

Říjen 2019

QuantiFERON[®]-CMV ELISA, příbalová informace



Test IFN- γ z plné krve ke zjištění odpovědí na peptidové antigeny lidského cytomegaloviru



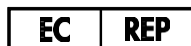
Pro diagnostické použití in vitro



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NĚMECKO

1075110 Rev. 06



www.QuantiFERON.com

Obsah

Účel použití.....	5
Shrnutí a vysvětlení	5
Princip postupu.....	6
Čas potřebný k provedení testu	7
Dodávané materiály	8
Obsah sady.....	8
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky	9
Varování a bezpečnostní opatření.....	9
Informace o bezpečnosti	11
Skladování reagentů a manipulace s nimi	12
Odběr vzorku a manipulace.....	13
Postup	15
Fáze 1: Inkubace krve a sběr plazmy.....	15
Fáze 2: Test QuantiFERON-CMV ELISA pro lidský IFN- γ	16
Výpočty a interpretace testu	21
Vytvoření standardní křivky (pokud se nepoužívá analyzační software QF-CMV).....	21
Kontrola kvality testu	22
Interpretace výsledků	23
Omezení	24
Očekávané hodnoty	24
Funkční charakteristiky.....	27
Klinická funkce	27
Prahová hodnota testu	28

Klinické studie	28
Specifická	28
Citlivost	29
Studie dokládající klinickou využitelnost	29
Mezinárodní konsenzus o léčbě infekce cytomegalovirem u pacientů s transplantovanými solidními orgány	34
Charakteristika funkčních vlastností analýzy	35
Technické údaje	37
Nejednoznačné výsledky	37
Sražení vzorků plazmy	37
Řešení problémů	38
Literatura	40
Symboly	42
Kontaktní údaje	43
Zkrácený postup testu ELISA	44
Fáze 1: Inkubace krve	44
Fáze 2: IFN- γ ELISA	44
Historie revizí příručky	47

Účel použití

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) je metoda analýzy in-vitro využívající směs peptidů, která simuluje bílkoviny lidského cytomegaloviru (cytomegalovirus, CMV), ke stimulaci buněk v heparinizované plné krvi. Detekce interferonu gama (IFN- γ) pomocí enzymově vázaného imunosorbentního testu (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) se používá ke kvantifikaci in vitro reakcí na tyto peptidové antigeny související s reakcí imunitního systému na infekci virem CMV. Ztráta této imunitní funkce může souviset s rozvojem onemocnění cytomegalovirem (CMV). Test QF-CMV je určen k monitorování úrovně obranyschopnosti pacienta proti viru CMV.

Test QF-CMV neslouží k určení infekce CMV a neměl by být používán k vyloučení možnosti infekce CMV.

Shrnutí a vysvětlení

CMV je herpesvirus, kterým je infikováno 50–85 % dospělých osob v populaci. Je častou komplikací při imunosupresivní léčbě, obzvláště po transplantaci, a může významně přispívat k morbiditě a mortalitě u příjemců transplantovaných orgánů. Současné způsoby imunosupresivní léčby používané k zabránění odmítnutí transplantovaného orgánu mají zhoubný vliv na T-lymfocyty a buněčnou imunitní (cell-mediated immune, CMI) odpověď, což má za následek zvýšenou náchylnost k virovým infekcím po transplantaci. Důležitost funkce T-buněk při potlačování replikace viru CMV je také podepřena skutečností, že CD8⁺ CMV specifické cytotoxické T-lymfocyty (CTL) mohou chránit před patogenezí virové nákazy. Výpočet CD8⁺ CMV specifických CTL u pacientů pod imunosupresivy a tvorba IFN- γ může být prediktivní při výpočtu rizika vzniku onemocnění CMV. Tvorba IFN- γ může být funkční náhražkou pro identifikaci CMV specifických CTL.

QF-CMV je test, který analyzuje odpovědi CMI na peptidové antigeny, které simulují bílkoviny CMV. Peptidy CMV jsou určeny k tomu, aby cílily na T buňky CD8+, včetně A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 a Cw6 (A30, B13) haplotypy HLA třídy I pokrývající > 98 % lidské populace. Krev osob infikovaných virem CMV obvykle obsahuje lymfocyty CD8+, které tyto antigeny rozpoznávají. Tento proces rozpoznávání zahrnuje vytvoření a sekreci cytokinu, IFN- γ . Základem tohoto testu je pak detekce a následná kvantifikace IFN- γ .

Princip postupu

Test QF-CMV se provádí ve dvou fázích. Nejprve se odebere plná krev do každé zkumavky QF-CMV pro odběr krve, mezi něž patří zkumavka Nil Control, zkumavka CMV Antigen, a zkumavka Mitogen.

Zkumavka Mitogen se používá při testu QF-CMV jako pozitivní kontrola. Toho lze využít obzvláště v případech, kdy existují pochybnosti o stavu imunitního systému osoby. Zkumavka Mitogen může také sloužit jako kontrola pro správné zacházení s krví a inkubaci.

Zkumavky je nutné co nejdříve inkubovat při teplotě 37 °C (do 16 hodin od odběru). Po uplynutí 16–24 hodin inkubace se zkumavky odstředí, odstraní se plazma a pomocí testu QF-CMV ELISA se změří množství IFN- γ (IU/ml).

Množství IFN- γ ve vzorcích plazmy ze zkumavek CMV Antigen a Mitogen může často být vyšší než horní limity většiny čteček ELISA, a to i případě mírné imunosuprese u vyšetřovaných osob. Pro kvalitativní výsledky použijte hodnoty vypočtené pro neředěnou plazmu. Pro kvantitativní výsledky, pokud jsou zapotřebí skutečné hodnoty IU/ml, je nutné vzorky plazmy zředit 1/10 v zeleném ředicím roztoku a testovat pomocí ELISA společně s neředěnou plazmou.

Poznámka: Pro vzorky, které jsou v rozmezí testu QF-CMV ELISA (tj. do 10 IU/ml), je nutné použít výsledek získaný ze vzorku neředěné plazmy. Pro takové koncentrace IFN- γ mohou být hodnoty získané pomocí ředění vzorků plazmy 1/10 nepřesné.

Test je považován za reaktivní na odezvu IFN- γ , pokud je hodnota zkumavky CMV Antigen významně vyšší než hodnota Nil IFN- γ v IU/ml. Vzorky mitogenem stimulované plazmy slouží jako pozitivní kontrola IFN- γ pro každý testovaný vzorek. Nízká odezva na mitogen označuje nejednoznačný výsledek, pokud má vzorek krve také nereaktivní odezvu na antigeny CMV. K této situaci může docházet při nedostatku lymfocytů, snížené aktivitě lymfocytů v důsledku nesprávného zacházení se vzorkem, nesprávného plnění/mísení zkumavky Mitogen nebo neschopnosti lymfocytů pacienta vytvářet IFN- γ – například u pacientů, kteří v nedávné době podstoupili transplantaci. Vzorkem Nil se provádí korekce pozadí nebo nespecifického IFN- γ v krevních vzorcích. Hladina IFN- γ zkumavky Nil se odečte od hladiny IFN- γ pro zkumavku CMV Antigen a zkumavku Mitogen (viz kapitola „Interpretace výsledků“ na straně 23 této příbalové informace, kde naleznete přehled interpretace výsledků QF-CMV).

Čas potřebný k provedení testu

Odhadovaný čas potřebný k provedení testu QF-CMV je uveden níže; rovněž je uveden čas potřebný k testování více vzorků v dávkovém zpracování:

Inkubace zkumavek s krví při 37 °C:	16–24 hodin
ELISA:	Cca. 3 hodiny na jednu destičku ELISA
	Méně než 1 hodina práce
	Pro každou další destičku přidejte 10–15 minut

Dodávané materiály

Obsah sady

Zkumavky pro odběr krve (balení pro jednoho pacienta)	
Katalogové č.	0192-0301
Počet stanovení	1
QuantIFERON Nil Control (Kontrola QuantiFERON Nil) (šedý uzávěr)	1 zkumavka
QuantIFERON CMV Antigen (Antigen QuantiFERON CMV) (modrý uzávěr)	1 zkumavka
QuantIFERON Mitogen Control (Kontrola QuantiFERON Mitogen) (fialový uzávěr)	1 zkumavka
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Příbalová informace pro zkumavky QF-CMV pro odběr krve)	1

Test QuantiFERON-CMV ELISA	Souprava ELISA se 2 destičkami
Katalogové č.	0350-0201
Stripy s mikrotitračními destičkami (12 × 8 jamek) pokryté myší monoklonální protilátkou proti lidskému IFN- γ	2 sady stripů mikrotitračních destiček s 12 × 8 jamkami
Lidský IFN- γ standard, lyofilizovaný (obsahuje rekombinantní lidský IFN- γ , bovinní kasein, Thimerosal 0,01 % hm./obj.)	1 x lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)
Green Diluent (Zelený ředící roztok) (obsahuje bovinní kasein, normální myší sérum, Thimerosal 0,01 % hm./obj.)	1 × 30 ml
Lyofilizovaný konjugovaný 100x koncentrát (myší protilátka proti lidskému IFN- γ -HRP, obsahuje Thimerosal 0,01 % hm./obj.)	1 × 0,3 ml
20x koncentrát promývacího pufru (pH 7,2; obsahuje ProClin® 300 0,05 % obj.)	1 × 100 ml
Roztok enzymového substrátu (obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'- tetramethylbenzindin)	1 × 30 ml
Zastavovací roztok pro enzymatické testy; (obsahuje 0,5M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
Příbalová informace k testu QF-CMV ELISA	1

* Obsahuje kyselinu sírovou. Bezpečnostní upozornění viz strana 9.

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi noste vždy vhodný laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

- Inkubátor 37 °C; CO₂ není vyžadován.
- Kalibrované pipety s proměnným objemem pro výdej 10–1 000 µl s jednorázovými špičkami.
- Kalibrovaná vícekanálová pipeta pro dávkování 50 a 100 µl s jednorázovými špičkami.
- Třepačka mikrotitračních destiček
- Deionizovaná nebo destilovaná voda, 2 litry
- Promývačka mikrotitračních destiček (doporučuje se automatizovaná promývačka).
- Čtečka mikrodestiček s filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm.
- Víčko destičky

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

Při práci s chemikáliemi noste vždy vhodný laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Ty jsou k dispozici online v praktickém a kompaktním formátu PDF na webových stránkách **www.qiagen.com/safety**, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou soupravu a součást soupravy QIAGEN®.

UPOZORNĚNÍ

S lidskou krví zacházejte jako s potenciálně infekční. Dodržujte příslušné postupy pro zacházení s krví.

Na komponenty soupravy QuantiFERON-CMV ELISA se vztahují následující věty o nebezpečnosti a bezpečnostní opatření.

Zastavovací roztok pro enzymatické testy QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Obsahuje: kyselinu sírovou. Varování! Může způsobovat korozi kovů. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Varování! Způsobuje mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

QuantiFERON Green Diluent

Obsahuje: 5-hydroxy-1-(4-sulfofenyl)-4-(4-sulfofenylazo)pyrazol-3-karboxylát sodný. Obsahuje: tartrazin. Varování! Může vyvolat alergickou kožní reakci. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Obsahuje: ProClin 300. Škodlivý pro vodní organismy s dlouhodobými účinky. Zabraňte uvolnění do prostředí.

Informace o bezpečnosti

Další informace

- Odchyly od informací uvedených v příbalové informaci QF-CMV mohou způsobit chybné výsledky. Před použitím si prosím pečlivě přečtete pokyny.
- Nepoužívejte soupravu, pokud jakákoliv láhev s činidlem vykazuje před použitím známky poškození nebo netěsnosti.
- **Důležité:** Před použitím zkontrolujte lahvičky. Nepoužívejte konjugované lahvičky ani lahvičky standardu IFN- γ , pokud vykazují známky poškození nebo pokud došlo k porušení pryžového těsnění. Nemanipulujte s poškozenými lahvičkami. S použitím náležitých bezpečnostních opatření lahvičky bezpečně zlikvidujte.

Doporučení: K otevření konjugovaných lahviček nebo lahviček standardu IFN- γ použijte dekrimpovací kleštičky, čímž se minimalizuje riziko zranění nalisovaným kovovým víčkem.

- Nepoužívejte společně stripy mikrotitračních destiček, lidský IFN- γ standard, zelený ředící roztok nebo konjugovaný 100 $\times$ koncentrát z různých šarží souprav QF-CMV. Ostatní činidla (20 $\times$ koncentrát promývacího pufru, roztok enzymového substrátu a zastavovací roztok pro enzymatické testy) mohou být používána z různých šarží souprav za předpokladu, že u činidel nevypřela doba použitelnosti a že jsou zaznamenány informace o dané šarži.
- Nepoužitá činidla a biologické vzorky likvidujte v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- Zkumavky QF-CMV pro odběr krve ani soupravy QF-CMV ELISA nepoužívejte po vypršení doby použitelnosti.
- Ujistěte se, že laboratorní vybavení, například promývačky a čtečky destiček, byly kalibrovány/validovány pro použití.

Skladování reagensií a manipulace s nimi

Zkumavky pro odběr krve

- Zkumavky QF-CMV pro odběr krve skladujte při teplotě 4–25 °C.
- Zkumavky QF-CMV pro odběr krve by v době plnění krví měly mít teplotu 17–25 °C.
- Doba skladovatelnosti zkumavek QF-CMV pro odběr krve je maximálně 15 měsíců od data výroby, pokud jsou skladovány při teplotě 4–25 °C.

Reagenční činidla soupravy ELISA

- Soupravu uchovávejte při teplotě 2–8 °C.
- Roztok enzymového substrátu vždy chraňte před přímým slunečním světlem.

Rekonstituovaná a nepoužitá činidla

Pokyny ke způsobu rekonstituce reagenčních činidel naleznete v oddílu „Fáze 2: Test QuantiFERON-CMV ELISA pro lidský IFN- γ „ (kroky 3 a 5 na stranách 16 a 18).

- Rekonstituovaný lidský IFN- γ standard lze uchovávat až 3 měsíce, pokud je skladován při teplotě 2–8 °C. Poznamenejte si datum, kdy byl lidský IFN- γ standard rekonstituován.
- Po rekonstituci musí být nespotřebovaný konjugovaný 100 $\times$ koncentrát znovu uskladněn při teplotě 2–8 °C a spotřebován do 3 měsíců.
Poznačte si datum, kdy byl konjugát rekonstituován.
- Pracovní roztok konjugátu musí být použit do 6 hodin od přípravy.
- Pracovní promývací pufr může být uchován při pokojové teplotě (22 °C $\pm$ 5 °C) po dobu až 2 týdnů.

Odběr vzorku a manipulace

Test QF-CMV využívá následující zkumavky pro odběr krve:

- Kontrola Nil (šedý uzávěr),
- CMV Antigen (modrý uzávěr),
- Kontrola Mitogen (fialový uzávěr).

Antigeny jsou vysušeny na vnitřní stěně zkumavek pro odběr krve, proto je nezbytné, aby byl obsah zkumavek důkladně promísen s krví. Zkumavky musí být co nejdříve přeneseny do inkubátoru při teplotě 37 °C (do 16 hodin od odběru).

Pro získání optimálních výsledků dodržujte následující postupy:

1. Každému pacientovi odeberte 1 ml krve ze žíly přímo do každé ze zkumavek pro odběr krve testu QF-CMV. Tento postup musí provádět pracovník vyškolený ve flebotomii.

Zkumavky QF-CMV pro odběr krve mohou být používány do nadmořské výšky 810 metrů.

Pokud jsou zkumavky QF-CMV pro odběr krve použity v nadmořské výšce nad 810 m nebo v případě nízkého objemu odebrané krve je možné odebrat krev pomocí stříkačky a 1 ml ihned přenést do každé ze tří zkumavek. Z bezpečnostních důvodů je nejvhodnější odstranit jehlu ze stříkačky, zajistit náležitě bezpečnostní postupy, odstranit víčka ze tří zkumavek QF-CMV pro odběr krve a přidat 1 ml krve do každé z nich (po černou značku na boční straně štítku každé zkumavky). Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle níže uvedeného popisu. Vzhledem k tomu, že krev do zkumavek o objemu 1 ml vtéká relativně pomalu, udržujte zkumavku na jehle po dobu 2–3 sekund. Jakmile se zdá, že zkumavka je plná, ujistěte se, že je získán správný objem.

Černá značka na boční straně zkumavek označuje objem plnění 1 ml. Zkumavky QF-CMV pro odběr krve byly validovány pro objemy od 0,8 do 1,2 ml. Jestliže hladina krve v kterékoliv zkumavce není v blízkosti značky, je nutné odebrat nový vzorek krve.

Jestliže se k odběru krve používá motýlková jehla, je nutné před použitím zkumavek QF-CMV pro odběr krve použít „odvzdušňovací“ zkumavku k zajištění, že je hadička naplněna krví.

Krev může být také odebrána do jedné běžné odběrové zkumavky obsahující heparin lithný jako antikoagulant a poté přenesena do zkumavek QF-CMV pro odběr krve. Jako antikoagulant používejte pouze heparin lithný, protože ostatní antikoagulanty mohou narušovat průběh testu. Naplňte zkumavku pro odběr krve (minimální objem 5 ml) a jemně promíchejte tak, že zkumavku několikrát převrátíte dnem vzhůru, aby došlo k rozpuštění heparinu. Tento postup musí provádět pracovník vyškolený ve flebotomii. Než bude krev přenesena do zkumavek QF-CMV pro odběr krve k inkubaci, která musí být zahájena do 16 hodin od odběru, musí být uchována při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2. Ihned po naplnění zkumavek QF-CMV pro odběr krve zkumavky 10krát dobře protřepejte tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.

Zkumavky by v době plnění krví měly být uchovány při teplotě $17\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příliš silné třepání může narušit gel a mohlo by vést k neplatným výsledkům.

Pokud byla krev odebrána do zkumavky s heparinem lithným, je nutné vzorky před přenesením do zkumavky QF-CMV pro odběr krve rovnoměrně promíchat. Ujistěte se, že je krev důkladně promíchána jemným obrácením zkumavky těsně před dávkováním krve. Rozdělte alikvotní podíly o objemu 1 ml (jeden do každé zkumavky QF-CMV pro odběr krve) do příslušných zkumavek Nil, CMV Antigen a Mitogen. To je nutné provést asepticky, zajistit náležitě bezpečnostní postupy, odstranit víčka ze tří zkumavek QF-CMV pro odběr krve a přidat 1 ml krve do každé z nich (po černou značku na boční straně štítku každé zkumavky). Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle výše uvedeného popisu.

3. Označte zkumavky příslušným způsobem.

Ujistěte se, že je možné každou zkumavku (Nil, CMV Antigen, Mitogen) identifikovat štítkem nebo jinými prostředky.

4. Po naplnění, protřepání a označení štítkem musí být zkumavky co nejdříve přeneseny do inkubátoru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (do 16 hodin od odběru). Před inkubací uchovávejte zkumavky při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Krevní vzorky nechladte ani nezmrazujte.

Postup

Fáze 1: Inkubace krve a sběr plazmy

1. Zkumavky inkubujte ve SVISLÉ poloze při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 16–24 hodin. Inkubátor nevyžaduje CO_2 ani zvlhčování.

Důležité: Jestliže krev nebude inkubována ihned po odběru, před inkubací zkumavky opět promíchejte tak, že je 10krát převrátíte.

Po inkubaci mohou být zkumavky na odběr krve uchovány před odstředěním při teplotě $4\text{--}27\text{ °C}$ po dobu až 3 dnů.

2. Po inkubaci zkumavek při teplotě 37 °C usnadníte sběr plazmy tím, že zkumavky podrobíte 15minutovému odstředování při 2 000–3 000 RCF (g). Gelová zátká oddělí buňky od plazmy. Pokud k tomu nedojde, je nutné zkumavky odstředít znovu.

Plazmu je možné sbírat bez odstředění, avšak je nutné věnovat větší péči při odstraňování plazmy, aniž by došlo k rozvíření buněk.

3. Po odstředění se před odběrem vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

Důležité: Vzorky plazmy je možné odebírat pouze pomocí pipety.

Vzorky plazmy je možné naplnit přímo z odstředěných zkumavek pro odběr krve do destičky QF-CMV ELISA, včetně případů, kdy jsou použity automatizované pracovní stanice ELISA.

Vzorky plazmy je možné uchovat v odstředěných zkumavkách QF-CMV pro odběr krve až po dobu 28 dní při teplotě $2\text{--}8\text{ °C}$ nebo po delší dobu, pokud je plazma sebrána, při teplotě nižší než -20 °C (nejlépe nižší než -70 °C).

Aby byl objem vzorků pro testování dostatečný, je třeba získat alespoň 150 μl plazmy.

Fáze 2: Test QuantiFERON-CMV ELISA pro lidský IFN- γ

Materiály potřebné k provedení testu ELISA viz „Obsah sady“, strana 8 a „Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky“, strana 9.

1. Všechny vzorky plazmy a činidla, kromě konjugátu 100× koncentráту, musí být před použitím ohřáty na pokojovou teplotu ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nechte temperovat alespoň 60 minut.
2. Z rámečku destičky ELISA vyjměte stripy, které nejsou vyžadovány, opět zalepte fólií, a vraťte do chladničky do doby, kdy je budete potřebovat.

Ponechte alespoň jeden strip pro standardy QF-CMV ELISA a dostatečné množství stripů pro počet pacientů, které máte testovat. Po použití rámeček uchovejte a uzavřete pro použití se zbývajícími stripy.

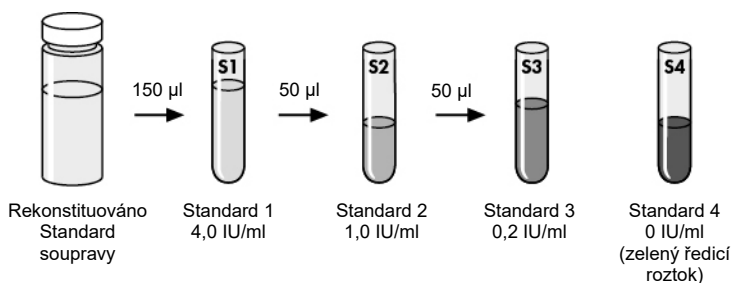
3. Rekonstituujte standard soupravy pro lidský IFN- γ deionizovanou nebo destilovanou vodou o objemu uvedeném na štítku lahvičky. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění, a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění. Rekonstitucí standardu IFN- γ na správný objem se získá roztok o koncentraci 8,0 IU/ml.

Poznámka: Rekonstituční objem standardu soupravy pro lidský IFN- γ se bude mezi jednotlivými dávkami lišit.

Pomocí rekonstituovaného standardu připravte řadu ředění pro čtyři koncentrace IFN- γ v zeleném ředicím roztoku (GD) (Obrázek 1 na následující straně). S1 (standard 1) obsahuje 4,0 IU/ml, S2 (standard 2) obsahuje 1,0 IU/ml, S3 (standard 3) obsahuje 0,25 IU/ml a S4 (standard 4) obsahuje 0 IU/ml (samotný zelený ředicí roztok GD). Standardy musí být otestovány alespoň v duplikátu. Připravte čerstvá ředění standardu soupravy pro každou relaci analýzy ELISA.

Příklad postupu postup pro duplikát standardů

Příklad postupu postup pro duplikát standardů	
A	Označte čtyři zkumavky: S1, S2, S3, S4
B	Do zkumavek S1, S2, S3 a S4 přidejte 150 μ l ředícího roztoku GD
C	Přidejte 150 μ l standardu soupravy do zkumavky S1 a důkladně promíchejte
D	Přeneste 50 μ l ze zkumavky S1 do zkumavky S2 a důkladně promíchejte
E	Přeneste 50 μ l ze zkumavky S2 do zkumavky S3 a důkladně promíchejte
F	Zelený ředící roztok (GD) samotný slouží jako nulový standard (S4)



Obrázek 1. Příprava standardní křivky sériovým ředěním.

- Lyofilizovaný konjugovaný 100 $\times$ koncentrát rekonstituujte pomocí 0,3 ml deionizované nebo destilované vody. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění, a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění konjugátu.

Pracovní konjugát se připravuje zředěním požadovaného množství rekonstituovaného konjugovaného 100 $\times$ koncentráту v zeleném ředícím roztoku (viz Tabulka 1 na následující straně).

Důkladně avšak jemně promíchejte, aby nedošlo k napěnění.

Okamžitě po použití uložte případný nespotřebovaný konjugovaný 100 $\times$ koncentrát při teplotě 2–8 $^{\circ}$ C.

Použijte pouze zelený ředící roztok.

Tabulka 1. Příprava pracovního konjugátu

Počet stripů	Objem konjugovaného 100× koncentrátu	Objem zeleného ředícího roztoku
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. Vzorky plazmy shromážděné ze zkumavek na odběr krve, které byly následně zmrazeny nebo uchovávány déle než 24 hodin před provedením testu, před přidáním do jamky testu ELISA důkladně promíchejte.

Důležité: Jestliže mají být vzorky plazmy přidány přímo z odstředěných zkumavek QF-CMV pro odběr krve, plazmu v žádném případě nepromíchejte. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

6. Jsou-li zapotřebí kvantitativní výsledky, zřed'te také plazmy CMV a Mitogen 1/10 v zeleném ředícím roztoku (10 µl plazmy + 90 µl zeleného ředícího roztoku). Plazma Nil nesmí být ředěna.

Doporučuje se paralelně testovat následující vzorky:

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

Analyzační software QuantiFERON-CMV však také podporuje následující možnosti pro vzorky pacientů:

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. Pomocí vícekanálové pipety přidejte 50 µl čerstvě připraveného pracovního konjugátu do potřebných jamek testu ELISA.
8. Do příslušných jamek přidejte 50 µl testovaných vzorků plazmy. Nakonec do příslušných jamek přidejte 50 µl každého ze standardů 1 až 4. Standardy by měly být analyzovány alespoň v duplikátu.
9. Zakryjte destičku ELISA a promíchejte důkladně konjugát a vzorky plazmy/standards pomocí třepačky mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty při otáčkách 500 až 1 000 ot/min. Zabraňte stříkání.
10. Zakryjte destičku ELISA a inkubujte při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 120 ± 5 minut.

Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu. Odchýlení od předepsaného rozmezí teplot může vést k chybným výsledkům.

11. Během inkubace připravte pracovní promývací pufr. Zředte jeden díl promývacího pufru $20\times$ koncentrátu 19 díly deionizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte.

K dispozici je dostatek $20\times$ koncentrátu promývacího činidla k přípravě 2 litrů pracovního promývacího pufru.

12. Po dokončení inkubace destičky ELISA jamky promyjte 400 µl pracovního promývacího pufru alespoň v šesti cyklech. Doporučuje se použít automatizovanou promývačku destiček.

Důležité: Důkladné promytí je pro výkon analýzy velmi důležité. Ujistěte se, že je každá jamka při každém promývacím cyklu úplně naplněna promývacím pufrem až po okraj. Doporučuje se ponechat jamky mezi každým cyklem namočené alespoň po dobu 5 sekund.

Do odpadního zásobníku by měl být přidán standardní laboratorní dezinfekční prostředek a je nutné dodržovat zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.

13. Poklepejte na destičky orientované otvory směrem dolů na savou utěrku nepouštějící vlákna, abyste odstranili zbytky promývacího pufru. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku enzymového substrátu, zakryjte destičku víčkem a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty při 500 až 1 000 ot/min.

14. Zakryjte každou destičku a inkubujte při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 30 minut. Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.

-
15. Po 30minutové inkubaci do každé jamky přidejte 50 µl zastavovacího roztoku pro enzymatické testy ve stejném pořadí jako při přidávání substrátu a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrotitračních destiček při 500 až 1 000 ot/min.
 16. Změřte optickou hustotu (OD) každé jamky během 5 minut od zastavení reakce pomocí čtečky mikrodestiček s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem 620 nm až 650 nm. Hodnoty OD budou použity k výpočtu výsledků.

Výpočty a interpretace testu

Analyzační software QuantiFERON-CMV pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků lze získat od společnosti QIAGEN na adrese www.QuantiFERON.com. Ověřte, že používáte nejnovější verzi softwaru pro analýzu QF-CMV.

Software provádí vyhodnocení kontroly kvality analýzy, vytváří standardní křivku a poskytuje výsledky testu pro každého pacienta, jak je uvedeno v oddílu „Interpretace výsledků“ na straně 23. Software vykazuje nejnižší ředění, které generuje výsledek v rozmezí testu QF-CMV ELISA, a bere v úvahu faktor ředění.

Jako alternativa k použití analyzačního softwaru QF-CMV je možné výsledky stanovit pomocí následujících metody.

Vytvoření standardní křivky (pokud se nepoužívá analyzační software QF-CMV)

Určete střední hodnoty OD replikátů standardů soupravy na každé destičce.

Sestavte standardní křivku $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ vynesáním hodnoty $\log_{(e)}$ středních hodnot OD (na ose y) proti hodnotám $\log_{(e)}$ standardní koncentrace IFN- γ v IU/ml (na ose x), s vynecháním nulového standard z výpočtů. Pomocí regresní analýzy vypočítejte linii nejlepší shody pro standardní křivku.

Standardní křivku použijte ke stanovení koncentrace IFN- γ (IU/ml) pro každý testovaný vzorek plazmy s použitím hodnoty OD každého vzorku.

Tyto výpočty je možné provádět pomocí softwarových balíčků, které jsou k dispozici pro čtečky mikrotitračních destiček, a standardního tabulkového procesoru nebo statistického softwaru (například Microsoft® Excel®). Doporučuje se, aby byly tyto balíčky použity k výpočtu regresní analýzy, koeficientu variace (Coefficient of Variation, %CV) pro standardy a korelačního koeficientu (r) standardní křivky.

Je třeba vykázat výsledek z nejnižšího ředění, které generuje výsledek v rozmezí testu QF-CMV ELISA; s tím, že kde je to relevantní, bude vzat v úvahu faktor ředění.

Kontrola kvality testu

Přesnost výsledků testu závisí na vytvoření přesné standardní křivky. Proto musí být výsledky odvozené od standardů před interpretací výsledky testů vzorků prošetřeny.

Aby byla analýza ELISA platná:

- Střední hodnota OD pro standard 1 musí být $\geq 0,600$.
- %CV pro OD hodnoty replikátu standardu 1 a standardu 2 musí být $< 15 \%$.
- OD hodnoty replikátu pro standardy 3 a 4 se nesmí lišit o více než 0,040 jednotek optické hustoty od jejich střední hodnoty.
- Korelační koeficient (r) vypočtený ze středních hodnot absorbance těchto standardů musí být $\geq 0,98$.

Software pro analýzu QF-CMV vypočítá tyto parametry kontroly kvality a vytvoří zprávu. Pokud výše uvedená kritéria nejsou splněna, bude cyklus testu neplatný a musí být zopakován.

Střední hodnota OD pro nulový standard (zelený ředící roztok) musí být $\leq 0,150$. Jestliže je střední hodnota OD $> 0,150$, je nutné prověřit postup promývání destiček.

Interpretace výsledků

Výsledky testu QuantiFERON-CMV jsou interpretovány pomocí kritérií uvedených v Tabulka 2.

Tabulka 2. Interpretace výsledků testu QuantiFERON-CMV

Nil (IU/ml)	CMV minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Výsledek testu QF-CMV	Vykázaný výsledek/Interpretace
≤8,0	≥0,20 a ≥25 % hodnoty Nil	Jakýkoliv	Reaktivní†	Protilátky proti CMV detekovány
	<0,20 NEBO ≥0,20 a <25 % hodnoty Nil	≥0,5	Nereaktivní	Protilátky proti CMV NEBYLY detekovány
		<0,5	Nejednoznačný‡	Výsledky jsou z hlediska odezvy CMV nejednoznačné
>8,0§	Jakýkoliv	Jakýkoliv	Nejednoznačný‡	Výsledky jsou z hlediska odezvy CMV nejednoznačné

* Odezvy na pozitivní kontrolu Mitogen (a příležitostně na antigeny CMV) mohou být běžně mimo rozsah čtečky mikrotitračních destiček. To nemá žádný dopad na výsledky testu.

† V případech, kdy neexistuje podezření na infekci cytomegalovirem, mohou být původní reaktivní výsledky potvrzeny opakovaným testováním původních vzorků plazmy testem QF-CMV ELISA v duplikátu. Pokud je opakované testování jednoho nebo obou replikátů pozitivní, musí být test dané osoby považován za reaktivní.

‡ Možné příčiny jsou uvedeny v „Řešení problémů“ (na straně 38).

V klinických studiích (1) bylo prokázáno, že nejednoznačný výsledek u příjemců transplantátů solidních orgánů, kdy je dárce reaktivní na CMV, ale kontrola Mitogen byla nižší než 0,5 IU/ml, je klinicky relevantní. U takových pacientů existuje nejvyšší riziko vzniku infekce CMV.

§ V klinických studiích mělo méně než 0,25 % subjektů u hodnoty Nil hladinu IFN-γ >8,0 IU/ml.

Poznámka: Naměřená hladina IFN-γ musí být při stanovování imunitní odpovědi pacienta na antigeny CMV použita ve spojení s jeho klinickým obrazem, zdravotní anamnézou a dalšími diagnostickými hodnoceními. Test QF-CMV neslouží k určení infekce CMV a neměl by být používán k vyloučení možnosti infekce CMV.

Omezení

Výsledky testu QuantiFERON-CMV musí být použity společně s epidemiologickou anamnézou každého pacienta, jeho aktuálním zdravotním stavem a dalšími diagnostickými hodnoceními.

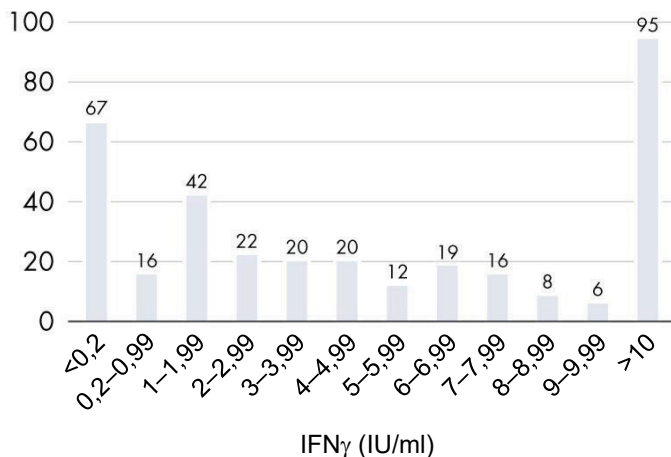
Nespolehlivé nebo neprůkazné výsledky se mohou objevit v důsledku:

- Odchyly od postupu popsaného v příbalové informaci testu QuantiFERON-CMV ELISA
- Nadměrné hladiny IFN- γ v kontrolní zkumavce
- Uplynutí doby od odběru vzorku krve do inkubace při 37 °C delší než 16 hodin.

Očekávané hodnoty

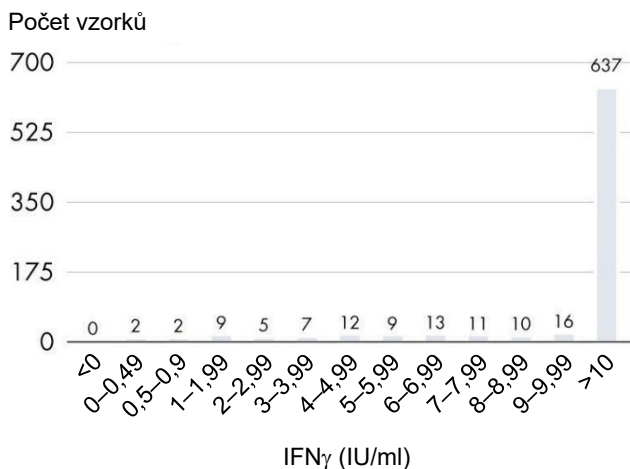
Očekávané hodnoty IFN- γ testu QuantiFERON-CMV byly získány testováním 591 vzorků odebraných zdravým subjektům. 343 testovaných vzorků bylo séropozitivních a 248 bylo séronegativních na CMV IgG. V době testování QF-CMV nebyl znám sérologický stav CMV. Ve skupině 248 vzorků od CMV séronegativních subjektů bylo 100 % (248/248) vzorků podrobených testu QF-CMV ELISA nereaktivních s odpověďmi IFN- γ <0,2 IU/ml na zkumavku CMV Antigen (mínus Nil). Distribuce odpovědí IFN- γ na zkumavku CMV Antigen (mínus Nil) u 343 CMV séropozitivních subjektů je znázorněna na (Obrázek 2).

Počet vzorků



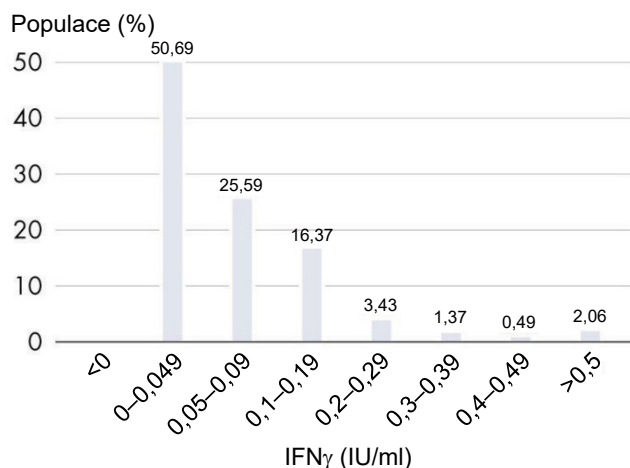
Obrázek 2. Distribuce odpovědí IFN- γ (mínus Nil) v testu QF-CMV u séropozitivních zdravých subjektů (n = 343).

Distribuce odpovědí IFN- γ na zkumavku Mitogen (mínus Nil) byla určena ze vzorků 733 zdravých dospělých subjektů testovaných pomocí testu QF-CMV ELISA bez ohledu na sérologii CMV IgG (Obrázek 3). Výsledek Mitogen (mínus Nil) menší než 0,5 IU/ml označuje buď selhání testu nebo sníženou imunitu subjektu. Ve skupině zdravých jedinců do této kategorie spadaly pouze 2 ze 733 výsledků.



Obrázek 3. Distribuce odpovědí na zkumavku Mitogen-IFN- γ (mínus Nil) u zdravých subjektů (n = 733).

Distribuce odpovědí IFN- γ na zkumavky Nil byla stanovena na základě 1020 vzorků plazmy odebraných zdravým subjektům testovaným pomocí testu QF-CMV ELISA bez ohledu na sérologii CMV IgG (Obrázek 4).



Obrázek 4. Distribuce odpovědí na zkumavku Nil IFN- γ u zdravých subjektů (n = 1020) vyjádřená jako procentní podíl populace.

Funkční charakteristiky

Klinická funkce

Prahová hodnota testu pro detekci předchozí expozice viru CMV pomocí testu QF-CMV byla stanovena s použitím analýzy výsledků od skupiny zdravých subjektů (n = 223), kde byly výsledky QF-CMV porovnány se sérologickými výsledky CMV IgG. Analýzou ROC bylo stanoveno, že prahová hodnota testu 0,04 IU/ml (po odečtení hodnoty Nil) poskytla optimální pozitivní a negativní prediktivní hodnoty testu QF-CMV (plocha pod křivkou = 0,9679 [95% CI: 0,9442–0,9915, p < 0,0001]), a představovala tedy prahovou hodnotu, při níž tento test nejúčinněji sloužil svému určenému účelu u zdravé populace.

Funkčnost testu QF-CMV byla porovnána se sérologickým testem SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). Test QF-CMV vykázal 95% (294/310 osob) shodu se sérologickým testem CMV IgG u zdravých subjektů, přičemž žádný ze 149 séronegativních vzorků dárců nevykazoval dle testu QF-CMV žádnou reaktivitu. 145 ze 161 séropozitivních vzorků dárců vykazalo v testu QF-CMV reaktivní odezvu. Celková shoda pozitivních výsledků byla 90 % a hodnota negativní shody byla 100 %. Úroveň shody u zdravých subjektů mezi odpověďmi QF-CMV a sérologickým stavem CMV IgG je uvedena v Tabulka 3.

Tabulka 3. Shoda mezi testem QuantiFERON-CMV a sérologickým testem CMV IgG u zdravých subjektů

		Sérologie CMV		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
QuantiFERON-CMV	Reaktivní	145	0	145 (46,8 %)
	Nereaktivní	16	149	165 (53,2 %)
	Celkem	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Prahová hodnota testu

Doporučená prahová hodnota klinického testu pro tuto analýzu u zkumavky CMV Antigen (mínus Nil) je 0,2 IU/ml, s tím, že pro jiná klinická prostředí mohou být validovány jiné prahové hodnoty.

Klinické studie

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný definitivní standard pro potvrzení nebo vyloučení diagnózy infekce cytomegalovirem, odhad citlivosti a specificity pro QF-CMV nelze prakticky vyhodnotit. Specifita a citlivost testu QF-CMV byla stanovena přibližně vyhodnocením úrovně shody mezi odpověďmi QF-CMV a sérologickým stavem CMV IgG u zdravých subjektů.

Specifita testu QF-CMV byla přibližně stanovena vyhodnocením míry falešně pozitivních výsledků (reaktivní odpovědi QF-CMV) u vzorků zdravých dárců bez průkazu předchozí expozice CMV (CMV IgG séronegativní osoby). Citlivost byla přibližně stanovena vyhodnocením odpovědí QF-CMV u vzorků zdravých dárců s prokázanou předchozí expozicí CMV (CMV IgG séropozitivní osoby). Test QF-CMV využívá velké množství epitopů specifických pro CMV z různých bílkovin CMV a tak pokrývá široké spektrum populace s různými haplotypy HLA I. třídy (přibližně 98 % populace). Vzhledem k tomu, že haplotypy HLA testovaných subjektů ve vztahu k sérologii CMV nebyly známy, očekávalo se, že malé procento sérologicky pozitivních osob bude na zkumavky QF-CMV pro odběr krve nereaktivní.

Specifita

Ve studii 591 vzorků zdravých subjektů nebyly detekovány žádné falešně pozitivní výsledky testu QF-CMV u CMV IgG séronegativních jedinců. 248 z 248 testovaných vzorků bylo dle testu QF-CMV ELISA nereaktivních a dle sérologického testu CMV IgG negativních. Výsledky získané pomocí testu QF-CMV a sérologického testu CMV IgG vykazaly 100% shodu.

U všech ostatních vyhodnocení specificity provedených u příjemců transplantovaných solidních orgánů (1–8), příjemců hematopoetických kmenových buněk (9,10) a pacientů infikovaných virem HIV (11), byla shoda mezi testem QF-CMV a sérologickým testem CMV IgG rovněž 100 %.

Citlivost

Ve studii prováděné na 343 vzorcích zdravých subjektů séropozitivních na CMV IgG byla úroveň shody mezi odpověďmi testu QF-CMV a sérologickými výsledky testu CMV IgG 80,5 %; 276 ze 343 vzorků bylo v testu QF-CMV reaktivních a v sérologickém testu CMV IgG pozitivních. Pozorovaná nesrovnalost může být způsobena falešně pozitivní sérologií CMV nebo absencí responzivních HLA typů u testovaných jedinců.

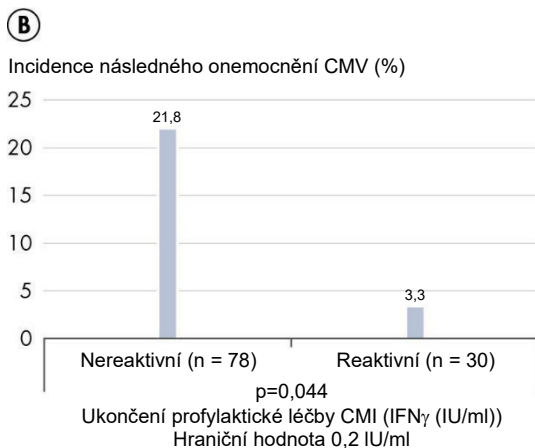
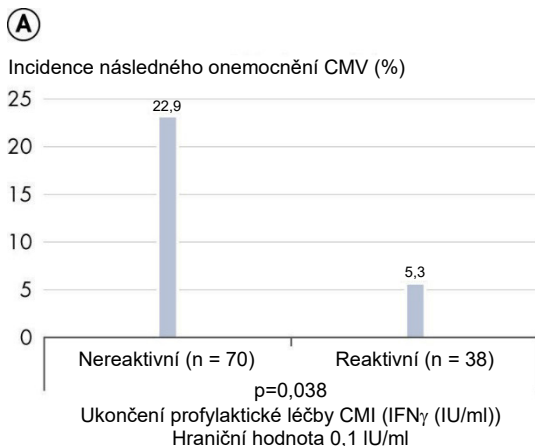
Úroveň shody při vyhodnocení citlivosti provedených u příjemců transplantovaných solidních orgánů (1–8), příjemců hematopoetických kmenových buněk (9, 10) a pacientů infikovaných virem HIV (11) byla nižší a mohla být způsobena použitím falešně pozitivního sérologického testu CMV, absencí responzivních typů HLA u testovaných jedinců nebo absencí reaktivních T-buněk u těchto pacientů v důsledku jejich imunosuprese.

Studie dokládající klinickou využitelnost

Jak sérologie CMV IgG, tak test QF-CMV uvádí, že zamýšleným použitím je možnost detekce imunity proti CMV. Ve vztahu k transplantacím je sérologie CMV široce využívána před transplantací pro stanovení rizika komplikací souvisejících s CMV u příjemce po transplantaci, avšak po transplantaci je hodnota vlastního testu omezená. Alternativně lze u příjemců transplantovaných orgánů použít test QF-CMV k vyhodnocení úrovně imunity vůči CMV u pacientů, kteří jsou ohroženi rozvojem symptomatické infekce CMV a/nebo onemocnění v důsledku imunosuprese (12–15).

Přínos testu QuantiFERON-CMV v souvislosti s transplantací prokázala řada publikovaných klinických studií prováděných v různých kohortách pacientů (1–11, 15, 16).

V rozsáhlé studii 108 příjemců transplantovaných solidních orgánů (4), měli pacienti s reaktivním výsledkem QF-CMV při dokončení profylaktické léčby infekce CMV významně nižší míru následného onemocnění CMV (3,3 % nebo 1/30; při použití prahové hodnoty 0,2 IU/ml) v porovnání s těmi, kteří měli nereaktivní výsledek QF-CMV (21,8 % nebo 17/78, $p = 0,044$) (obrázek 5).



Obrázek 5. Míra onemocnění CMV s pozdním nástupem u pacientů s reaktivním výsledkem testu QuantiFERON-CMV oproti pacientům s nereaktivním výsledkem testu QuantiFERON-CMV při ukončení profylaktické léčby. Základní údaje nalezeny v dokumentu autorů Kumar et al. (4).

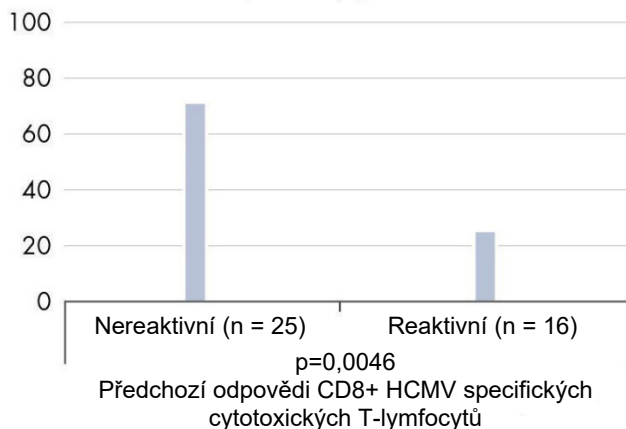
Navíc CMV séronegativní příjemci transplantovaných orgánů, kteří obdrželi orgán od CMV pozitivního dárce (tj. D+/R–) a měli reaktivní výsledek testu QF-CMV po ukončení profylaktické léčby, zůstávali bez onemocnění CMV častěji a po delší dobu, což znamená, že test QF-CMV může být použit pro identifikaci pacientů s rizikem onemocnění CMV s pozdním nástupem.

Tato studie také upozornila na to, že v kohortě pacientů po transplantaci s nejvyšším rizikem rozvoje onemocnění CMV (D+/R–) byl reaktivní výsledek kdykoliv po ukončení profylaktické léčby spojen s vyšší šancí, že u nich onemocnění CMV nepropukne.

Ve studii zahrnující 37 pacientů po transplantaci solidních orgánů (6) pomohlo hodnocení CMV-specifických CD8+ T-buněčných odpovědí pomocí testu QF-CMV předpovědět spontánní virovou clearanci ve srovnání s progresí CMV onemocnění po zvýšení CMV viremie. V této studii 24 z 26 pacientů (92,3 %) s reaktivním výsledkem testu QF-CMV (při použití testovací prahové hodnoty $\text{IFN-}\gamma \geq 0,2 \text{ IU/ml}$) virus CMV spontánně vyloučilo, zatímco ve skupině s nereaktivním výsledkem QF-CMV mělo stejný výsledek pouze 5 z 11 (45,5 %) pacientů.

Studie provedená na 67 příjemcích transplantátu plíce, která hodnotila epizody CMV viremie po transplantaci (7), zjistila, že 18/25 (72 %) epizodám CMV viremie předcházela nereaktivní výsledek testu QF-CMV, oproti 4/16 (25 %) epizodám, kterým předcházela reaktivní odpověď QF-CMV (Fisherův exaktní test, $p = 0,0046$; Obrázek 6).

Epizody HCMV DNAemie s virovou zátěží >1000 kopií/ml (%)



Obrázek 6. Statistická analýza reakcí CD8+ CMV specifických T- buněk dle detekce při testu QuantiFERON-CMV a rozvoj virémie CMV (Fisherův exaktní test, $p = 0,0046$). Základní údaje nalezeny v dokumentu autorů Weseslindtner et al (7).

Ve velké multicentrické prospektivní studii zahrnující 127 CMV-séropozitivních dárců a CMV-séronegativních příjemců - pacientů po transplantaci solidních orgánů (8), z nichž všichni dostávali antivirovou profylaxi, bylo prokázáno, že pacienti s reaktivním výsledkem QF-CMV (při použití testovací prahové hodnoty 0,1 IU/ml) v jakémkoli časovém bodě po dokončení profylaxe proti CMV měli významně nižší míru pozdního onemocnění 12 měsíců po transplantaci (6,4 %) ve srovnání s pacienty s nereaktivním výsledkem QF-CMV (22,2 %) a neprůkazným výsledkem (58,3 %, $p < 0,001$). Při klasifikaci neprůkazných výsledků jako „nereaktivních“ byla incidence následného onemocnění CMV 6,4 % vs. 26,8 %, $p = 0,024$. Prediktivní hodnoty pozitivních a negativních výsledků testu QF-CMV pro ochranu před onemocněním CMV byly 0,90 (95% CI 0,74–0,98), respektive 0,27 (95% CI 0,18–0,37). Tato studie zjistila, že test QF-CMV může být užitečný k predikci, zda jsou pacienti vystaveni malému, střednímu, nebo vysokému riziku rozvoje onemocnění CMV po profylaktické léčbě.

V rámci prospektivní studie 55 příjemců transplantovaného solidního orgánu (8), v níž byla analyzována souvislost mezi výsledky testů QF-CMV před transplantací a epizod replikace CMV po transplantaci, bylo zjištěno, že vyšší incidence replikací CMV po transplantaci byla pozorována u CMV séropozitivních příjemců s nereaktivním (s použitím prahové hodnoty testu 0,2 IU/ml) výsledkem testu QF-CMV před transplantací (7/14 nebo 50 %), v porovnání s CMV séropozitivními příjemci s reaktivním výsledkem testu QF-CMV (4/30 nebo 13,3 %, $p = 0,021$).

Tato studie zjistila, že příjemci s nereaktivní odpovědí QF-CMV před transplantací, kteří obdrželi orgán od CMV-séropozitivního dárce, měli desetkrát vyšší riziko replikace CMV ve srovnání s příjemci s reaktivní odpovědí QF-CMV před transplantací (upravený OR 10,49, 95% CI 1,88–58,46). Proto může být test QF-CMV před transplantací užitečný při predikci rizika replikace CMV po transplantaci a tím umožnit individualizaci léčby infekce CMV po transplantaci solidních orgánů.

Po celém světě byla dokončena (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) nebo v současné době probíhá řada dalších studií zabývajících se detekcí CMV-specifických CD8⁺ T-buněčných odpovědí pomocí testu QF-CMV u skupiny příjemců transplantátů.

Mezinárodní konsenzus o léčbě infekce cytomegalovirem u pacientů s transplantovanými solidními orgány

Důležitost monitoringu imunity specifiky zaměřeného na CMV byla uznána a publikována v *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Aktualizovaný mezinárodní konsenzus o léčbě infekce cytomegalovirem u pacientů s transplantovanými solidními orgány) (12). Tyto mezinárodní pokyny vytvořené komisí odborníků na CMV a transplantace solidních orgánů, kterou svolala „The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society“, představuje konsenzus založený na důkazech a odborných názorech o léčbě CMV, včetně: diagnostiky, imunologie, prevence a léčby.

Závěr těchto pokynů zní, že „Monitorování imunitní odpovědi CMV specifických T-buněk může predikovat osoby s rizikem onemocnění CMV po transplantaci a může být užitečné při řízení profylaxe a preventivní léčby“ (12).

Dále tyto pokyny také poskytly doporučení ohledně atributů ideálního testování pro monitoring imunity, které zahrnují:

- Schopnost posoudit množství a funkci CD4⁺ a CD8⁺ T buněk u příjemce transplantátu
- Schopnost stanovit hladinu IFN- γ
- Jednoduchost provedení, efektivnost nákladů a reprodukovatelnost
- Rychlou dobu zpracování
- Snadné zaslání vzorků do specializovaných referenčních laboratoří

Test QF-CMV splňuje prakticky všechna kritéria stanovená těmito pokyny a představuje jediný standardizovaný test pro monitorování imunity specifický pro CMV a schopný detekovat IFN- γ .

Charakteristika funkčních vlastností analýzy

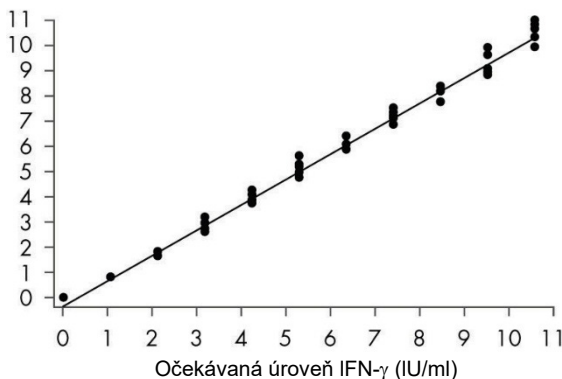
Test QF-CMV ELISA využívá rekombinantní lidský IFN- γ standard, jenž byl analyzován srovnáním s referenčním přípravkem IFN- γ (ref. NIH: Gxg01-902-535). Výsledky testu vzorků jsou uvedeny v mezinárodních jednotkách (International Units, IU) podle standardní křivky připravené testováním ředění sekundárního standardu dodaného spolu se soupravou.

Je známo, že heterofilní (např. lidské protimysí) protilátky v séru nebo plazmě určitých jedinců způsobují interferenci s imunitními analýzami. Vliv heterofilních protilátek je v testu QF-CMV ELISA minimalizován přidáním normálního myšího séra do zeleného ředícího roztoku a použitím monoklonálních fragmentů protilátek F(ab')₂ jako protilátky k zachycení IFN- γ , kterou jsou potaženy jamky mikrotitračních destiček.

Detekční mez testu QF-CMV ELISA činí 0,065 IU/ml a nebyl prokázán žádný efekt prozóny u koncentrací IFN- γ do 10.000 IU/ml. Ukázalo se, že protilátky QF-CMV ELISA nereagují zkříženě s žádnými testovanými cytokiny včetně IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 a IL12.

Linearita testu QF-CMV ELISA byla prokázána náhodným umístěním pěti replikátů 11 směsí plazmy se známými koncentracemi IFN- γ na destičku ELISA. Křivka lineární regrese má sklon $1,002 \pm 0,011$ a korelační koeficient 0,99 (Obrázek 7).

Stanovená hladina IFN- γ



Obrázek 7. Profil linearity testu QF-CMV ELISA určený z testování pěti replikátů 11 vzorků plazmy o známých koncentracích IFN γ .

Reprodukovatelnost testu QF-CMV ELISA byla stanovena testováním 20 vzorků plazmy s různými koncentracemi IFN- γ ve třech replikátech, třech laboratořích, ve třech dnech, které po sobě nenásledovaly, a třemi různými pracovníky obsluhy. Každý vzorek byl tedy testován 27krát v devíti nezávislých testovacích cyklech. Jedním ze vzorků byla kontrola Nil, u níž byla vypočtena koncentrace IFN- γ 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. U zbývajících 19 vzorků plazmy byly koncentrace v rozsahu 0,33 (95% CI 0,31–0,34) až 7,7 IU/ml (95% CI 7,48–7,92).

Nepřesnost v rámci jednoho běhu testu nebo v rámci jedné analýzy byla odhadnuta jako průměr variačního koeficientu %CV pro každou testovanou plazmu obsahující IFN- γ z každého testovacího cyklu destičky ($n = 9$) a pohybovala se v rozsahu 4,1 až 9,1 %CV. Průměrná hodnota %CV v rámci běhu testu ($\pm 95\%$ CI) činila $6,6 \pm 0,6$ %. Nulová hodnota IFN- γ plazmy činila v průměru 14,1 %CV.

Celková nepřesnost neboli nepřesnost mezi různými analýzami byla stanovena porovnáním 27 vypočítaných koncentrací IFN- γ pro každý vzorek plazmy a pohybovala se v rozsahu od 6,6 do 12,3 %CV. Celková průměrná hodnota %CV ($\pm 95\%$ CI) činila $8,7 \pm 0,7$ %. Nulová hodnota IFN- γ plazmy vykazovala variační koeficient 26,1 %CV. Tato úroveň odchylky se dala očekávat, protože vypočítaná koncentrace IFN- γ je nízká a odchylka v okolí nízkého odhadu koncentrace bude větší než při vyšších koncentracích.

Technické údaje

Nejednoznačné výsledky

Nejednoznačné výsledky mohou souviset se stavem imunity testovaných osob, avšak mohou se také vztahovat k množství technických faktorů:

- Uplynutí doby od odběru krve do inkubace při 37 °C delší než 16 hodin
- Uchovávání krve mimo doporučený rozsah teplot (22 °C ±5 °C)
- Nedostatečné promíchání zkumavek s odebranou krví
- Nedokonalé promytí destičky ELISA

Pokud existuje podezření, že došlo k technickým problémům při odběru nebo manipulaci se vzorky krve, zopakujte celý test QF-CMV s novými vzorky krve. Zopakování testování ELISA stimulované plazmy je možné provést, pokud je podezření na jakoukoliv odchylku od postupu pro test ELISA. Nejednoznačné výsledky (z nízkých hodnot mitogenu) by se neměly při opakovaném testování změnit, pokud nedošlo k chybě při testování ELISA.

Sražení vzorků plazmy

Pokud se při dlouhodobém skladování objeví ve vzorcích plazmy sraženiny fibrinu, odstředte vzorky, aby se sražený materiál usadil a napíjetování plazmy bylo snadnější.

Řešení problémů

Tento návod k řešení problémů může být užitečný při řešení případných potíží. Více informací naleznete také v technických údajích uvedených na stránkách **www.QuantiFERON.com**. Kontaktní údaje naleznete na zadní straně.

Komentáře a návrhy

Nizké hodnoty optické hustoty pro standardy

- | | |
|---|---|
| a) Chyba ředění standardu | Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle pokynů v příbalovém letáku testu QF-CMV ELISA. |
| b) Chyba pipetování | Ujistěte se, že je zařízení kalibrováno a používáno dle pokynů výrobce. |
| c) Příliš nízká teplota inkubace | Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (22 °C ±5 °C). |
| d) Příliš krátká doba inkubace | Inkubace destičky s konjugátem, standardy a vzorky musí trvat 120 ±5 minut. Roztok enzymového substrátu se inkubuje na destičce po dobu 30 minut. |
| e) Použit nesprávný filtr čtečky destiček | Hodnoty destičky musí být načteny s filtrem o vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem od 620 do 650 nm. |
| f) Příliš studené reagencie | Všechna reagenční činidla, s výjimkou konjugovaného 100× koncentrátu, musí být před zahájením analýzy temperována na pokojovou teplotu. To může trvat přibližně 1 hodinu. |
| g) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Souprava musí být použita do uplynutí data použitelnosti. Dbejte, aby rekonstituovaný standard a konjugovaný 100× koncentrát byly použity do 3 měsíců od data rekonstituce. |

Nespecifické zabarvení

- | | |
|---|--|
| a) Nedostatečné promytí destiček | Promyjte destičku alespoň šestkrát pomocí 400 pl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím roztoku může být zapotřebí více než šest promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Zkřížená kontaminace jamek ELISA | Při pipetování a mísení vzorku buďte opatrní, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. |
| c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Souprava musí být použita do uplynutí data použitelnosti. Dbejte, aby rekonstituovaný standard a konjugovaný 100× koncentrát byly použity do 3 měsíců od data rekonstituce. |
| d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu | Pokud se objeví modré zabarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na reagencie. |

Komentáře a návrhy

- | | |
|--|---|
| e) Mísení plazmy v centrifugačních zkumavkách před odběrem | Ujistěte se, že jsou vzorky plazmy pečlivě odebrány z horní části gelu, aniž by byl obsah pipetován nahoru a dolů. Dbejte na to, aby se nenarušil materiál na povrchu gelu. |
|--|---|

Vysoké pozadí

- | | |
|---|--|
| a) Nedostatečné promytí destičky | Promyjte destičku alespoň šestkrát pomocí 400 pl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím roztoku může být zapotřebí více než šest promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Příliš vysoká teplota inkubace | Inkubace při analýze ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Souprava musí být použita do uplynutí data použitelnosti. Dbejte, aby rekonstituovaný standard a konjugovaný 100× koncentrát byly použity do 3 měsíců od data rekonstituce. |
| d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu | Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na reagencie. |

Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátu

- | | |
|---|--|
| a) Nedostatečné promytí destičky | Promyjte destičku alespoň šestkrát pomocí 400 pl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím roztoku může být zapotřebí více než šest promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Chyba ředění standardu | Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle pokynů v této příbalové informaci. |
| c) Nedostatečné promíchání | Reagenční činidla důkladně promíchejte tak, že před jejich přidáním na destičku zkumavku převrátíte nebo lehce protřepete na třepače. |
| d) Nejednotná technika pipetování nebo přerušení během přípravy testu | Přidávání vzorků a standardů by mělo probíhat nepřerušovaně. Všechna reagenční činidla musí být připravena před zahájením analýzy. |

Informace o výrobku a technické pokyny jsou zdarma k dispozici u společnosti QIAGEN, prostřednictvím vašeho dodavatele nebo na stránce **www.QuantiFERON.com**.

Literatura

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.

Symbols

Na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
	Obsahuje dostatek reagentů pro <N> reakcí
	Použijte do
	Označení CE
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Globální číslo obchodní položky (Global Trade Item Number)
	Teplotní omezení
	Nepoužívejte opakovaně
	Chraňte před slunečním světlem
	Prostudujte si návod k použití
	Výrobce
	Zplnomocněný zástupce pro Evropské společenství

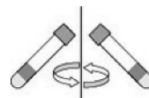
Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na internetové adrese **www.qiagen.com/Support**, volejte na telefonní číslo 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN anebo naše místní distributory (viz zadní strana obalu nebo navštivte webové stránky **www.qiagen.com**).

Zkrácený postup testu ELISA

Fáze 1: Inkubace krve

1. Odeberte krev pacienta do odběrových zkumavek a poté desetkrát (10) dobře protřepejte zkumavky tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.
2. Zkumavky inkubujte ve svislé poloze při teplotě $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 16–24 hodin.
3. Po inkubaci zkumavky odstředujte po dobu 15 minut při 2 000–3 000 RCF (g), aby se oddělila plazma a červené krvinky.
4. Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.



Fáze 2: IFN- γ ELISA

1. Ponechte temperovat součásti testu ELISA, s výjimkou konjugovaného 100 $\times$ koncentrátu, na pokojovou teplotu alespoň po dobu 60 minut.



2. Proveďte rekonstituci standardu soupravy na 8,0 IU/ml deionizovanou nebo destilovanou vodou. Připravte čtyři (4) standardní ředění.



3. Proveďte rekonstituci lyofilizovaného konjugovaného 100× koncentrátu destilovanou nebo deionizovanou vodou.

4. Připravte pracovní roztok konjugátu v zeleném ředicím roztoku a do všech jamek přidejte 50 µl.



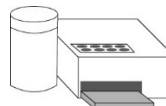
5. Do příslušných jamek přidejte 50 µl testovaných vzorků plazmy a 50 µl standardů. Promíchejte pomocí třepačky.



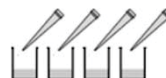
6. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 120 minut.



7. Promyjte jamky alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku.



8. Přidejte do jamek 100 µl roztoku enzymového substrátu. Promíchejte pomocí třepačky.



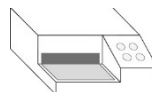
9. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 minut.



10. Přidejte do jamek 50 μ l zastavovacího roztoku pro enzymatické testy. Promíchejte pomocí třepačky.



11. Zjistěte výsledné hodnoty při 450 nm pomocí referenčního filtru 620 až 650 nm.



12. Proveďte analýzu výsledků.



Historie revizí příručky

Dokument	Změny	Datum
L1075110-R06	Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky, přidaná víčka destiček, strana 9	Říjen 2019

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

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

Smlouva o omezené licenci pro soupravu QuantiFERON-CMV ELISA

Používáním tohoto produktu vyjadřuje každý kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v panelu. Společnost QIAGEN neuděluje žádnou licenci na své duševní vlastnictví k použití nebo začlenění součástí tohoto panelu společně s jakýmkoli součástí, které nejsou jeho součástí, s výjimkou případů popsaných v protokolech dodaných s produktem, v této příručce a v dalších protokolech dostupných na adrese www.qiagen.com. Některé z těchto dalších protokolů byly poskytnuty uživateli QIAGEN dalším uživatelům QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.

2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tento panel a/nebo jeho použití nenarušuje práva třetích stran.

3. Tento panel a jeho komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.

4. Společnost QIAGEN specificky vylučuje jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.

5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy z tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem a/nebo jeho součástmi.

Aktualizované licenční podmínky naleznete na adrese www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN. Všechna práva vyhrazena.

