

Октябрь 2019 г.

Инструкция-вкладыш к QuantiFERON[®]-CMV ELISA



Тест для определения клеточного ответа на цитомегаловирусные пептидные антигены по уровню интерферона гамма (IFN- γ) в цельной крови человека

IVD

Для диагностики *in vitro*

CE

REF

0350-0201



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

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ГЕРМАНИЯ

1075110, ред. 06



www.QuantiFERON.com

Sample to Insight



Содержание

Назначение	5
Краткий обзор и пояснения	5
Принципы проведения процедуры	6
Время, необходимое для проведения анализа	7
Материалы, входящие в комплект поставки	8
Комплектация набора	8
Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки	9
Предупреждения и меры предосторожности	9
Информация по технике безопасности	11
Хранение реагентов и обращение с ними	12
Отбор и обработка образцов	13
Порядок работы	16
Этап 1. Инкубация крови и отбор плазмы	16
Этап 2. QuantiFERON-CMV ELISA для IFN- γ человека	17
Расчеты и интерпретация результатов теста	22
Получение стандартной кривой (если программное обеспечение для анализа QF-CMV не используется)	22
Контроль качества анализа	23
Интерпретация результатов	24
Ограничения	25
Ожидаемые значения	25
Рабочие характеристики	28
Клиническая эффективность	28
Порог теста	29

Клинические исследования	29
Специфичность	30
Чувствительность	30
Исследования, подчеркивающие клиническую пользу.....	31
Публикация Международные консенсусные рекомендации по лечению цитомегаловируса при трансплантации органов	36
Аналитические характеристики тест-системы.....	37
Техническая информация	39
Неопределенные результаты.....	39
Образцы плазмы со сгустками	39
Руководство по поиску и устранению неполадок	40
Список литературы.....	42
Символы.....	44
Контактная информация	45
Краткое описание теста ELISA	46
Этап 1. Инкубация крови.....	46
Этап 2. ELISA для определения уровня IFN- γ	46
История изменения руководства	49

Назначение

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) — это тест-система для анализа *in vitro* с использованием пептидной смеси, моделирующей белки цитомегаловируса человека (ЦМВ) для стимуляции клеток в гепаринизированной цельной крови. Обнаружение интерферона гамма (interferon-gamma, IFN- γ) методом твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) используется для количественного определения *in vitro* клеточного ответа на эти пептидные антигены, связанного с иммунным контролем над ЦМВ-инфекцией. Потеря этой иммунной функции может быть связана с развитием CMV. Назначение QF-CMV — мониторинг уровня иммунитета к ЦМВ у пациента.

Тест-система QF-CMV не предназначена для определения наличия ЦМВИ. Ее не следует использовать для исключения ЦМВИ.

Краткий обзор и пояснения

ЦМВ — это герпес-вирус, которым инфицировано 50–85 % взрослой популяции. ЦМВИ — часто встречающееся осложнение при иммуносупрессивных состояниях, особенно после трансплантации, и может в значительной степени способствовать повышению заболеваемости и смертности у реципиентов после трансплантации. Виды иммуносупрессивной терапии, используемые в настоящее время для предотвращения отторжения пересаженного органа, оказывают негативное влияние на Т-лимфоциты и клеточно-опосредованный иммунный ответ (cell-mediated immunity, CMI), в результате чего повышается восприимчивость к вирусным инфекциям в период после трансплантации. Важность функции Т-клеток в подавлении репликации ЦМВ подтверждается тем фактом, что CD8 $^{+}$ ЦМВ-специфические цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) могут защищать от прогрессии заболевания, вызванного вирусом. Данные подсчета ЦМВ-специфических ЦТЛ CD8 $^{+}$ у больных с иммуносупрессией и данные об уровне выработки IFN- γ могут служить средством прогнозирования риска развития ЦМВИ. Определение уровня выработки IFN- γ может заменять выявление ЦМВ-специфических ЦТЛ.

Тест-система QF-CMV предназначена для определения CMI-ответа на пептидные антигены, моделирующие белки ЦМВ. Подобраны ЦМВ-пептиды, нацеленные на Т-клетки CD8⁺, включая гаплотипы HLA I класса A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 и Cw6 (A30, B13), охватывающие > 98 % человеческой популяции. В кровотоке у людей, инфицированных ЦМВ, обычно циркулируют CD8⁺ лимфоциты, распознающие эти антигены. Этот процесс распознавания предполагает производство и секрецию цитокина, IFN-γ. Данный тест основан на обнаружении и последующем количественном анализе концентрации форм IFN-γ.

Принципы проведения процедуры

Тест QF-CMV выполняется в два этапа. Сначала отбирают цельную кровь в каждую из пробирок для забора крови для теста QF-CMV (пробирки «ноль-контроль», «антиген ЦМВ» и «митоген»).

Пробирка «митоген» используется в рамках теста QF-CMV в качестве положительного контроля. Это особенно целесообразно в том случае, когда есть сомнения относительно иммунного статуса пациента. Кроме того, пробирка с митогеном может быть использована в качестве контроля в целях обеспечения правильного обращения с пробой крови и ее надлежащей инкубации.

Пробирки следует в кратчайшие сроки (в течение 16 часов после отбора крови) инкубировать при температуре 37 °C. После периода инкубации длительностью от 16 до 24 часов пробирки центрифугируют, отделяют плазму и с помощью QF-CMV ELISA определяют количество IFN-γ (в МЕ/мл).

Количество IFN-γ в образцах плазмы из пробирок «антиген ЦМВ» и «митоген» часто может превышать верхний предел для большинства считающих устройств ELISA даже у пациентов с умеренной иммуносупрессией. Для получения качественных результатов используйте значения, рассчитанные для неразведенной плазмы. Для получения количественных результатов, если требуются фактические значения в МЕ/мл, образцы плазмы следует разбавлять зеленым разбавителем (Green Diluent) в соотношении 1 : 10 и исследовать методом ELISA вместе с неразведенной плазмой.

Примечание. Для образцов, находящихся в пределах диапазона измерений тест-системы QF-CMV ELISA (до 10 МЕ/мл), следует использовать результат, полученный для неразведенного образца плазмы. При таких концентрациях IFN- γ значения, полученные с использованием образцов плазмы, разведенных в соотношении 1 : 10, могут быть неточными.

Результат теста на IFN- γ -ответ считается реактивным, если показания для пробирки «антиген ЦМВ» значительно превышают значение в МЕ/мл для IFN- γ в пробирке «ноль-контроль». Митоген-стимулированный образец плазмы выступает в качестве IFN- γ -положительного контроля для каждого исследуемого образца. Слабый ответ на митоген указывает на неопределенный результат, если образец крови также дает нереактивный ответ на антигены ЦМВ. Такая картина возможна при недостатке лимфоцитов, снижении активности лимфоцитов из-за неправильной обработки образца, неправильного заполнения либо неправильного перемешивания содержимого пробирки «митоген» или неспособности лимфоцитов пациента вырабатывать IFN- γ , как, например, у пациентов, недавно перенесших трансплантацию. Образец «ноль-контроль» используется для учета фонового или неспецифического IFN- γ в образцах крови. Уровень IFN- γ в пробирке «ноль-контроль» вычитается из уровня IFN- γ в пробирках «антиген ЦМВ» и «митоген» (порядок интерпретации результатов QF-CMV см. на стр. 24 данной инструкции-вкладыша в разделе «Интерпретация результатов»).

Время, необходимое для проведения анализа

Ниже приведено расчетное время, необходимое для выполнения теста QF-CMV. Также указано время, необходимое для исследования партии из нескольких образцов.

Инкубация пробирок с кровью при температуре 37 °C

От 16 до 24 часов

ELISA:

прибл. 3 часа на каждый планшет ELISA

менее 1 человеко-часа

Добавить 10–15 мин на каждый дополнительный планшет

Материалы, входящие в комплект поставки

Комплектация набора

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
№ по каталогу	0192-0301
Количество образцов для приготовления	1
QuantiFERON Nil Control («ноль-контроль» QuantiFERON) (серый колпачок)	1 пробирка
QuantiFERON CMV Antigen («антиген ЦМВ» QuantiFERON) (синий колпачок)	1 пробирка
QuantiFERON Mitogen Control («митоген-контроль» QuantiFERON) (фиолетовый колпачок)	1 пробирка
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (инструкция-вкладыш к пробиркам для забора крови QF-CMV)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Набор из двух планшетов ELISA
№ по каталогу	0350-0201
Microplate strips (микропланшетные стрипы) (12 × 8 лунок), покрытые мышиними моноклональными антителами мыши к IFN-γ человека	2 набора микропланшетных стрипов 12 × 8 лунок
IFN-γ Standard, (стандарт IFN человека), лиофилизированный (содержит рекомбинантный человеческий IFN-γ, коровий казеин и 0,01 % [м/о] тимеросала)	1 × флаcon (8 ME/мл в восстановленном виде)
Green Diluent (Зеленый разбавитель) (содержит коровий казеин, нормальную мышью сыворотку и 0,01 % [м/о] тимеросала)	1 × 30 мл
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (концентрат конъюгата (100-кратная концентрация), лиофилизат) (конъюгат мышьих антител к IFN-γ-HRP человека с пероксидазой хрена, содержит 0,01 % [м/о] тимеросала)	1 × 0,3 мл
Wash Buffer 20x Concentrate (Концентрат промывочного буфера 20-кратная концентрация) (рН 7,2, содержит 0,05 % [о/о] ProClin® 300)	1 × 100 мл
Раствор ферментного субстрата (содержит H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' тетраметиленцидин)	1 × 30 мл
Enzyme Stopping Solution (стоп-реактив для ферментативной реакции) (содержит 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 мл
QF-CMV ELISA Package Insert (инструкция-вкладыш для QF-CMV ELISA)	1

* Содержит серную кислоту. См. меры предосторожности на странице 9.

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

При работе с химическими веществами обязательно надевайте подходящие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставленных поставщиком продукции.

- Инкубатор на 37 °C; СО₂ не требуется
- Калибранные пипетки переменного объема для дозирования от 10–1000 мкл с одноразовыми наконечниками
- Калиброванная многоканальная пипетка с одноразовыми наконечниками для дозирования 50 и 100 мкл.
- Шейкер для микропланшетов
- Деионизированная или дистиллированная вода, 2 литра
- Промыватель микропланшетов (рекомендуется автоматический промыватель).
- Считывающее устройство для микропланшетов, оснащенное фильтром 450 нм и эталонным фильтром от 620 до 650 нм.
- Крышка для планшета

Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*

При работе с химическими веществами обязательно надевайте подходящие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Дополнительную информацию см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ). Для каждого набора QIAGEN® и каждого компонента набора их можно найти, просмотреть и распечатать на сайте по адресу www.qiagen.com/safety, где они размещены в удобном и компактном формате PDF.

ВНИМАНИЕ!

С кровью человека следует обращаться как с потенциально инфицированной. Соблюдайте соответствующие инструкции по работе с кровью.

Следующие заявления об опасных факторах и мерах предосторожности относятся к компонентам набора QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Содержит серную кислоту. Осторожно! Может оказывать корродирующее действие на металлы. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Следует надевать соответствующую защитную одежду, защитные перчатки и средства защиты для глаз/лица.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Осторожно! Вызывает легкое раздражение кожи. Следует надевать соответствующую защитную одежду, защитные перчатки и средства защиты для глаз/лица.

QuantiFERON Green Diluent

Содержит: тринатрия 5-гидрокси-1-(4-сульфофенил)-4-(4-сульфенилазо)пиразол-3-карбоксилат. Содержит: тарtrазин. Осторожно! Может вызывать кожные аллергические реакции. Следует надевать соответствующую защитную одежду, защитные перчатки и средства защиты для глаз/лица.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Содержит: ProClin 300. Наносит вред водной флоре и фауне с длительными неблагоприятными последствиями. Не допускать попадания в окружающую среду.

Информация по технике безопасности

Дополнительная информация

- Несоблюдение указаний, содержащихся в инструкции-вкладыше для QF-CMV, может привести к получению ошибочных результатов. Перед использованием внимательно прочтите инструкцию.
- Не используйте набор, если перед использованием у какого-либо флакона с реагентом обнаружены признаки повреждения или признаки утечки содержимого.
- **Важно!** Осматривайте флаконы перед использованием. Не используйте флаконы с коньюгатом или стандартом IFN- γ Standard, имеющие признаки повреждений или дефекты резиновой пробки. Не работайте с разбитыми флаконами. Утилизируйте флаконы, принимая необходимые меры предосторожности. **Рекомендация.** Открывайте флаконы с коньюгатом или стандартом IFN- γ Standard с помощью приспособления для снятия обжимных крышечек, чтобы свести к минимуму риск травмы от металлической обжимной крышки.
- Не смешивайте и не используйте микропланшетные стрипы, стандарт IFN- γ Standard человека, зеленый разбавитель или концентрат коньюгата (100x) из разных партий наборов QF-CMV. Другие реагенты (концентрат промывочного буфера [20x], раствор ферментного субстрата и стоп-реактив для ферментативной реакции) можно заменять аналогами из других наборов при условии соблюдения сроков годности и записи сведений о партии.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и биологические образцы в соответствии с местным, региональным и федеральным законодательством.
- Не используйте пробирки для забора крови QF-CMV и наборы QF-CMV ELISA после истечения срока годности.
- Убедитесь в том, что лабораторное оборудование, например промыватели микропланшетов и считающие устройства, откалиброваны/разрешены к применению.

Хранение реактивов и обращение с ними

Пробирки для забора крови

- Пробирки для забора крови QF-CMV подлежат хранению при температуре 4–25 °C.
- Во время заполнения кровью температура пробирок для забора крови QF-CMV должна составлять 17–25 °C.
- Срок годности пробирок для сбора крови QF-CMV составляет не более 15 месяцев с даты изготовления при условии хранения при температуре 4–25 °C.

Реактивы набора ELISA

- Набор подлежит хранению при температуре от 2–8 °C.
- Раствор ферментного субстрата необходимо всегда защищать от воздействия прямых солнечных лучей.

Разведенные и неиспользованные реактивы

Инструкции по подготовке реагентов для анализа представлены в разделе «Этап 2. QuantiFERON-CMV ELISA для IFN- γ человека человека» (этапы 3 и 5 на страницах 17 и 21).

- Восстановленный стандарт IFN- γ Standard человека можно хранить до 3 месяцев при температуре 2–8 °C. Обратите внимание на дату, в которую IFN- γ Standard был восстановлен.
- Не использованный после разведения концентрат конъюгата (100×) подлежит хранению при температуре от 2–8 °C и использованию в течение 3 месяцев.
Запишите дату разведения конъюгата.
- Рабочий конъюгат использовать в течение шести часов с момента приготовления.
- Рабочий промывочный раствор подлежит хранению при комнатной температуре (22 ± 5 °C) не более 2 недель.

Отбор и обработка образцов

В наборах QF-CMV используются следующие пробирки для забора крови.

- Nil Control («ноль-контроль») (серый колпачок)
- CMV Antigen («антиген ЦМВ») (синий колпачок)
- Mitogen Control («митоген-контроль») (фиолетовый колпачок)

На внутреннюю поверхность пробирок для забора крови нанесены высушенные антигены, поэтому важно тщательно перемешивать содержимое таких пробирок с кровью. Затем пробирки следует как можно скорее (в течение 16 часов после забора крови) переместить в инкубатор с температурой 37 °C.

Для достижения оптимальных результатов необходимо соблюдать следующие инструкции.

1. У каждого пациента отбирайте 1 мл крови венепункцией непосредственно в каждую из пробирок для забора крови QF-CMV. Эта процедура должна выполняться квалифицированным флейботомистом.

Пробирки для забора крови QF-CMV можно использовать на высоте над уровнем моря не более 810 м.

При использовании пробирок для забора крови QF-CMV на высоте более 810 м над уровнем моря, а также при недостаточном объеме поступающей крови забор крови можно произвести с помощью шприца. Сразу после этого перенесите по 1 мл крови в каждую из трех пробирок. Из соображений безопасности это лучше всего делать сняв со шприца иглу и с соблюдением надлежащих мер безопасности. Необходимо снять колпачки со всех трех пробирок для забора крови QF-CMV и внести по 1 мл крови в каждую из них (до наклеенной на пробирку черной метки). Затем плотно закройте пробирки колпачками и перемешайте их содержимое, как описано ниже. Поскольку кровь набирается в пробирку 1 мл относительно медленно, когда пробирка будет выглядеть заполненной, подержите ее на игле в течение 2–3 секунд, чтобы убедиться в получении нужного объема.

Черная метка на пробирке указывает объем заполнения 1 мл. Пробирки для забора крови QF-CMV валидированы применительно к объему от 0,8 до 1,2 мл. Если уровень крови в пробирке не доходит до метки, необходимо получить еще один образец крови.

Если для забора крови используется игла типа «бабочка», необходимо использовать «пробную» пробирку, чтобы убедиться в наполнении трубки кровью, прежде чем использовать пробирку для забора крови QF-CMV.

Вместо этого можно собрать кровь в отдельную обычную пробирку, содержащую литий-гепарин в качестве антикоагуланта, а затем перенести кровь в пробирки для забора крови QF-CMV. В качестве антикоагуланта используйте только литий-гепарин, так как другие антикоагулянты оказывают влияние на результаты анализа. Заполните пробирки для забора крови (минимальный объем — 5 мл) и осторожно перемешайте содержимое, перевернув пробирку несколько раз, чтобы растворить гепарин. Эта процедура должна выполняться квалифицированным флеботомистом. Пробирки для забора крови QF-CMV необходимо поместить в инкубатор не позднее 16 часов с момента забора крови. Перед инкубацией кровь должна находиться при комнатной температуре (22 ± 5 °C).

2. Сразу после заполнения пробирок для забора крови QF-CMV встряхните их 10 раз так, чтобы вся их внутренняя поверхность покрылась кровью для растворения антигенов на их стенках.

Во время забора крови пробирки должны находиться при температуре от 17-25 °C.

Слишком сильное встряхивание пробирок может привести к получению неверных результатов из-за разрушения геля.

Если кровь была отобрана в пробирку с литий-гепарином, то перед разливом в пробирки для забора крови QF-CMV образцы необходимо равномерно перемешать. Непосредственно перед разливом обязательно тщательно перемешайте кровь, осторожно переворачивая пробирку. Внесите аликвоты 1 мл (по одной в каждую пробирку для забора крови QF-CMV) в соответствующие нулевую контрольную пробирку, пробирку с антигеном ЦМВ и пробирку с митогеном. Это следует делать асептическим способом, принимая надлежащие меры обеспечения безопасности. Снимите колпачки со всех трех пробирок забора крови QF-CMV и внесите по 1 мл крови в каждую из них (до наклеенной на

пробирку черной метки). Плотно закройте пробирки колпачками и перемешайте их содержимое, как описано выше.

3. Маркируйте пробирки надлежащим образом.

Убедитесь, что каждую пробирку (нулевую, с антигеном ЦМВ, с митогеном) можно идентифицировать по этикетке или иным способом.

4. После заполнения, перемешивания и маркировки пробирки необходимо как можно скорее (не позднее 16 часов после отбора крови) поместить в инкубатор с температурой 37 ± 1 °C. Перед инкубацией пробирки должны находиться при комнатной температуре (22 ± 5 °C). Не помещайте образцы крови в холодильную камеру и не замораживайте их.

Порядок работы

Этап 1. Инкубация крови и отбор плазмы

1. Инкубируйте пробирки В ВЕРТИКАЛЬНОМ ПОЛОЖЕНИИ при температуре 37 ± 1 °C в течение 16–24 часов. Для инкубатора не требуется CO₂ или увлажнение.

Важно! Если инкубация крови производится не сразу после ее забора, то непосредственно перед помещением в инкубатор необходимо повторно перемешать содержимое пробирок, перевернув их 10 раз.

После инкубации пробирки для забора крови можно хранить при температуре от 4–27 °C в течение 3 суток перед центрифугированием.

2. После инкубации пробирок при температуре 37 °C их в течение 15 минут центрифугируют при ОСЦ 2000–3000 (g) для отделения плазмы. Гелевая ловушка отделит клетки от плазмы. Если этого не произойдет, необходимо центрифугировать пробирки повторно.

Можно отделить плазму без центрифугирования, но в этом случае требуется особая осторожность, чтобы удалить плазму, не взбаламутив клетки.

3. После центрифугирования перед сбором плазмы не допускайте ее набора и выпуска пипеткой или перемешивания. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не потревожить материал на поверхности геля.

Важно! Собирать образцы плазмы следует только с помощью пипетки.

После центрифугирования образцы плазмы из пробирок для сбора крови можно помещать непосредственно на планшет ELISA QF-CMV, в том числе при использовании автоматизированных рабочих станций ELISA.

Образцы плазмы можно хранить в центрифужированных пробирках для забора крови QF-CMV до 28 суток при температуре от 2–8 °C или, если плазма уже собрана, в течение более продолжительного времени при температуре ниже –20 °C (предпочтительно ниже –70 °C).

Для получения необходимого для анализа количества образца необходимо собрать не менее 150 мкл плазмы.

Этап 2. QuantiFERON-CMV ELISA для IFN- γ человека

См. «Содержимое набора», страница 8, и «Необходимые материалы, не входящие в комплект набора», страница 9, чтобы узнать, какие материалы необходимы для проведения ELISA.

1. Перед проведением анализа все образцы плазмы и реактивы, кроме 100-кратного концентратса коньюгата, должны быть доведены до комнатной температуры (22 ± 5 °C). Выделите на доведение до комнатной температуры не менее 60 минут.
2. Снимите ненужные стрипы планшета ELISA с рамки, запечатайте обратно в пакет из фольги и снова поместите в холодильную камеру для хранения, пока не они потребуются.

Необходимо иметь по крайней мере один стрип для стандартов QF-CMV ELISA и достаточное количество стрипов, соответствующее количеству проходящих исследования пациентов. После использования сохраните рамку и крышку для последующего использования с оставшимися стрипами.

3. Разведите стандарт IFN- γ человека указанным на этикетке флакона объемом деионизированной или дистиллированной воды. Перемешайте осторожно, чтобы свести к минимуму вспенивание и обеспечить полное растворение. При разведении стандарта IFN- γ Standard надлежащим объемом получается раствор концентрацией 8,0 МЕ/мл.

Примечание. Объем разведенного стандарта IFN- γ Standard человека (из набора) различен в разных партиях.

С помощью разведенного стандарта приготовьте серию разведений с четырьмя уровнями концентрации IFN- γ в зеленом разбавителе (Green Diluent, GD) (Рисунок 1, следующая страница). S1 (стандарт 1) содержит 4,0 МЕ/мл, S2 (стандарт 2) содержит 1,0 МЕ/мл, S3 (стандарт 3) содержит 0,25 МЕ/мл, а S4 (стандарт 4) содержит 0 МЕ/мл (чистый GD). Анализ стандартов необходимо проводить как минимум в двух повторностях. Готовьте свежие разведения стандарта набора для каждого цикла ELISA.

Пример процедуры для анализа стандартов в двух повторностях

Пример процедуры для анализа стандартов в двух повторностях

- A Промаркируйте четыре пробирки: S1, S2, S3, S4.
- B Внесите 150 мкл GD в S1, S2, S3, S4.
- C Добавьте 150 мкл стандарта из набора в S1 и тщательно перемешайте.
- D Перенесите 50 мкл из S1 в S2 и тщательно перемешайте.
- E Переносят 50 мкл из S2 в S3 и тщательно перемешивают.
- F Чистый GD служит нулевым стандартом (S4).

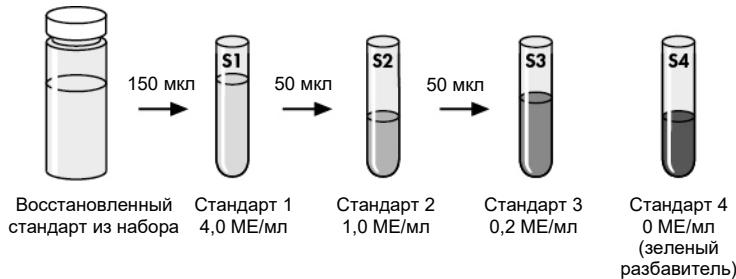


Рисунок 1. Приготовление стандартных растворов методом последовательного разведения

4. Разведите лиофилизированный 100-кратный концентрат коньюгата в 0,3 мл деионизированной или дистиллированной воды. Осторожно перемешайте, сведя к минимуму образование пены, и убедитесь, что коньюгат полностью растворился.

Рабочий раствор коньюгата готовится путем разбавления необходимого количества разведенного 100-кратного концентрата коньюгата зеленым разбавителем (см. Таблицу 1, следующая страница).

Перемешайте полученный раствор тщательно, но осторожно во избежание вспенивания.

Весь неиспользованный 100-кратный концентрат коньюгата сразу после использования снова поместите на хранение при температуре от 2–8 °C.

Используйте только зеленый разбавитель.

Таблица 1. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Количество стрипов	Объем концентрата конъюгата (100-кратная концентрация)	Объем зеленого разбавителя
2	10 мкл	1,0 мл
3	15 мкл	1,5 мл
4	20 мкл	2,0 мл
5	25 мкл	2,5 мл
6	30 мкл	3,0 мл
7	35 мкл	3,5 мл
8	40 мкл	4,0 мл
9	45 мкл	4,5 мл
10	50 мкл	5,0 мл
11	55 мкл	5,5 мл
12	60 мкл	6,0 мл

5. Образцы плазмы, отобранные из пробирок для забора крови, а затем замороженные или хранившиеся более 24 часов до момента проведения анализа, должны быть тщательно смешаны перед их внесением в лунки планшета для ELISA.

Важно! Если образцы плазмы добавляются непосредственно из центрифужированных пробирок для забора крови QF-CMV, необходимо избегать перемешивания плазмы каким-либо образом. Необходимо соблюдать осторожность во избежание взбаламучивания материала на поверхности геля.

6. Если необходимо получить количественные результаты, разбавьте образцы плазмы «ЦМВ» и «митоген» в соотношении 1 : 10 зеленым разбавителем (GD) (10 мкл плазмы + 90 мкл GD). Плазму в пробирке «ноль-контроль» разбавлять не следует.

Рекомендуется выполнить параллельно анализ следующих образцов:

«ноль-контроль», «антиген ЦМВ», «митоген», «антиген ЦМВ» (1:10),
«митоген» (1:10).

Однако программное обеспечение для анализа QuantiFERON-CMV поддерживает также следующие варианты анализа образцов пациентов:

«ноль-контроль», «антиген ЦМВ», «митоген»;
«ноль-контроль», «антиген ЦМВ» (1 : 10), «митоген» (1 : 10);
«ноль-контроль», «антиген ЦМВ», «митоген», «антиген ЦМВ» (1 : 10);
«ноль-контроль», «антиген ЦМВ» (1 : 10), «митоген».

-
7. С помощью многоканальной пипетки внесите 50 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата в соответствующие лунки планшета для ELISA.
 8. Внесите в надлежащие лунки по 50 мкл образцов плазмы для анализа. В последнюю очередь внесите в соответствующие лунки 50 мкл каждого стандарта (1–4). Анализ стандартов необходимо проводить как минимум в двух повторностях.
 9. Закройте планшет для ELISA и тщательно перемешивайте конъюгат и образцы плазмы/стандарты с помощью шейкера для микропланшетов в течение 1 минуты со скоростью 500–1000 об/мин. Не допускайте расплескивания содержимого.
 10. Накройте планшет для ELISA крышкой и инкубируйте при комнатной температуре (22 ± 5 °C) в течение 120 ± 5 минут.

Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей. Отклонение от указанного температурного диапазона может привести к получению ошибочных результатов.

11. Во время инкубации приготовьте рабочий промывочный буфер. Разведите одну часть 20-кратного концентрата промывочного буфера 19 частями деионизированной или дистиллированной воды и тщательно перемешайте.

В комплект поставки входит количество концентрата промывочного буфера (20-кратная концентрация), достаточное для приготовления 2 литров рабочего раствора промывочного буфера.

12. Когда инкубация планшета для ELISA будет завершена, проведите не менее шести циклов промывки лунок 400 мкл рабочего промывочного буфера. Рекомендуется использовать автоматическую мойку для планшетов.

Важно! Для проведения анализа очень важна тщательная промывка. Проследите, чтобы во время каждого промывочного цикла каждая лунка была до краев заполнена промывочным буфером. Между циклами рекомендуется выдерживать по меньшей мере пятисекундный период замачивания.

Для обеззараживания потенциально инфекционных материалов в резервуар для отходов необходимо добавлять стандартное лабораторное дезинфицирующее средство и соблюдать установленные процедуры.

-
13. Для удаления остатков промывочного буфера поместите планшеты вверх дном на безворсовую впитывающую салфетку. Вносят по 100 мкл раствора ферментного субстрата в каждую лунку, закрывают планшет крышкой и тщательно перемешивают содержимое с помощью шейкера для микропланшетов в течение 1 минуты со скоростью 500–1000 об/мин.
 14. Закройте каждый планшет и инкубируйте при комнатной температуре (22 ± 5 °C) в течение 30 минут. Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.
 15. После 30-минутной инкубации внесите в каждую лунку по 50 мкл стоп-реактива для ферментативной реакции в том же порядке, в котором вносился субстрат, и тщательно перемешайте содержимое с помощью шейкера для микропланшетов со скоростью 500–1000 об/мин.
 16. Измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки планшета в течение пяти минут после добавления стоп-реагента, для измерения используйте считающее устройство для микропланшетов с фильтром 450 нм и референсным фильтром 620–650 нм. Значения ОП необходимы для расчета результатов.

Расчеты и интерпретация результатов теста

Программное обеспечение для анализа QuantiFERON-CMV, предназначенное для анализа необработанных данных и расчета результатов, можно получить у компании QIAGEN по адресу www.QuantiFERON.com. Убедитесь, что вы используете самую свежую версию программного обеспечения для анализа QF-CMV.

Программное обеспечение осуществляет контроль качества тест-системы, выстраивает стандартную кривую и выдает результат анализа для каждого пациента, как описано в разделе «Интерпретация результатов» на странице 24. Программное обеспечение выдает значение наименьшего разведения, при котором результат анализа находится в диапазоне, предусмотренном для тест-системы QF-CMV ELISA с учетом коэффициента разведения.

В качестве альтернативы использованию программного обеспечения для анализа QF-CMV результаты могут быть определены в соответствии со следующим методом.

Получение стандартной кривой (если программное обеспечение для анализа QF-CMV не используется)

Для каждого планшета определите средние значения ОП по результатам анализа стандартов набора в двух повторностях.

Постройте стандартную кривую $\log_{(e)}-\log_{(e)}$, откладывая по оси y $\log_{(e)}$ средней ОП, а по оси x — $\log_{(e)}$ концентрации IFN- γ в стандартах в МЕ/мл, исключив из этих расчетов нулевой стандарт. Рассчитывают линию наилучшего соответствия стандартной кривой с помощью регрессионного анализа.

С помощью стандартной кривой для каждого исследуемого образца плазмы определите концентрацию IFN- γ (в МЕ/мл), используя значение ОП для каждой пробы.

Эти расчеты можно выполнить с использованием программных пакетов, прилагаемых к считывающим устройствам для микропланшетов, а также с помощью

стандартных электронных таблиц или статистического программного обеспечения (например, Microsoft® Excel®). Такие пакеты рекомендуется использовать для выполнения регрессионного анализа, расчета коэффициента вариации (%CV) для стандартов и коэффициента корреляции (r) стандартной кривой.

Для отчета используйте результаты анализа при наименьшем разведении, достаточном для получения результата в диапазоне измерений тест-системы QF-CMV ELISA. Необходимо обязательно учитывать коэффициент разведения там, где это необходимо.

Контроль качества анализа

Точность результатов анализа зависит от точности полученной стандартной кривой. Поэтому, прежде чем интерпретировать результаты анализа образцов, необходимо проверить результаты, полученные на стандартах.

Полученные методом ELISA результаты считаются действительными, если:

- среднее значение оптической плотности (ОП) для стандарта 1 составляет $\geq 0,600$;
- коэффициент вариации (CV%) значений ОП для репликатов стандартов 1 и 2 $< 15\%$;
- значения ОП, полученные для репликатов стандартов 3 и 4 при параллельном анализе, не отличаются от соответствующего среднего значения более чем на 0,040 единицы оптической плотности;
- коэффициент корреляции (r), рассчитанный по средним значениям оптической плотности стандартов, $\geq 0,98$.

Программное обеспечение для анализа QF-CMV рассчитывает эти параметры контроля качества и выдает результаты расчетов. Если указанные выше условия не соблюдаются, цикл анализа недействителен и его необходимо повторить.

Среднее значение ОП для нулевого стандарта (зеленый разбавитель) должно быть $\leq 0,150$. Если этот показатель $> 0,150$, то необходимо проверить, правильно ли проводилась процедура промывки.

Интерпретация результатов

Результаты теста QuantiFERON-CMV интерпретируются с использованием критерииев, приведенных в Таблице 2.

Таблица 2. Интерпретация результатов теста QuantiFERON-CMV

Nil (МЕ/мл)	Антиген ЦМВ минус нулевой контроль (МЕ/мл)	Mitogen минус Nil (МЕ/мл)*	Результат QF-CMV	Отчет/интерпретация
≤ 8,0	≥ 0,20 и ≥ 25 % от Nil	Любой показатель	Реактивный†	Антитела к ЦМВ обнаружены
	< 0,20 ИЛИ ≥ 0,20 и < 25 % от значения нулевого контроля	≥ 0,5	Нереактивный	Антитела к ЦМВ НЕ обнаружены
		< 0,5	Неопределенный‡	Получены неопределенные результаты в отношении ответа на ЦМВ
> 8,0§	Любой показатель	Любой показатель	Неопределенный‡	Получены неопределенные результаты в отношении ответа на ЦМВ

* Значения ответа на положительный контроль с митогеном (а иногда и антигены ЦМВ) часто могут находиться вне рабочего диапазона считающего устройства для микропланшетов. Это не оказывает влияния на результаты анализа.

† При отсутствии подозрения на цитомегаловирусную инфекцию изначально положительный результат может быть подтвержден повторным анализом исходных образцов плазмы в двух повторностях с помощью тест-системы QF-CMV ELISA. Если результат повторного анализа в одной или обеих повторностях окажется положительным, то результат анализа индивида следует считать реактивным.

‡ См. «Руководство по устранению неполадок» (страница 40) для получения информации о возможных причинах.

В клинических исследованиях (1) показана клиническая значимость неопределенного результата у пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов, в случаях когда донор реактивен к ЦМВ, однако для контроля с митогеном получено значение ниже 0,5 МЕ/мл. У таких пациентов риск развития ЦМВИ наиболее высок.

§ В клинических исследованиях уровень IFN-γ > 8,0 МЕ/мл при нулевом контроле имел место у менее чем 0,25 % субъектов.

Примечание. При оценке иммунного ответа на антигены ЦМВ измеренный уровень IFN-γ следует использовать вместе с клинической картиной, историей болезни и другими диагностическими показателями. Тест-система QF-CMV не предназначена для определения наличия ЦМВИ. Ее не следует использовать для исключения ЦМВИ.

Ограничения

Результаты теста QuantiFERON-CMV необходимо рассматривать в совокупности с эпидемиологической историей пациента, его текущим состоянием здоровья и другими диагностическими показателями.

Недостоверность или неопределенность результатов возможна по следующим причинам:

- Отступление от порядка проведения процедуры анализа, изложенного в инструкции-вкладыше для QuantiFERON-CMV ELISA (QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert);
- Избыточный уровень IFN- γ в контрольной пробирке
- с момента забора образца крови до его инкубации при температуре 37 °C прошло более 16 часов.

Ожидаемые значения

Ожидаемые значения уровня IFN- γ при использовании тест-системы QuantiFERON-CMV были получены при анализе 591 образца, взятого у здоровых индивидов. 343 образца были определены как серопозитивные, 248 образцов — как серонегативные в отношении IgG к ЦМВ. До анализа QF-CMV ЦМВ-серологический статус испытуемых был неизвестен. Из 248 образцов, взятых у ЦМВ-серонегативных испытуемых, 100 % (248/248), оказались нереактивными по результатам анализа с помощью тест-системы QF-CMV ELISA — концентрация IFN- γ , который вырабатывался в ответ на антиген ЦМВ в соответствующей пробирке (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем), была ниже <0,2 МЕ/мл. На Рисунке 2 показано распределение ответов IFN- γ на содержимое пробирки «антиген ЦМВ» (за вычетом результатов для нулевой контрольной пробирки) у 343 ЦМВ-серопозитивных испытуемых.

Количество образцов

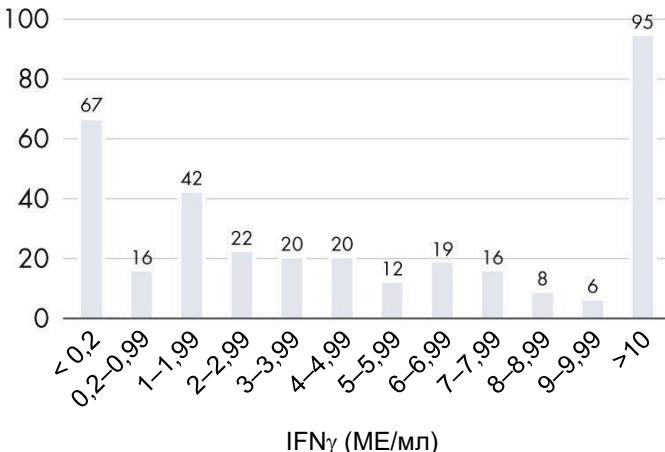


Рисунок 2. Распределение IFN- γ -ответов при проведении теста QF-CMV (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) у серопозитивных здоровых испытуемых (n = 343)

Распределение IFN- γ -ответов на содержимое пробирки «митоген» (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) было получено путем анализа 733 образцов крови здоровых взрослых испытуемых. Анализ проводился с использованием тест-системы QF-CMV ELISA, без учета серологического статуса по IgG к ЦМВ (Рисунок 3). Результат для пробирки «митоген» (за вычетом результатов для нулевой контрольной пробирки) менее 0,5 МЕ/мл указывает либо на ошибки теста, либо на то, что пациент находится в иммунокомпрометированном состоянии. В здоровой популяции в эту категорию попало лишь 2 из 733 результатов.

Количество образцов

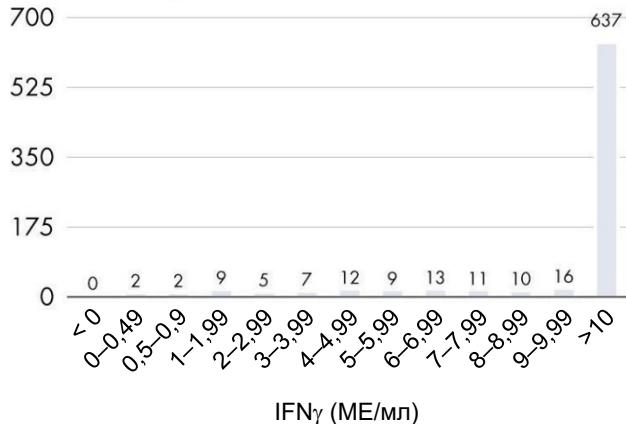


Рисунок 3. Распределение IFN- γ -ответов на митоген (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) у здоровых испытуемых ($n = 733$)

Распределение IFN- γ -ответов на содержимое пробирок с нулевым контролем было получено путем анализа 1020 образцов плазмы крови здоровых испытуемых. Анализ проводился с использованием тест-системы QF-CMV ELISA, без учета серологического статуса по IgG к ЦМВ (Рисунок 4).

Количество участников (%)

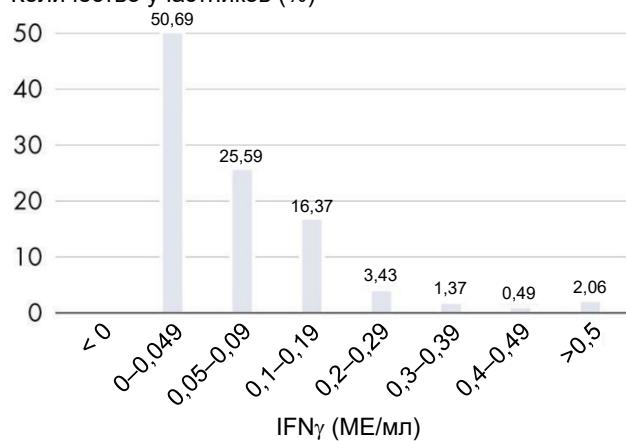


Рисунок 4. Распределение IFN- γ -ответов на содержимое пробирок с нулевым контролем у здоровых испытуемых ($n = 1020$), в процентах от популяции

Рабочие характеристики

Клиническая эффективность

Порог теста для обнаружения предшествующей сенсибилизации к ЦМВ с помощью QF-CMV был установлен после анализа результатов для группы здоровых индивидов ($n = 223$), при котором результаты теста QF-CMV сравнивались с результатами серологических исследований на антитела (IgG) к ЦМВ. ROC-анализ определил, что пороговое значение теста 0,04 МЕ/мл (после вычитания нуля) обеспечивает оптимальные положительные и отрицательные прогностические значения для QF-CMV (площадь под кривой = 0,9679 [95 % ДИ: 0,9442–0,9915, $p < 0,0001$]), и таким образом, данное значение являлось порогом, при котором данная тест-система наиболее эффективно выполняла свое назначение в здоровой популяции.

Рабочие характеристики теста QF-CMV сравнивались с характеристиками серологического теста SeraQuest™ CMV IgG производства Quest International. В отношении теста QF-CMV было продемонстрировано 95%-ное (294/310 индивидов) совпадение с результатами серологического теста на IgG к ЦМВ у здоровых субъектов. При этом ни у одного из 149 серонегативных доноров не было выявлено реактивности по результатам QF-CMV. У 145 из 161 из серопозитивных доноров был выявлен реактивный ответ методом QF-CMV. Общий показатель совпадения по положительным результатам составил 90 %, а по отрицательным результатам — 100 %. В Таблице 3 показана степень согласия между тестом QF-CMV и серологическим статусом по антителам (IgG) к ЦМВ у здоровых людей.

Таблица 3. Совпадение результатов теста QuantiFERON-CMV и серологического теста на IgG к ЦМВ у здоровых субъектов

		Серология ЦМВ		Всего
		Положительный	Отрицательный	
QuantiFERON-CMV	Реактивный	145	0	145 (46,8 %)
	Нереактивные	16	149	165 (53,2 %)
	Всего	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Порог теста

Рекомендуемый клинический порог теста для данного анализа составляет 0,2 МЕ/мл в пробирке «антиген ЦМВ» (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем), хотя для различных клинических условий могут быть утверждены разные пороговые значения.

Клинические исследования

Поскольку абсолютного стандарта для подтверждения или исключения диагноза «цитомегаловирусная инфекция» не существует, выполнить практическую оценку чувствительности и специфичности для QF-CMV невозможно. Специфичность и чувствительность теста QF-CMV были приблизительно определены путем оценки степени совпадения результатов теста QF-CMV и серологического статуса по IgG к ЦМВ у здоровых испытуемых.

Специфичность QF-CMV определялась приблизительно путем оценки частоты ложноположительных результатов (реактивный ответ по результатам QF-CMV) для образцов здоровых доноров без признаков предшествующей сенсибилизации к ЦМВ (индивидуов, серонегативных по IgG к ЦМВ). Чувствительность определялась приблизительно путем оценки QF-CMV-реактивности для образцов здоровых доноров с признаками предшествующей сенсибилизации к ЦМВ (индивидуов, серопозитивных по IgG к ЦМВ). QF-CMV предполагает использование большого количества ЦМВ-специфичных эпитопов из разных белков ЦМВ. Это позволяет охватить весьма большую часть населения с разными гаплотипами HLA I класса (приблизительно 98 % популяции). Поскольку гаплотипы HLA субъектов, проходивших анализ, результаты которого сопоставлялись с серологическим статусом по ЦМВ, были неизвестны, ожидалось, что у небольшого процента серопозитивных индивидов будет отсутствовать ответ на антиген в пробирках для забора крови QF-CMV.

Специфичность

При анализе 591 образца крови здоровых испытуемых не было получено ложноположительных результатов теста QF-CMV у индивидов, серонегативных по результатам серологического исследования на IgG к ЦМВ. Все образцы (248 из 248) оказались нереактивными при анализе с помощью тест-системы QF-CMV ELISA и негативными по результатам серологического анализа на IgG к ЦМВ. Таким образом, результаты, полученные с помощью теста QF-CMV, на 100 % соответствуют результатам серологического теста на антитела (IgG) к ЦМВ.

Также на 100 % совпали результаты этих двух анализов и в рамках других исследований специфичности с участием пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов (1–8); пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (9, 10), а также ВИЧ-инфицированных пациентов (11).

Чувствительность

В рамках исследования 343 образцов крови здоровых испытуемых, серопозитивных по IgG к ЦМВ, определялась степень совпадения результатов теста QF-CMV и серологического анализа на IgG к ЦМВ. Она составила 80,5 %: 276 из 343 образцов были реактивны по результатам теста QF-CMV и позитивны по результатам серологического анализа на IgG к ЦМВ. Наблюдаемое несоответствие может быть обусловлено ложноположительной серологией ЦМВ или отсутствием реагирующих типов HLA у обследованных лиц.

Показатели совпадения результатов оценки чувствительности были ниже в рамках других исследований чувствительности — с участием пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов (1–8); пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (9, 10), а также ВИЧ-инфицированных пациентов (11). Это, возможно, обусловлено наличием ложноположительных результатов серологического анализа на ЦМВ, отсутствием реактивных типов HLA у испытуемых либо отсутствием у таких пациентов реактивных Т-клеток в связи с угнетением иммунитета.

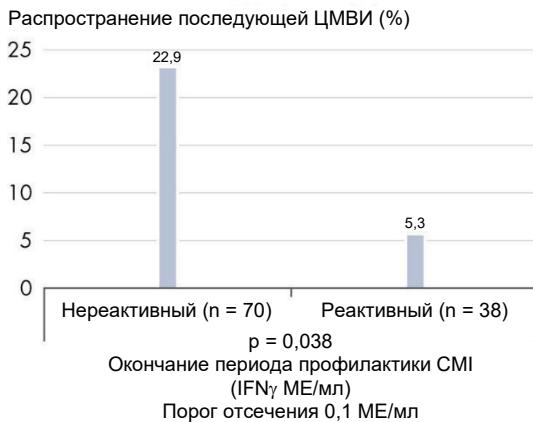
Исследования, подчеркивающие клиническую пользу

Как серологический метод определения антител IgG к ЦМВ, так и метод QF-CMV при использовании по прямому назначению позволяют выявить наличие иммунитета к ЦМВ. При трансплантации серологический анализ на ЦМВ широко используется в качестве предтрансплантационной процедуры для определения риска развития осложнений, связанных с ЦМВ, после трансплантации, но в период после трансплантации ценность данного метода ограничена. В качестве альтернативы у реципиентов трансплантатов можно использовать метод QF-CMV для оценки уровня иммунитета к ЦМВ при наличии риска развития симптоматической ЦМВ-инфекции и (или) заболевания в связи с угнетением иммунитета (12–15).

Ряд опубликованных данных клинических исследований в разных когортах пациентов, которым выполнялась трансплантация, демонстрирует полезность тест-системы QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

В рамках масштабного исследования с участием 108 реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов (4) было выявлено, что по завершении анти-ЦМВ-профилактики у пациентов с реактивным результатом QF-CMV частота последующего развития ЦМВИ была значительно ниже (3,3 %, или 1 из 30, при пороговом значении 0,2 МЕ/мл) по сравнению с пациентами с нереактивным результатом QF-CMV (21,8 %, или 17 из 78, $p = 0,044$) (Рисунок 5).

(A)



(B)

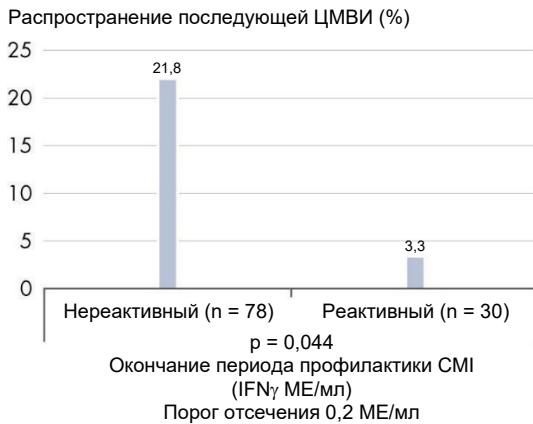


Рисунок 5. Частота ЦМВИ с поздним началом у пациентов с реактивным результатом QuantiFERON-CMV и нереактивным результатом QuantiFERON-CMV в конце профилактики По данным публикации Kumar et al. (4).

Кроме того, ЦМВ-серонегативные реципиенты трансплантатов, получившие орган от ЦМВ-позитивного донора (D+R-) с реактивным результатом QF-CMV, по завершении профилактики были в меньшей степени подвержены развитию ЦМВИ, и этот показатель сохранялся у них в течение более длительного срока. Это свидетельствует о пригодности метода QF-CMV для выявления лиц с риском развития ЦМВИ с поздним началом.

Данное исследование также подчеркивает, что в группе пациентов с самым высоким риском развития ЦМВИ после трансплантации (D+R-) появление реактивного результата в любое время после профилактики связано с высокой вероятностью отсутствия развития ЦМВИ.

При исследовании с участием 37 пациентов после трансплантации солидных органов (6) оценка ответов CD8⁺ ЦМВ-специфических Т-клеток методом QF-CMV помогала предсказать спонтанный клиренс вируса по сравнению с прогрессированием заболевания ЦМВ, с последующим увеличением виреемии ЦМВ. В этом исследовании у 24 из 26 пациентов (92,3 %) с реактивным результатом QF-CMV произошел спонтанный клиренс вируса ЦМВ (порог теста IFN- γ : $\geq 0,2$ МЕ/мл), в то время как тот же результат был только у 5 из 11 (45,5 %) пациентов с нереактивным результатом QF-CMV.

В ходе исследования, оценивающего случаи виреемии ЦМВ (7) у 67 реципиентов легкого, было обнаружено, что нереактивный результат QF-CMV предшествовал виреемии ЦМВ в 18 случаях из 25 (72 %), тогда как реактивный ответ QF-CMV предшествовал 4 случаям из 16 (25 %) (точный критерий Фишера, $p = 0,0046$, Рисунок 6).

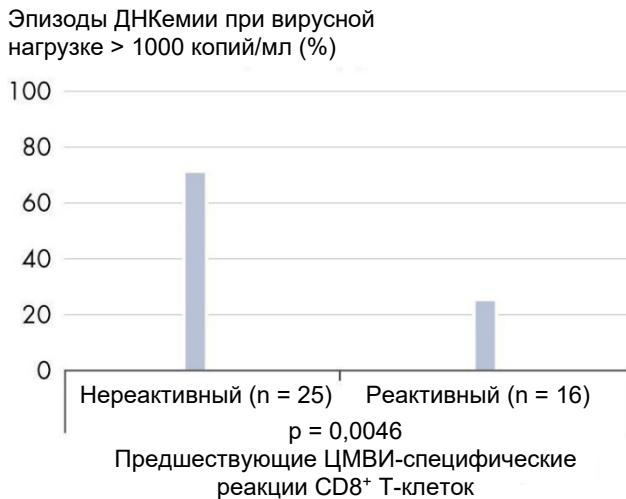


Рисунок 6. Статистический анализ ответов ЦМВ-специфических Т-клеток CD8+ по результатам теста QuantiFERON-CMV и развитие виремии ЦМВ (точный критерий Фишера, $p = 0,0046$) По данным публикации Weseslindtner et al (7).

Масштабное многоцентровое перспективное исследование 127 случаев трансплантации паренхиматозных органов от ЦМВ-серопозитивного донора к ЦМВ-серонегативному реципиенту (8), каждый из которых проходил антивирусную профилактику, показало, что у пациентов с реактивным результатом QF-CMV (с использованием порога теста 0,1 МЕ/мл) в любой момент после завершения анти-ЦМВ-профилактики наблюдалась значительно более низкая частота развития заболевания с поздним началом через 12 месяцев после трансплантации (6,4 %) по сравнению с пациентами с нереактивным результатом QF-CMV (22,2 %) и неопределенным результатом (58,3 %, $p < 0,001$). При классификации неопределенных результатов как являющихся также нереактивными распространение последующей ЦМВИ составило 6,4 % против 26,8 %, $p = 0,024$. Прогностичность положительного и отрицательного результатов QF-CMV в отношении защиты от ЦМВИ составляла 0,90 (95 % ДИ 0,74–0,98) и 0,27 (95 % ДИ 0,18–0,37) соответственно. Данное исследование показало, что метод QF-CMV может быть полезен для прогнозирования того, находится ли пациенты в группе низкого, среднего или высокого риска развития ЦМВИ после профилактики.

В перспективном исследовании 55 случаев трансплантации паренхиматозных органов (8) анализировалась взаимосвязь между предтрансплантационными результатами QF-CMV и эпизодами репликации ЦМВ после трансплантации. В ходе исследования было установлено, что у ЦМВ-серопозитивных реципиентов с нереактивным предтрансплантационным результатом QF-CMV (при пороге теста 0,2 МЕ/мл) наблюдалась более высокая частота репликации ЦМВ после трансплантации (7 из 14, или 50 %) по сравнению с ЦМВ-серопозитивными реципиентами с реактивным результатом QF-CMV (4 из 30, или 13,3 %, $p = 0,021$).

Это исследование показало, что у реципиентов с предтрансплантационным нереактивным ответом QF-CMV, получивших орган от ЦМВ-серопозитивного донора, десятикратно увеличивается риск репликации ЦМВ по сравнению с реципиентами с предтрансплантационным реактивным ответом QF-CMV (скорректированное ОШ 10,49, 95 % ДИ 1,88–58,46). Таким образом, показана полезность предтрансплантационного анализа по методу QF-CMV в прогнозировании риска репликации ЦМВ после трансплантации. Это позволяет индивидуализировать лечение ЦМВИ после трансплантации паренхиматозных органов.

В настоящее время по всему миру завершены (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) либо продолжаются другие исследования, касающиеся определения ответа ЦМВ-специфических Т-клеток CD8⁺ методом QF-CMV в когортах реципиентов трансплантатов.

Публикация Международные консенсусные рекомендации по лечению цитомегаловируса при трансплантации органов

Важность мониторинга специфического иммунитета к ЦМВ признана и отмечается в публикации Обновленные международные консенсусные рекомендации по лечению цитомегаловируса при трансплантации органов. Эти международные основополагающие принципы, разработанные группой экспертов по ЦМВ и трансплантации паренхиматозных органов, созданной Отделением инфекционных заболеваний Общества трансплантации (Transplantation Society), представляют собой доказательную базу и основанные на консенсусном мнении экспертов руководящие принципы лечения ЦМВ, в частности в отношении диагностики, иммунологии, профилактики и лечения.

В данных основополагающих принципах указано, что «С помощью иммунологического мониторинга ЦМВ-специфических Т-клеток можно предсказать риск развития ЦМВ-инфекции у пациентов после трансплантации. Он может быть полезным в качестве ориентиров при профилактике и превентивной терапии» (12).

Эти основополагающие принципы также содержат рекомендации касательно характеристик идеального метода анализа для иммунологического мониторинга, а именно:

- Возможность оценки количества и функции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток реципиента трансплантата
- Возможность измерить уровень IFN- γ
- Простоту выполнения, экономичность и воспроизводимость;
- малую продолжительность цикла обработки;
- простоту доставки образцов в специализированные лаборатории.

Тест QF-CMV отвечает практически всем критериям, указанным в этих рекомендациях, и является единственным стандартизованным методом анализа для иммунологического мониторинга, позволяющим обнаруживать IFN- γ , специфичный к ЦМВ.

Аналитические характеристики тест-системы

В тест-системе QF-CMV ELISA используется рекомбинантный стандарт IFN- γ человека, проверенный по эталонному препарату IFN- γ (рег. № NIH: Gxg01-902-535). Результаты для исследованных образцов выражаются в международных единицах (МЕ) относительно стандартной кривой, полученной путем анализа разведений вспомогательного стандарта, входящего в комплект поставки системы.

Известно, что гетерофильные антитела (например, человеческие антимышиные антитела) в сыворотке или плазме крови определенных лиц могут мешать иммунологическому анализу. В тест-системе QF-CMV ELISA этот эффект гетерофильных антител сведен к минимуму. Для этого в зеленый разбавитель добавлена нормальная мышиная сыворотка, а также используются F(ab')2-фрагменты моноклональных антител для захвата IFN- γ (нанесены на лунки микропланшетов).

Предел обнаружения метода QF-CMV ELISA составляет 0,065 МЕ/мл; не обнаружено признаков хук-эффекта для высоких концентраций (прозоны) при концентрации IFN- γ до 10 000 МЕ/мл. Перекрестная реактивность антител тестсистемы QF-CMV ELISA к испытанным цитокинам (включая ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12) не обнаружена.

Линейность QF-CMV ELISA подтверждена путем параллельного анализа пяти проб 11 пулов плазмы с известной концентрацией IFN- γ при случайном размещении этих проб на планшете для ELISA. Линия линейной регрессии имеет наклон $1,002 \pm 0,011$ и коэффициент корреляции 0,99 (Рисунок 7).

Определенный уровень IFN- γ

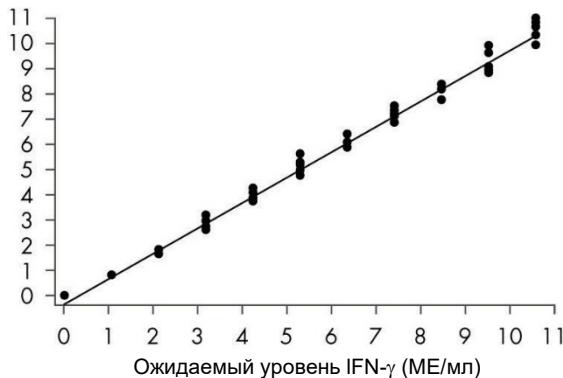


Рисунок 7. Профиль линейности QF-CMV ELISA, определенный по результатам параллельного анализа пяти проб 11 пулов плазмы с известной концентрацией IFN- γ

Воспроизводимость результатов теста QF-CMV ELISA оценивалась путем исследования 20 образцов плазмы с разной концентрацией IFN- γ в трех повторностях в трех лабораториях в течение трех не идущих подряд дней тремя разными операторами. Таким образом, каждый образец подвергался анализу 27 раз в девяти независимых сериях испытаний. Один образец выступал в качестве «ноль-контроля» с рассчитанной концентрацией IFN- γ , равной 0,08 (95 % ДИ 0,07-0,09) МЕ/мл. В остальных 19 образцах плазмы концентрация аналита находилась в диапазоне от 0,33 (95 % ДИ 0,31–0,34) до 7,7 МЕ/мл (95 % ДИ 7,48-7,92).

Погрешность результатов внутри одного анализа оценивалась путем усреднения значений %CV для каждой исследуемой плазмы, содержащей IFN- γ , по результатам анализа для каждого планшета ($n = 9$) и колебалась в диапазоне от 4,1 до 9,1 % (значение %CV). Среднее для серии значение CV (%) (± 95 % ДИ) составило $6,6 \pm 0,6$ %. Средний нулевой IFN- γ показатель плазмы составил 14,1 % CV.

Общая, или межаналитическая, погрешность определялась путем сравнения 27 результатов расчета концентрации IFN- γ для каждого образца плазмы и колебалась в диапазоне от 6,6 до 12,3 % (значение %CV). Общее среднее значение %CV (± 95 % ДИ) составило $8,7 \pm 0,7$ %. Нулевой IFN- γ показатель плазмы составил 26,1 % CV. Такой уровень вариации является ожидаемым, поскольку рассчитанная концентрация IFN- γ низка, а вариация при низкой расчетной концентрации больше, чем при высоких концентрациях.

Техническая информация

Неопределенные результаты

Неопределенные результаты могут быть обусловлены иммунным статусом проходящего исследование индивида, но также могут быть связаны с рядом технических факторов, а именно:

- Инкубирование отобранный крови при температуре 37 °C спустя более чем 16 часов после забора;
- хранение крови вне рекомендуемого температурного диапазона (22 ± 5 °C);
- недостаточное перемешивание содержимого пробирок для забора крови;
- недостаточное промывание планшета для ELISA.

При наличии подозрений на технические проблемы при заборе или обработке образцов крови повторите весь тест QF-CMV с новыми образцами крови. При наличии подозрений на процедурные отклонения в ходе выполнения теста ELISA можно провести тест ELISA повторно с использованием стимулированной антигеном плазмы. Если при выполнении теста ELISA не было ошибок, то неопределенные результаты (из-за низких значений для пробирки «митоген») не должны измениться при повторе теста.

Образцы плазмы со сгустками

В случае образования в образцах плазмы, хранившихся длительное время, фибриновых сгустков необходимо центрифугировать образцы. При этом сгустки выпадут в осадок, что облегчит пипетирование плазмы.

Руководство по поиску и устранению неполадок

Данное руководство по устранению неполадок может быть полезным в решении любых проблем, которые могут возникнуть. См также дополнительную техническую информацию по адресу: www.QuantiFERON.com. Контактную информацию см. на последней странице обложки.

Комментарии и рекомендации

Низкие показатели оптической плотности у стандартов

- a) Ошибка при разведении стандарта Обеспечьте правильное приготовление стандартных разведений согласно инструкции-вкладыша QF-CMV ELISA.
- b) Ошибка пипетирования Убедитесь, что пипетки откалиброваны и используются в соответствии с инструкциями производителя.
- c) Температура инкубации слишком низкая Инкубация при проведении ELISA должна осуществляться при комнатной температуре (22 ± 5 °C).
- d) Слишком малое время инкубации Инкубация планшета с коньюгатом, пробами и образцами должна продолжаться 120 ± 5 мин. Инкубация планшета с раствором ферментного субстрата проводится в течение 30 мин.
- e) На считающем устройстве для планшетов используется неподходящий фильтр Луночный планшет должен анализироваться при 450 нм с помощью референсного фильтра, установленного на длину волн между 620 и 650 нм.
- f) Реактивы слишком холодные Перед проведением анализа все реактивы, за исключением концентрата коньюгата (100-кратная концентрация), необходимо довести до комнатной температуры. Это занимает около 1 часа.
- g) Истек срок годности набора/компонентов Используйте набор до истечения срока годности. Стандартный раствор и 100-кратный концентрат коньюгата необходимо использовать в течение 3 месяцев с момента разведения.

Неспецифическое окрашивание

- a) Неполное промывание планшета Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться больше шести промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее 5 секунд.
- b) Перекрестное загрязнение лунок при проведении ELISA Соблюдайте осторожность при пипетировании и перемешивании образцов, чтобы свести риск загрязнения к минимуму.
- c) Истек срок годности набора/компонентов Используйте набор до истечения срока годности. Стандартный раствор и 100-кратный концентрат коньюгата необходимо использовать в течение 3 месяцев с момента разведения.

Комментарии и рекомендации

- d) Раствор ферментного субстрата загрязнен
Утилизируйте субстрат при окрашивании в синий цвет. Используйте чистые емкости для реактивов.
- e) Смешивание плазмы в центрифужных пробирках до сбора
Убедитесь, что образцы плазмы осторожно собраны выше уровня геля без набора и выпуска пипеткой. Страйтесь не взбаламутить материал на поверхности геля.

Высокий фон

- a) Неполное промывание планшета
Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться больше шести промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее 5 секунд.
- b) Температура инкубации слишком высокая
Инкубация при проведении ELISA должна осуществляться при комнатной температуре ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$).
- c) Истек срок годности набора/компонентов
Используйте набор до истечения срока годности. Стандартный раствор и 100-кратный концентрат коньюгата необходимо использовать в течение 3 месяцев с момента разведения.
- d) Раствор ферментного субстрата загрязнен
Утилизируйте субстрат при окрашивании в синий цвет. Используйте чистые емкости для реактивов.

Нелинейность стандартной кривой, вариабельность результатов параллельного анализа

- a) Неполное промывание планшета
Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться больше шести промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее 5 секунд.
- b) Ошибка при разведении стандарта
Обеспечьте правильное приготовление разведений входящего в набор стандарта согласно настоящей инструкции-вкладышу.
- c) Плохое перемешивание
Тщательно перемешивайте реактивы путем перевертывания или вихревым способом перед внесением на планшет.
- d) Непоследовательная техника пипетирования или приостановка рабочего процесса на этапе постановки теста
Внесение проб и стандартов должно осуществляться непрерывно. Все реактивы должны быть подготовлены до проведения теста.

Информация о продукте и технические руководства предоставляются компанией QIAGEN бесплатно. Их можно заказать через регионального дистрибутора или загрузить на веб-сайте по адресу: www.QuantiFERON.com.

Список литературы

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- α 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. Infect. 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.

СИМВОЛЫ

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие символы.

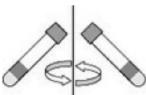
Символ	Значение символа
 <N>	Содержит реагенты для <N> реакций
	Срок годности
	Маркировка CE
 IVD	Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro
 REF	Номер по каталогу
 LOT	Номер партии
 MAT	номер материала;
 GTIN	Глобальный идентификационный номер единицы товара
	Ограничение по температуре
	Не использовать повторно
	Хранить вдали от прямого солнечного света
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель
 EC REP	Полномочный представитель в ЕС

Контактная информация

По вопросам технической поддержки и для получения дополнительной информации обращайтесь в Центр технической поддержки по адресу www.qiagen.com/Support, по тел. 00800-22-44-6000 или через отделы технической поддержки QIAGEN либо региональных дистрибуторов (см. последнюю страницу обложки или веб-страницу www.qiagen.com).

Краткое описание теста ELISA

Этап 1. Инкубация крови

1. Возьмите у пациента кровь в пробирки для забора крови и тщательно перемешайте ее, встряхивая пробирки по 10 (десять) раз так, чтобы вся внутренняя поверхность пробирки покрылась кровью, что необходимо для растворения антигенов на стенках пробирки.
2. Инкубируйте пробирки в вертикальном положении в течение 16–24 часов при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. После инкубации центрифугируйте пробирки в течение 15 минут при ОСЦ 2000–3000 (g) для отделения плазмы от эритроцитов.
4. После центрифугирования не допускайте набора и выпуска плазмы пипеткой или перемешивания плазмы до ее отбора. Всегда соблюдайте осторожность во избежание взбаламучивания материала на поверхности геля.

Этап 2. ELISA для определения уровня IFN- γ

1. Все компоненты для ELISA (кроме 100-кратного концентратса конъюгата) выдержать при комнатной температуре как минимум в течение 60 минут.



2. Развести стандарт деионизированной или дистиллированной водой до концентрации 8,0 МЕ/мл. Приготовьте 4 (четыре) разведения стандарта.



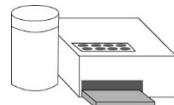
3. Разведите лиофилизированный 100-кратный концентрат конъюгата деионизированной или дистиллированной водой.
4. Разведите конъюгат зеленым разбавителем до рабочей концентрации и внесите по 50 мкл во все лунки.



5. Внесите 50 мкл каждого образца плазмы и 50 мкл стандарта в соответствующие лунки. Перемешайте содержимое с помощью шейкера.
6. Инкубируйте в течение 120 минут при комнатной температуре.



7. Не менее 6 раз промойте лунки промывочным буфером (400 мкл на каждую лунку).



8. Внести по 100 мкл раствора ферментного субстрата в каждую лунку. Перемешайте содержимое с помощью шейкера.

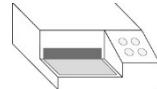


9. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.

10. В каждую лунку внести по 50 мкл стоп-реагента.
Перемешайте содержимое с помощью шейкера.



11. Считайте результаты, используя фильтр на 450 нм и эталонный фильтр на 620–650 нм.



12. Проанализируйте результаты.



История изменения руководства

Документ	Изменения	Дата
L1075110-R06	Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки, добавлены крышки планшетов, страница 9	Октябрь 2019 г.

Эта страница оставлена пустой намеренно.

Эта страница оставлена пустой намеренно.

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

Ограниченнное лицензионное соглашение для набора QuantiFERON-CMV ELISA

Использование настоящего продукта означает согласие покупателя или пользователя продукта со следующими условиями.

1. Изделие подлежит использованию исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к изделию, и настоящим руководством и только с компонентами, которые входят в состав набора. Компания QIAGEN не дает разрешения в рамках своей интеллектуальной собственности на использование или объединение компонентов, входящих в состав настоящего набора, с любыми компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, прилагаемых к изделию, настоящем руководстве и дополнительных протоколах, опубликованных по адресу www.qiagen.com. Некоторые из этих дополнительных протоколов были предоставлены пользователями QIAGEN для пользователей QIAGEN. Компания QIAGEN не гарантирует их правильности, а также не гарантирует того, что они не нарушают прав третьих лиц.
2. Кроме официально заявленных лицензий, компания QIAGEN не предоставляет никаких гарантий того, что данный набор и/или его использование не нарушают прав третьих лиц.
3. Данный набор и его компоненты лицензированы для одноразового использования и не подлежат повторному использованию, восстановлению или перепродаже.
4. Компания QIAGEN прямо отказывается от всех прочих лицензий, заявленных или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено официально.
5. Покупатель и пользователь данного набора соглашаются не совершать и не допускать совершения другими лицами каких-либо действий, которые могут привести к любым действиям, запрещенным выше, или способствовать им. Компания QIAGEN может требовать исполнения запретов, предусмотренных настоящим ограниченным лицензионным соглашением, в судебном порядке в любом суде и получать возмещение всех понесенных ею следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, по любому иску, направленному на исполнение настоящего ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с набором и/или его компонентами.

Актуальные условия лицензии см. на веб-сайте www.qiagen.com.

© QIAGEN, 2019. Все права защищены.

Для заказа www.qiagen.com/shop | Техническая поддержка support.qiagen.com | Веб-сайт www.qiagen.com
