
QuantiFERON[®]-CMV

Příbalový leták 2 x 96

Interferon-gamma test plné krve ke zjištění odpovědí na peptidové antigeny lidského cytomegaloviru

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Austrálie

Telefon: (Austrálie) +613-9840-9800, (Evropa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NĚMECKO

1075110CS Rev. 01



Obsah

Účel použití	4
Úvod	4
Princip testu	5
Čas potřebný k provedení testu	5
Činidla a skladování	6
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	7
Skladování a manipulace	7
Upozornění a bezpečnostní opatření	8
Odběr vzorku a manipulace	9
Návod k použití	10
Fáze 1 – Inkubace krve a sběr plazmy	10
Fáze 2 – QuantiFERON-CMV ELISA pro lidský IFN- γ	10
Výpočty a interpretace testu	13
Interpretace výsledků	14
Omezení	14
Očekávané hodnoty	15
Funkční vlastnosti	16
Prediktivní testování	16
Prahová hodnota testu	17
Klinické studie	17
Specifická	17
Citlivost	18
Studie zdůrazňující klinický přínos	18
Mezinárodní konsenzus o léčbě infekce cytomegalovirem u pacientů s transplantovanými solidními orgány	21
Funkční vlastnosti	21
Technické údaje	23
Nejednoznačné výsledky	23
Návod na řešení problémů	24

Literatura	25
Technická podpora	26
Zkrácený postup testu	30
Fáze 1 – inkubace krve	30
Fáze 2 – IFN- γ ELISA	30

Účel použití

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) je in-vitro analýza s použitím směsi peptidů simulující bílkoviny lidského cytomegaloviru (CMV) ke stimulaci buněk v heparinizované plné krvi. Detekce interferon-gamma (IFN- γ) pomocí testu ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se používá ke kvantifikaci in-vitro reakcí na tyto peptidové antigeny, které souvisí s kontrolou imunitní reakce na infekci CMV. Ztráta imunitní funkce může souviset s rozvojem onemocnění cytomegalovirem (CMV). Test QF-CMV je určen k monitorování úrovně imunity pacienta proti CMV.

QF-CMV není test k určení infekce CMV a neměl by být používán k vyloučení možnosti infekce CM.

Úvod

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

QF-CMV je test pro odpovědi CMI na peptidové antigeny, které simulují bílkoviny CMV. Peptidy CMV jsou navrženy pro cíle CD8⁺ T buněk, včetně A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 a Cw6 (A30, B13) haplotypy HLA třídy I pokrývající > 98 % lidské populace. Krev osob infikovaných virem CMV obvykle obsahuje lymfocyty CD8⁺, které tyto antigeny rozpoznají. Tento proces rozpoznání zahrnuje vytvoření a sekreci cytokinu, IFN- γ . Detekce a následná kvantifikace IFN- γ tvoří základ tohoto testu.

Princip testu

Test QF-CMV se provádí ve 2 fázích. Nejprve se odebere plná krev do každé zkumavky QF-CMV pro odběr krve, mezi které patří zkumavka Nil Control, zkumavka CMV Antigen, a zkumavka Mitogen.

Zkumavka Mitogen se používá při testu QF-CMV jako pozitivní kontrola. Toho lze využít obzvláště v případech, kdy existují pochybnosti o stavu imunitního systému osoby.

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

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

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

Test je považován za reaktivní na odezvu IFN- γ , pokud je hodnota zkumavky CMV Antigen významně vyšší než hodnota Nil IFN- γ IU/ml. Vzorky mitogenem stimulované plazmy slouží jako pozitivní kontrola IFN- γ pro každý testovaný vzorek. Nízká odezva na mitogen označuje nejednoznačný výsledek, pokud má vzorek krve také nereaktivní odezvu na antigeny CMV. K této situaci může docházet při nedostatku lymfocytů, snížené aktivitě lymfocytů v důsledku nesprávného zacházení se vzorkem, nesprávného plnění/mísení zkumavky Mitogen nebo neschopnosti lymfocytů pacienta vytvářet IFN- γ , například u pacientů, kteří v nedávné době podstoupili transplantaci. Vzorek Nil se upravuje pro pozadí nebo nespecifický IFN- γ v krevních vzorcích. Hladina IFN- γ zkumavky Nil se odečte od hladiny IFN- γ pro zkumavku CMV Antigen a zkumavku Mitogen (informace o interpretaci výsledků QF-CMV viz „Interpretace výsledků“ na straně 14 tohoto příbalového letáku).

Čas potřebný k provedení testu

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

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

Činidla a skladování

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Zkumavky CMV a zkumavky pro odběr krve pro kontrolu antigenu (balení pro jednoho pacienta))

Katalogové č. 0192-0301

Počet prep. 1

QuantiFERON Nil Control
(Kontrola QuantiFERON Nil) (šedý uzávěr) 1 zkumavka

CMV Antigen (modrý uzávěr) 1 zkumavka

QuantiFERON Mitogen Control
(Kontrola QuantiFERON Mitogen) (fialový uzávěr) 1 zkumavka

Příbalový leták 1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (Součásti QuantiFERON-CMV ELISA)

Katalogové č. 0350-0201

Stripy s mikrodestičkami stripy s jamkami 24 x 8

Human IFN- γ Standard (Lidský IFN- γ standardní), lyofilizovaný 1 x lahvička

Green Diluent (Zelený ředící roztok) 1 x 30 ml

QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate
(Konjugát QuantiFERON 100X koncentrát), lyofilizovaný 1 x 0,3 ml

QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate
(Promývací činidlo QuantiFERON 20X koncentrát) 1 x 100 ml

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(Roztok enzymového substrátu QuantiFERON) 1 x 30 ml

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(Zastavovací roztok enzymů QuantiFERON) 1 x 15 ml

Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

- Inkubátor 37 °C; CO₂ není vyžadováno
- Kalibrované pipety s proměnným objemem pro výdej 10 µl až 1000 µl s jednorázovými špičkami
- Kalibrované vícekanálové pipety pro výdej 50 µl a 100 µl s jednorázovými špičkami
- Třepačka mikrodestiček
- Deionizovaná nebo destilovaná voda, 2 litry
- Promývačka mikrodestiček (doporučuje se automatizovaná promývačka)
- Čtečka mikrodestiček s filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm

Skladování a manipulace

Zkumavky pro odběr krve

- Zkumavky pro odběr krve skladujte při teplotě 4 °C až 25 °C.
- Doba skladovatelnosti zkumavek pro odběr krve QuantiFERON-CMV je maximálně 15 měsíců od data výroby, pokud jsou skladovány při teplotě 4 °C až 25 °C.

Činidla soupravy ELISA

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

Rekonstituovaná a nepoužitá činidla

Pokyny ke způsobu rekonstituce činidel naleznete v části „Návod k použití – fáze 2“ (kroky 3 a 5 na stránkách 10 a 11).

- Rekonstituovaný standard soupravy může být uchován až po dobu 3 měsíců, pokud je skladován při teplotě 2 °C až 8 °C.

Poznačte si datum, kdy byl standard soupravy rekonstituován.

- Po rekonstituci musí být nespotřebovaný konjugát QuantiFERON 100X koncentrát vrácen do skladovací teploty 2 °C až 8 °C a musí být spotřebován do 3 měsíců.

Poznačte si datum, kdy byl konjugát rekonstituován.

- Pracovní roztok konjugátu musí být použit do 6 hodin od přípravy.
- Pracovní promývací pufr může být uchován při pokojové teplotě (17 °C až 27 °C) po dobu až 2 týdnů.

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in-vitro.

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.



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

Na komponenty soupravy QF-CMV ELISA Kit se vztahují následující upozornění na nebezpečí a pokyny pro bezpečné zacházení.

Zastavovací roztok enzymů QuantiFERON



Obsahuje kyselinu sírovou: Dráždivý. Věty rizik a bezpečnostní věty:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zelený ředící roztok** obsahuje normální myší sérum a kasein. Ty mohou spouštět alergické reakce; vyhněte se kontaktu s pokožkou.

Pro chemickou nouzovou situaci

Rozlítí, únik, vystavení účinkům nebo nehoda

Volejte nonstop CHEMTREC

V rámci USA a Kanady: 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanady: +1-703-527-3887 (hovory na účet volaného jsou přijímány)

Další informace

Bezpečnostní listy: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Dráždí oči a kůži; S26: V případě kontaktu s očima okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc; S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít.

Odběr vzorku a manipulace

Důležité body před zahájením:

Odchytky od informací uvedených v příbalovém letáku QF-CMV mohou způsobit chybné výsledky. Před použitím si prosím pečlivě přečtete pokyny.

- Nepoužívejte soupravu, pokud jakákoliv láhev s činidlem vykazuje před použitím známky poškození nebo netěsnosti.
- Nesměšujte dohromady činidla ELISA z jiných šarží souprav QF-CMV ELISA.
- Zlikvidujte nepoužitá činidla a biologické vzorky v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- Nepoužívejte zkumavky na odběr krve QF-CMV ani soupravy QF-CMV ELISA po vypršení doby použitelnosti.

QF-CMV využívá následující zkumavky na odběr krve:

1. Kontrola Nil (šedý uzávěr)
2. CMV Antigen (modrý uzávěr)
3. Kontrola Mitogen (fialový uzávěr)

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

Pro získání optimálních výsledků dodržujte následující postupy:

1. **Od každého pacienta odeberte 1 ml krve ze žíly přímo do každé ze zkumavek na odběr krve QF-CMV.**
 - Vzhledem k tomu, že krev do zkumavek o objemu 1 ml vtéká relativně pomalu, udržujte zkumavku na jehle po dobu 2–3 sekund. Jakmile se zdá, že zkumavka je plná, ujistěte se, že je získán správný objem. Černá značka na boční straně zkumavek označuje objem plnění 1 ml. Zkumavky na odběr krve QF-CMV byly validovány pro objemy od 0,8 do 1,2 ml. Jestliže hladina krve v jakékoliv zkumavce není v blízkosti rysky, doporučuje se získat jiný vzorek krve.
 - Zkumavky na odběr krve QF-CMV byly validovány k odběru objemu 0,8 ml až 1,2 ml v nadmořských výškách do 810 metrů (2650 stop). Nad touto nadmořskou výškou se musí uživatelé ujistit, zda je objem krve odebrané do každé zkumavky v rámci tohoto rozmezí. Jestliže odebíraná krev teče příliš pomalu, může se odebrat pomocí stříkačky a 1 ml krve přenést do každé ze 3 zkumavek. Z bezpečnostních důvodů je nejvhodnější odstranit jehlu ze stříkačky, zajistit náležité bezpečnostní postupy, odstranit víčka ze tří zkumavek QF-CMV a přidat 1 ml krve do každé z nich (po černou značku na boční straně štítku každé zkumavky). Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle níže uvedeného popisu.
 - Jestliže se k odběru krve používá motýlková jehla, je nutné před použitím zkumavek na odběr krve QF-CMV použít „odvzdušňovací“ zkumavku k zajištění, že je hadička naplněna krví.
2. **Ihned po naplnění desetkrát (10) dobře protřepejte zkumavky tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.**
 - Zkumavky by v době plnění krví měly být uchovány při teplotě 17–25 °C.
 - Příliš silné třepání může narušit gel a mohlo by vést k neplatným výsledkům.
3. **Označte zkumavky příslušným způsobem.**
4. **Zkumavky musí být co nejdříve přeneseny do inkubátoru při teplotě 37 °C ± 1 °C (do 16 hodin od odběru). Krevní vzorky nechladte ani nezmrazujte.**

Návod k použití

Fáze 1 – Inkubace krve a sběr plazmy

1. Jestliže se neprovede inkubace krve ihned po odběru, musí se mísení zkumavek zopakovat těsně před inkubací, dle popisu v kroku 2 předchozí části.
2. Zkumavky inkubujte ve **VZPŘÍMENÉ** poloze při teplotě 37 °C po dobu 16 až 24 hodin. Inkubátor nevyžaduje CO₂ ani zvlhčování.
3. Po inkubaci mohou být zkumavky na odběr krve uchovány před dalším krokem při teplotě od 2 °C do 27 °C po dobu až 3 dnů. Po inkubaci zkumavek při teplotě 37 °C, zkumavky odstředíte po dobu 15 minut při 2000 až 3000 RCF (g). Gelová zátka oddělí buňky od plazmy. Pokud k tomu nedojde, zkumavky by měly být opětovně odstředěny při vyšší rychlosti.
 - Plazmu je možné sbírat bez odstředění, avšak je nutné věnovat větší péči při odstraňování plazmy, aniž by došlo k rozvření buněk.
4. Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. **Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.**
 - Vzorky plazmy je možné odebírat pouze pomocí pipety.
 - Vzorky plazmy je možné naplnit přímo z odstředěných zkumavek na odběr krve do destičky QF-CMV ELISA, včetně případů, kdy jsou použity automatizované pracovní stanice ELISA.
 - Vzorky plazmy je možné uchovat až po dobu 28 dní při teplotě 2 až 8 °C nebo při teplotě nižší než -20 °C (nejlépe nižší než -70 °C) po delší dobu ve zkumavkách nebo nádobách na uchování plazmy.

Fáze 2 – QuantiFERON-CMV ELISA pro lidský IFN- γ

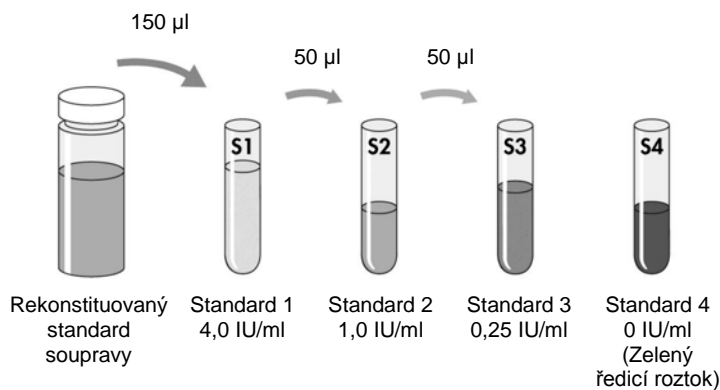
1. **Všechny vzorky plazmy a činidla, kromě konjugátu 100X koncentráту, musí být před použitím ohřáty na pokojovou teplotu (17 až 27 °C). Ponechte teplotu vyrovnat alespoň 60 minut.**
2. **Z rámečku vyjměte stripy, které nejsou vyžadovány, opět zalepte fólií, a vraťte do chladničky do doby, kdy je budete potřebovat.11**

Ponechte alespoň jeden strip pro standardy QF-CMV ELISA a dostatečné množství stripů pro počet pacientů, které chcete testovat. Po použití rámeček uchovejte a uzavřete pro použití se zbývajícími stripy.
3. **Rekonstituujte mrazem sušený standard soupravy pomocí objemu deionizované nebo destilované vody, který je uveden na štítku lahvičky standardu. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění. Rekonstitucí standardu na uvedený objem se získá roztok o koncentraci 8,0 IU/ml.**
4. **Standardní křivka se připravuje pomocí 3 ředění standardu soupravy a zelený ředicí roztok se používá samotný jako standard 4 (0 IU/ml).**

Použijte rekonstituovaný standard soupravy k vytvoření série ředění o koncentracích 3 IFN- γ . Zřeďte v zeleném ředicím roztoku soupravy (GD) (viz obrázek 1 na další straně). Standardy by měly být testovány alespoň v duplikátu; pomocí následujících kroků vytvoříte dostatečný objem pro tento účel.

 - a. Označte 4 zkumavky „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
 - b. Do těchto 4 zkumavek přidejte 150 μ l zeleného ředicího roztoku (S1–S4).
 - c. Do zkumavky S1 přidejte 150 μ l standardu soupravy a důkladně promíchejte.
 - d. Přeneste 50 μ l ze zkumavky S1 do S2 a důkladně promíchejte.

- e. Přeneste 50 μ l ze zkumavky S2 do S3 a důkladně promíchejte.
 f. Zelený ředicí roztok samotný slouží jako nulový standard (S4).



Obrázek 1. Příprava Standardní křivky. Připravte čerstvá ředění standardu soupravy pro každou relaci testu ELISA.

5. Rekonstituujte mrazem sušený konjugát QuantiFERON 100X koncentrát pomocí 0,3 ml deionizované nebo destilované vody. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění konjugátu.
6. Pracovní konjugát se připravuje zředěním požadovaného množství rekonstituovaného konjugátu 100X koncentrátu v zeleném ředicím roztoku dle hodnot v tabulce 1 – Příprava konjugátu.
 - Důkladně avšak jemně promíchejte, aby nedošlo k napěnění.
 - Ihned po použití vraťte případný nespotřebovaný konjugát 100X koncentrát do skladovací teploty 2 až 8 °C.
 - Použijte pouze zelený ředicí roztok.

Tabulka 1. Příprava konjugátu

Počet stripů	Objem konjugátu 100X koncentrátu	Objem zeleného ředicího roztoku
2	10 μ l	1,0 ml
3	15 μ l	1,5 ml
4	20 μ l	2,0 ml
5	25 μ l	2,5 ml
6	30 μ l	3,0 ml
7	35 μ l	3,5 ml
8	40 μ l	4,0 ml
9	45 μ l	4,5 ml
10	50 μ l	5,0 ml
11	55 μ l	5,5 ml
12	60 μ l	6,0 ml

7. **Před testováním musí být plazma promíchána, aby se zajistilo, že je IFN- γ rovnoměrně rozložen v každém vzorku. Zřeďte také plazmy CMV a Mitogen 1/10 v zeleném ředícím roztoku (10 μ l plazmy smíchané s 90 μ l zeleného ředícího roztoku), pokud jsou zapotřebí kvantitativní výsledky. Plazma Nil nesmí být zředěna.**

Doporučuje se otestovat následující vzorky:

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

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

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

8. **Přidejte 50 μ l čerstvě připraveného pracovního konjugátu do požadovaných jamek ELISA pomocí vícekanálové pipety.**
9. **Přidejte 50 μ l vzorků plazmy pro testování do příslušných jamek pomocí vícekanálové pipety. Nakonec přidejte 50 μ l každého ze standardů 1 až 4.**
10. **Promíchejte důkladně konjugát a vzorky plazmy/standardy pomocí třepačky mikrodestiček po dobu 1 minuty.**
11. **Zakryjte každou destičku víčkem a inkubujte při pokojové teplotě (17 až 27 °C) po dobu 120 \pm 5 minut.**
- Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.
12. **Během inkubace zřeďte jednu část promývacího pufru 20X koncentrátu s 19 díly deionizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte. Je k dispozici dostatek promývacího pufru 20X koncentrátu k přípravě 2 litrů pracovního promývacího pufru.**
- Promývejte jamky 400 μ l pracovního promývacího pufru alespoň 6 cyklů. Doporučuje se použít automatizovanou promývačku destiček.
- Důkladné promytí je velmi důležité pro výkon testu. Ujistěte se, že je každá jamka při každém promývacím cyklu **úplně naplněna** promývacím pufrem až po okraj. Doporučuje se ponechat jamky mezi každým cyklem namočené alespoň po dobu 5 sekund.
 - Do odpadního zásobníku by měl být přidán standardní laboratorní dezinfekční prostředek a je nutné dodržovat zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.
13. **Poklepejte destičkami čelem dolů na absorpční utěrku, abyste odstranili zbytky pufru. Do každé jamky přidejte 100 μ l roztoku enzymového substrátu a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrodestiček.**
14. **Zakryjte každou destičku víčkem a inkubujte při pokojové teplotě (17 až 27 °C) po dobu 30 minut.**
- Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.
15. **Po uplynutí 30 minut inkubace do každé jamky přidejte 50 μ l zastavovacího roztoku enzymů a promíchejte.**
- Zastavovací roztok enzymů by měl být přidán do jamek ve stejném pořadí a přibližně stejnou rychlostí jako substrát v kroku 13.
16. **Změřte optickou hustotu (OD) každé jamky během 5 minut od zastavení reakce pomocí čtečky mikrodestiček s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem 620 nm až 650 nm. Hodnoty OD budou použity k výpočtu výsledků.**

Výpočty a interpretace testu

Analyzační software QuantiFERON-CMV pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků je k dispozici u společnosti QIAGEN na adrese www.QuantiFERON.com.

Software provádí vyhodnocení kontroly kvality testu, vytváří standardní křivku a poskytuje výsledky testu pro každého pacienta, jak je uvedeno v části Interpretace výsledků.

Jako alternativa k použití analyzačního softwaru QF-CMV je možné výsledky stanovit dle následující metody.

Vytvoření standardní křivky

Určete střední hodnoty OD replikátů standardů soupravy na každé destičce.

Vytvořte standardní křivku $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ pomocí grafického znázornění $\log_{(e)}$ střední hodnoty OD (osy y) oproti koncentraci $\log_{(e)}$ IFN- γ standardů v IU/ml (osa x), s vynecháním nulového standardu z těchto výpočtů. Vypočítejte čáru nejlepšího výsledku pro standardní křivku pomocí regresní analýzy.

Použijte standardní křivku ke stanovení koncentrace IFN- γ (IU/ml) pro každý testovaný vzorek plazmy s použitím hodnoty OD pro každý vzorek.

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

Kontrola kvality testu

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

Aby byl test ELISA platný:

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

Pokud výše uvedená kritéria nejsou splněna, bude cyklus testu neplatný a musí být zopakován.

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

Interpretace výsledků

Výsledky testu QuantiFERON-CMV jsou interpretovány pomocí následujících kritérií:

CMV minus Nil (IU/ml)*	Mitogen minus Nil (IU/ml)	Výsledek QF-CMV	Zpráva/Interpretace
< 0,2	≥ 0,5	Nereaktivní	Protilátky proti CMV NEBYLY detekovány
≥ 0,2	Jakýkoliv	Reaktivní	Protilátky proti CMV detekovány
< 0,2	< 0,5	Nejednoznačný [†]	Výsledek je nejednoznačný na reakci CMV

* Reakce IFN- γ na pozitivní kontrolu Antigen CMV a Mitogen může být běžně mimo rozsah čtečky mikrodestiček. To nemá žádný dopad na kvalitativní výsledky.

[†] Možné příčiny viz část Řešení problémů.

Omezení

Výsledky testů QuantiFERON-CMV musí být použity společně s epidemiologickou anamnézou každého jedince, současným zdravotním stavem a dalšími diagnostickými hodnoceními.

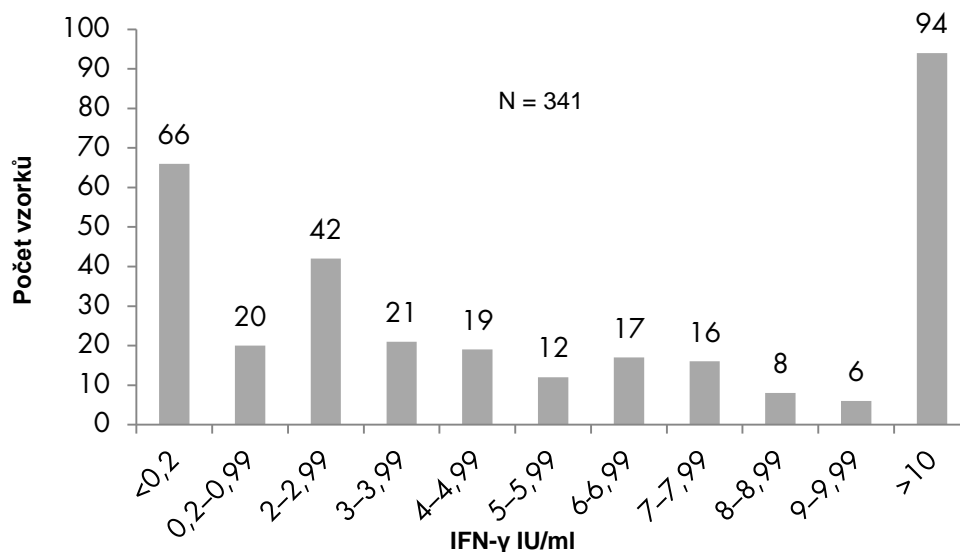
Nespolehlivé nebo neprůkazné výsledky se mohou objevit v důsledku:

- Odchytky od postupu popsaného v příbalovém letáku.
- Nadměrné hladiny IFN- γ ve zkumavce Nil.
- Uplynutí delší doby od odběru vzorku krve do inkubace při 37 °C než 16 hodin.

■ Očekávané hodnoty

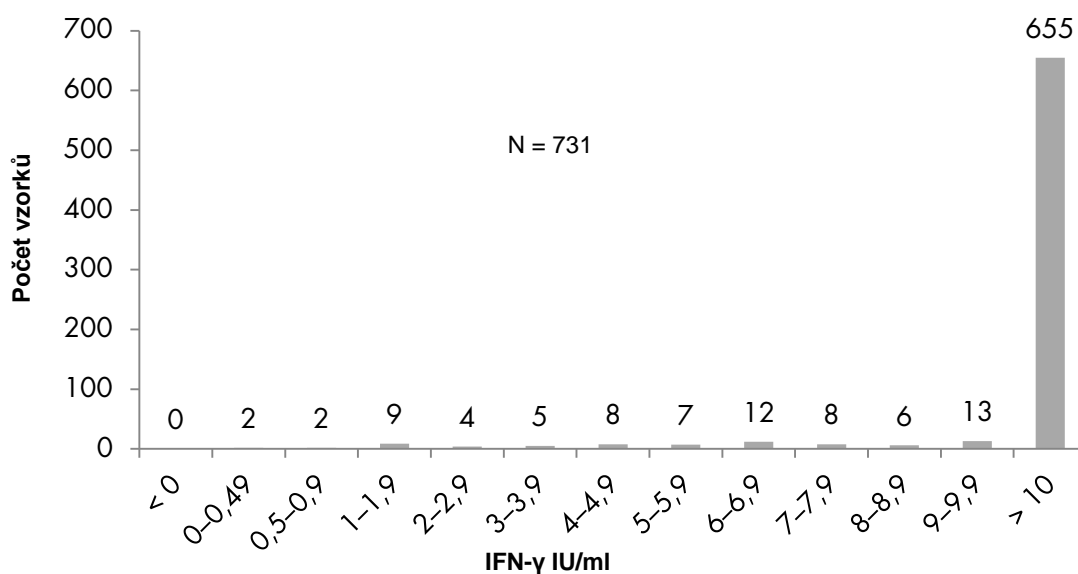
Očekávané hodnoty IFN- γ s použitím testu QuantiFERON-CMV byly získány z testování 591 vzorků od zdravých dospělých osob, z nichž 341 bylo CMV séropozitivních a 250 bylo séronegativních.

U 250 zdravých dospělých subjektů bez infekce CMV, dle stanovení sérologickým testem anti-CMV (CMV séronegativních), vykázalo 100 % subjektů reakce IFN- γ < 0,2 IU/ml na zkušavku CMV Antigen (mínus Nil). Distribuce zkušavky CMV Antigen (mínus Nil) pro 341 zdravých subjektů s CMV infekcí, dle stanovení sérologickým testem anti-CMV (CMV séropozitivních), je znázorněna na obrázku 2.



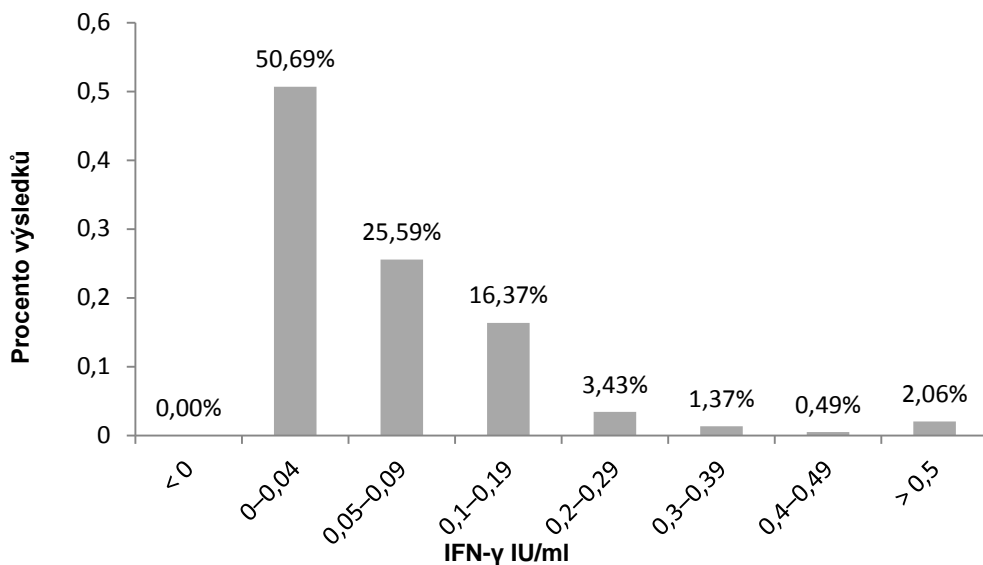
Obrázek 2. Distribuce reakcí CMV-Nil IFN- γ u séropozitivních zdravých subjektů (n=341).

Výsledky distribuce Mitogenu (mínus pozadí Nil) u 731 vzorků normální krve od zdravých dospělých subjektů, bez ohledu na známou infekci CMV jsou uvedeny na obrázku 3. Výsledek Mitogen (mínus Nil) menší než 0,5 IU/ml označuje buď selhání testu nebo že osoba je ve stavu snížené imunity. U zdravé populace do této kategorie spadá pouze 2 ze 731 výsledků.



Obrázek 3. Distribuce reakcí na Mitogen-Nil IFN- γ u zdravých dospělých pacientů (n = 731).

Očekávané hodnoty pro zkumavky Nil jsou znázorněny na obrázku 4. Data jsou odvozena ze 1020 vzorků plazmy od zdravých dospělých subjektů testovaných pomocí testu QuantiFERON-CMV ELISA.



Obrázek 4. Distribuce (vyjádřeno jako % populace) reakcí Nil IFN- γ u zdravých dospělých subjektů (n = 1020).

Funkční vlastnosti

Prediktivní testování

Prahová hodnota testu pro detekci před expozicí CMV pomocí QF-CMV byla stanovena s použitím analýzy výsledků od skupiny zdravých subjektů (n = 223), přičemž výsledky QF-CMV byly porovnány se sérologickými výsledky CMV. Analýza ROC určila, že prahová hodnota testu 0,04 IU/ml (po odečtení nil) poskytla optimální pozitivní a negativní prediktivní hodnoty pro QF-CMV (oblast pod křivkou = 0,9679 [95%CI = 0,9442 až 0,9915, $p < 0,0001$]), a je tedy reprezentována prahovou hodnotou, při které byl tento test prováděn dle určeného použití nejefektivněji u zdravé populace.

Při prediktivním testování byl porovnán výkon testu QF-CMV se sérologickým testem SeraQuest CMV IgG (Quest International). Test QF-CMV vykázal 95% (294/310 osob) shodu s prediktivním sérologickým testem anti-HCMV u zdravých osob, přičemž žádný ze 149 séronegativních vzorků nevykazoval dle testu QF-CMV žádnou reaktivitu a 145 ze 161 séropozitivních vzorků dárců vykazovalo reaktivní odezvu na IFN- γ . Celková shoda pozitivních výsledků byla 90 % a hodnota negativní shody byla 100 %. Úroveň shody mezi reakcemi IFN- γ na peptidy CMV dle měření pomocí QF-CMV u zdravých dobrovolníků a sérologický stav protilátek proti CMV u těchto subjektů s použitím sérologického testu SeraQuest CMV IgG jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Shoda mezi testem QuantiFERON-CMV a sérologickým testem CMV IgG u zdravých subjektů.

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

Prahová hodnota testu

Doporučená prahová hodnota klinického testu pro tuto analýzu je 0,2 IU/ml u zkumavky CMV Antigen (mínus Nil) ačkoliv pro různé klinické prostředí mohou být validovány různé prahové hodnoty. Odůvodnění leží v základních imunologických rozdílech mezi normální testovanou populací a populacemi, u kterých je test považován za klinicky užitečný – konkrétně u osob s potlačenou imunitou, kteří jsou v důsledku imunosuprese ohroženi rozvojem symptomatické infekce CMV a/nebo onemocnění. U takových vysoce rizikových osob spočívá klinický přínos QF-CMV v přesné detekci úrovně imunity proti CMV u těchto subjektů, protože nedostatek imunity může souviset s rozvojem onemocnění CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

Klinické studie

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný definitivní standard pro potvrzení nebo vyloučení diagnózy infekce cytomegalovirem, nelze prakticky vyhodnotit odhad citlivosti a specifity pro QF-CMV. Přibližná specificita a citlivost testu QF-CMV byla stanovena vyhodnocením úrovně shody mezi reakcemi IFN- γ na peptidy CMV, dle měření QF-CMV u zdravých dobrovolníků a sérologickým stavem protilátek proti CMV těchto subjektů s použitím sérologického testu CMV IgG.

Přibližná specificita testu QF-CMV byla stanovena vyhodnocením míry falešně pozitivních výsledků (reaktivní odpovědi QF-CMV) u zdravých dobrovolníků bez důkazu o předchozím vystavení CMV (CMV séronegativní osoby). Přibližná citlivost byla stanovena vyhodnocením zdravých dobrovolníků s prokázanou předchozí expozicí CMV (CMV séropozitivní osoby). Ačkoliv test QF-CMV využívá velké množství epitopů specifických pro CMV z různých bílkovin CMV, a tím poskytuje široké klinické využití širokému spektru populace s různými haplotypy HLA II. třídy, pokrytí těchto peptidů není 100%. Vzhledem k tomu, že haplotypy HLA testovaných subjektů oproti sérologii CMV nebyly známy, očekávalo se, že malé procento sérologicky pozitivních osob bude nereaktivní na zkumavky QF-CMV.

Specificita

Ve studii prováděné u zdravých subjektů bez prokázané předchozí expozice CMV (osoby CMV séronegativní, kde $n = 250$), byla úroveň shody mezi reakcemi IFN- γ na peptidy CMV, dle měření QF-CMV, a sérologickým testem protilátek proti CMV 100%.

U všech ostatních vyhodnocení specifity provedených u příjemců transplantovaných solidních orgánů (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), příjemců hematopoetických kmenových buněk (7, 13) a pacientů infikovaných HIV (2), byla úroveň shody mezi reakcemi IFN- γ na peptidy CMV, dle měření QF-CMV a sérologickým testem na protilátky proti CMV, konzistentně 100%.

Citlivost

Ve studii prováděné u zdravých subjektů bez prokázané předchozí expozice CMV (osoby CMV séropozitivní, kde $n = 341$), byla úroveň shody mezi reakcemi IFN- γ na peptidy CMV, dle měření QF-CMV, a sérologickým testem protilátek proti CMV 80,6% (275/341). Pozorovaná neshoda může být způsobena použitím vyšší prahové hodnoty testu (0,2 IU/ml), falešně pozitivní sérologického testu CMV, nebo nereaktivitou subjektu na peptidy CMV obsažené v testu.

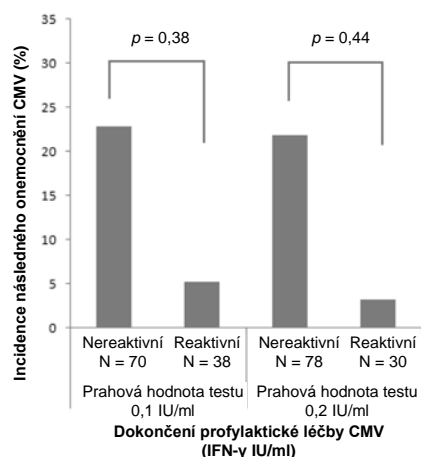
U vyhodnocení citlivosti prováděných u příjemců transplantovaných solidních orgánů (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), příjemců hematopoetických kmenových buněk (7, 13) a pacientů infikovaných HIV (2), byly zjištěny mírně nižší úrovně shody mezi reakcemi IFN- γ na peptidy CMV, dle měření pomocí QF-CMV a CMV séropozitivních reakcí u těchto pacientů. Nižší úroveň shody může být důsledkem falešně pozitivních výsledků sérologie CMV, nereaktivity pacientů na peptidy CMV obsažené v testu nebo absencí reaktivních T-buněk u těchto pacientů v důsledku jejich imunoprese.

Studie zdůrazňující klinický přínos

Sérologický test i test QF-CMV popisují své určené použití jako umožnění detekce imunity vůči CMV. V prostředí transplantací je sérologie CMV široce využívána před transplantací pro stanovení rizika komplikací souvisejících s CMV u příjemce po transplantaci, avšak samotná má po transplantaci omezenou hodnotu. Alternativně lze QF-CMV použít u příjemců transplantovaných orgánů k vyhodnocení úrovně imunity vůči CMV u pacientů, kteří jsou ohroženi rozvojem symptomatické infekce CMV a/nebo onemocnění v důsledku imunoprese (6, 9–11).

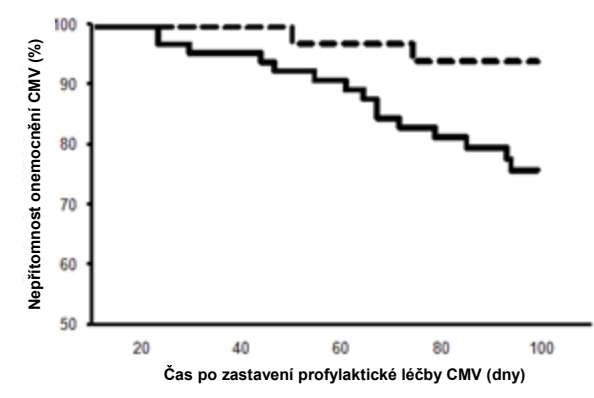
Množství publikovaných klinických studií prováděných v různých kohortách transplantací ukázalo přínos testu QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

V rozsáhlé studii u 108 příjemců transplantace solidních orgánů (4), měli pacienti s reaktivním výsledkem QF-CMV při dokončení profylaktické léčby proti CMV významně nižší míru pozdního nástupu příznaků onemocnění v porovnání s těmi, kteří měli nereaktivní výsledek QF-CMV (5,3 % vs. 22,9 %, $p = 0,044$) (obr. 5).



Obrázek 5. Míra pozdního nástupu onemocnění CMV u pacientů s reaktivním výsledkem testu QuantiFERON-CMV vs. nereaktivní výsledek testu QuantiFERON-CMV při dokončení profylaktické léčby. Zdroj dat: Kumar et al.(4)

Kromě toho pacienti s reaktivním testem QF-CMV při dokončení profylaktické léčby zůstávali bez onemocnění CMV častěji a po delší dobu (obr. 6), což znamená, že QF-CMV může být použit pro identifikaci pacientů ohrožených pozdním nástupem onemocnění CMV.

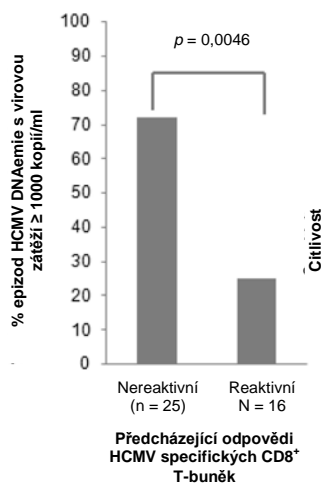


Obrázek 6. Doba pro rozvoj onemocnění CMV u pacientů s reaktivním výsledkem testu QuantiFERON-CMV (zvýrazněno přerušovanou čarou) vs. nereaktivní výsledek testu QuantiFERON-CMV (zvýrazněno nepřerušovanou čarou) při dokončení profylaktické léčby. Zdroj dat: Kumar et al.(4)

Tato studie také upozornila na to, že v kohortě pacientů s transplantacemi s nejvyšším rizikem vzniku onemocnění CMV (CMV séronegativní příjemci transplantovaných orgánů, kteří obdrželi orgán od CMV séropozitivního dárce, tj. D+/R-) byl reaktivní výsledek QF-CMV kdykoliv po profylaktické léčbě spojován s 90% šancí, že onemocnění CMV nepropukne.

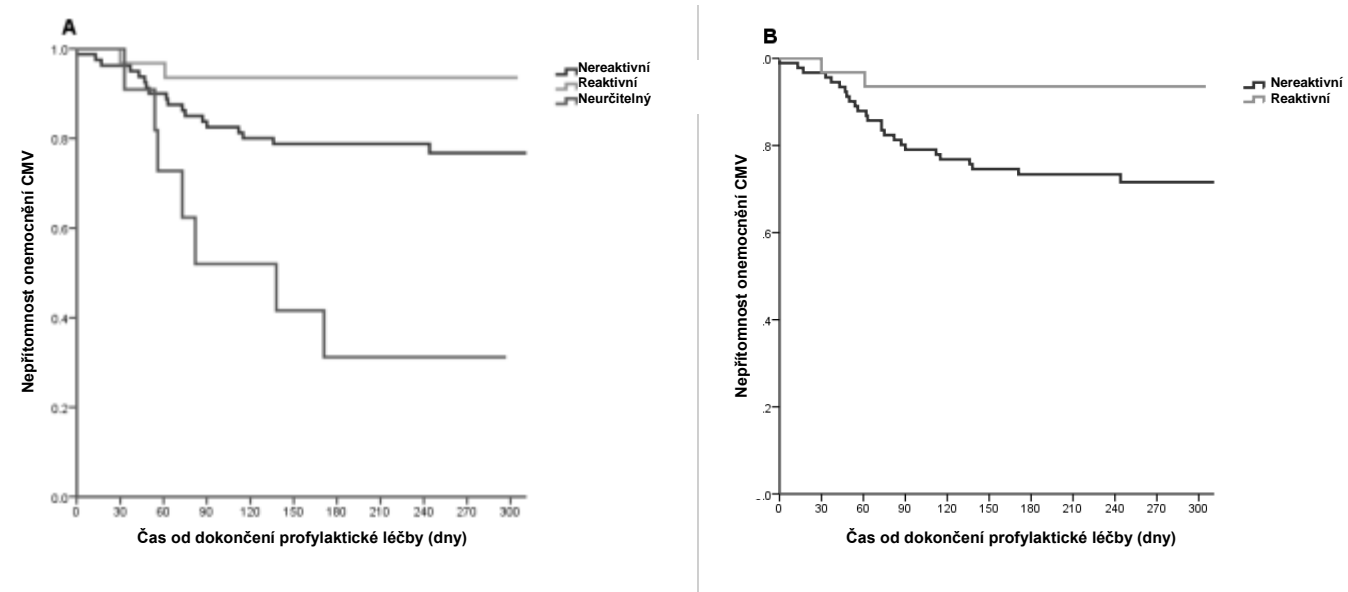
Ve studii 37 pacientů s transplantovaným solidním orgánem (12) vyhodnocení reakcí CMV specifických CD8⁺ T-buněk dle QF-CMV pomohlo při predikci spontánní virové clearance v porovnání s progresí onemocnění CMV po zvýšení virémie CMV. V této studii došlo u 24/26 pacientů (92,3 %) s reaktivním výsledkem QF-CMV ke spontánní clearanci viru CMV, zatímco pouze 5/11 (45,5 %) pacientů s nereaktivním výsledkem QF-CMV mělo stejný výsledek.

Ve studii 67 příjemců transplantace plic vyhodnocující epizody virémie CMV po transplantaci (14) bylo zjištěno, že 18/25 (72 %) epizod virémie CMV předcházela nereaktivní výsledek QF-CMV, oproti 4/16 (25 %) epizodám, kterým předcházela reaktivní reakce na test QF-CMV (Fisherův přesný test, $p = 0,0046$, viz obrázek 7).



Obrázek 7. Statistická analýza reakcí CMV specifických CD8⁺ T-buněk dle detekce při testu QuantiFERON-CMV a rozvoj virémie CMV (Fisherův přesný test, $p = 0,0046$). Zdroj dat: Weseslindtner et al (14).

V rozsáhlé multicentrické prospektivní studii 127 D+/R- příjemců transplantace solidních orgánů (15), z nichž všichni dostávali antivirovou profylaktickou léčbu, měli pacienti s reaktivním výsledkem QF-CMV (s použitím prahové hodnoty testu 0,1 IU/ml) v jakémkoliv časovém bodě po absolvování profylaktické léčby proti CMV významně nižší míru výskytu pozdního nástupu onemocnění ve 12 měsících po transplantaci v porovnání s pacienty s nereaktivním výsledkem QF-CMV a neprůkazným výsledkem (6,4 % vs. 22,2 % vs. 58,3 %, $p < 0,001$). Při klasifikaci neprůkazných výsledků jako „Nereaktivních“ byla incidence následného onemocnění CMV 6,4 % vs. 26,8 %, $p = 0,024$ (viz obrázek 8). Prediktivní hodnoty pozitivních a negativních výsledků QF-CMV pro ochranu před onemocněním CMV byly 0,90 (95% CI 0,74–0,98) a 0,27 (95% CI 0,18–0,37), což ukazuje, že reaktivní výsledek testu QuantiFERON-CMV kdykoliv po profylaktické léčbě souvisel s 90% šancí, že pacient ne onemocní CMV. Tato studie zjistila, že test QF-CMV může být užitečný k predikci, zda jsou pacienti vystaveni malému, střednímu, nebo vysokému riziku rozvoje onemocnění CMV po profylaktické léčbě.



Obrázek 8. Křivky Kaplan-Meier incidence onemocnění CMV podle výsledků testu QF-CMV.

A Reaktivní vs. nereaktivní vs. nejednoznačné výsledky testu QF-CMV (test log rank, $p < 0,001$).

B Reaktivní vs. nereaktivní, přičemž nejednoznačné výsledky byly považovány za „Nereaktivní“ (test log rank, $p = 0,024$).

V rámci prospektivní studie 55 příjemců transplantovaného solidního orgánu (16), v níž byla analyzována souvislost mezi výsledky testů QF-CMV před transplantací a epizod replikace CMV po transplantaci, bylo zjištěno, že vyšší incidence replikací CMV po transplantaci byla pozorována u příjemců R(+) s nereaktivním výsledkem testu QF-CMV před transplantací (7/14 nebo 50 %), v porovnání s příjemci R(+) s reaktivním výsledkem testu QF-CMV (4/30 nebo 13,3 %).

Na základě této studie bylo zjištěno, že u příjemců jejichž test QF-CMV před transplantací byl nereaktivní a kteří získali orgán od CMV séropozitivního dárce, bylo desetkrát zvýšené riziko replikace CMV v porovnání s těmi, jejichž výsledky testu QF-CMV byly před transplantací reaktivní (upravený poměr pravděpodobností (Odds Ratio) 10,49, 95% CI 1,88–58,46), a test QF-CMV před transplantací může být užitečný při predikci rizika replikace CMV po transplantaci a tím umožní individualizaci léčby infekce CMV po transplantaci solidních orgánů.

Bylo uskutečněno několik dalších studií zabývajících se detekcí reakce CMV specifických CD8⁺ T-buněk pomocí QF-CMV v kohortě příjemců transplantovaných orgánů (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) nebo v současné době na celém světě probíhají.

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

Důležitost monitoringu imunity vůči CMV bylo uznáno a publikováno v „International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation“ (Mezinárodní konsenzus o léčbě infekce cytomegalovirem u pacientů s transplantovanými solidními orgány (6)). Tyto mezinárodní pokyny vytvořené komisí odborníků na CMV a transplantace solidních orgánů, kterou svolala „The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society“, představuje konsenzus založený na důkazech a odborných názorech o léčbě CMV, včetně: diagnostiky, imunologie, prevence a léčby.

Závěr těchto pokynů je, že „Monitorování imunitní odpovědi CMV specifických T-buněk může predikovat osoby s rizikem onemocnění CMV po transplantaci a může být užitečné při řízení profylaxe a preventivní léčby“ (6).

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

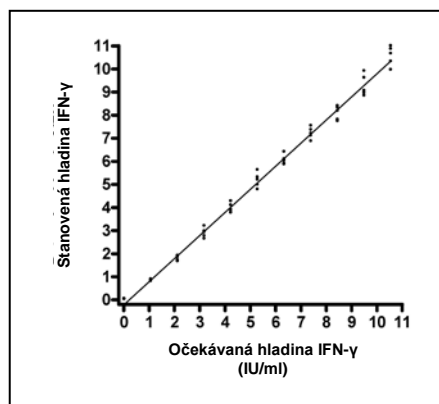
- Schopnost vyhodnotit množství a funkci CD4⁺ a CD8⁺ T-buněk příjemce transplantace
- Schopnost změřit IFN- γ
- Jednoduchost provedení, efektivnost nákladů a reprodukovatelnost
- Rychlou dobu zpracování
- Snadnost zaslání vzorků do specializovaných referenčních laboratoří

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

Funkční vlastnosti

Metoda pro měření koncentrace IFN- γ pomocí testu QF-CMV ELISA prokázala linearitu od nuly po 10 IU/ml (obrázek 9). Studie linearity byla provedena náhodným umístěním 5 replikátů 11 směsí plazmy se známými koncentracemi IFN- γ na destičku ELISA.

Test QF-CMV ELISA neprokázal žádný důkaz o efektu „high-dose hook“ (prozóna) u koncentrací IFN- γ až do 100 000 IU/ml.



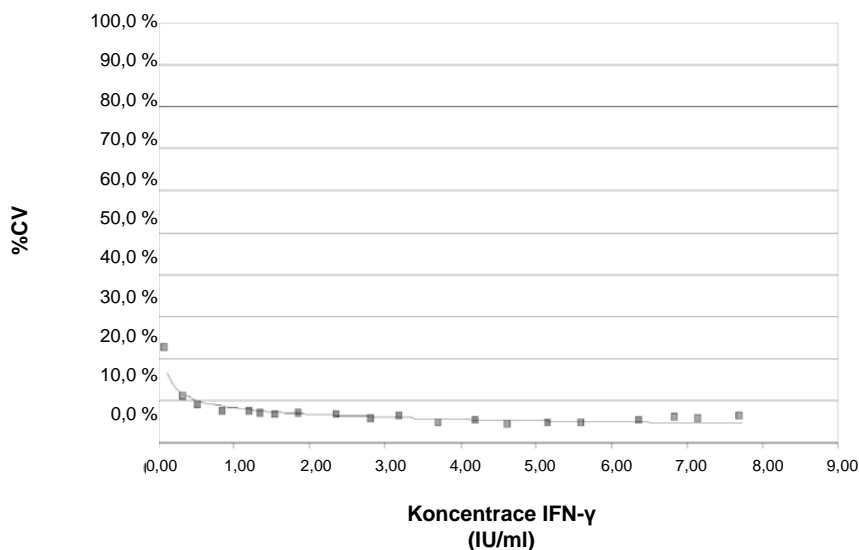
Obrázek 9. Profil linearity testu QF-CMV ELISA určený z testování 5 replikátů 11 vzorků plazmy o známých koncentracích IFN- γ . Křivka lineární regrese měla sklon $1,002 \pm 0,011$ a korelační koeficient 0,99.

Nepřesnost mezi testy a v rámci testů (%CV) u testu QF-CMV ELISA byla stanovena testováním 20 vzorků plazmy s různými koncentracemi IFN- γ ve 3 replikátech, 3 laboratořích, ve 3 dnech, které po sobě nenásledovaly, a 3 různými obsluhami. Každý vzorek byl tedy testován 27krát, v 9 nezávislých testovacích cyklech. Jedním ze vzorků byla kontrola Nil, u níž byla vypočtena koncentrace IFN- γ 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. U zbývajících 19 vzorků plazmy byly koncentrace v rozsahu 0,33 (0,31–0,34) až 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

Nepřesnost během jednoho cyklu testu nebo mezi jednotlivými testy byla stanovena dle průměru hodnot %CV pro každý test plazmy obsahující IFN- γ z každého cyklu testu destičky (n=9) a v rozsahu od 4,1 do 9,1 %CV. Průměrná hodnota %CV v rámci cyklu testu ($\pm 95\%$ CI) činila 6,6 % \pm 0,6 %. Průměr plazmy s nulovou hodnotou IFN- γ činil 14,1 %CV.

Celková nepřesnost nebo nepřesnost mezi testy byla stanovena porovnáním 27 vypočítaných koncentrací IFN- γ pro každý vzorek plazmy a byl stanoven rozsah od 6,6 do 12,3 %CV. Celková průměrná hodnota %CV ($\pm 95\%$ CI) činila 8,7 % \pm 0,7 %. Hodnota plazmy s nulovou hodnotou IFN- γ činila 26,1 %CV. Tato úroveň odchylky se dala očekávat, protože vypočítaná koncentrace IFN- γ je nízká a odchylka v okolí nízkého odhadu koncentrace bude větší než při vyšších koncentracích.

Profil přesnosti pro test QF-CMV ELISA je znázorněn na obrázku 10 a ukazuje, že nepřesnost se nezvyšuje s vyššími koncentracemi IFN- γ .



Obrázek 10. Profil přesnosti testu QF-CMV ELISA stanovený na základě testování 20 vzorků plazmy ve třech opakováních, 3 po sobě nejdoucích dnech, ve 3 laboratořích a 3 obsluhami. Vývojová křivka je stanovena výpočtem metodou nejmenších čtverců.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti testu QF-CMV s použitím vzorků krve od 8 subjektů s neznámým stavem CMV. Krev od každého subjektu byla odebrána do tří sad zkumavek QF-CMV (3x Nil, 3x CMV a 3x Mitogen). Tyto tři sady zkumavek byly poté inkubovány na třech různých pracovištích (jedna sada zkumavek Nil, CMV, a Mitogen na každém pracovišti), dle pokynů v příbalovém letáku. Po uplynutí 16–24 hodin inkubace byly zkumavky odstředěny a odebrána plazma.

Následně byly třikrát provedeny testy ELISA na každém ze tří pracovišť, což vytvořilo tři výsledky QF-CMV pro každý subjekt a pracoviště (celkem 9 výsledků na všech pracovištích). Každé pracoviště využilo různou obsluhu. Destičky použité pro tuto studii nemusely být nutně ze stejného čísla šarže, ale všechny použity byly v rámci jejich doby použitelnosti.

Pro každý vzorek krve byla stanovena reprodukovatelnost, co se týče diagnostického stavu (reaktivní, nereaktivní, nebo nejednoznačné) a číselné hodnoty. Reprodukovatelnost číselné hodnoty byla vyhodnocena pouze u reaktivních vzorků (vyjádřena jako %CV), protože hladiny IFN- γ u „nereaktivních“ vzorků byly příliš nízké na to, aby mohly poskytnout jakýkoliv smysluplný odhad přesnosti.

Celkově činila diagnostická reprodukovatelnost 100 %, přičemž diagnostický stav QF-CMV u všech 8 dobrovolníků byl reprodukován na všech pracovištích a při všech testech, bez hlášených nejednoznačných výsledků vzorků. Reprodukovatelnost reaktivních vzorků byla přijatelná jak v rámci pracoviště, tak mezi jednotlivými pracovišti. Střední %CV pro každé pracoviště provádějící test byla 4,5 % (pracoviště 1), 5,9 % (pracoviště 2) a 7,3 % (pracoviště 3). Celkově bylo %CV mezi pracovišti 5,9 % pro všech 5 reaktivních vzorků. Procentní hodnoty variančního koeficientu nižší než 10 % jsou považovány za vynikající.

Technické údaje

Nejednoznačné výsledky

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

- Uplynutí delší doby od odběru krve do inkubace při 37 °C než 16 hodin.
- Skladování krve mimo doporučený rozsah teplot (17 až 27 °C).
- Nedostatečné promíchání zkumavek s odebranou krví.

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

Návod na řešení problémů

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Více informací naleznete také v Technických údajích uvedených na stránkách: www.QuantiFERON.com. Kontaktní údaje naleznete na straně 26 a na zadní straně.

Řešení problémů s testem ELISA

Nízké hodnoty optické hustoty pro standardy

Možná příčina	Řešení
a) Chyba ředění standardu	Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle pokynů v příbalovém letáku.
b) Chyba pipetování	Ujistěte se, že je zařízení kalibrováno a používáno dle pokynů výrobce.
c) Příliš nízká teplota inkubace	Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (17 až 27 °C).
d) Příliš krátká doba inkubace	Inkubace destičky s konjugátem, standardy a vzorky musí trvat 120 ± 5 minut. Roztok enzymového substrátu se inkubuje na destičce po dobu 30 minut.
e) Nesprávný filtr čtečky destiček	Hodnoty destičky musí být načteny s filtrem o vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem od 620 do 650 nm.
f) Příliš chladná činidla	Všechna činidla, s výjimkou konjugátu 100X koncentráту, musí být před zahájením testu temperována na pokojovou teplotu. To může trvat přibližně 1 hodinu.
g) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent	Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100X koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce.

Nespecifická barva / vysoké hodnoty pozadí

Možná příčina	Řešení
a) Nedokonalé promytí destičky	Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočené alespoň po dobu 5 sekund.
b) Příliš vysoká teplota inkubace	Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (17 až 27 °C).
c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent	Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100X koncentrát použit do tří měsíců od data rekonstituce.
d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu	Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla.
e) Mísení plazmy v centrifugačních zkumavkách před odběrem	Ujistěte se, že jsou vzorky plazmy pečlivě odebrány z horní části gelu, aniž by byl obsah pipetován nahoru a dolů. Dbejte na to, aby se nenarušil materiál na povrchu gelu.

Literatura

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).

Technická podpora

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

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

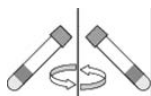
Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

Zkrácený postup testu

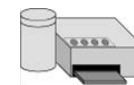
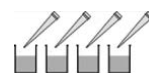
Fáze 1 – inkubace krve

1. Odeberte krev pacienta do odběrových zkumavek a poté desetkrát (10) dobře protřepejte zkumavky tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.
2. Zkumavky inkubujte ve vzpřímené poloze při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 16 až 24 hodin.
3. Po inkubaci odstředte zkumavky po dobu 15 minut při 2000 až 3000 RCF (g), aby se oddělila plazma a červené krvinky.
4. Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.



Fáze 2 – IFN- γ ELISA

1. Ponechte temperovat součásti testu ELISA, s výjimkou konjugátu 100X koncentrátu, na pokojovou teplotu alespoň po dobu 60 minut.
2. Rekonstituujte standard soupravy na 8,0 IU/ml pomocí deionizované nebo destilované vody. Připravte čtyři (4) standardní ředění.
3. Rekonstituujte mrazem sušený konjugát 100X koncentrát pomocí destilované nebo deionizované vody.
4. Připravte pracovní roztok konjugátu v zeleném ředícím roztoku a do všech jamek přidejte 50 μ l.
5. Do příslušných jamek přidejte 50 μ l testovaných vzorků plazmy a 50 μ l standardů. Promíchejte pomocí třepačky.
6. Inkubujte po dobu 120 minut při pokojové teplotě.
7. Promyjte jamky alespoň 6krát pomocí 400 μ l promývacího pufru na jamku.
8. Přidejte do jamek 100 μ l roztoku enzymového substrátu. Promíchejte pomocí třepačky.
9. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
10. Přidejte do jamek 50 μ l zastavovacího roztoku enzymů. Promíchejte pomocí třepačky.
11. Zjistěte výsledné hodnoty při 450 nm pomocí referenčního filtru 620 až 650 nm.
12. Provedte analýzu výsledků.



Ochranné známky: QIAGEN[®], QuantiFERON[®] (QIAGEN Group); Microsoft[®], Excel[®] (Microsoft).

Omezená licenční smlouva pro soupravu QuantiFERON-CMV ELISA Kit

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

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoliv jiné licence, výslovné nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, všechna práva vyhrazena.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

