
Листовка за QuantiFERON[®]-CMV 2 x 96

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

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Австралия

Телефон: (Австралия) +613-9840-9800, (Европа) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

1075110BG Изд. 01



Съдържание

Предназначение	5
Въведение	5
Принципи на теста	6
Време, необходимо за извършване на теста	6
Реагенти и съхранение	7
Необходими, но непредоставени материали	8
Съхранение и работа	8
Предупреждения и предпазни мерки	9
Вземане и работа с проби	10
Указания за употреба	11
Етап 1 — Инкубиране на кръвта и събиране на плазмата	11
Етап 2 — QuantiFERON-CMV ELISA за човешки IFN- γ	12
Изчисления и интерпретация на теста	15
Интерпретация на резултатите	16
Ограничения	16
Очаквани стойности	17
Работни характеристики	19
Сравнително тестване	19
Праг на теста	19
Клинични проучвания	20
Специфичност	20
Чувствителност	20
Проучвания, подчертаващи клиничната приложимост	21
Международни консенсусни насоки относно контролирането на цитомегаловирус при трансплантация на солиден орган	24
Работни характеристики на теста	24
Техническа информация	26
Неопределени резултати	26
Ръководство за отстраняване на проблеми	27
Библиография	28
Техническа поддръжка	29

Съкратена процедура на теста	30
Етап 1 — инкубиране на кръвта	30
Етап 2 — IFN- γ ELISA	30

Предназначение

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

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

Въведение

CMV е херпес вирус, с който са заразени между 50–85% от възрастните в популацията. Заразяването с този вирус е често срещано усложнение при потисната имунната система, особено след трансплантация, и може да допринесе в значителна степен за болестността и смъртността при реципиентите на трансплантант. Текущите имunosупресивни терапии, използвани за предотвратяване на отхвърлянето на трансплантирани органи, имат неблагоприятни ефекти върху Т-лимфоцитите и клетъчно-медираните имунни (CMI) отговори, което води до повишаване на податливостта на вирусни инфекции след трансплантация. Важното значение на Т-клетъчната функция при потискането на CMV репликацията се подчертава и от факта, че CD8⁺ CMV-специфичните цитотоксични Т-лимфоцити (CTL) могат да осигуряват защита срещу развитие на заболявания, свързани с вируси. Преброяването на CD8⁺ CMV-специфичните CTL при имunosупресирани пациенти и производството на IFN- γ може да се използват за прогнозиране на риска от развитие на CMV заболяване. IFN- γ може да е заместителен (сурогатен) маркер за идентифицирането на CMV-специфични CTL.

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

Принципи на теста

Тестът QF-CMV се извършва в 2 етапа. Първо, цяла кръв се взема във всяка от епруветките за вземане на кръв на QF-CMV, които включват епруветка с нулева контрола, епруветка с CMV антиген и епруветка с митоген.

Епруветката с митоген се използва в теста QF-CMV като положителна контрола. Това може да е особено приложимо в случаи на съмнение относно имунния статус на пациента.

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

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

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

Тестът се счита за реактивен за IFN- γ отговор, когато епруветката с CMV антиген е с резултат значително над нулевата IFN- γ IU/ml стойност. Митоген-стимулираната плазмена проба служи като IFN- γ положителна контрола за всяка тествана проба. Слабият отговор към митоген посочва неопределен резултат, когато кръвната проба също е с нереактивен отговор към CMV антигелата. Това може да се получи при недостатъчно лимфоцити, намалена лимфоцитна активност поради неправилно обработване на пробата, неправилно напълване/смесване на епруветката с митоген или невъзможност на лимфоцитите на пациента да произведат IFN- γ , например при пациента със скорошна трансплантация. Нулевата проба регулира фона или неспецифичния IFN- γ в кръвните проби. Нивото на IFN- γ в нулевата епруветка се изважда от IFN- γ нивото за епруветката с CMV антиген и епруветката с митоген (вижте „Интерпретация на резултатите“ на стр. 16 в тази листовка за информацията относно интерпретирането на QF-CMV резултатите).

Време, необходимо за извършване на теста

Приблизителното време, необходимо за извършване на теста QF-CMV, е представено по-долу; като е посочено и времето за тестване на множество проби, когато са групирани в партиди:

Инкубиране на епруветките с кръв при 37°C: 16 до 24 часа

ELISA: Около 3 часа за 1 плака за ELISA

Под 1 час работа

Добавете 10 до 15 минути за всяка допълнителна плака

Реагенти и съхранение

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Епруветки за вземане на кръв за CMV и контролен антиген (пакет за употреба при един пациент))	
Каталожен №	0192-0301
Брой елементи	1
QuantiFERON Nil Control (Нулева контрола QuantiFERON) (сива капачка)	1 епруветка
CMV Antigen (CMV антиген) (синя капачка)	1 епруветка
QuantiFERON Mitogen Control (Митоген контрола QuantiFERON) (лилава капачка)	1 епруветка
Листовка	1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (Компоненти на QuantiFERON-CMV ELISA)	
Каталожен №	0350-0201
Ленти микроплаки	24 x 8 ленти за ямки
Human IFN- γ Standard (Човешки IFN- γ стандарт), лиофилизиран	1 x флакон
Green Diluent (Зелен разредител)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (Конюгат 100X концентрат QuantiFERON), лиофилизиран	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (Промивен буфер 20X концентрат QuantiFERON)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (Разтвор на ензимен субстрат QuantiFERON)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопиращ разтвор QuantiFERON)	1 x 15 ml

Необходими, но непредоставени материали

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

Съхранение и работа

Епруветки за вземане на кръв

- Съхранявайте епруветките за вземане на кръв при температура от 4°C до 25°C.
- Срокът на годност на епруветките за вземане на кръв QuantiFERON-CMV е най-много 15 месеца от дата на производство, когато се съхраняват при температура от 4°C до 25°C.

Реагенти на набора за ELISA

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

Разтворени и неизползвани реагенти

За инструкции относно разтварянето на реагентите вижте „Указания за употреба – етап 2“ (стъпки 3 и 5 на стр 12).

- Разтвореният стандарт на набора може да се използва в срок до 3 месеца, ако се съхранява при температура от 2°C до 8°C.

Запишете датата на разтваряне на стандарта на набора.

- След като бъде разтворен, неизползваният конюгат 100X концентрат QuantiFERON трябва да се върне на мястото за съхранение при температура от 2°C до 8°C и да се използва в срок до 3 месеца.

Запишете датата на разтваряне на конюгата.

- Конюгатът с работна концентрация трябва да използва в рамките на 6 часа от приготвянето.
- Промивният буфер с работна концентрация трябва да се съхранява при стайна температура (17°C до 27°C) за период до 2 седмици.

Предупреждения и предпазни мерки

За in vitro диагностика.

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



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

Следните предупреждения за опасности и безопасността се отнасят за компонентите на набора на QF-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопирац разтвор QuantifERON)



Съдържа сярна киселина: Дразнещ. Изрази за обозначаване на рискове и безопасността:* R36/38, S26-36/37/39

■ **Зеленият разрежител** съдържа нормален миши серум и казеин, които могат да тригерират алергични реакции; избягвайте контакт с кожата.

При спешни ситуации, свързани с химикали

Разлив, теч, експозиция или инцидент

Позвънете на CHEMTREC през деня или нощта

В САЩ и Канада: 1-800-424-9300

Извън САЩ и Канада: +1-703-527-3887 (приемат се обаждания за сметка на избрания номер)

Допълнителна информация

Информационни листове за безопасност: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Дразни очите и кожата; S26: При контакт с очите, веднага да се изплакнат обилно с вода и да се потърси медицинска помощ; S36/37/39: Да се носи подходящо защитно облекло, ръкавици и предпазни средства за очите/лицето.

Вземане и работа с проби

Важни забележки преди започване:

Отклонения от указанията в листовката за QF-CMV могат да доведат до погрешни резултати. Прочетете внимателно инструкциите преди употреба.

- Не използвайте набора, ако преди употреба някоя от бутилките е с признаци на повреда или утечка.
- Не смесвайте или използвайте реагенти за ELISA от други партиди на набора на QF-CMV ELISA.
- Изхвърлете неизползваните реагенти и биологични проби в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.
- Не използвайте епруветките за вземане на кръв за QF-CMV или наборите на QF-CMV ELISA след изтичане на срока на годност.

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

1. QuantiFERON Nil Control (Нулева контрола QuantiFERON) (сива капачка)
2. CMV Antigen (CMV антиген) (синя капачка)
3. QuantiFERON Mitogen Control (Митоген контрола QuantiFERON) (лилава капачка)

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

За оптимални резултати трябва да се спазват следните процедури:

1. За всеки пациент вземете 1 ml кръв чрез венепункция директно във всяка от епруветките за вземане на кръв за QF-CMV.

- Тъй като в епруветките от 1 ml кръвта се събира относително бавно, задръжте епруветката на иглата за 2–3 секунди, след като епруветката изглежда изцяло напълнена, за да се гарантира вземането на правилен обем.

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

- Епруветките за вземане на кръв за QF-CMV са валидирани за вземане между 0,8 ml и 1,2 ml при височини над морското равнище до 810 метра (2650 фута). Над тази надморска височина потребителите трябва да се уверят, че кръвта е взета във всяка епруветка в тези граници. Ако кръвотокът е слаб, кръв може да се вземе чрез използване на спринцовка и прехвърляне на 1 ml във всяка от 3-те епруветки. С оглед на безопасността това се извършва най-добре чрез отстраняване на иглата на спринцовката, като се гарантират правилни процедури за безопасността, отстраняване на капачките от три епруветки за QF-CMV и добавяне на 1 ml кръв (до черния маркер отстрани на етикета на епруветката). Поставете обратно капачките плътно и смесете, както е описано по-долу.
- Ако за вземане на кръв се използва игла тип бъртерфлай, трябва да се използва епруветка за „почистване“, за да се гарантира, че тръбичките са запълнени, преди да се използват епруветките за вземане на кръв за QF-CMV.

2. **Веднага след напълване разклатете епруветките 10 (десет) пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв, за да се разтворят антигените по стените на епруветката.**
 - Епруветките трябва да се съхраняват при температура между 17–25°C по време на напълването.
 - Прекомерно енергичното разклащане може да причини нарушаване на гела и да доведе до абнормни резултати.
3. **Обозначете епруветките по подходящ начин.**
4. **Епруветките трябва да се прехвърлят в инкубатор при температура от 37°C ± 1°C възможно най-скоро и до 16 часа след вземането. Не поставяйте в хладилник или фризер кръвните проби.**

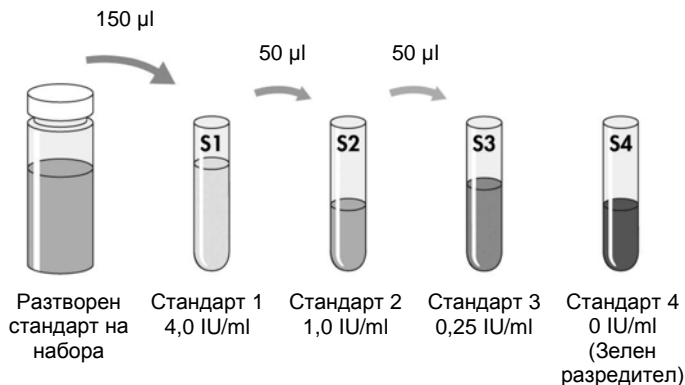
Указания за употреба

Етап 1 — Инкубиране на кръвта и събиране на плазмата

1. **Ако кръвта не се инкубира веднага след вземането, смесването на епруветките трябва да се повтори непосредствено преди инкубирането, както е описано в стъпка 2 в предходния раздел.**
2. **Инкубирайте епруветките ИЗПРАВЕНИ при 37°C за период от 16 до 24 часа. Инкубаторът не изисква CO₂ или овлажняване.**
3. **След инкубирането епруветките за вземане на кръв могат да се съхраняват при температура между 2°C и 27°C за период до 3 дни преди следващата стъпка. След като инкубирате епруветките при 37°C, центрофугирайте епруветките за 15 минути при 2000 до 3000 RCF (g). Запушалката от гел ще отдели клетките от плазмата. Ако това не се случи, епруветките трябва да се центрофугират отново при по-висока скорост.**
 - Събирането на плазма може да се извърши и без центрофугиране, но е необходимо допълнително внимание за отстраняване на плазмата без нарушаване на клетките.
4. **След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.**
 - Плазмените проби трябва да се събират само чрез използване на пипета.
 - Плазмените проби могат да се заредят директно от центрофугирани епруветки за вземане на кръв в плака за QF-CMV ELISA, включително когато се използват автоматизирани работни станции за ELISA.
 - Плазмените проби могат да се съхраняват за период до 28 дни при температура от 2°C до 8°C или, ако плазмата е събрана, под –20°C (за предпочитане под –70°C) за продължителни периоди в епруветки или контейнери за съхранение на плазма.

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

1. Преди употреба всички плазмени проби и реагенти, с изключение на конюгат 100X концентрата, трябва да се темперират до стайна температура (17°C до 27°C). Отделете 60 минути за достигане на стайна температура.
2. Отстранете от рамката лентите, които не са необходими, затворете отново фолиевата опаковка и ги върнете обратно в хладилника за съхранение, докато ви потрябват.
Оставете поне една лента за стандартите QF-CMV ELISA и достатъчно ленти за броя на пациентите, които се тестват. След употреба запазете рамката и капака за употреба с останалите ленти.
3. Разтворете лиофилизирания стандарт на набора с обема от дейонизирана или дестилирана вода, посочен на етикета на флакона със стандарта. Смесвайте внимателно за избягване на образуването на пяна и гарантиране на пълно повторно разтваряне. При разтварянето на стандарта до посочения обем ще се получи разтвор с концентрация 8,0 IU/ml.
4. Стандартната крива е изготвена чрез използване на 3 разреждания на стандарта на набора и само на зеления разредител на набора като стандарт 4 (0 IU/ml).
Използвайте разтворения стандарт на набора за изготвяне на серия на разреждане на 3 концентрации на IFN- γ . Разреждете в зеления разредител на набора (GD) (вижте фигура 1). Стандартите трябва да се тестват поне двукратно; при следващите стъпки се получава обем, достатъчен за това.
 - а. Поставете етикети на 4 епруветки „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
 - б. Добавете 150 μ l от зеления разредител в 4 епруветки (S1–S4).
 - в. Добавете 150 μ l от стандарта на набора в S1 и смесете щателно.
 - г. Прехвърлете 50 μ l от S1 в S2 и смесете щателно.
 - д. Прехвърлете 50 μ l от S2 в S3 и смесете щателно.
 - е. Зеленият разредител самостоятелно служи като нулев стандарт (S4).



Фигура 1. Генериране на стандартна крива. Подгответе пресни разреждания на стандарта на набора за всяка сесия на ELISA.

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

6. **Конюгатът с работна концентрация се приготвя чрез разреждане на необходимото количество разтворен конюгат 100X концентрат в зелен разредител, както е посочено в таблица 1 – Приготвяне на конюгата.**
- Смесете щателно, но внимателно, за избягване на образуването на пяна.
 - Върнете неизползвания конюгат 100X концентрат на съхранение при температура от 2°C до 8°C веднага след употреба.
 - Използвайте само зелен разредител.

Таблица 1. Приготвяне на конюгата

Брой на лентите	Обем на конюгат 100X концентрат	Обем на зеления разредител
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

7. **Преди теста плазмите трябва да се смесят, за да се гарантира, че IFN-γ е равномерно разпределен във всяка проба. Също така разредете плазмите с CMV и митоген 1/10 в зелен разредител (10 µl плазма, смесена с 90 µl GD), ако са необходими количествени резултати. Нулевата плазма не трябва да се разрежда.**
- Препоръчва се да се тестват следните проби:
- Нулева, CMV антиген, митоген, CMV антиген (1/10), митоген (1/10)
- Независимо от това, в софтуера за анализ на QuantiFERON-CMV се поддържат и следните опции за проби на пациента:
- Нулева, CMV антиген, митоген
 - Нулева, CMV антиген (1/10), митоген (1/10)
 - Нулева, CMV антиген, митоген, CMV антиген (1/10)
 - Нулева, CMV антиген (1/10), митоген
8. **Добавете 50 µl прясно приготвен конюгат с работна концентрация в необходимите ямки за ELISA, като използвате многоканална пипета.**
9. **Добавете 50 µl от тестовите плазмени проби в съответните ямки, като използвате многоканална пипета. Накрая добавете 50 µl от всеки от стандартите от 1 до 4.**

10. Смесете конюгата и плазмените проби/стандартите щателно, като използвате шейкър за микроплаки за 1 минута.
11. Покрийте всяка плака с капак и инкубирайте при стайна температура (17°C до 27°C) за 120 ± 5 минути.
 - Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.
12. По време на инкубирането разреждете една част промивен буфер 20X концентрат с 19 части дейонизирана или дестилирана вода и смесете щателно. Предоставен е достатъчно промивен буфер 20X концентрат за приготвянето на 2 литра промивен буфер с работна концентрация.

Промийте ямките с 400 µl от промивния буфер с работна концентрация за поне 6 цикъла. Препоръчва се автоматизирано промивно устройство за плаки.

 - Щателното промиване е много важно за функционирането на теста. Уверете се, че всяка ямка е **изцяло напълнена** с промивен буфер до горната част на ямката за всеки цикъл на промиване. Препоръчва се период на наkisване от поне 5 секунди между всеки цикъл.
 - Трябва да се добави стандартен лабораторен дезинфектант в резервоара за отпадните течности, както и да се спазват установените процедури за деконтаминация на потенциално заразни материали.
13. Почукайте плаките с лицевата част надолу върху абсорбираща салфетка, за да отстраните остатъчния промивен буфер. Добавете 100 µl разтвор на ензимен субстрат във всяка ямка и смесете щателно, като използвате шейкър за микроплаки.
14. Покрийте всяка плака с капак и инкубирайте при стайна температура (17°C до 27°C) за 30 минути.
 - Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.
15. След 30-минутното инкубиране добавете 50 µl ензимен стопиращ разтвор във всяка ямка и смесете.
 - Ензимният стопиращ разтвор трябва да се добавя към ямките в същия ред и с приблизително същата скорост като субстрата в стъпка 13.
16. Измерете оптичната плътност (OD) за всяка ямка в рамките на 5 минути от спирането на реакцията, като използвате четеца за микроплаки, снабден с филтър за 450 nm и с референтен филтър за 620 nm до 650 nm. Стойностите на OD се използват за изчисляване на резултатите.

Изчисления и интерпретация на теста

Можете да намерите софтуера за анализ на QuantiFERON-CMV за анализиране на необработените данни и изчисляване на резултатите от QIAGEN на www.QuantiFERON.com.

Софтуерът извършва оценка за контрол на качеството на теста, генерира стандартна крива и предоставя резултат от теста за всеки пациент, както е описано подробно в раздела „Интерпретация на резултатите“.

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

Генериране на стандартна крива

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

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

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

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

Качествен контрол на теста

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

За да е валиден ELISA:

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

Ако горепосочените критерии не са удовлетворени, работният цикъл е невалиден и трябва да се повтори.

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

Интерпретация на резултатите

Резултатите от QuantiFERON-CMV се интерпретират чрез използване на следните критерии:

CMV минус нулевата (IU/ml)*	Митоген минус нулевата (IU/ml)	Резултат от QF-CMV	Докладване/интерпретация
< 0,2	≥ 0,5	Нереактивен	НЕ е открит анти-CMV имунитет
≥ 0,2	Всяка	Реактивен	Открит е анти-CMV имунитет
< 0,2	< 0,5	Неопределен [†]	Резултатът е неопределен за отговор към CMV

* IFN-γ отговорите към CMV антигена и митоген положителната контрола може често да са извън диапазона на четеща за микроплаката. Това не оказва влияние върху качествените резултати.

[†] Вижте раздела „Отстраняване на проблеми“ за възможните причини.

Ограничения

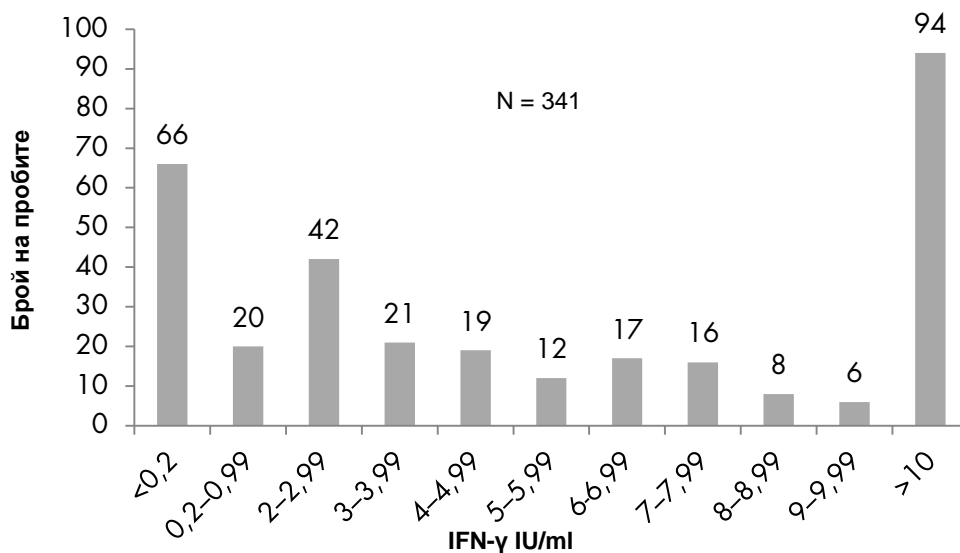
Резултатите от теста QuantiFERON-CMV трябва да се използват заедно с епидемиологичната анамнеза на отделните пациенти, текущия медицински статус и други диагностични изследвания.

Ненадеждни или неопределени резултати могат да се получат поради:

- Отклоняване от процедурите, описани в листовката.
- Прекомерни нива на IFN-γ в нулевата епруветка.
- Период над 16 часа от вземането на кръвта до инкубирането при температура 37°C.

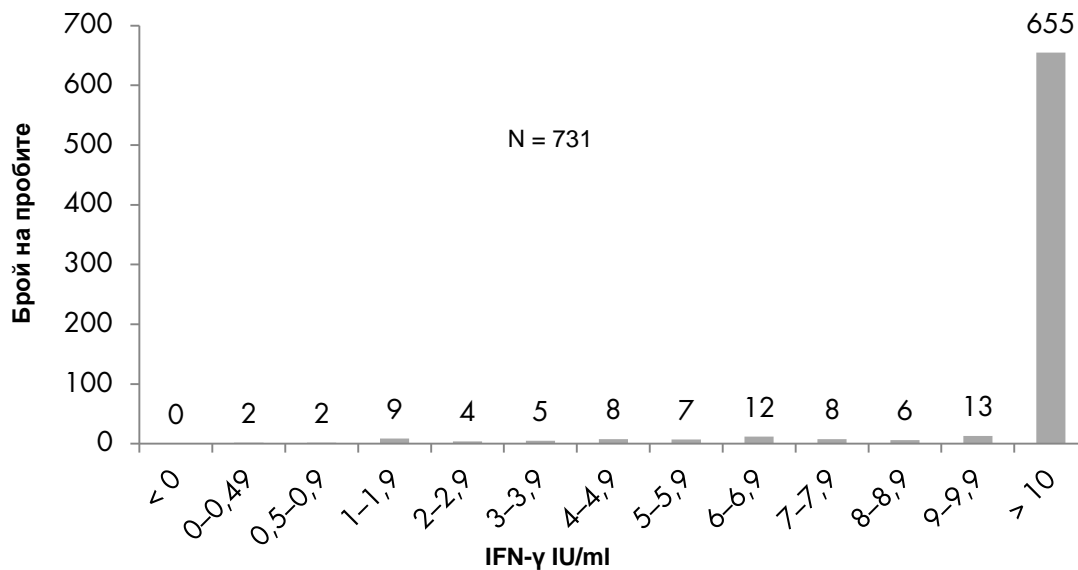
Очаквани стойности

Очакваните стойности на IFN- γ чрез използване на QuantiFERON-CMV са получени от тестване на 591 проби от здрави възрастни участници, като 341 са CMV сероположителни и 250 са серонегативни. При 250 здрави възрастни участници без CMV инфекция, според определеното чрез анти-CMV серологични изследвания (CMV серонегативни), при 100% от участниците се получават IFN- γ отговори от $< 0,2$ IU/ml към епруветката с CMV антигена (минус нулевата). Разпределението на епруветката с CMV антиген (минус нулевата) за 341 здрави участници с CMV инфекция, според определеното чрез анти-CMV серология (CMV сероположителни), е показано на фигура 1.



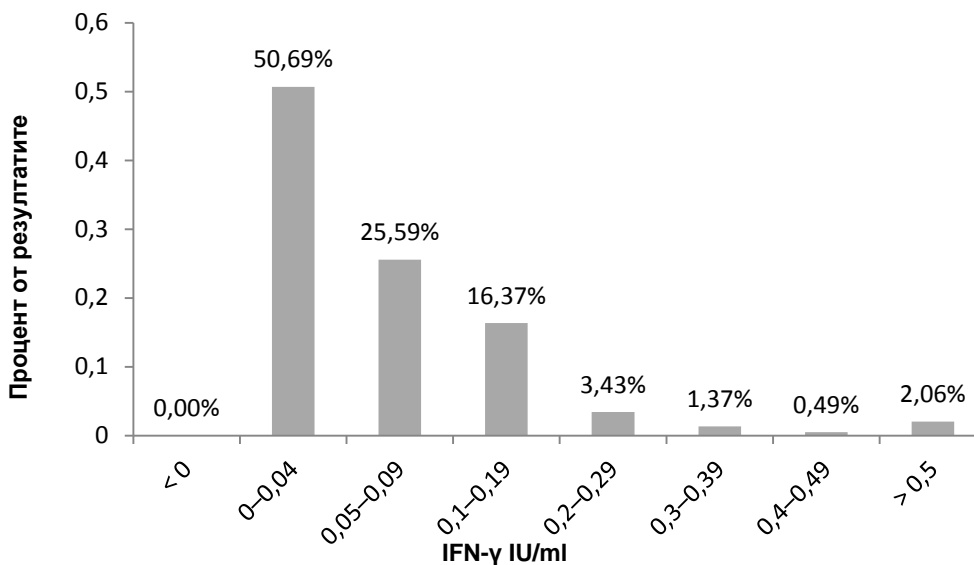
Фигура 1. Разпределение на IFN- γ отговорите за CMV-нулевата при сероположителни здрави участници (n = 341).

Разпределението на резултатите за митоген (минус нулевия фон) при 731 нормални кръвни проби от здрави възрастни участници, независимо от известна CMV инфекция, е показано на фигура 2. Резултатите за митоген (минус нулевата), по-малки от 0,5 IU/ml, посочват или неуспешно извършване на теста, или състояние на компрометирана имунна система на участника. В популацията на здравите участници само 2/731 резултата попадат в тази категория.



Фигура 2. Разпределение на IFN- γ отговорите за митоген-нулевата при здрави участници (n = 731).

Очакваните стойности за нулевите епруветки са показани на фигура 3. Данните са получени от 1020 плазмени проби от здрави възрастни участници, изследвани с теста QuantiFERON-CMV ELISA.



Фигура 3. Разпределение (представено като % от популацията) на IFN- γ отговорите за нулевата при здрави възрастни участници (n = 1020).

Работни характеристики

Сравнително тестване

Установен е праг на теста за откриване преди CMV експозиция чрез използване на QF-CMV след анализ на резултатите от група здрави участници (n = 223), където резултатите от QF-CMV са сравнение със серологичните резултати за CMV. ROC анализът установи, че прагът на теста от 0,04 IU/ml (след изваждане на нулевата) предоставя оптимални положителни и отрицателни предиктивни стойности за QF-CMV (област под кривата = 0,9679 [95%CI = 0,9442 до 0,9915, $p < 0,0001$]), представяйки по този начин прага, при който този тест изпълнява предназначението си най-ефективно в популацията от здрави лица.

При сравнително тестване характеристиките на QF-CMV са сравнени със серологичния тест SeraQuest за CMV IgG (Quest International). Тестът QF-CMV показва 95% (294/310 лица) съвпадение с анти-HCMV серологичния тест за сравнение при здрави лица, като никой от 149-те серологично отрицателни донори не показва каквато и да е реактивност с QF-CMV, а при 145 от 161 сероположителни донори се наблюдава реактивен IFN- γ отговор. Общото съответствие на положителните резултати е 90%, а стойността на съответствието на отрицателните резултати е 100%. Нивото на съответствие между IFN- γ отговорите към CMV пептиди според измереното с QF-CMV при здрави лица и анти-CMV серологичния статус на тези участници чрез използване на серологичния тест SeraQuest за CMV IgG са показани в таблица 2.

Таблица 2. Съответствие между QuantiFERON-CMV и серологичния тест за CMV IgG при здрави участници.

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

Праг на теста

Препоръчваният клиничен праг за този тест е 0,2 IU/ml в епруветката с CMV антиген (минус нулевата), независимо че различни прагове могат да бъдат валидирани за различни клинични среди. Основанието за това се базира на основните имунологични разлики между нормална тестова популация и популациите, при които тестът се счита за клинично полезен – особено имunosупресирани лица, които поради имunosупресия са изложени на риск от развитие на CMV симптоматична инфекция и/или заболяване. При такива високорискови лица клиничното приложение на QF-CMV се основава на точното откриване на нивата на анти-CMV имунитета при тези участници, тъй като липсата на имунитет може да се свърже с развитието на CMV заболяване (1–5, 7, 8, 11–16).

Клинични проучвания

Тъй като няма дефинитивен стандарт за потвърждаване или изключване на диагнозата за инфекция с цитомегаловирус, предвиждането за чувствителността и специфичността за QF-CMV не може да се оцени практически. Направена е приблизителна преценка на специфичността и чувствителността на QF-CMV чрез оценка на съответствието между IFN- γ отговорите към CMV пептиди според измереното с QF-CMV при здрави доброволци и анти-CMV серологичния статус на тези участници чрез използване на серологичен тест за CMV IgG.

Специфичността на QF-CMV е предвидена приблизително чрез оценка на процента на фалшиво положителните резултати (QF-CMV реактивни отговори) при здрави доброволци без доказателства за предходна CMV експозиция (CMV сероотрицателни лица). Чувствителността е предвидена приблизително чрез оценка на здрави доброволци с доказателства за предходна експозиция на CMV (CMV сероположителни лица). Независимо че QF-CMV използва голям брой CMV-специфични епитопи от различни CMV протеини, предоставяйки широко клинично приложение за различна популация с различни HLA клас I хаплотипове, обхватът на тези пептиди не е 100%. Тъй като HLA хаплотиповете на участниците, тествани спрямо CMV серологични изследвания, са неизвестни, очакваше се малък процент серологично положителни лица да са нереактивни към QF-CMV епруветките.

Специфичност

В проучване, проведено при здрави доброволци без доказателства за предходна CMV експозиция (CMV сероотрицателни лица, където $n = 250$), е установено, че нивото на съответствие между IFN- γ отговорите към CMV пептиди според измереното с QF-CMV и анти-CMV серологичната информация е 100%.

При всички други оценките на специфичността, проведени при реципиенти на трансплантанти на солиден орган (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), реципиенти на трансплантанти на хемопоеични стволови клетки (7, 13) и HIV-инфектирани пациенти (2), е доказано, че нивото на съответствие между IFN- γ отговорите към CMV пептиди според измереното с QF-CMV и анти-CMV серологичните изследвания е трайно 100%.

Чувствителност

В проучване, проведено при здрави доброволци без доказателства за предходна CMV експозиция (CMV сероположителни лица, където $n = 341$), е установено, че нивото на съответствие между IFN- γ отговорите към CMV пептиди според измереното с QF-CMV и анти-CMV серологичната информация е 80,6% (275/341). Наблюдаваното несъответствие може да се дължи на използването на по-висок праг на теста (0,2 IU/ml), фалшиво положителни CMV серологични резултати или липса на отговор към CMV пептидите, включени в теста.

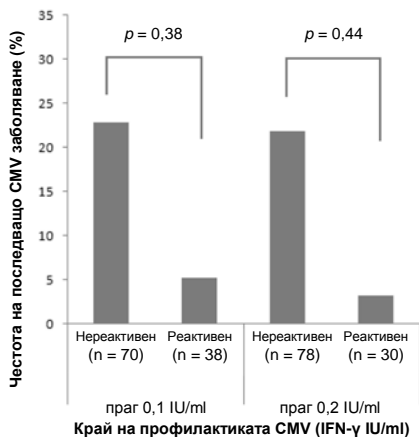
При оценките на чувствителността, проведени при участници с трансплантация на солиден орган (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), трансплантация на хемопоеични стволови клетки (7, 13) и HIV-инфектирани пациенти (2), се наблюдават леко по-ниски нива на съответствие между IFN- γ отговорите към CMV пептиди според измереното с QF-CMV и анти-CMV серологичните отговори при тези пациенти. По-ниското ниво на съответствие може да дължи или на фалшиво положителни CMV серологични резултати, липса на отговор при пациентите към CMV пептидите, включени в теста, или липса на реактивност на T клетките при тези пациенти поради потискане на имунната система.

Проучвания, подчертаващи клиничната приложимост

Както за серологичните изследвания, така и за теста QF-CMV описаното предназначение е предоставяне на възможност за откриване на CMV имунитет. В областта на трансплантациите CMV серологичните изследвания се използват широко преди трансплантирането за установяване на риска от CMV усложнения, появяващи се при реципиентите след трансплантацията, но са с ограничена стойност след трансплантацията. Алтернативно QF-CMV може да се използва при реципиенти на трансплантат за оценка на нивото на CMV имунитета при пациентите с риск от развитие на симптоматична CMV инфекция и/или заболяване поради имunosупресия (6, 9–11).

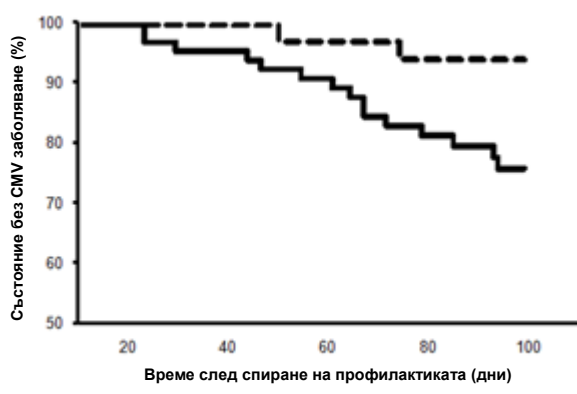
Редица публикувани клинични проучвания при различни трансплантантни кохорти показват приложимостта на QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

В голямо проучване на 108 реципиенти на солиден орган (4) при пациентите с реактивен резултат от QF-CMV при завършването на анти-CMV профилактиката се наблюдава значително по-нисък процент на късно начало на заболяването в сравнение с пациентите с нереактивен резултат от QF-CMV (съответно 5,3% спрямо 22,9%, $p = 0,044$) (Фигура 4).



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

Освен това при пациентите с реактивен резултат от теста QF-CMV при завършването на профилактиката по-често се запазва състоянието без CMV заболяване, както и за по-дълго време (фигура 5), което посочва, че QF-CMV може да се използва за идентифициране на пациентите, изложени на риск от късна поява на CMV заболяване.

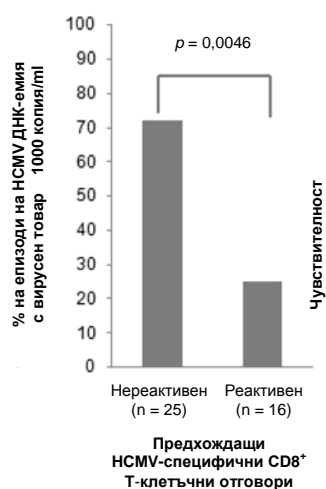


Фигура 5. Време до развитие на CMV заболяване при пациенти с реактивен резултат от QuantiFERON-CMV (маркирани с прекъснатата линия) спрямо пациентите с нереактивен резултат от QuantiFERON-CMV (маркирани с непрекъснатата линия) в края на профилактиката. Данните са възпроизведени от Kumar et al (4).

Това проучване също така подчертава, че в кохортата на пациентите с трансплантация с най-висок риск от развитие на CMV заболяване (CMV сероотрицателните реципиенти, които са получили орган от CMV сероположителен донор, т.е. Д+/P-) реактивният резултат от QF-CMV по което и да е време след профилактиката се свързва с 90% шанс за запазване на състоянието без CMV заболяване.

В проучване на 37 пациенти с трансплантация на солиден орган (12) оценката на CMV специфичните CD8⁺ Т-клетъчни отговори чрез QF-CMV подпомогна предвиждането на спонтанно вирусно изчистване в сравнение с прогресия на CMV заболяването след повишения на CMV вiremията. В това проучване при 24/26 пациенти (92,3%) с реактивен резултат от QF-CMV се наблюдава спонтанно изчистване от CMV вируса, докато само при 5/11 (45,5%) пациенти с нереактивен резултат от QF-CMV се наблюдава същият изход.

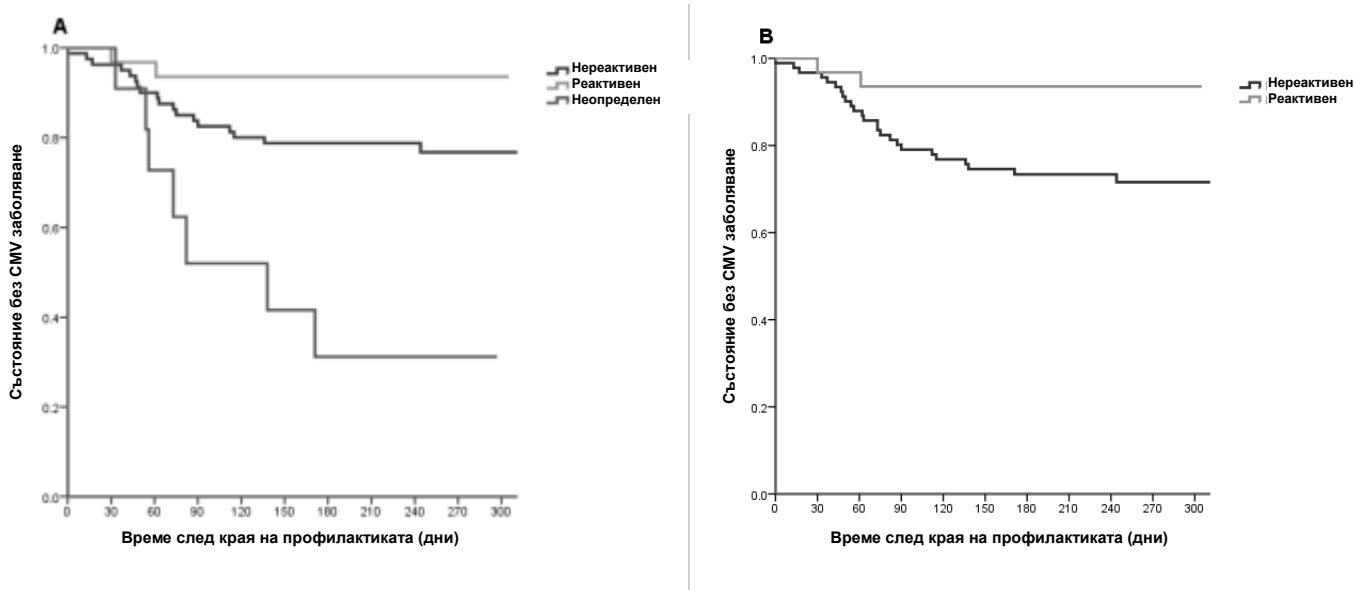
Проучване на 67 пациенти с трансплантация на бял дроб, оценяващо епизодите на CMV вiremия след трансплантацията (14), установява, че 18/25 (72%) епизоди на CMV вiremия се предхождат от нереактивен резултат от QF-CMV спрямо 4/16 (25%) епизода, предхождани от реактивен резултат от QF-CMV (точен тест на Fisher, $p = 0,0046$, вижте фигура 6).



Фигура 6. Статистически анализ на CMV-специфични CD8⁺ Т-клетъчни отговори според установеното с QuantiFERON-CMV и развитие на CMV вiremия (точен тест на Fisher, $p = 0,0046$).

Данните са възпроизведени от Weseslindtner et al (14).

В голямо, многоцентрово, проспективно проучване на 127 Д+/P- реципиенти на солиден орган (15), като всички пациенти са получили антивирусна профилактика, при пациентите с реактивен резултат от QF-CMV (чрез използване на праг на теста от 0,1 IU/ml) в който и да е момент след завършване на анти-CMV профилактиката се наблюдава значително по-нисък процент на късно начало на заболяването 12 месеца след трансплантацията в сравнение с пациентите с нереактивен или неопределен резултат от QF-CMV (съответно 6,4% спрямо 22,2% спрямо 58,3%, $p < 0,001$). Когато неопределените резултати се класифицират също като „нереактивни“, честотата на последващо CMV заболяване е 6,4% спрямо 26,8%, $p = 0,024$ (вижте фигура 7). Положителните и отрицателните предиктивни стойности на QF-CMV за защита от CMV заболяване са съответно 0,90 (95% CI 0,74–0,98) и 0,27 (95% CI 0,18–0,37), което посочва, че реактивният резултат от QuantiFERON-CMV по което и да е време след профилактиката е свързан с 90% шанс за запазване на състоянието без CMV заболяване. Това проучване установи, че QF-CMV може да е полезен за предвиждане дали пациентите са с нисък, среден или висок риск от развитие на последващо CMV заболяване след профилактиката.



Фигура 7. Криви на Карпан-Меиер на честотата на CMV заболяване според резултата от теста QF-CMV.

А Реактивни спрямо нерактивни спрямо неопределени резултати от QF-CMV (log rank тест, $p < 0,001$).

Б Реактивни спрямо нерактивни, където неопределените резултати се приемат за „нерактивни“ (log rank тест, $p = 0,024$).

В проспективно проучване на 55 пациенти с трансплантация на солиден орган (16), където връзката между резултатите от QF-CMV преди трансплантацията и епизодите на CMV репликация след трансплантацията са анализирани, е установено, че по-висока честота на CMV репликация след трансплантацията се наблюдава при P(+) реципиентите с нерактивен резултат от QF-CMV преди трансплантацията (7/14 или 50%), в сравнение с P(+) реципиентите с реактивен резултат от QF-CMV (4/30 или 13,3%).

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

Множество други проучвания, изследващи откриването на CMV-специфични CD8⁺ Т-клетъчни отговори с помощта на QF-CMV в кохорта на реципиенти на трансплантант, са завършени (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) или все още се провеждат в световен мащаб.

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

Значението на мониторирането на CMV-специфичния имунитет е взето под внимание и са публикувани „Международни консенсусни насоки относно контролирането на цитомегаловирус при трансплантация на солиден орган“ (6). Тези международни насоки, разработени от група експерти по CMV и трансплантацията на солиден орган, свикана от отдела по инфекциозни заболявания на Организацията по трансплантации, представляват консенсусни насоки, базирани на доказателства и експертни оценки, относно контролирането на CMV, включително: диагностиката, имунологията превенцията и лечението.

Тези насоки заключават, че „Мониторирането на имунитета по отношение на CMV-специфичните Т-клетъчни отговори може да предвиди кои пациенти са с риск от CMV заболяване след трансплантацията и може да е полезно за насочване на профилактиката и превантивните лечения“ (6).

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

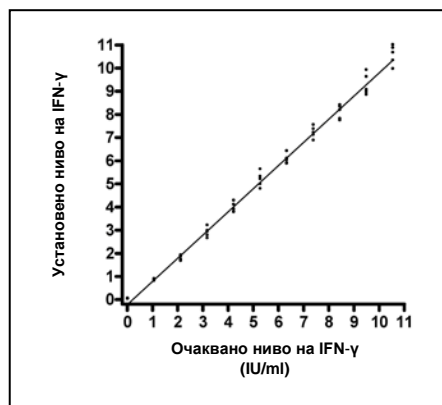
- Възможност за оценка на количеството и функционирането на CD4⁺ и CD8⁺ Т клетките на реципиента на трансплантант
- Възможност за измерване на IFN- γ
- Лекота на извършване, рентабилност и възпроизводимост
- Кратко време на получаване на резултат
- Лесно изпращане на проби до специализирани лаборатории

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

Работни характеристики на теста

Доказано е, че методът за измерване на концентрацията на IFN- γ с QF-CMV ELISA е линеен от нула до 10 IU/ml (фигура 8). Проучването за линейност е проведено чрез поставяне на 5 репликата на 11 плазмени сборни проби с известна концентрация на IFN- γ на случаен принцип в плака за ELISA.

При QF-CMV ELISA не се наблюдава прозонов (Hook) ефект на висока концентрация при концентрации на IFN- γ до 100 000 IU/ml.



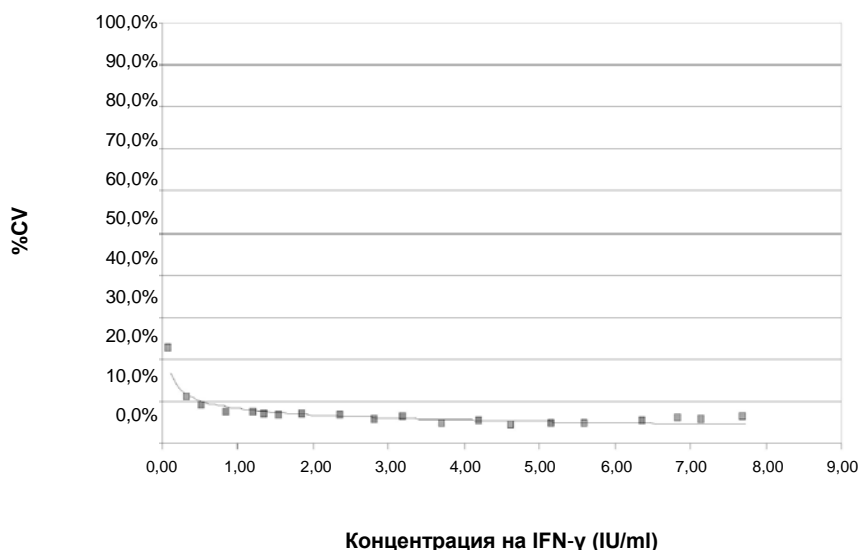
Фигура 8. Линеен профил на QF-CMV ELISA, установен чрез тестване на 5 репликата на 11 плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ . Линейната регресионна линия е с наклон от $1,002 \pm 0,011$ и корелационен коефициент от 0,99.

Интра- и интертестовата неточност (%CV) на QF-CMV ELISA са установени чрез изследване на 20 плазмени проби с различни концентрации на IFN- γ в 3 репликата, в 3 центъра, в 3 непоследователни дни от 3-ма оператори. По този начин всяка проба е тествана 27 пъти в 9 независими работни цикъла на теста. Една проба е нулевата контрола и е с изчислена концентрация на IFN- γ от 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. При останалите 19 плазмени проби диапазонът на концентрациите е 0,33 (0,31–0,34) до 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

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

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

Профилът на прецизността за QF-CMV ELISA е показан на фигура 9 и посочва, че неточността не се увеличава при по-високи концентрации на IFN- γ .



Фигура 9. Профил на прецизността на QF-CMV ELISA, определен чрез тестване на 20 плазмени проби трикратно в 3 непоследователни дни, в 3 центъра от 3-ма оператори. Линията на тренда е изчисление на най-малките квадрати.

Проведено е проучване за установяване на възпроизводимостта на теста QF-CMV чрез използване на кръвни проби от 8 участници с неизвестен CMV статус. Кръвта за всеки участник е взета в три комплекта епруветки на QF-CMV (3 x нулева, 3 x CMV и 3 x митоген). След това трите комплекта епруветки са инкубирани в три различни центъра (по един комплект от нулевата, CMV и митоген в център), както е посочено в листовката. След инкубацията от 16–24 часа епруветките са центрофугирани и е извършено събиране на плазмата.

ELISA са извършени след това три пъти във всяка от трите лаборатории, генерирайки три резултата от QF-CMV за всеки участник в лаборатория (9 резултата общо във всички лаборатории). Във всяка лаборатория е използван различен оператор. Плаките, използвани за проучването, не са непременно от партида с един и същ номер, но в рамките на съответните дати на изтичане на срока на годност.

Възпроизводимостта по отношение както на диагностичния статус (реактивни, нереактивни или неопределени), така и на цифровата стойност са определени за всяка кръвна проба. Възпроизводимостта на цифровата стойност е оценена само за реактивните проби (представена като %CV), тъй като нивата на IFN- γ в „нереактивните“ проби са прекалено ниски за осигуряване на значимо предвиждане на точността.

Като цяло, диагностичната възпроизводимост е 100%, където определеният с QF-CMV диагностичен статус на всичките 8 доброволци е възпроизведен във всички центрове във всички изследвания, като не се съобщава за неопределени проби. Възпроизводимостта на реактивните проби е приемлива както в рамките на самия център, така и между центровете. Средният %CV за всеки от тестовите центрове е 4,5% (Център 1), 5,9% (Център 2) и 7,3% (Център 3). Като цяло, %CV между центровете е 5,9% за всичките 5 реактивни проби. Стойностите на коефициента на вариация под 10% се считат за отлични.

Техническа информация

Неопределени резултати

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

- Период над 16 часа от вземането на кръвта до инкубирането при 37°C.
- Съхраняване на кръвта извън рамките на препоръчвания температурен диапазон (17°C до 27°C).
- Недостатъчно смесване на епруветките за вземане на кръв.

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

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да е полезно при отстраняване на проблеми, които може да възникнат. За повече информация вижте също техническата информация, предоставена на: www.QuantiFERON.com. За информация за контакти вижте страница 29 и задната корица.

Отстраняване на проблеми при ELISA

Ниски отчитания на оптичната плътност за стандартите

Възможна причина	Решение
а) Грешка при разреждането на стандарта	Уверете се, че разрежданията на стандарта на набора са извършени правилно съгласно листовката.
б) Грешка при пипетирането	Уверете се, че пипетите са калибрирани и се използват съгласно инструкциите на производителя.
в) Температурата на инкубиране е прекалено ниска	Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (17°C до 27°C).
г) Времето на инкубиране е твърде кратко	Инкубирането на плаките с конюгат, стандарти и проби трябва да е за 120 ± 5 минути. Разтворът на ензимния субстрат се инкубира в плаката за 30 минути.
д) Използван е неправилен филтър на четеца за плаки	Плаките трябва да се отичат при 450 nm с референтен филтър между 620 и 650 nm.
е) Реагентите са твърде студени	Всички реагенти, с изключение на конюгата 100X концентрат, трябва да се темперират до стайна температура преди започване на теста. Това отнема около 1 час.
ж) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност	Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100X концентрат се използват в рамките на 3 месеца сред датата на разтварянето.

Неспецифично оцветяване/висок фон

Възможна причина	Решение
а) Непълно промиване на плаката	Промийте плаката поне 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на накисване от поне 5 секунди между циклите.
б) Температурата на инкубиране е твърде висока	Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (17°C до 27°C).
в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност	Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100X концентрат се използват в рамките на три месеца сред датата на разтварянето.
г) Разтворът на ензимен субстрат е контаминиран	Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реагенти.
д) Смесване на плазмата в епруветки за центрофугиране преди събирането ѝ	Уверете се, че плазмените проби са внимателно събрани от материала над гела без изтегляне и накапване, като внимавате да не нарушавате материала по повърхността на гела.

Библиография

1. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* **9**, 165.
2. Singh, K.P., Howard, J.L., Wild, S.P., Jones, S.L., Hoy, J., Lewin, S.R. (2007) Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of HCMV disease despite CD4+ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* **124**, 200.
3. Westall, G.P., Mifsud, N., Kotsimbos, T. (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. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**, 76.
6. Kotton, C.N., et al. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. 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.
8. Lachmanova, A.I., et al. (2010) Quantiferon-CMV Test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **42(9)**, 3574.
9. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 26 October 2010; doi:10.1038/nrneph.2010.
10. 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(10)**, 735-11.
11. Giulieri, S, Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11(1)**, 17.
12. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E., Humar, A. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93(2)**, 195.
13. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detecting and estimating the magnitude and functionality of the CMV-specific IFN- γ CD8+ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* Online ahead of print 29 February 2012; doi: 10.1128/CVI.05633-111.
14. 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(8)**, 2172.
15. Manuel, O., et al. (2012) 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.* (Manuscript accepted November 2012).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Manuscript accepted November 2012).

Техническа поддръжка

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ■ techservice-ap@qiagen.com

Europe ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

USA/Canada ■ techservice-na@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) ■ techservice-latam@qiagen.com

Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

Съкратена процедура на теста

Етап 1 — инкубиране на кръвта

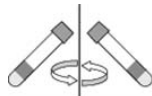
1. Вземете кръв от пациента в епруветките за вземане на кръв и ги смесете, като разклатите епруветките 10 (десет) пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв, за да се разтворят антигените по стените на епруветката.



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



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

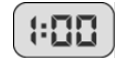


4. След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.



Етап 2 — IFN- γ ELISA

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

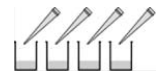


2. Разтворете стандарта на набора до 8,0 IU/ml с дестилирана или дейонизирана вода. Подгответе 4 (четири) разреждания на стандарта.

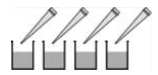


3. Разтворете лиофилизирания конюгат 100X концентрат с дестилирана или дейонизирана вода.

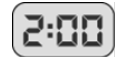
4. Пригответе конюгат с работна концентрация в зеления разредител и добавете 50 μl във всяка ямка.



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



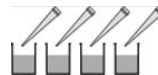
6. Инкубирайте за 120 минути на стайна температура.



7. Промийте ямките поне 6 пъти с 400 μl /ямка от промивния буфер.



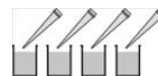
8. Добавете 100 μl разтвор на ензимен субстрат в ямките. Смесете с шейкър.



9. Инкубирайте за 30 минути на стайна температура.



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



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



12. Анализирайте резултатите.



Търговски марки: QIAGEN®, QuantiFERON® (групата QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

Ограничено лицензионно споразумение за набора QuantiFERON-CMV ELISA

Използването на продукта означава приемане от закупилите или използващите продукта лица на следните условия:

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

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

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, всички права запазени.

Phone: (Australia) +613- 9840-9800, (Europe) +49-2103-29-12000, (USA) 1-800-362-7737

E-mail: quantiferon@cellestis.com

