilată indicat pe eticheta flaconului. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura resolubilizarea completă. Prin reconstituirea standardului IFN- γ la volumul corect se va obține o soluție cu o concentrație de 8,0 UI/ml.

Notă: Volumul de reconstituire a standardului IFN- γ uman (standardul din kit) diferă în funcție de lot.

Folosind standardul reconstituit, preparați o serie de diluție de patru concentrații IFN- γ în Diluant verde (DV) (Figura 1, pagina următoare). S1 (Standardul 1) conține 4,0 UI/ml, S2 (Standardul 2) conține 1,0 UI/ml, S3 (Standardul 3) conține 0,25 UI/ml și S4 (Standardul 4) conține 0 UI/ml (doar DV). Standardele trebuie testate cel puțin în duplicat. Preparați diluții proaspete cu standard din kit pentru fiecare sesiune de testare ELISA.

Exemplu de procedură pentru standarde duplicate

Exemplu de procedură pentru standarde duplicate	
A	Etichetați patru tuburi: S1, S2, S3, S4
B	Adăugați 150 µl de DV în S1, S2, S3, S4
C	Adăugați 150 µl de standard din kit în tubul S1 și amestecați bine
D	Transferați 50 µl din tubul S1 în tubul S2 și amestecați bine
E	Transferați 50 µl din tubul S2 în tubul S3 și amestecați bine
F	DV simplu servește ca standard zero (S4)

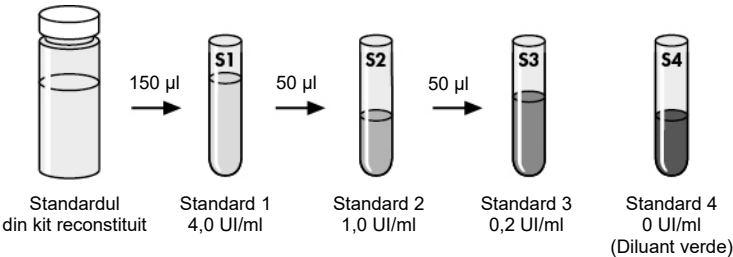


Figura 1. Prepararea curbei standard prin diluție serială.

4. Reconstituiți conjugatul concentrat 100× liofilizat cu 0,3 ml de apă deionizată sau distilată. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura solubilizarea completă a conjugatului.

Concentrația de lucru a conjugatului se obține prin diluarea cantității necesare de conjugat concentrat 100× reconstituit în Diluant verde (consultați Tabelul 1, pagina următoare).

Amestecați bine, dar cu atenție, pentru a evita spumarea.

Readuceți conjugatul concentrat 100× neutilizat la o temperatură între 2 și 8 °C imediat după utilizare.

Utilizați doar Diluant verde.

Tabelul 1. Prepararea conjugatului în concentrație de lucru

Numărul de stripuri	Volumul de conjugat concentrat 100×	Volumul de Diluant verde
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Pentru probele de plasmă recoltate din tuburile de recoltare a sângelui și ulterior congelate și stocate timp de peste 24 de ore înainte de testare, amestecați bine înainte de a le adăuga la godeul ELISA.

Important: Dacă probele de plasmă se adaugă direct din QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugate, trebuie să evitați orice amestecare a plasmei. Aveți întotdeauna grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

6. Dacă doriți rezultate cantitative, diluați probele de plasmă cu CMV și Mitogen în proporție de 1/10 cu Diluant verde (10 µl de plasmă + 90 µl DV). Plasma cu Nil nu trebuie diluată.

Este recomandată testarea următoarelor probe în paralel:

Nil, Antigen CMV, Mitogen, Antigen CMV (1/10), Mitogen (1/10)

Totuși, QuantiFERON-CMV Analysis Software acceptă și următoarele opțiuni pentru probele de la pacient:

Nil, Antigen CMV, Mitogen

Nil, Antigen CMV (1/10), Mitogen (1/10)

Nil, Antigen CMV, Mitogen, Antigen CMV (1/10)

Nil, Antigen CMV (1/10), Mitogen

7. Adăugați 50 µl de conjugat în concentrație de lucru proaspăt preparat în godeurile ELISA dorite folosind o pipetă multicanal.
8. Adăugați 50 µl din probele de plasmă pentru testare în godeurile corespunzătoare. În final, adăugați câte 50 µl din fiecare dintre standardele de la 1 la 4 în godeurile corespunzătoare. Standardele trebuie testate cel puțin în duplicat.
9. Acoperiți placa ELISA și omogenizați temeinic conjugatul și probele de plasmă/standardele folosind un agitator pentru microplăci timp de 1 minut la 500-1000 rot/min. Evitați stropirea.
10. Acoperiți placa ELISA și incubați la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) timp de 120 ± 5 minute.

Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării. Abaterea de la intervalul de temperatură specificat poate duce la rezultate incorecte.

11. În timpul incubării, preparați soluția tampon de spălare în concentrație de lucru. Diluați o parte soluție tampon de spălare concentrată 20× cu 19 părți de apă deionizată sau distilată și omogenizați temeinic.

A fost furnizată o cantitate suficientă de soluție tampon de spălare concentrată 20x pentru a prepara 2 litri de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru.

12. Atunci când incubarea plăcii ELISA este completă, spălați godeurile cu 400 µl de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru, în cel puțin șase cicluri. Este recomandat un spălător de plăci automat.

Important: Spălarea temeinică este foarte importantă pentru reușita testului. Asigurați-vă că fiecare godeu este umplut în întregime cu soluție tampon de spălare până în partea superioară a godeului pentru fiecare ciclu de spălare. Este recomandată o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.

În rezervorul pentru efluent trebuie adăugat dezinfectant standard de laborator, iar pentru decontaminarea materialelor potențial infecțioase trebuie urmate procedurile omologate.

13. Loviți ușor plăcile așezate cu fața în jos pe un prosop absorbant fără scame pentru a elimina soluția tampon de spălare reziduală. Adăugați 100 µl de soluție de substrat enzimatic în fiecare godeu, acoperiți placa și omogenizați temeinic, folosind un agitator pentru microplăci timp de 1 minut la 500-1000 rot/min.
14. Acoperiți fiecare placă și incubați la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) timp de 30 de minute. Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării.

-
15. După o incubare de 30 de minute, adăugați 50 µl de Enzyme Stopping Solution (soluție de inhibitor enzimatic) în fiecare godeu, în aceeași ordine în care a fost adăugat substratul și omogenizați temeinic la 500-1000 rot/min, folosind un agitator pentru microplăci.
 16. Măsurați Densitatea Optică (DO) a fiecărui godeu în cel mult 5 minute de la stoparea reacției, utilizând un cititor de microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință între 620 nm și 650 nm. Valorile DO sunt utilizate pentru calcularea rezultatelor.

Calculule și interpretarea testului

QuantiFERON-CMV Analysis Software, pentru analizarea datelor brute și calcularea rezultatelor, este oferit de QIAGEN la adresa **www.QuantiFERON.com**. Asigurați-vă că este utilizată cea mai nouă versiune a QF-CMV Analysis Software.

Software-ul efectuează o evaluare a controlului calității testului, generează o curbă standard și furnizează câte un rezultat al testului pentru fiecare subiect, așa cum este detaliat în „Interpretarea rezultatelor” la pagina 24. Software-ul raportează cea mai mică diluție care generează un rezultat în cadrul intervalului QF-CMV ELISA, luând în considerare factorul de diluție.

Ca o alternativă la utilizarea QF-CMV Analysis Software, rezultatele pot fi obținute folosind metoda de mai jos.

Generarea curbei standard (dacă nu se utilizează QF-CMV Analysis Software)

Determinați media valorilor DO ale replicatelor standardului din kit de pe fiecare placă.

Construiți o curbă standard $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ reprezentând grafic valoarea $\log_{(e)}$ a mediei DO (axa y) în raport cu valoarea $\log_{(e)}$ a concentrației de IFN- γ a standardelor în UI/ml (axa x), omițând standardul zero din aceste calcule. Calculați linia care corespunde cel mai bine pentru curba standard prin analiză de regresie.

Utilizați curba standard pentru determinarea concentrației de IFN- γ (UI/ml) pentru fiecare dintre probele de plasmă testate, utilizând valoarea DO a fiecărei probe.

Aceste calcule pot fi efectuate utilizând pachetele software disponibile împreună cu cititoarele de microplăci și un program de calcul tabelar sau un software statistic standard (ca de exemplu Microsoft® Excel®). Este recomandat ca aceste pachete să fie utilizate pentru a calcula analiza de regresie, coeficientul de variație (CV%) al standardelor și coeficientul de corelație (r) al curbei standard.

Rezultatul raportat trebuie extras din cea mai mică diluție care generează un rezultat în cadrul intervalului QF-CMV ELISA, asigurându-vă că este luat în considerare factorul de diluție, dacă este cazul.

Controlul calității testului

Acuratețea rezultatelor testului depinde de generarea unei curbe standard exacte. Din acest motiv, rezultatele obținute pe baza standardelor trebuie examinate înainte ca rezultatele probelor testate să poată fi interpretate.

Pentru ca testul ELISA să fie valid:

- Valoarea medie a DO pentru Standardul 1 trebuie să fie $\geq 0,600$.
- CV% pentru valorile DO replicate pentru Standardul 1 și Standardul 2 trebuie să fie $<15\%$.
- Valorile DO replicate pentru Standardele 3 și 4 nu trebuie să varieze cu mai mult de 0,040 unități de densitate optică față de media lor.
- Coeficientul de corelație (r) calculat pe baza valorilor medii de absorbanță ale standardelor trebuie să fie $\geq 0,98$.

QF-CMV Analysis Software calculează și raportează acești parametri de control al calității. Dacă criteriile de mai sus nu sunt îndeplinite, execuția testului este nevalidă și trebuie repetată.

Valoarea medie a DO pentru Standardul zero (Diluantul verde) trebuie să fie $\leq 0,150$. Dacă valoarea medie a DO este $>0,150$, trebuie analizată procedura de spălare a plăcilor.

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele testului QuantiFERON-CMV sunt interpretate pe baza criteriilor din Tabelul 2.

Tabelul 2. Interpretarea rezultatelor QuantiFERON-CMV

Nil (UI/ml)	CMV minus Nil (UI/ml)	Mitogen minus Nil (UI/ml)*	Rezultatul testului QF-CMV	Raport/Interpretare
≤ 8,0	≥ 0,20 și ≥ 25 % din Nil	Orice valoare	Reactiv†	Imunitate anti-CMV detectată
	<0,20 SAU ≥0,20 și <25 % din Nil	≥ 0,5	Nereactiv	Imunitate anti-CMV NE-detectată
		<0,5	Neconcludent‡	Rezultatele sunt neconcludente pentru reacția la CMV
>8,0§	Orice valoare	Orice valoare	Neconcludent‡	Rezultatele sunt neconcludente pentru reacția la CMV

* De obicei, răspunsurile la controlul pozitiv cu Mitogen (și ocazional antigenii CMV) pot fi în afara intervalului cititorului de microplăci. Acest lucru nu influențează rezultatele testelor.

† Dacă infecția cu virusul citomegalic nu este suspectată, rezultatele inițial reactive pot fi confirmate prin retestarea probelor originale de plasmă în duplicat în QF-CMV ELISA. Dacă rezultatul retestării unuia sau ambelor replicate este pozitiv, persoana trebuie considerată ca având un răspuns reactiv la test.

‡ Consultați „Ghidul de depanare” (pagina 39) pentru cauze posibile.

În cadrul studiilor clinice (1), un rezultat neconcludent la pacienții beneficiari de transplanturi de organe solide, unde un donator este reactiv la CMV, dar controlul cu Mitogen a fost sub 0,5 UI/ml, s-a demonstrat a fi relevant din punct de vedere clinic. Astfel de pacienți prezintă cel mai mare risc de dezvoltare a bolii induse de CMV.

§ În cadrul studiilor clinice, mai puțin de 0,25 % dintre subiecți au înregistrat niveluri de IFN-γ >8,0 UI/ml pentru valoarea Nil.

Notă: Nivelul de IFN-γ măsurat trebuie utilizat în asocieră cu prezentarea clinică, anamneza și alte evaluări pentru diagnosticare la stabilirea răspunsului imun la antigenii CMV. QF-CMV nu este un test destinat determinării infecției cu CMV și nu trebuie utilizat pentru a exclude infecția cu CMV.

Limitări

Rezultatele testului QuantiFERON-CMV trebuie interpretate împreună cu istoricul epidemiologic, starea curentă de sănătate și alte evaluări pentru diagnosticare ale fiecărui subiect.

Rezultatele nefiabile sau neconcludente se pot datora:

- Abaterii de la procedura descrisă în QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert
- Niveluri excesive de IFN- γ în tubul de control
- Scurgerii unui interval de timp de peste 16 ore de la recoltarea eșantionului de sânge până la incubarea la 37 °C.

Valori prognozate

Valorile de IFN- γ prognozate folosind QuantiFERON-CMV s-au obținut din testarea a 591 de probe prelevate de la subiecți sănătoși. 343 de probe au fost testate seropozitiv și 248 de probe au fost testate seronegativ la CMV IgG. Starea serologică CMV nu a fost cunoscută în momentul testării QF-CMV. În cazul celor 248 de probe de la subiecții CMV-seronegativi, 100 % (248/248) din probele testate au fost nereactive la QF-CMV ELISA, generând răspunsuri IFN- γ de <0,2 UI/ml la tubul Antigen CMV (minus Nil). Este ilustrată distribuția răspunsurilor IFN- γ la tubul Antigen CMV (minus Nil) în cazul celor 343 de subiecți CMV-seropozitivi (Figura 2).

Numărul de probe

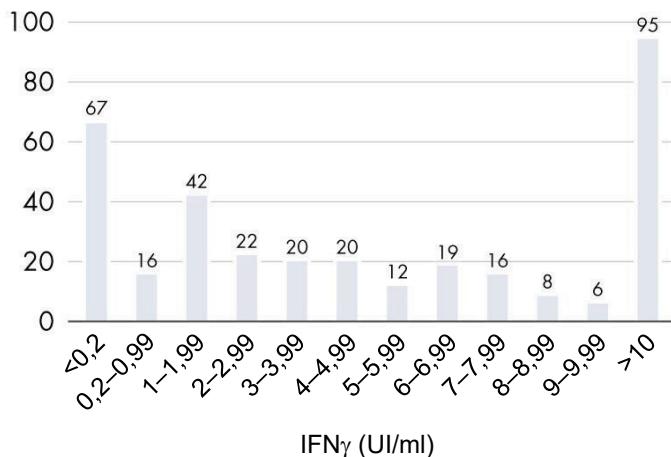


Figura 2. Distribuția răspunsurilor QF-CMV IFN- γ (minus Nil) la subiecții sănătoși seropozitivi (n = 343).

Distribuția răspunsurilor IFN- γ la Mitogen (minus Nil) a fost stabilită pe baza a 733 de probe recoltate de la subiecți adulți sănătoși cu ajutorul QF-CMV ELISA, indiferent de serologia CMV IgG (Figura 3). Un rezultat pentru tubul Mitogen (minus Nil) cu o valoare sub 0,5 UI/ml indică eșuarea testului sau faptul că subiectul este imunocompromis. În cazul unei populații sănătoase, numai 2/733 de rezultate s-au încadrat în această categorie.

Numărul de probe

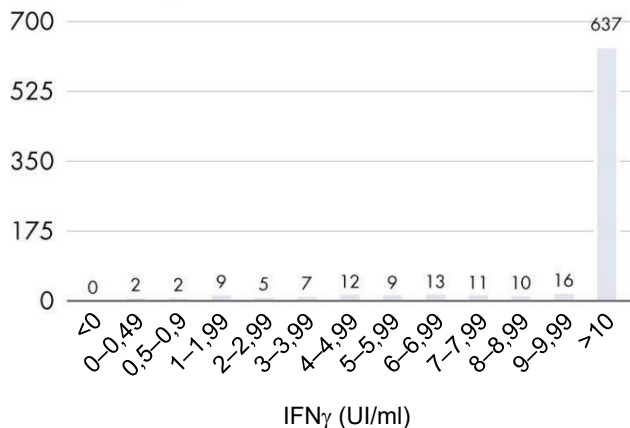


Figura 3. Distribuția răspunsurilor Mitogen-IFN- γ (minus Nil) la subiecții sănătoși (n = 733).

Distribuția răspunsurilor IFN- γ la tuburile Nil a fost stabilită pe baza a 1020 de probe de plasmă recoltate de la subiecți sănătoși cu ajutorul QF-CMV ELISA, indiferent de serologia CMV IgG (Figura 4).

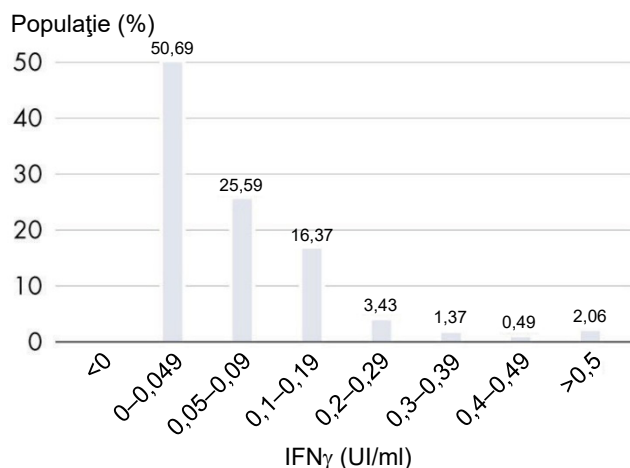


Figura 4. Distribuția răspunsurilor Nil IFN- γ la subiecți sănătoși (n = 1020) exprimată în procente de populație.

Caracteristici de performanță

Performanță clinică

Valoarea prag a testului pentru detectarea expunerii anterioare la CMV cu ajutorul testului QF-CMV a fost stabilită în urma unei analize a rezultatelor obținute pe un grup de subiecți sănătoși (n = 223), în care rezultatele testului QF-CMV au fost comparate cu rezultatele serologice pentru CMV IgG. O analiză ROC a stabilit că un prag de testare de 0,04 UI/ml (după scăderea Nil) a furnizat valori predictive pozitive și negative optime pentru QF-CMV (aria de sub curbă = 0,9679 [Îl 95 %: 0,9442–0,9915, p <0,0001]), și, astfel, a reprezentat pragul la care acest test a acoperit domeniul de utilizare cel mai eficient, la o populație sănătoasă.

Performanța testului QF-CMV a fost comparată cu cea a testului serologic SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). Testul QF-CMV a demonstrat o concordanță de 95 % (294/310 indivizi) cu testul serologic CMV IgG comparativ la subiecți sănătoși și niciunul dintre cei 149 de donatori seronegativi nu a manifestat vreo reacție la testul QF-CMV. 145 dintre cei 161 de donatori seropozitivi au manifestat un răspuns QF-CMV reactiv. Acordul pozitiv general a fost de 90 %, cu o valoare a acordului negativ de 100 %. Nivelul de concordanță dintre răspunsurile QF-CMV și starea serologică CMV IgG la subiecții sănătoși este indicat în Tabelul 3.

Tabelul 3. Concordanța între testul QuantiFERON-CMV și testul serologic CMV IgG la subiecți sănătoși

		Serologia CMV		Total
		Pozitiv	Negativ	
QuantiFERON-CMV	Reactiv	145	0	145 (46,8 %)
	Nereactiv	16	149	165 (53,2 %)
	Total	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Valoarea prag a testului

Valoarea prag recomandată pentru acest test clinic este de 0,2 UI/ml pentru tubul Antigen CMV (minus Nil), deși pot fi validate valori prag diferite pentru situații clinice diferite.

Studii clinice

Deoarece nu există un standard definitiv pentru confirmarea sau excluderea diagnosticului de infecție cu virusul citomegalic, sensibilitatea și specificitatea testului QF-CMV nu pot fi practic evaluate. Specificitatea și sensibilitatea testului QF-CMV au fost approximate prin evaluarea nivelului de concordanță între răspunsurile QF-CMV și starea serologică CMV IgG a subiecților sănătoși.

Specificitatea testului QF-CMV a fost aproximată prin evaluarea ratelor rezultatelor fals pozitive (răspuns reactiv la testul QF-CMV) la donatori sănătoși fără antecedente de expunere la CMV (indivizi CMV IgG-seronegativi). Sensibilitatea a fost aproximată prin evaluarea răspunsului QF-CMV la probe recoltate de la donatori sănătoși cu antecedente de expunere la CMV (indivizi CMV IgG-seropozitivi). QF-CMV utilizează un număr mare de epitopi specifici CMV din diferite proteine CMV, oferind astfel o acoperire largă a populației cu diverse haplotipuri HLA din Clasa I (aproximativ 98 % din populație). Întrucât haplotipurile HLA ale subiecților testați serologic pentru CMV sunt necunoscute, s-a estimat că un procent mic de găsite ca persoane seropozitive la examenul serologic nu va reacționa la QF-CMV Blood Collection Tubes.

Specificitate

Într-un studiu efectuat pe 591 de probe recoltate de la subiecți sănătoși, nu s-au înregistrat rezultate QF-CMV fals pozitive la indivizii CMV IgG-seronegativi, 248/248 de probe având rezultat nereactiv la testul QF-CMV ELISA și negativ la testul serologic CMV IgG. Prin urmare, rezultatele obținute utilizând QF-CMV și testul serologic IgG CMV au arătat o concordanță de 100 %.

În toate celelalte evaluări ale specificității efectuate pe persoanele care au primit transplanturi de organe solide (1–8), persoanele care au primit transplanturi de celule stem hematopoietice (9, 10) și pacienții infectați cu HIV (11), concordanța dintre testul QF-CMV și testul serologic CMV IgG a fost de asemenea de 100 %.

Sensibilitate

Într-un studiu efectuat pe 343 de probe recoltate de la subiecți sănătoși cu CMV IgG-seropozitiv, nivelul de concordanță dintre răspunsurile QF-CMV și rezultatele serologice CMV IgG a fost de 80,5 %, 276/343 de probe fiind reactive la QF-CMV și pozitive la testul serologic CMV IgG. Neconcordanța observată se poate datora reacției serologice fals pozitive la CMV sau lipsei tipurilor de HLA de reacție la indivizii testați.

Nivelurile de concordanță în evaluările de sensibilitate efectuate la beneficiari de transplanturi de organe solide (1–8), la beneficiari de transplanturi cu celule stem hematopoietice (9, 10) și la pacienți infectați cu HIV (11), au fost mai scăzute, acest lucru putând fi cauzat de serologia CMV fals pozitivă, de absența tipurilor HLA reactive la indivizii testați sau de absența celulelor T reactive la acești pacienți, din cauza imunosupresiei.

Studii care evidențiază utilitatea clinică

Atât serologia CMV IgG, cât și testul QF-CMV au ca domeniu de utilizare detectarea imunității la CMV. În cazul unui transplant, serologia pentru CMV este utilizată la scară largă anterior transplantului, pentru a determina riscul de apariție a complicațiilor CMV post-transplant la beneficiarul transplantului, însă are, în sine, o valoare post-transplant limitată. Ca alternativă, testul QF-CMV poate fi utilizat la primitorii de organe transplantate pentru a evalua nivelul de imunitate la CMV al pacienților care prezintă risc de dezvoltare a unei infecții simptomatice și/sau a bolii induse de CMV din cauza imunosupresiei (12–15).

Câteva studii clinice publicate efectuate pe o varietate de cohorte care au suferit un transplant au demonstrat utilitatea testului QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

Într-un studiu amplu efectuat pe 108 pacienți care au primit un transplant de organ solid (4), în rândul pacienților care au obținut un rezultat reactiv la testul QF-CMV la terminarea tratamentului profilactic anti-CMV a existat un procent considerabil mai mic de cazuri de boală CMV ulterioară (3,3 % sau 1/30, pe baza unui prag de 0,2 UI/ml) comparativ cu pacienții care au obținut un rezultat nereactiv la testul QF-CMV (21,8 % sau 17/78, $p = 0,044$) (Figura 5).

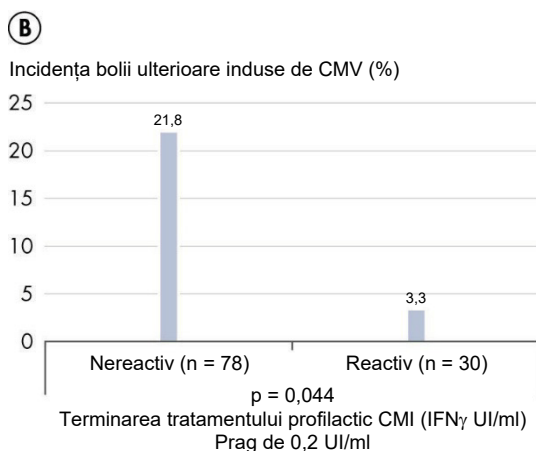
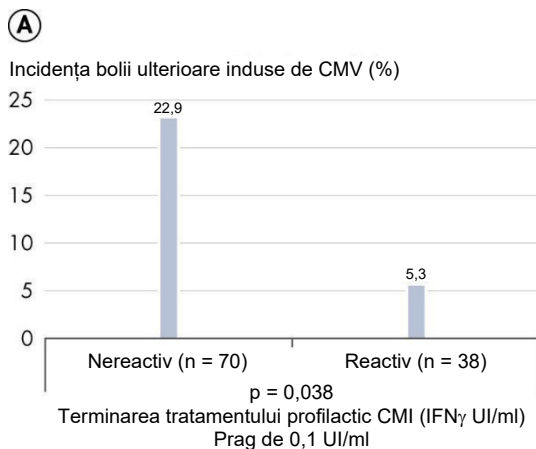


Figura 5. Procentele cazurilor de debut târziu al bolii induse de CMV la pacienții care au obținut un rezultat reactiv la testul QuantiFERON-CMV, comparativ cu pacienții care au obținut un rezultat nereactiv la testul QuantiFERON-CMV la terminarea tratamentului profilactic. Date subiacente întâlnite la Kumar et al. (4).

În plus, beneficiarii de transplanturi seronegativi CMV care au primit un organ de la un donator CMV-pozitiv (D+R-) cu un rezultat reactiv la QF-CMV în urma finalizării tratamentului profilactic au experimentat mai des și pentru mai mult timp situația de lipsă a bolii induse de CMV, ceea ce indică faptul că testul QF-CMV poate fi utilizat pentru a identifica persoanele care prezintă risc de dezvoltare a bolii induse de CMV cu debut târziu.

Acest studiu a evidențiat de asemenea faptul că în această cohortă de pacienți cu transplant care prezentau cel mai mare risc de a dezvolta boala indusă de CMV (D+/R-), un rezultat reactiv în orice moment post-tratament profilactic a fost asociat cu o probabilitate mai mare de a nu dezvolta boala indusă de CMV.

Într-un studiu efectuat pe 37 de pacienți care au primit un transplant de organ solid (6), evaluarea răspunsurilor celulelor T CD8+ specifice CMV cu ajutorul testului QF-CMV a ajutat la estimarea predictivă a clearance-ului viral spontan, comparativ cu evoluția bolii induse de CMV, în urma creșterii viremiei CMV. În acest studiu, 24/26 de pacienți (92,3 %) care au obținut un rezultat reactiv la testul QF-CMV (utilizând un prag de testare IFN- γ $\geq 0,2$ UI/ml) au eliminat spontan virusul CMV, în timp ce la numai 5/11 pacienți (45,5 %) care au obținut un rezultat nereactiv la testul QF-CMV s-a constatat aceeași reacție.

Un studiu efectuat pe 67 de pacienți beneficiari de transplant pulmonar care evaluează episoadele de viremie CMV post-transplant (7), a relevat faptul că 18/25 (72 %) de episoade de viremie CMV au fost precedate de un rezultat nereactiv la testul QF-CMV, comparativ cu 4/16 (25 %) episoade precedate de un rezultat reactiv la testul QF-CMV (testul de exactitate Fischer, $p = 0,0046$; Figura 6).

Episoade de ADN-emie HCMV cu
o încărcare virală >1000 copii/ml (%)

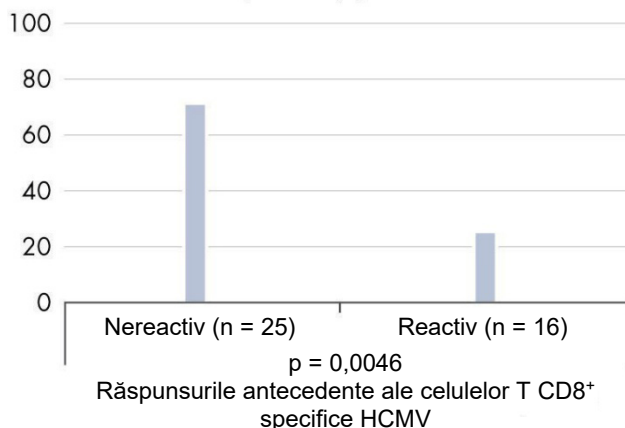


Figura 6. Analiza statistică a răspunsurilor celulelor T CD8⁺ specifice CMV detectate cu ajutorul testului QuantiFERON-CMV și evoluția viremiei CMV (testul de exactitate Fisher, p = 0,0046). Date subiacente întâlnite la Weseslindtner et al (7).

Într-un studiu prospectiv multicentric amplu efectuat pe 127 de pacienți CMV-seronegativi beneficiari de transplanturi de organe solide de la donatori CMV seropozitivi (8), care au primit toți tratament antiviral profilactic, a indicat că în rândul pacienților care au obținut un rezultat reactiv la testul QF-CMV (folosind un prag al testului de 0,1 UI/ml) în orice moment după terminarea tratamentului profilactic anti-CMV a existat un procent considerabil mai mic de cazuri de debut tardiv al bolii la 12 luni post-transplant (6,4 %), comparativ cu pacienții care au obținut un rezultat nereactiv (22,2 %) și un rezultat neconcludent la testul QF-CMV (58,3 %, p <0,001). La clasificarea rezultatelor neconcludente ca fiind și „nonreactive” (nereactive), incidența apariției ulterioare a bolii induse de CMV a fost de 6,4 % comparativ cu 26,8 %, p = 0,024. Valorile predictive pozitive și negative raportate ale testului QF-CMV pentru protecție împotriva bolii CMV au fost 0,90 (ÎI 95 % 0,74–0,98), respectiv 0,27 (ÎI 95 % 0,18–0,37). Acest studiu a demonstrat că testul QF-CMV poate fi util pentru a estima predictiv dacă pacienții prezintă risc redus, mediu sau crescut de a dezvolta ulterior boala indusă de CMV după tratamentul profilactic.

Într-un studiu prospectiv efectuat pe 55 de persoane care au primit un transplant de organe solide (8), studiu care a analizat legătura dintre rezultatele testului QF-CMV pre-transplant și episoadele de replicare CMV post-transplant, s-a descoperit că recipienții CMV-seropozitivi care au obținut un rezultat nereactiv (pe baza unui prag al testului de 0,2 UI/ml) la testul QF-CMV efectuat pre-transplant (7/14 sau 50 %) au prezentat o incidență mai mare a replicării CMV post-transplant comparativ cu recipienții CMV-seropozitivi care au obținut un rezultat reactiv la testul QF-CMV pretransplant (4/30 sau 13,3 %, $p = 0,021$).

Acest studiu a descoperit că recipienții cu un răspuns nereactiv la testul QF-CMV efectuat pre-transplant care au primit un organ de la un donator CMV-seropozitiv au prezentat un risc de replicare CMV de zece ori mai mare decât recipienții reactivi la testul QF-CMV efectuat pre-transplant (raportul șanselor ajustat 10,49, IÎ 95 % 1,88–58,46). Prin urmare, un test QF-CMV pre-transplant poate fi util pentru estimarea predictivă a riscului de replicare a CMV în urma transplantului, permițând astfel individualizarea gestionării infecției cu CMV după transplantarea unui organ solid.

Alte câteva studii care cercetează detectarea răspunsurilor celulelor T CD8⁺ specifice CMV cu ajutorul testului QF-CMV pe o cohortă de beneficiari de transplant au fost efectuate (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) sau sunt în curs de desfășurare în întreaga lume.

Îndrumări consensuale internaționale actualizate privind gestionarea virusului citomegalic în transplantul de organe solide

Importanța monitorizării imunologice specifice CMV a fost recunoscută și publicată în *„Îndrumări consensuale internaționale actualizate privind gestionarea virusului citomegalic în transplantul de organe solide”* (12). Aceste îndrumări internaționale, elaborate de un grup de experți în CMV și transplantul de organe solide, aprobate de Departamentul de Boli Infecțioase al Societății de Transplant, sunt recomandări consensuale, bazate pe dovezi și pe opinia experților, privind gestionarea CMV, inclusiv: diagnosticare, imunologie, prevenire și tratament.

Concluzia acestor îndrumări este că „Monitorizarea răspunsurilor imune ale celulelor T specifice CMV poate identifica predictiv persoanele care prezintă risc de apariție a bolii induse de CMV post-transplant și poate fi utilă în stabilirea tratamentului profilactic și a terapiilor preventive” (12).

În plus, îndrumările au oferit și recomandări privind atributele testului ideal de monitorizare imunologică, care au inclus:

- Capacitatea de a evalua cantitatea și funcția celulelor T CD4⁺ și CD8⁺ ale unui receptor de transplant
- Capacitatea de a măsura IFN- γ
- Ușurință în utilizare, eficiență din punct de vedere al costurilor și caracter reproductibil
- Rapiditate de efectuare
- Permite transportarea ușoară a eșantioanelor către laboratoare specializate de referință

Testul QF-CMV îndeplinește practic toate criteriile specificate în aceste îndrumări și este singurul test de monitorizare imunologică standardizat capabil să detecteze IFN- γ specific CMV.

Caracteristicile de performanță ale testului

Testul QF-CMV ELISA utilizează standard IFN- γ uman recombinant, acesta fiind comparat cu un preparat IFN- γ de referință (Ref NIH: Gxg01-902-535). Rezultatele probelor testate sunt raportate în Unități Internaționale (UI) având ca referință o curbă standard preparată prin testarea diluției standardului secundar furnizat cu kitul.

Se cunoaște că anticorpilor heterofili (de ex., umani anti-șoareci) din serul sau plasma unor persoane provoacă interferență cu testele imune. Efectul anticorpilor heterofili din QF-CMV ELISA este minimizat prin adăugarea de ser normal de șoarece în Diluantul verde și prin utilizarea de fragmente de anticorpi monoclonali F(ab')₂, ca anticorpi de captură a IFN- γ atașați la godeurile microplăcii.

Limita de detecție a testului QF-CMV ELISA este de 0,065 UI/ml și nu există dovezi de rezultate fals negative la doză ridicată (prozonă) pentru concentrații de IFN- γ de până la 10.000 UI/ml. S-a demonstrat că anticorpilor QF-CMV ELISA nu reacționează încrucișat cu niciuna din citokinele testate, printre care se numără IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 și IL12.

Testul QF-CMV ELISA s-a dovedit liniar în condițiile poziționării aleatorii a cinci replicare pentru 11 probe de plasmă cu concentrații de IFN- γ cunoscute pe placa ELISA. Linia regresiei liniare are o pantă de $1,002 \pm 0,011$ și un coeficient de corelație de 0,99 (Figura 7).

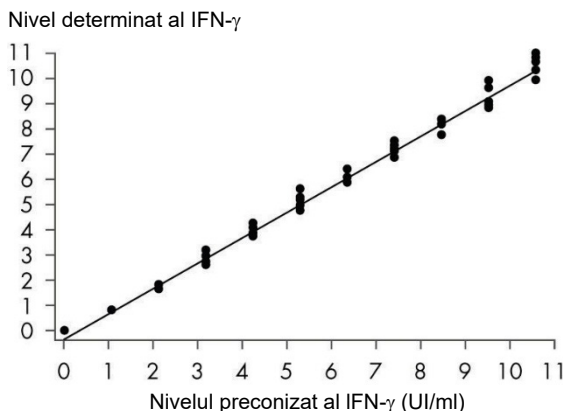


Figura 7. Profilul liniarității testului QF-CMV ELISA determinat în urma testării a cinci replicare pentru 11 probe de plasmă cu concentrații de IFN- γ cunoscute.

Reproductibilitatea QF-CMV ELISA a fost estimată în urma efectuării unui test pe 20 de probe de plasmă cu concentrații de IFN- γ diferite în câte trei replicare, în trei laboratoare diferite, în trei zile neconsecutive și de către trei operatori diferiți. Așadar, fiecare probă a fost testată de 27 de ori, în cadrul a nouă execuții de teste independente. Una dintre probe a fost un control Nil, iar concentrația de IFN- γ calculată pentru aceasta a fost de 0,08 (IÎ 95 % 0,07–0,09) UI/ml. Pentru cele 19 probe de plasmă rămase, intervalul de concentrații a fost cuprins între 0,33 (IÎ 95 % 0,31–0,34) și 7,7 UI/ml (IÎ 95 % 7,48–7,92).

Imprecizia intra-test și inter-teste a fost estimată prin calcularea mediei CV% pentru fiecare probă de plasmă testată care conținea IFN- γ din cadrul fiecărei analize a plăcii ($n = 9$), variația fiind cuprinsă între 4,1 și 9,1 CV%. Media CV% (IÎ $\pm$ 95 %) din cadrul testului a fost de 6,6 % $\pm$ 0,6 %. Media pentru plasma cu zero IFN- γ a fost de 14,1 CV%.

Imprecizia totală sau imprecizia inter-teste a fost determinată prin compararea celor 27 de concentrații de IFN- γ calculate pentru fiecare probă de plasmă, și a avut valori cuprinse între 6,6 și 12,3 CV%. Media totală a CV% (IÎ $\pm$ 95 %) a fost de 8,7 % $\pm$ 0,7 %. Plasma cu zero IFN- γ a avut un CV% de 26,1. Acest nivel de variație este preconizat deoarece concentrația de IFN- γ calculată este mică, iar variația în jurul unei valori mici estimate pentru concentrație va fi mai mare decât în cazul concentrațiilor mai mari.

Informații tehnice

Rezultate neconcludente

Rezultatele neconcludente pot fi legate de starea imunitară a individului care este testat, dar pot fi, de asemenea, legate de un număr de factori tehnici:

- Scurgerea unui interval de timp de peste 16 ore de la recoltarea probei de sânge până la incubarea la 37 °C
- Păstrarea sângelui în afara intervalului de temperatură recomandat (22 °C ± 5 °C)
- Amestecarea insuficientă a tuburilor de recoltare a sângelui
- Spălare insuficientă a plăcii ELISA

Dacă sunt suspectate probleme tehnice legate de recoltarea sau manipularea probelor de sânge, repetați întregul test QF-CMV cu eșantioane de sânge noi. Repetarea testului ELISA asupra probelor de plasmă stimulată poate fi realizată dacă este suspectată vreo abatere de la procedurile testului ELISA. Nu este de așteptat ca rezultatele neconcludente (bazate pe valori Mitogen scăzute) să se schimbe la repetare, cu excepția cazului în care a survenit o eroare în timpul testului ELISA.

Probe de plasmă coagulate

În cazul în care apar cheaguri de fibrină în urma stocării pe termen lung a probelor de plasmă, centrifugați probele pentru a sedimenta substanța coagulată și a facilita pipetarea plasmei.

Ghid de depanare

Acest ghid de depanare poate fi util pentru rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, consultați și Informațiile tehnice furnizate la adresa **www.QuantiFERON.com**. Pentru informații de contact, consultați coperta spate.

Comentarii și sugestii

Valori scăzute ale densității optice a standardelor

- | | |
|--|---|
| a) Eroare la diluția standardului | Asigurați-vă că diluțiile standardului din kit sunt preparate corect, conform QF-CMV ELISA Package Insert. |
| b) Eroare la pipetare | Asigurați-vă că pipetele sunt calibrate și utilizate conform instrucțiunilor producătorului. |
| c) Temperatură de incubare prea mică | Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| d) Timp de incubare prea scurt | Incubarea plăcii cu conjugat, standarde și probe trebuie să dureze 120 ± 5 minute. Soluția de substrat enzimatic este incubată pe placă timp de 30 de minute. |
| e) Filtru necorespunzător utilizat pentru cititorul de plăci | Placa trebuie citită la 450 nm, cu un filtru de referință între 620 și 650 nm. |
| f) Reactivii sunt prea reci | Toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100x, trebuie aduși la temperatura camerei înainte de începerea testării. Această operațiune durează aproximativ 1 oră. |
| g) Kitul/componentele a(u) expirat | Asigurați-vă că utilizați kitul înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100x reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii. |

Colorare nespecifică

- | | |
|---|--|
| a) Spălare incompletă a plăcii | Spălați placa de cel puțin șase ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de șase cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri. |
| b) Contaminare încrucișată a godeurilor ELISA | Aveți grijă când pipetați sau amestecați proba pentru a minimaliza riscul. |
| c) Kitul/componentele a(u) expirat | Asigurați-vă că utilizați kitul înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100x reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii. |

Comentarii și sugestii

- | | |
|--|--|
| d) Soluție de substrat enzimatic este contaminată | Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi. |
| e) Omogenizarea plasmei în tuburile de centrifugare înainte de recoltări | Asigurați-vă că probele de plasmă sunt recoltate cu atenție de la suprafața gelului fără pipetare verticală, procedând cu atenție pentru a nu afecta materialul de la suprafața gelului. |

Fond ridicat

- | | |
|---|---|
| a) Spălare incompletă a plăcii | Spălați placa de cel puțin șase ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de șase cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri. |
| b) Temperatură de incubare prea mare | Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (22 °C ± 5 °C). |
| c) Kitul/componentele a(u) expirat | Asigurați-vă că utilizați kitul înainte de data de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100x reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii. |
| d) Soluție de substrat enzimatic este contaminată | Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi. |

Curbă standard neliniară și variabilitate între duplicate

- | | |
|--|---|
| a) Spălare incompletă a plăcii | Spălați placa de cel puțin șase ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de șase cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri. |
| b) Eroare la diluția standardului | Asigurați-vă că diluțiile standardului din kit sunt preparate corect, conform acestui prospect. |
| c) Omogenizare insuficientă | Amestecați bine reactivii prin răsturnarea acestora sau cu mișcări circulare înainte de adăugării lor pe plăcuță. |
| d) Tehnică de pipetare inconsecventă sau întrerupere în timpul configurării testului | Adăugarea probei și a standardului trebuie efectuată în mod continuu. Toți reactivii trebuie preparați înainte de a începe testul. |

Informațiile despre produs și îndrumările tehnice vă sunt puse la dispoziție gratuit de către QIAGEN, prin intermediul distribuitorului local sau al site-ului **www.QuantiFERON.com**.

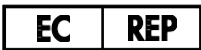
Referințe

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.

Simboluri

Pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:

Simbol	Definiția simbolului
	Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții
	Data de expirare
	Marcaj CE
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	Număr de catalog
	Număr de lot
	Număr material
	Numărul global de articol comercial (GTIN)
	Limită de temperatură
	A nu se refolosi
	A se păstra ferit de razele soarelui
	Consultați instrucțiunile de utilizare
	Producător
	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană

Date de contact

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru asistență tehnică la adresa **www.qiagen.com/Support**, apălați numărul de telefon 00800-22-44-6000 sau contactați Departamentele de servicii tehnice ale QIAGEN sau distribuitorii locali (a se vedea coperta a patra sau vizitați **www.qiagen.com**).

Procedura de testare ELISA pe scurt

Etapa 1: Incubarea sângelui

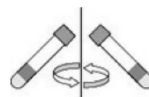
1. Recoltați sângele pacientului în tuburile de recoltare a sângelui și agitați tuburile de zece (10) ori cu suficientă fermitate pentru a vă asigura că întreaga suprafață interioară a tubului este acoperită cu sânge, pentru a dizolva antigenii de pe pereții tubului.



2. Incubați tuburile în poziție verticală la $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 16 până la 24 de ore.



3. După incubare, centrifugați tuburile timp de 15 minute la 2.000 până la 3.000 RCF (*g*) pentru a separa plasma și hematiile.



4. După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.



Etapa 2: IFN- γ ELISA

1. Aduceți componentele kitului ELISA, cu excepția conjugatului concentrat 100 $\times$, la temperatura camerei timp de cel puțin 60 de minute.



2. Reconstituiți standardul din kit la o concentrație de 8,0 UI/ml cu apă distilată sau deionizată. Preparați patru (4) diluții ale standardului.



3. Reconstituiți conjugatul liofilizat 100× liofilizat cu apă distilată sau deionizată.

4. Preparați conjugatul în concentrație de lucru în Diluant verde și adăugați 50 µl în toate godeurile.



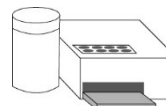
5. Adăugați 50 µl din probele de plasmă pentru testare și 50 µl de standarde în godeurile corespunzătoare. Amestecați folosind agitatorul.



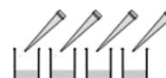
6. Incubați timp de 120 de minute la temperatura camerei.



7. Spălați godeurile de cel puțin 6 ori cu 400 µl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu.



8. Adăugați 100 µl de soluție de substrat enzimatic în godeuri. Amestecați folosind agitatorul.



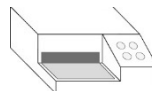
9. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei.



10. Adăugați 50 μ l de soluție de inhibitor enzimatic în toate godeurile. Amestecați folosind agitatorul.



11. Citiți rezultatele la 450 nm folosind un filtru de referință între 620 și 650 nm



12. Analizați rezultatele.



Istoricul revizuirilor manualului

Document	Modificări	Data
L1075110-R06	Materiale necesare, dar nefurnizate, capace de plăci adăugate, pagina 9	Octombrie 2019

Această pagină a fost lăsată liberă în mod intenționat

Această pagină a fost lăsată liberă în mod intenționat

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

Acord de licență limitată pentru QuantiFERON-CMV ELISA

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în panou. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest panou cu orice componentă care nu este inclusă în acest panou, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul ghid și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com. Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest panou și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest panou și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul panoului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile sale de proprietate intelectuală legate de panou și/sau componentele acestuia.

Pentru clauzele de licență actualizate, consultați www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

