

---

# QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV

## Ulotka informacyjna 2 x 96

Test wydzielania interferonu gamma krwi pełnej  
sprawdzający reakcję na antygeny peptydowe ludzkiego  
cytomegalowirusa

**IVD**

**CE**

**REF**

0350-0201



Cellestis, firma grupy QIAGEN

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Telefon: (Australia) +613-9840-9800, (Europa) +49-2103-29-12000

**EC REP**

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, Niemcy

1075110PL Wersja 01





# Spis treści

<b>Przeznaczenie</b>	<b>5</b>
<b>Wstęp</b>	<b>5</b>
Zasady testu	6
Czas wymagany do przeprowadzenia testu	6
<b>Odczynniki i przechowywanie</b>	<b>7</b>
Materiały które są wymagane, ale nie zostały dołączone	8
Przechowywanie i postępowanie	8
<b>Ostrzeżenia i środki ostrożności</b>	<b>9</b>
<b>Pobranie i postępowanie z próbkami</b>	<b>10</b>
<b>Wskazówki dotyczące stosowania</b>	<b>11</b>
Etap 1 — inkubacja krwi i pobranie osocza	11
Etap 2 — test QuantiFERON-CMV ELISA przeznaczony dla ludzkiego IFN- $\gamma$	11
<b>Obliczenia i interpretacja testu</b>	<b>14</b>
Interpretacja wyników	15
<b>Ograniczenia</b>	<b>16</b>
<b>Wartości oczekiwane</b>	<b>16</b>
<b>Charakterystyka działania testu</b>	<b>18</b>
Testy porównawcze	18
Próg testu	18
<b>Badania kliniczne</b>	<b>19</b>
Swoistość	19
Czułość	19
Badania podkreślające użyteczność kliniczną	20
Wypracowane międzynarodowe wytyczne w zakresie zarządzania cytomegalowirusem w przypadku przeszczepów narządów litych	22
<b>Charakterystyka działania testu</b>	<b>23</b>
<b>Informacje techniczne</b>	<b>25</b>
Wyniki niekonkluzywne	25
Przewodnik rozwiązywania problemów	26

<b>Bibliografia</b>	<b>27</b>
<b>Serwis</b>	<b>28</b>
<b>Skrócona procedura testowa</b>	<b>29</b>
Etap 1 — inkubacja krwi	30
Etap 2 — test ELISA IFN- $\gamma$	30

## Przeznaczenie

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) to test *in vitro* wykorzystujący koktajl peptydowy naśladujący działanie białek ludzkiego cytomegalowirusa (ang. cytomegalovirus, CMV) w celu stymulacji komórek heparynizowanej krwi pełnej. Wykrywanie interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) przez test immunoenzymatyczny (ELISA) jest wykorzystywane do ilościowego ujęcia reakcji *in vitro* na te antygeny peptydowe powiązane z regulacją odpornościową infekcji wirusem CMV. Utrata odporności może wiązać się z rozwojem cytomegalii. Test QF-CMV ma na celu monitorowanie poziomu odporności pacjenta na infekcję CMV.

Test QF-CMV nie służy do określenia faktu infekcji CMV i nie powinien być wykorzystywany do wykluczenia infekcji CMV.

## Wstęp

Wirus CMV należy do rodziny herpeswirusów. Około 50–85% dorosłej populacji jest nim zainfekowane. Infekcja jest częstym skutkiem immunosupresji, szczególnie po przeszczepach, i jest znaczącym czynnikiem chorób i zgonów u biorców organów. Obecne terapie immunosupresyjne zapobiegające odrzuceniu przeszczepionych organów mają szkodliwy wpływ na limfocyty T i odpowiedź odpornościową komórkową (ang. cell-mediated immune, CMI), co powoduje większą wrażliwość na infekcje wirusowe po przeszczepach. Znaczenie komórek T w supresji replikacji CMV zwiększa także fakt zapewniania przez CMV-specyficzne cytotoksyczne limfocyty T (ang. cytotoxic T-lymphocytes, CTL) CD8<sup>+</sup> ochrony przed patogenezą zakażenia wirusem. Liczebność CMV-specyficznych komórek CTL CD8<sup>+</sup> u pacjentów z immunosupresją i produkcja IFN- $\gamma$  mogą stanowić wskaźniki predykcyjne ryzyka wystąpienia cytomegalii. Produkcja IFN- $\gamma$  może stanowić zastępczy wariant funkcjonalny identyfikacji CMV-specyficznych komórek CTL.

QF-CMV to test reakcji CMI na antygeny peptydowe udające białka wirusa CMV. Białka CMV są stworzone tak, aby atakować komórki T CD8<sup>+</sup>, w tym haplotypy HLA klasy I A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 i Cw6 (A30, B13), które występują u ponad 98% ludzkiej populacji. Osoby zarażone CMV na ogół wykazują obecność limfocytów CD8<sup>+</sup> we krwi w związku z reakcją na antygeny. Proces wykrywania wiąże się z produkcją i wydzielaniem cytokin, IFN- $\gamma$ . Wykrywanie i dalsze ujęcie ilościowe IFN- $\gamma$  stanowi istotę tego testu.

## Zasady testu

Test QF-CMV jest wykonywany w 2 etapach. W ramach pierwszego etapu krew jest pobierana do próbek na krew QF-CMV, w tym próbkę z próbką zerową, próbkę z antygenem CMV oraz próbkę z mitogenem.

Próbka z mitogenem jest wykorzystywana w teście QF-CMV jako kontrola pozytywna. Jest to szczególnie uzasadnione w przypadku, gdy nie ma pewności co do stanu układu odpornościowego badanej osoby.

Próbki powinny być jak najszybciej poddane inkubacji w temperaturze 37°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania próbek. Po upływie okresu inkubacji trwającego od 16 do 24 godzin próbki są odwirowywane, osocze jest usuwane i dokonywany jest pomiar ilości IFN- $\gamma$  (IU/ml) z wykorzystaniem testu QF-CMV ELISA.

Ilość IFN- $\gamma$  w próbkach osocza zawartych w próbkach z antygenem CMV oraz z mitogenem może często przekraczać górne ograniczenia większości czytników ELISA, także wtedy gdy u badanej osoby występuje umiarkowana immunosupresja. W celu **uzyskania wyników jakościowych** należy użyć wartości obliczonych dla nierozcieńczonego osocza. W celu **uzyskania wyników ilościowych**, w przypadku których wymagane są rzeczywiste wartości IU/ml, próbki osocza należy rozcieńczyć w stosunku 1:10 za pomocą zielonego rozcieńczalnika i poddać testowi ELISA wraz z czystym osoczem.

**Uwaga:** W przypadku próbek, których wartości są poprawnie wykrywane przez test QF-CMV ELISA (tj. –do 10 IU/ml), należy korzystać z wyników uzyskanych z wykorzystaniem czystego osocza.

W przypadku takiego stężenia IFN- $\gamma$  wartości uzyskane z wykorzystaniem próbek osocza rozcieńczonych w stosunku 1:10 mogą nie być dokładne.

Uważa się, że test jest reaktywny na odpowiedź IFN- $\gamma$ , jeśli odczyt wyrażonej w IU/ml ilości IFN- $\gamma$  w próbce z antygenem CMV jest istotnie różny od wartości dla próbki zerowej. Stymulowana mitogenem próbka osocza służy jako kontrola pozytywna IFN- $\gamma$  dla wszystkich testowanych próbek. Słaba reakcja na mitogen wskazuje na niekonkluzywny wynik i niereaktywną reakcję krwi na przeciwciała CMV. Taka sytuacja może występować w przypadku niewystarczającej liczby limfocytów, zmniejszonej aktywności limfocytów związanej z nieprawidłowym obchodzeniem się z próbką, nieprawidłowym napełnieniem lub mieszaniem próbki z mitogenem, lub brakiem możliwości produkcji IFN- $\gamma$  przez limfocyty pacjenta, co występuje na przykład u pacjentów po niedawno przebytej operacji przeszczepu. Próbkę zerową jest korygowana z uwzględnieniem tła i ogólnej zawartości IFN- $\gamma$  zawartego w próbkach krwi. Poziom IFN- $\gamma$  w próbce z próbką zerową jest odejmowany od poziomu IFN- $\gamma$  w próbkach z antygenem CMV i z mitogenem (instrukcje na temat sposobu interpretacji wyników QF-CMV zawiera sekcja „Interpretacja wyników” na stronie 15 niniejszej ulotki informacyjnej).

## Czas wymagany do przeprowadzenia testu

Szacunkowy czas wymagany do przeprowadzenia testu QF-CMV został przedstawiony poniżej. Przedstawiono także czas testowania wielu próbek podzielonych na partie:

Inkubacja próbek z krwią w temperaturze 37°C: od 16 do 24 godzin

ELISA: około 3 godziny na 1 płytkę ELISA

mniej niż godzina pracy

od 10 do 15 minut na każdą dodatkową płytkę

## Odczynniki i przechowywanie

<b>CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)</b> <b>(Probówki na pobraną krew — antygen CMV i na próbkę zerową [pakiet dla jednego pacjenta])</b>	
<b>Nr katalogowy</b>	<b>0192-0301</b>
<b>Liczba badań</b>	<b>1</b>
QuantiFERON Nil Control (próbka zerowa QuantiFERON) (szara zatyczka)	1 probówka
CMV Antigen (antygen CMV) (niebieska zatyczka)	1 probówka
QuantiFERON Mitogen Control (kontrola mitogenu QuantiFERON) (fioletowa zatyczka)	1 probówka
Ulotka informacyjna	1
<b>QuantiFERON-CMV ELISA Components</b> <b>(Składniki zestawu QuantiFERON-CMV ELISA)</b>	
<b>Nr katalogowy</b>	<b>0350-0201</b>
Paski mikropłytkowe	24 paski 8-dołkowe
Human IFN- $\gamma$ Standard (standardowy IFN- $\gamma$ człowieka), liofilizowany	1 x fiołka
Green Diluent (zielony rozcieńczalnik)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (koncentrat koniugatu 100X QuantiFERON), liofilizowany	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (koncentrat 20X buforu do płukania QuantiFERON)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (roztwór substratu enzymu QuantiFERON)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (roztwór powstrzymujący działanie enzymu QuantiFERON)	1 x 15 ml

## Materiały które są wymagane, ale nie zostały dołączone

- Ciepłarka 37°C, CO<sub>2</sub> niewymagane
- Kalibrowane pipety o zmiennej objętości do podawania ilości wynoszącej od 10 µl do 1000 µl z jednorazowymi końcówkami
- Kalibrowane pipety wielokanałowe do podawania ilości wynoszącej od 50 µl do 100 µl z jednorazowymi końcówkami
- Wstrząsarka mikroplątkowa
- Woda dejonizowana lub destylowana, 2 litry
- Płuczka mikroplątek (zalecana płuczka automatyczna)
- Czytnik mikroplątkowy wyposażony w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm

## Przechowywanie i postępowanie

### Probówki na pobraną krew

- Probówki na pobraną krew przechowywać w temperaturze od 4°C do 25°C.
- Dopuszczalny okres magazynowania probówek na pobraną krew QuantiFERON-CMV wynosi 15 miesięcy od daty produkcji, w przypadku przechowywania w temperaturze od 4°C do 25°C.

### Zestaw odczynników ELISA

- Zestaw przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C.
- Chronić roztwór substratu enzymu przed bezpośrednim światłem słonecznym.

### Rekonstruowane i nieużywane odczynniki

Instrukcje na temat rekonstruowania odczynników zawiera sekcja „Wskazówki dotyczące stosowania — etap 2” (kroki 3 i 5 na stronie 12).

- Rekonstruowany zestaw standardowy można przechowywać przez okres maksymalnie 3 miesięcy w przypadku przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C.

Należy zapisać datę rekonstruowania zestawu standardowego.

- Po rekonstruowaniu nieużywany koncentrat koniugatu 100X QuantiFERON należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Musi on zostać wykorzystany w ciągu 3 miesięcy.

Należy zapisać datę rekonstruowania koniugatu.

- Koniugat w stężeniu roboczym należy wykorzystać w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
- Bufor do płukania w stężeniu roboczym można przechowywać w temperaturze pokojowej (od 17°C do 27°C) przez okres wynoszący do 2 tygodni.



# Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do celów diagnostyki in vitro.

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym formacie PDF pod adresem [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.



**OSTRZEŻENIE: Należy ostrożnie obchodzić się z ludzką krwią i traktować ją jako potencjalne źródło zakażenia. Należy przestrzegać odpowiednich wytycznych w zakresie postępowania z krwią.**

W odniesieniu do składników zestawu QF-CMV ELISA mają zastosowanie następujące zwroty ryzyka i bezpieczeństwa.

## Roztwór powstrzymujący działanie enzymu QuantiFERON



Zawiera kwas siarkowy: Środek drażniący. Zwroty ryzyka i bezpieczeństwa:\* R36/38, S26-36/37/39

- **Zielony rozcieńczalnik** zawiera prawidłowe osocze myszy i kazeinę, które mogą wywołać reakcje alergiczne. Unikać zanieczyszczenia skóry.

### W przypadku zagrożenia chemicznego,

### rozlania się substancji, wycieku, narażenia na działanie lub wypadku

natychmiast skontaktować się z centrum CHEMTREC.

W Stanach Zjednoczonych i Kanadzie: 1-800-424-9300

Poza Stanami Zjednoczonymi i Kanadą: +1-703-527-3887 (dopuszczalne połączenie na koszt odbiorcy)

### Dodatkowe informacje

Karty charakterystyki: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

\* R36/38: Działa drażniąco na oczy i skórę. S26: Zanieczyszczone oczy przemyć natychmiast dużą ilością wody i zasięgnąć porady lekarza. S36/37/39: Nosić odpowiednią odzież ochronną i okulary lub ochronę twarzy.

# Pobranie i postępowanie z próbkami

Ważne czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury:

Postępowanie w inny sposób niż określony w ulotce QF-CMV może doprowadzić do uzyskania błędnych wyników. Przed rozpoczęciem należy dokładnie przeczytać instrukcje.

- Nie korzystać z zestawu, jeśli przed użyciem dowolna butelka z odczynnikami nosi ślady uszkodzeń lub przecieka.
- Nie mieszać ani nie korzystać z odczynników ELISA pochodzących z innych partii zestawu QF-CMV ELISA.
- utylizować nieużywane odczynniki i próbki biologiczne zgodnie z przepisami lokalnymi i krajowymi.
- Nie korzystać z próbek na pobraną krew QF-CMV ani zestawów QF-CMV ELISA po upływie ich daty ważności.

W zestawie QF-CMV wykorzystywane są następujące próbki na pobraną krew:

1. Próbka zerowa (szara zatyczka)
2. Antygen CMV (niebieska zatyczka)
3. Kontrola mitogenu (fioletowa zatyczka)

Antygeny zostały poddane liofilizacji na wewnętrznej stronie próbek na pobraną krew, w związku z czym należy pamiętać o dokładnym wymieszaniu zawartości próbek z krwią. Probówki powinny jak najszybciej zostać poddane inkubacji w temperaturze 37°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania próbek.

**W celu zapewnienia optymalnych wyników należy przestrzegać następującej procedury:**

1. **Od każdego pacjenta należy pobrać 1 ml krwi, nakłuwając żyłę i pobierając krew bezpośrednio do poszczególnych próbek na pobraną krew QF-CMV.**
  - Ponieważ próbki o pojemności 1 ml stosunkowo wolno napełniają się krwią, pozostawić próbkę na igle przez 2-3 sekundy po zakończeniu napełniania próbki, aby upewnić się, że została pobrana odpowiednia ilość.  
  
Znacznik koloru czarnego umieszczony na bokach próbek wskazuje objętość napełnienia wynoszącą 1 ml. Walidacja próbek na pobraną krew QF-CMV została przeprowadzona dla objętości wynoszących od 0,8 do 1,2 ml. Jeśli poziom krwi w dowolnej próbce jest poniżej poziomu linii wskazującej, zalecane jest pobranie kolejnej próbki krwi.
  - Walidacja próbek na pobraną krew QF-CMV została przeprowadzona dla objętości wynoszących od 0,8 do 1,2 ml przy wysokościach n.p.m. do 810 m (2650 stóp). Powyżej tej wysokości użytkownicy powinni dokonać poboru krwi do próbek w granicach tych limitów. W przypadku pobrania zbyt małej ilości krwi można pobrać ją z użyciem strzykawki, a następnie napełnić 3 próbki do poziomu 1 ml. Z przyczyn bezpieczeństwa tę czynność najlepiej jest przeprowadzić w następujący sposób: Zdjąć igłę strzykawki i, zachowując odpowiednie procedury bezpieczeństwa, zdjąć zatyczki z trzech próbek QF-CMV, a następnie przelać 1 ml krwi do wszystkich próbek (do poziomu czarnego znacznika po bocznej stronie etykiety). Zatkać starannie próbki za pomocą zatyczek i wymieszać zawartość w następujący sposób:
  - Jeśli do pobierania krwi jest stosowana igła motylkowa, należy zastosować próbkę wstępną, aby przed pobraniem krwi do próbek QF-CMV upewnić się, że przewód jest wypełniony krwią.

2. **Natychmiast po napełnieniu probówek należy mocno nimi potrząsnąć dziesięć (10) razy, aby cała wewnętrzna powierzchnia była pokryta krwią. Ma to na celu rozpuszczenie antygenów na ściankach probówki.**
  - W czasie napełniania krwią, probówki powinny mieć temperaturę pomiędzy 17–25°C.
  - Zbyt intensywne potrząsanie może uszkodzić żel i doprowadzić do zafałszowania wyników.
3. **Prawidłowo opisać próbówki.**
4. **Probówki powinny jak najszybciej zostać poddane inkubacji w temperaturze 37°C ± 1°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania próbek. Nie chłodzić i nie zamrażać próbek krwi.**

## Wskazówki dotyczące stosowania

### Etap 1 — inkubacja krwi i pobranie osocza

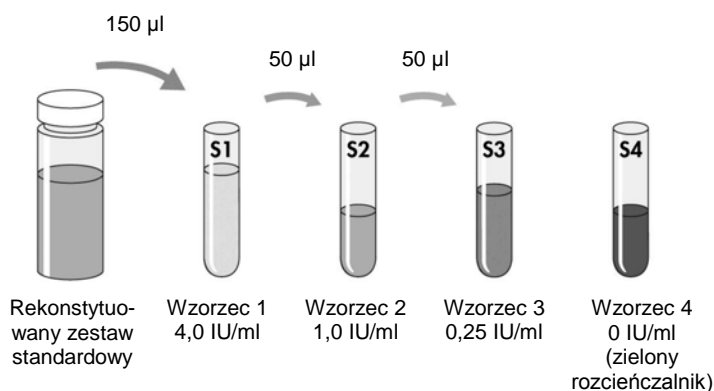
1. **W przypadku braku inkubacji krwi bezpośrednio po jej pobraniu należy przeprowadzić mieszanie probówek bezpośrednio przed inkubacją w sposób opisany w kroku 2 poprzedniej sekcji.**
2. **Przeprowadzić inkubację probówek przez okres od 16 do 24 godzin w pozycji PIONOWEJ w temperaturze 37°C. Inkubator nie wymaga CO<sub>2</sub> ani nawilżania.**
3. **Po zakończeniu inkubacji i przed rozpoczęciem następnego kroku temperatura probówek na pobraną krew powinna wynosić od 2°C do 27°C przez maksymalnie 3 dni. Po przeprowadzeniu inkubacji probówek w temperaturze 37°C wirować probówki przez 15 minut przy względnej sile odśrodkowej (RCF) wynoszącej od 2000 do 3000 jednostek. Czop żelowy spowoduje oddzielenie komórek od osocza. Jeśli tak się nie stanie, należy ponownie przeprowadzić odwirowanie z większą prędkością obrotową.**
  - Możliwe jest pobranie osocza bez przeprowadzenia odwirowania, jednak przy usuwaniu osocza należy przedsięwziąć szczególną ostrożność, aby nie naruszyć komórek.
4. **Po odwirowaniu i przed pobraniem należy koniecznie unikać pipetowania i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać na materiał umieszczony na powierzchni żelu.**
  - Próbkę osocza można pobierać jedynie za pomocą pipety.
  - Próbkę osocza można załadować bezpośrednio z probówek z odwirowaną krwią na płytkę QF-CMV ELISA, także w przypadku wykorzystywania automatycznych stacji roboczych ELISA.
  - Próbkę osocza można przechowywać przez okres do 28 dni w temperaturze od 2°C do 8°C w przypadku pobrania próbek lub poniżej –20°C (najlepiej poniżej –70°C) w przypadku dłuższego okresu przechowywania w probówkach lub zbiornikach do przechowywania osocza.

### Etap 2 — test QuantiFERON-CMV ELISA przeznaczony dla ludzkiego IFN- $\gamma$

1. **Wszystkie próbki osocza i odczynniki z wyjątkiem koncentratu koniugatu 100X QuantiFERON muszą osiągnąć temperaturę pokojową (od 17°C do 27°C) przed ich wykorzystaniem. Odczekać przynajmniej 60 minut w celu doprowadzenia próbek do temperatury pokojowej.**
2. **Usunąć z ramki niepotrzebne paski, zamknąć w torbie foliowej i włożyć do lodówki w celu przechowywania do momentu, gdy ponownie będą potrzebne.**

Pozostawić co najmniej jeden pasek na potrzeby wzorca QF-CMV ELISA oraz liczbę pasków odpowiednią do liczby pacjentów biorących udział w testach. Po użyciu należy pozostawić ramkę i pokrywę do wykorzystania z pozostałymi paskami.

3. Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego zestawu standardowego z wykorzystaniem wody dejonizowanej lub destylowanej w ilości podanej na etykiecie fiołki wzorca. Delikatnie wymieszać zawartość, aby zminimalizować spienianie i zapewnić pełne ponowne przesykanie. Rekonstruowanie wzorca do określonej objętości spowoduje powstanie roztworu o stężeniu 8,0 IU/ml.
4. Krzywa wzorcowa jest przygotowywana z wykorzystaniem 3 roztworów zestawu standardowego i próbki z samym zielonym rozcieńczalnikiem, czyli wzorca 4 (0 IU/ml).  
 Użyć rekonstruowanego zestawu standardowego do sporządzenia roztworów IFN- $\gamma$  w 3 stężeniach. Rozcieńczyć za pomocą zielonego rozcieńczalnika (GD) dostarczanego w zestawie (patrz Rysunek 1). Wzorce należy wyznaczyć przynajmniej dwukrotnie. Następujące kroki pozwalają na spełnienie tego warunku.
  - a. Oznaczyć 4 próbki jako „S1”, „S2”, „S3” i „S4”.
  - b. Dodać 150  $\mu$ l zielonego rozcieńczalnika do 4 próbek (S1–S4).
  - c. Dodać 150  $\mu$ l zestawu standardowego do próbki S1 i starannie wymieszać.
  - d. Przebrać 50  $\mu$ l z próbki S1 do S2 i starannie wymieszać.
  - e. Przebrać 50  $\mu$ l z próbki S2 do S3 i starannie wymieszać.
  - f. Sam zielony rozcieńczalnik służy jako wzorec zerowy (S4).



**Rysunek 1. Przygotowanie krzywej wzorcowej.** Przygotować nowe roztwory zestawu standardowego dla wszystkich sesji ELISA.

5. Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego koncentratu koniugatu 100X QuantiFERON z użyciem 0,3 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Delikatnie wymieszać zawartość, aby zminimalizować spienianie i zapewnić pełne przesykanie koniugatu.
6. Koniugat w stężeniu roboczym jest uzyskiwany poprzez rozcieńczenie wymaganej ilości rekonstruowanego koncentratu koniugatu 100X w zielonym rozcieńczalniku w sposób przedstawiony w Tabeli 1 — Przygotowanie koniugatu.
  - Wymieszać dokładnie, ale delikatnie w celu uniknięcia spieniania.
  - Natychmiast po wykorzystaniu koncentratu koniugatu 100X schłodzić go do temperatury od 2°C do 8°C.
  - Stosować wyłącznie zielony rozcieńczalnik.

**Tabela 1. Przygotowywanie koniugatu**

Liczba pasków	Ilość koncentratu koniugatu 100X	Ilość zielonego rozcieńczalnika
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. **Przed przeprowadzeniem testu należy wymieszać osocza, aby zapewnić równomierne rozproszenie IFN- $\gamma$  w poszczególnych próbkach. Jeśli wymagane są odpowiednie pod względem ilościowym rezultaty, rozcieńczyć w zielonym rozcieńczalniku osocza zawierające CMV i mitogen w stosunku 1:10 (10 µl osocza wymieszane z 90 µl zielonego rozcieńczalnika). Osocze próbki zerowej nie powinno być rozcieńczone.**

Zalecane jest przetestowanie następujących próbek:

- próbka zerowa, z antygenem CMV, mitogenem, antygenem CMV (1:10), mitogenem (1:10).

Oprogramowanie do analizy QuantiFERON-CMV obsługuje także następujące warianty próbek pacjentów:

- próbka zerowa, z antygenem CMV, z mitogenem,
- próbka zerowa, z antygenem CMV (1:10), mitogenem (1:10),
- próbka zerowa, z antygenem CMV, mitogenem, antygenem CMV (1:10),
- próbka zerowa, z antygenem CMV (1:10), mitogenem.

8. **Za pomocą pipety wielokanałowej dodać 50 µl świeżo przygotowanego koniugatu w stężeniu roboczym do odpowiednich dołków ELISA.**
9. **Za pomocą pipety wielokanałowej dodać 50 µl testowych próbek osocza do odpowiednich dołków. Na końcu dodać 50 µl mieszanin od wzorców od 1 do 4.**
10. **Dokładnie wymieszać koniugat i próbki osocza/wzorce, korzystając z wstrząsarki mikro płytkowej przez minutę.**
11. **Przykryć wszystkie płytki za pomocą pokryw i przeprowadzić inkubację w temperaturze pokojowej (od 17°C do 27°C) przez 120 ± 5 minut.**
- Podczas inkubacji nie należy wystawiać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

12. **W czasie inkubacji rozcieńczyć jedną część koncentratu 20X buforu do płukania z 19 częściami wody dejonizowanej lub destylowanej i dokładnie wymieszać. Dostarczona ilość koncentratu 20X buforu do płukania jest wystarczająca do przygotowania 2 litrów buforu do płukania w stężeniu roboczym.**

Przemyć dołki za pomocą **400 µl** buforu do płukania w stężeniu roboczym co najmniej raz na 6 cykli. Zalecane jest stosowanie płuczki automatycznej.

  - Dokładne mycie jest bardzo ważnym czynnikiem działania testu. Podczas każdego cyklu przemywania wszystkie dołki powinny być **całkowicie wypełnione** buforem do płukania. Zalecany jest czas absorpcji wynoszący co najmniej 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami.
  - Do zbiornika na wodę zużytą do mycia należy dodać standardowy laboratoryjny środek dezynfekujący. Należy też przestrzegać obowiązujących procedur w zakresie odkażania potencjalnie zakaźnego materiału.
13. **Płytki ochronne powinny być skierowane w dół ku ręcznikowi absorpcyjnemu w celu usunięcia pozostałości buforu do płukania. Dodać 100 µl roztworu substratu enzymu do poszczególnych dołków i starannie wymieszać za pomocą wstrząsarki mikroplytkowej.**
14. **Przykryć wszystkie płytki za pomocą pokryw i przeprowadzić inkubację w temperaturze pokojowej (od 17°C do 27°C) przez 30 minut.**
  - Podczas inkubacji nie należy wystawiać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego.
15. **Po zakończeniu 30-minutowej inkubacji dodać 50 µl roztworu powstrzymującego działanie enzymu do poszczególnych dołków i wymieszać.**
  - Roztwór powstrzymujący działanie enzymu należy dodawać do poszczególnych dołków zgodnie z kolejnością i szybkością zastosowaną w przypadku substratu w kroku 13.
16. **W ciągu 5 minut od zatrzymania reakcji przeprowadzić pomiar gęstości optycznej poszczególnych dołków za pomocą czytnika mikroplytkowego wyposażonego w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm. Wartości gęstości optycznej są używane do obliczenia wyników.**

## Obliczenia i interpretacja testu

Oprogramowanie do analizy QuantiFERON-CMV służące do przetwarzania danych pierwotnych i obliczania wyników jest dostępne w witrynie firmy QIAGEN pod adresem [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).

Oprogramowanie przeprowadza ocenę próby w zakresie kontroli jakości, tworzy krzywą wzorcową i zapewnia wyniki testów dla poszczególnych pacjentów w sposób opisany w sekcji Interpretacja wyników.

Oprócz zastosowania oprogramowania do analizy QF-CMV wyniki można uzyskać z wykorzystaniem jednej z następujących metod.

### Generowanie krzywej wzorcowej

Określić średnie wartości gęstości optycznej zestawów standardowych zawartych na poszczególnych płytkach.

Wyznaczyć krzywą wzorcową  $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ , sporządzając wykres funkcji  $\log_{(e)}$  średniej gęstości optycznej (oś Y) względem  $\log_{(e)}$  stężenia wzorców IFN- $\gamma$  wyrażonego w IU/ml (oś X), pomijając wzorec zerowy w obliczeniach. Obliczyć parametry prostej o najlepszym dopasowaniu do krzywej wzorcowej, stosując analizę metodą regresji.

Użyć krzywej wzorcowej do określenia stężenia IFN- $\gamma$  (IU/ml) we wszystkich testowych próbkach osocza, wykorzystując wartości gęstości optycznej dla poszczególnych próbek.

Obliczenia można wykonać za pomocą pakietów oprogramowania dostępnych w czytnikach mikro płytkowych oraz standardowych arkuszy kalkulacyjnych lub oprogramowania statystycznego (np. Microsoft® Excel®). Zaleca się korzystanie z tych pakietów do wyznaczenia parametrów regresji, współczynnika zmienności wzorców (CV, wyrażona w %) oraz współczynnika korelacji (r) krzywej wzorcowej.

## Kontrola jakości testu

Dokładność wyników testu jest zależna od wygenerowania odpowiedniej krzywej wzorcowej. W związku z tym przed dokonaniem interpretacji wyników próbki testowej należy sprawdzić wyniki uzyskane na podstawie wzorców.

Poprawny test ELISA odznacza się następującymi cechami:

- średnia wartość gęstości optycznej wzorca 1 musi być równa  $\geq 0,600$ ;
- wyrażony procentowo współczynnik zmienności wzorca 1 i 2, odzwierciedlający wartości gęstości optycznej, musi być mniejszy od 15%;
- wartości gęstości optycznej odzwierciedlone dla wzorca 3 i 4 nie mogą różnić się od ich średniej wartości o więcej niż 0,040 jednostki gęstości optycznej;
- współczynnik korelacji (r) obliczony na podstawie średnich wartości absorbancji wzorców musi być większy od lub równy 0,98.

Jeśli nie są spełnione powyższe kryteria, test nie jest prawidłowy i należy go powtórzyć.

Średnia wartość gęstości optycznej wzorca zerowego (zielony rozcieńczalnik) powinna wynosić  $\leq 0,150$ . Jeśli średnia wartość gęstości optycznej jest większa od 0,150, należy sprawdzić procedurę mycia płytki.

## Interpretacja wyników

Wyniki QuantiFERON-CMV są interpretowane z wykorzystaniem następujących kryteriów:

Próbka CMV minus próbka zerowa (IU/ml)*	Próbka z mitogenem minus próbka zerowa (IU/ml)	Wynik QF-CMV	Raport/interpretacja
< 0,2	$\geq 0,5$	Niereaktywny	BRAK wykrytej odporności na wirus CMV
$\geq 0,2$	Dowolne	Reaktywny	Wykryta odporność na wirus CMV
< 0,2	< 0,5	Wynik niekonkluzywny <sup>†</sup>	Niekonkluzywny wynik reakcji na CMV

\* Natężenie reakcji IFN- $\gamma$  na kontrolę pozytywną antygeny CMV i mitogenu może wykraczać poza skalę czytnika mikro płytkowego. Nie ma to wpływu na wyniki jakościowe.

<sup>†</sup> Informacje na temat możliwych przyczyn zostały zamieszczone w sekcji Rozwiązywanie problemów.

## Ograniczenia

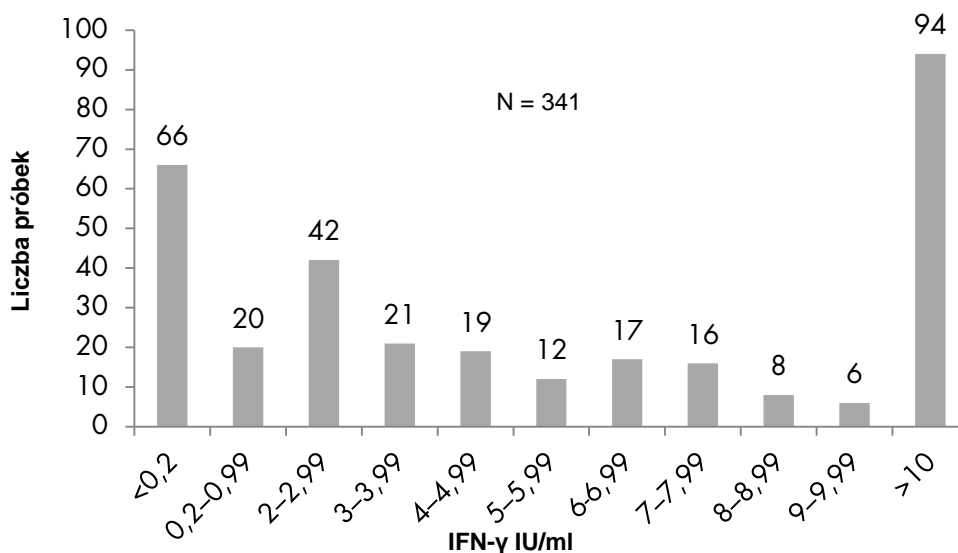
Wyniki testów QuantiFERON-CMV należy wykorzystywać w kontekście historii epidemiologicznej poszczególnych osób, obecnego stanu medycznego i innych ocen diagnostycznych.

Niepewne lub niekonkluzywne wyniki mogą występować w związku z:

- nieprzestrzeganiem procedury opisanej w ulotce informacyjnej;
- zbyt wysokim poziomem IFN- $\gamma$  w próbce zerowej;
- wynoszącym więcej niż 16 godzin odstępem czasowym pomiędzy pobraniem próbki krwi i inkubacją w temperaturze 37°C.

## Wartości oczekiwane

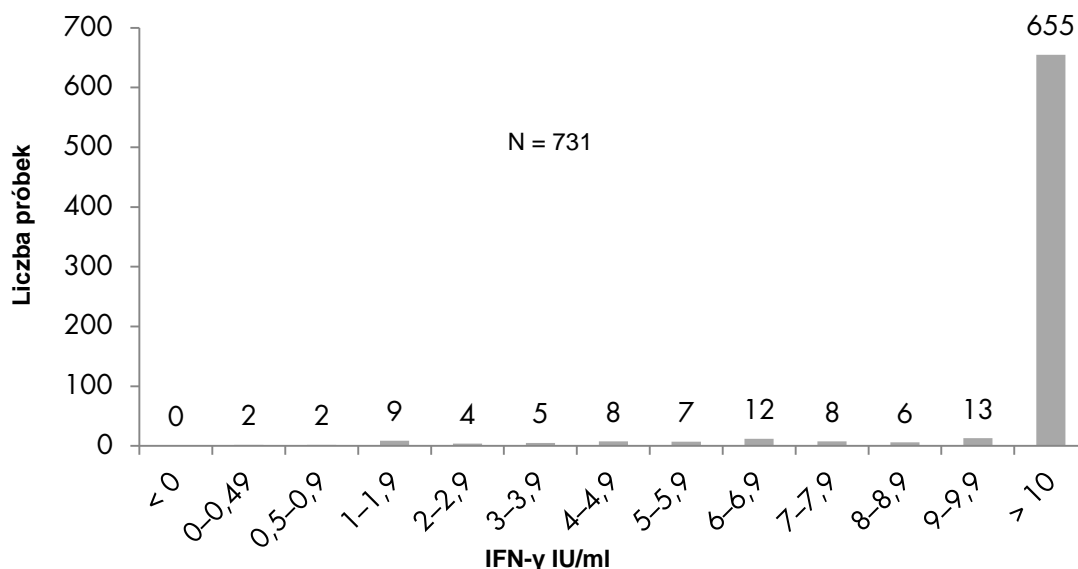
Wartości oczekiwane IFN- $\gamma$  uzyskane w ramach testów QuantiFERON-CMV zostały uzyskane po zbadaniu 591 próbek pochodzących od zdrowych osób dorosłych, spośród których 341 było CMV-seropozytywnych, natomiast 250 było CMV-seronegatywnych. W przypadku 250 zdrowych badanych osób dorosłych bez infekcji CMV, zdefiniowanej zgodnie z serologią CMV (CMV-seronegatywnych), u 100% osób wystąpiły reakcje IFN- $\gamma$  na próbkę z antygenem CMV na poziomie  $<0,2$  IU/ml (po odjęciu próbki zerowej). Rozkład dla próbek z antygenem CMV (po odjęciu próbki zerowej) w przypadku 341 zdrowych osób z infekcją CMV, zdefiniowanej zgodnie z serologią CMV (CMV-seropozytywnych), został przedstawiony na Rysunku 2.



Rysunek 2. Rozkład reakcji IFN- $\gamma$  w próbce CMV minus zerowa u zdrowych seropozytywnych osób (n = 341).

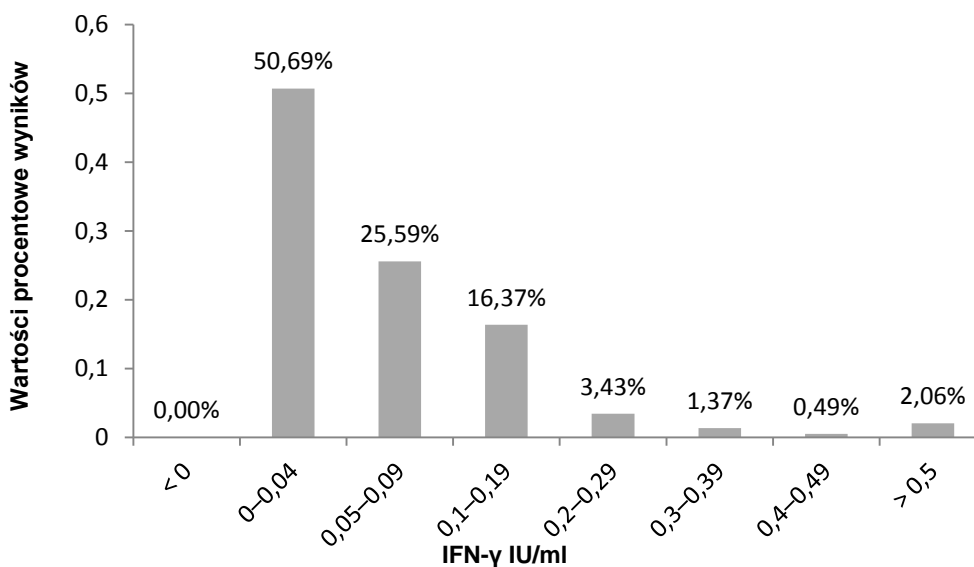


Na Rysunku 3 został przedstawiony rozkład wyników mitogenu (po odjęciu próbki zerowej) w przypadku 731 normalnych próbek krwi pobranych od zdrowych osób dorosłych, niezależnie od znanych infekcji CMV. Wynik zawartości mitogenu (po odjęciu próbki zerowej) na poziomie poniżej 0,5 IU/ml wskazuje na błąd testu lub obniżoną odporność badanej osoby. U zdrowej populacji jedynie 2 wyniki na 731 są objęte tą kategorią.



**Rysunek 3. Rozkład reakcji IFN- $\gamma$  w próbce mitogenowej minus zerowa u zdrowych dorosłych osób (n = 731).**

Wartości oczekiwane próbek zerowych przedstawia Rysunek 4. Dane zostały oparte na pochodzących od zdrowych dorosłych osób 1020 próbkach osocza przetestowanych z wykorzystaniem testu QuantiFERON-CMV ELISA.



**Rysunek 4. Rozkład (wyrażony jako % populacji) reakcji IFN- $\gamma$  w próbce zerowej u zdrowych dorosłych osób (n = 1020).**

# Charakterystyka działania testu

## Testy porównawcze

Próg testu QF-CMV do wykrywania wcześniejszego narażenia na działanie wirusa CMV został ustalony na podstawie analizy wyników pochodzących od grupy zdrowych osób ( $n = 223$ ), a następnie wyniki QF-CMV zostały porównane do wyników serologicznych CMV. W wyniku analizy ROC określono, że próg testu wynoszący 0,04 IU/ml (po odjęciu próbki zerowej) zapewnia optymalne predykcyjne wartości pozytywne i negatywne dla testu QF-CMV (powierzchnia pod krzywą = 0,9679 [przy przedziale ufności 95% = od 0,9442 do 0,9915,  $p < 0,0001$ ]). W ten sposób stanowi próg, przy którym test najskuteczniej spełniał swój cel w przypadku zdrowej populacji.

W przypadku testów porównawczych skuteczność testu QF-CMV porównano z testem serologicznym SeraQuest CMV IgG (Quest International). Test QF-CMV pokazał zgodność z porównawczym testem serologicznym anti-HCMV u zdrowych osób na poziomie 95% (294 spośród 310 osób). Żaden z seronegatywnych 149 dawców nie wykazał reaktywności testu QF-CMV, a u 145 ze 161 seropozytywnych dawców wystąpiła reakcja IFN- $\gamma$ . Ogólna zgodność pozytywnych wyników wynosiła 90%, natomiast zgodność negatywnych wyników wyniosła 100%. Poziom zgodności reakcji IFN- $\gamma$  na peptydy CMV zmierzony za pomocą testu QF-CMV u zdrowych ochotników oraz stan serologiczny CMV uczestników badania, określony za pomocą testu serologicznego SeraQuest CMV IgG, przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2. Zgodność pomiędzy testem QuantiFERON-CMV i testem serologicznym CMV IgG u zdrowych osób.**

		Serologia CMV		Łącznie
		Pozytywny	Negatywny	
QuantiFERON-CMV	Reaktywny	145	0	145 (46,8%)
	Niereaktywny	16	149	165 (53,2%)
	Łącznie	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

## Próg testu

Zalecany próg tego testu w zastosowaniach klinicznych wynosi 0,2 IU/ml w próbce z antygenem CMV (po odjęciu próbki zerowej), chociaż w różnych warunkach klinicznych można przeprowadzać walidację dla zróżnicowanych progów. Chodzi tu o zasadnicze różnice immunologiczne pomiędzy normalną populacją testową i populacjami, w których test jest użyteczny klinicznie — w szczególności chodzi o osoby, które w związku z immunosupresją są podatne na objawową infekcję i/lub chorobę CMV. W przypadku osób o wysokim ryzyku użyteczność kliniczna testu QF-CMV tkwi w dokładnym wykrywaniu poziomu odporności na wirus CMV, ponieważ brak odporności może być związany z rozwojem choroby CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

## Badania kliniczne

W związku z brakiem norm w zakresie potwierdzania i wykluczania infekcji cytomegalowirusem nie istnieją możliwości praktycznego sprawdzenia czułości i swoistości diagnostycznej testu QF-CMV. Czułość i swoistość diagnostyczna została oszacowana poprzez ocenę poziomu zgodności między reakcjami IFN- $\gamma$  na peptydy CMV, przeprowadzoną za pomocą testu QF-CMV u zdrowych ochotników, oraz stanu serologicznego CMV uczestników badania za pomocą testu serologicznego CMV IgG.

Swoistość diagnostyczną testu QF-CMV oszacowano, dokonując oceny wskaźnika fałszywych wyników pozytywnych (silna reakcja QF-CMV) u zdrowych ochotników bez historii narażenia na wpływ wirusa CMV (osób CMV-seronegatywnych). Czułość oszacowano, dokonując oceny zdrowych ochotników z zarejestrowanym wcześniejszym narażeniem na wpływ wirusa CMV (osób CMV-seropozytywnych). Test QF-CMV wykorzystuje dużą liczbę epitopów specyficznych dla wirusa CMV, pochodzących z różnych białek CMV. Mimo że w związku z tym zapewnia szeroką gamę zastosowań klinicznych w odniesieniu do zróżnicowanej populacji o różnych haplotypach HLA klasy I, nie wszystkie peptydy są objęte. W związku z tym, że nie były znane haplotypy HLA w kontekście serologii CMV testowanych osób, oczekiwano braku reakcji niewielkiego odsetka osób seropozytywnych na próbówki QF-CMV.

## Swoistość

W badaniu przeprowadzonym na zdrowych osobach bez historii narażenia na wpływ wirusa CMV (liczba osób CMV-seronegatywnych  $n = 250$ ) zgodność pomiędzy reakcjami IFN- $\gamma$  na peptydy CMV zmierzona za pomocą testu QF-CMV zgodnie z serologią CMV wyniosła 100%.

We wszystkich pozostałych ocenach przeprowadzonych u biorców narządów litych (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), biorców hematopoetycznych komórek macierzystych (7, 13) oraz pacjentów zarażonych wirusem HIV (2) poziom zgodności pomiędzy reakcjami IFN- $\gamma$  na peptydy CMV, zmierzony za pomocą testu QF-CMV zgodnie z serologią CMV, stale wynosił 100%.

## Czułość

W badaniu przeprowadzonym na zdrowych osobach bez historii narażenia na wpływ wirusa CMV (liczba osób CMV-seronegatywnych  $n = 341$ ) zgodność pomiędzy reakcjami IFN- $\gamma$  na peptydy CMV zmierzona za pomocą testu QF-CMV zgodnie z serologią CMV wyniosła 80,6% (275 z 341). Zaobserwowana niezgodność może być spowodowana użyciem wyższego progu testu (0,2 IU/ml), fałszywymi wynikami pozytywnymi serologii CMV oraz brakiem reakcji badanych na testowe peptydy CMV.

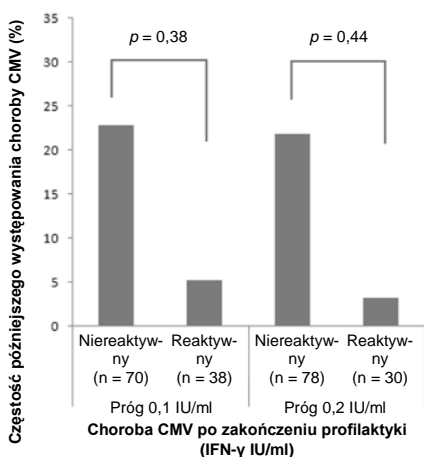
W ocenach czułości przeprowadzonych u biorców narządów litych (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), biorców hematopoetycznych komórek macierzystych (7, 13) oraz pacjentów zarażonych wirusem HIV (2) poziom zgodności pomiędzy reakcjami IFN- $\gamma$  na peptydy CMV zmierzony za pomocą testu QF-CMV i seropozytywnych reakcjach CMV był nieznacznie niższy. Niższy poziom zgodności może być wynikiem fałszywych wyników pozytywnych serologii CMV, braku reakcji pacjentów na testowe peptydy CMV lub braku u tych pacjentów reaktywnych komórek T w związku z ich immunosupresją.

## Badania podkreślające użyteczność kliniczną

Zastosowanie zarówno serologii, jak i testu QF-CMV jest opisywane jako umożliwiające wykrywanie odporności na wirus CMV. W przypadkach transplantacji serologia CMV jest szeroko stosowanym badaniem przed-transplantacyjnym mającym na celu określenie ryzyka związanego ze spowodowanymi wirusem CMV komplikacjami potransplantacyjnymi u biorcy, ale jej samodzielna przydatność potransplantacyjna jest ograniczona. Test QF-CMV może być także wykorzystywany u biorców przeszczepów w celu oceny poziomu odporności na wirus CMV u pacjentów wykazujących ryzyko objawowej infekcji i/lub choroby CMV w związku z immunosupresją (6, 9–11).

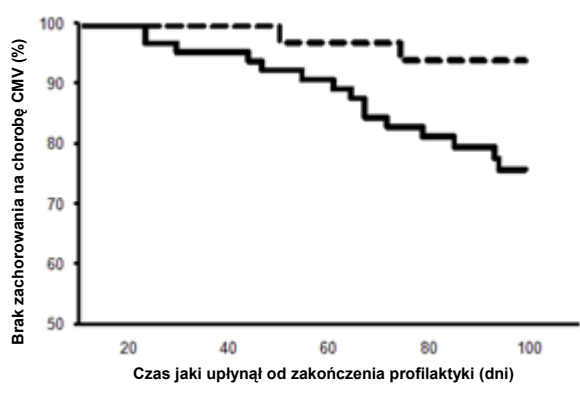
Szereg opublikowanych badań klinicznych dotyczących różnych badanych grup osób po przeszczepie wykazało użyteczność testu QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

W ramach dużego badania 108 biorców narządów litych (4) pacjenci z reaktywnym wynikiem testu QF-CMV po zakończeniu profilaktyki CMV odznaczali się istotnie niższym ryzykiem późniejszego ataku choroby w porównaniu z pacjentami z niereaktywnym wynikiem testu QF-CMV (odpowiednio 5,3% i 22,9%,  $p = 0,044$ ) (Rysunek 5).



**Rysunek 5. Porównanie ryzyka późnego ataku choroby CMV u pacjentów z reaktywnym wynikiem testu QuantiFERON-CMV i wynikiem braku reakcji tego testu.** Dane przedstawione w oparciu o pozycję Kumar et al. (4)

Ponadto u pacjentów z reaktywnym wynikiem testu QF-CMV po zakończeniu profilaktyki w większej ilości przypadków nie stwierdzano obecności wirusa CMV przez dłuższy okres (Rysunek 6), co wskazuje na to, że test QF-CMV można stosować do identyfikacji osób zagrożonych późnym atakiem choroby CMV.

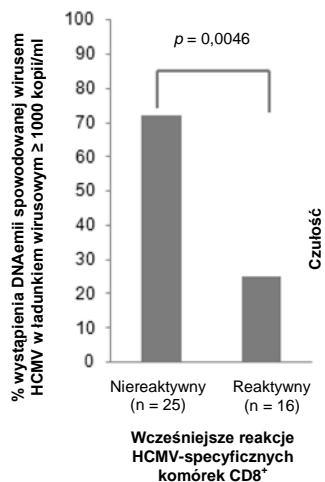


**Rysunek 6. Czas rozwoju choroby CMV u pacjentów z reaktywnym wynikiem testu QuantiFERON-CMV (zaznaczony linią przerywaną) w porównaniu do pacjentów z niereaktywnym wynikiem tego testu (zaznaczony linią ciągłą) po zakończeniu profilaktyki.** Dane przedstawione w oparciu o pozycję Kumar et al. (4)

Badanie pokazało także, że w grupie pacjentów po przeszczepie odznaczającej się najwyższym ryzykiem rozwoju choroby CMV (CMV-seronegatywni biorcy przeszczepów, którzy otrzymali narząd od CMV-sero-  
pozytywnego dawcy, tj. D+/R-) reaktywnemu wynikowi testu QF-CMV po zakończeniu profilaktyki towarzyszyła  
wynosząca 90% szansa dalszego braku zachorowania na CMV.

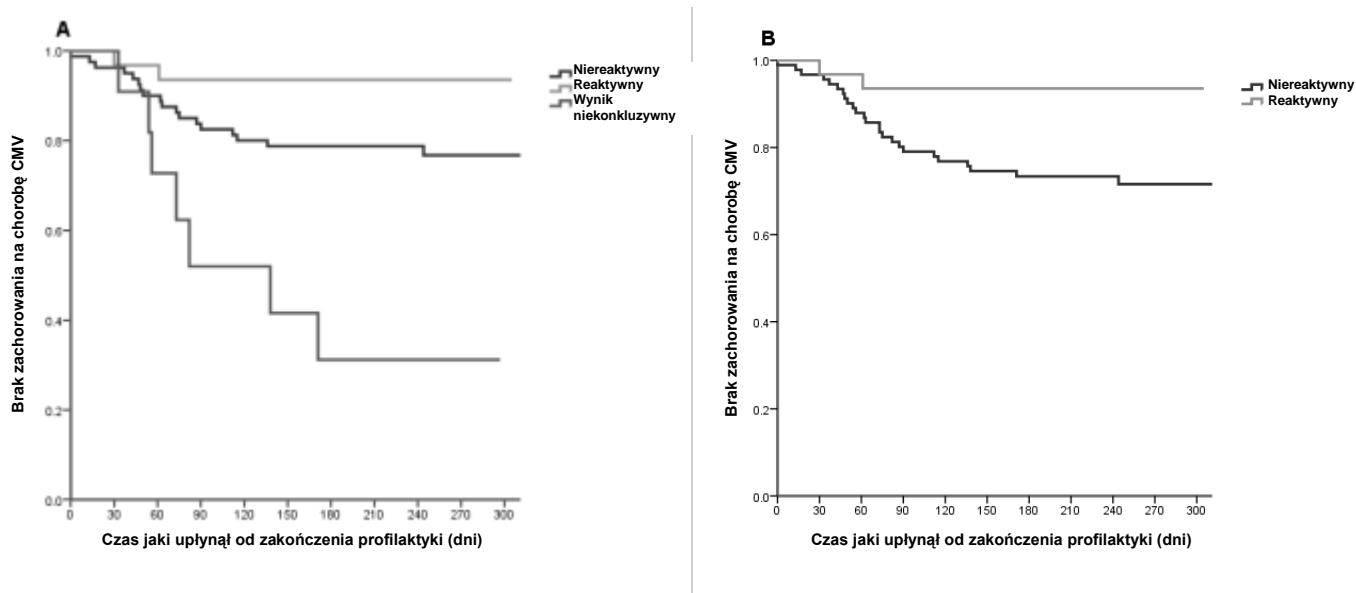
W badaniu 37 pacjentów po przeszczepach narządów litych (12) ocena specyficznych dla wirusa CMV reakcji  
komórek T CD8<sup>+</sup> za pomocą testu QF-CMV pomogła w przewidywaniu spontanicznego usunięcia wirusa  
w odniesieniu do postępów choroby CMV w wyniku wzrostu wirerii CMV. W tym badaniu w przypadku 24  
z 26 pacjentów (92,3%) z reaktywnym wynikiem testu QF-CMV wystąpiło spontaniczne usunięcie wirusa, natomiast  
u pacjentów z niereaktywnym wynikiem testu QF-CMV taki sam wynik wystąpił jedynie u 5 z 11 pacjentów (45,5%).

W ramach badania 67 biorców płuc dokonano oceny wystąpień wirerii po przeszczepie (14). Zaobserwowano,  
że 18 spośród 25 (72%) wystąpień wirerii CMV było poprzedzonych niereaktywnym wynikiem testu QF-CMV,  
natomiast 4 spośród 16 wystąpień (25%) było poprzedzone reaktywnym wynikiem testu QF-CMV (dokładny test  
Fishera,  $p = 0,0046$ , patrz Rysunek 7).



**Rysunek 7. Analiza statystyczna reakcji CMV-specyficznych komórek T CD8<sup>+</sup> wykrywanych przez test QuantiFERON-CMV i wystąpienia wirerii CMV (dokładny test Fishera,  $p = 0,0046$ ).** Dane przedstawione w oparciu o pozycję Weseslindtner et al. (14).

W ramach dużego badania prospektywnego przeprowadzanego w wielu ośrodkach przebadano 127 biorców  
narządów litych D+/R- (15), zapewniając każdemu z nich profilaktykę antywirusową. Pacjenci z reaktywnym  
wynikiem testu QF-CMV (stosując próg testowy 0,1 IU/ml) w czasie następującym po zakończeniu profilaktyki  
CMV wykazywali istotnie niższe ryzyko późnego ataku choroby w ciągu 12 miesięcy od przeszczepu  
w porównaniu z osobami z niereaktywnym wynikiem testu QF-CMV i wynikiem niekonkluzywnym  
(odpowiednio 6,4%, 22,2%, 58,3%, przy  $p < 0,001$ ). Przy klasyfikacji niekonkluzywnych wyników jako  
niereaktywnych częstość występowania choroby CMV wyniosła odpowiednio 6,4% i 26,8% przy  $p = 0,024$   
(patrz Rysunek 8). Predykcyjne wartości pozytywne i negatywne testu QF-CMV w zakresie ochrony przed  
chorobą CMV wyniosły odpowiednio 0,90 (przy przedziale ufności 95%: 0,74–0,98) oraz 0,27 (przy przedziale  
ufności 95%: 0,18–0,37), co wskazuje na to, że reaktywnemu wynikowi testu QuantiFERON-CMV po  
profilaktyce towarzyszyła wynosząca 90% szansa dalszego braku zachorowania na CMV. W ramach tego  
badania dowiedziono, że test QF-CMV może być skuteczny w prognozowaniu ryzyka rozwoju choroby CMV  
po przeprowadzeniu działań profilaktycznych.



**Rysunek 8. Krzywe Kaplana-Meiera pokazujące częstość występowania choroby CMV zgodnie z wynikami testu QF-CMV.**

**A** Reaktywne, niereaktywne i niekonkluzywne wyniki testu QF-CMV (logarytmiczny test rang,  $p < 0,001$ ).

**B** Wyniki reaktywne i niereaktywne, przy czym wyniki niekonkluzywne zostały potraktowane jako niereaktywne (logarytmiczny test rang,  $p = 0,024$ ).

W prospektywnym badaniu 55 biorców narządów litych (16), w ramach którego zbadano związek pomiędzy wynikami testu QF-CMV przed przeszczepem i replikacją CMV po przeszczepie, odkryto, że częściej replikacja CMV po przeszczepie występuje u biorców R(+) z przedtransplantacyjnym niereakcyjnym wynikiem QF-CMV (7 z 14 biorców, 50%) niż u biorców R(+) z wynikiem reakcyjnym (4 z 30, 13,3%).

Badanie dowiodło, że biorcy z przedtransplantacyjnym niereakcyjnym wynikiem QF-CMV, którym przeszczepiono narząd pochodzący od CMV-seropozytywnego dawcy, odznaczają się dziesięciokrotnie większym ryzykiem replikacji CMV niż biorcy z przedtransplantacyjnym reakcyjnym wynikiem QF-CMV (skorygowany współczynnik szans wynoszący 10,49, przy przedziale ufności 95%: 1,88–58,46). Dowiedziono także, że test Q-CMV przed przeszczepem może być użyteczny w przewidywaniu ryzyka replikacji CMV po przeszczepie, umożliwiając w ten sposób indywidualne podejście do zarządzania infekcją CMV po przeszczepie narządów litych.

Na całym świecie ukończono także szereg badań (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) lub trwają prace nad wykrywaniem reakcji CMV-specyficznych komórek T CD8<sup>+</sup> za pomocą testu QF-CMV w grupie biorców organów.

## Wypracowane międzynarodowe wytyczne w zakresie zarządzania cytomegalowirusem w przypadku przeszczepów narządów litych

Znaczenie monitorowania CMV-specyficznej reakcji immunologicznej zostało opisane w artykule „International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation” (Międzynarodowe wytyczne w zakresie zarządzania cytomegalowirusem w przypadku przeszczepów narządów litych) (6).

Te międzynarodowe wytyczne opracowane przez panel specjalistów w dziedzinie wirusa CMV i przeszczepów organów litych, powołany przez organizację The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society (Sekcja Chorób Zakaźnych Towarzystwa Transplantacyjnego), odzwierciedlają powstałe w oparciu o opinie specjalistów wytyczne w zakresie zarządzania wirusem CMV, w tym: diagnostykę, immunologię, profilaktykę i leczenie.

Wytyczne są zakończone wnioskiem: „monitorowanie reakcji immunologicznej CMV-specyficznych komórek T może prowadzić do określenia ryzyka wystąpienia choroby CMV po przeszczepie i znaleźć zastosowanie w formułowaniu profilaktyki i terapii wyprzedzających” (6).

Ponadto wytyczne stanowią także zalecenia w zakresie właściwości idealnego testu immunologicznego, które obejmują:

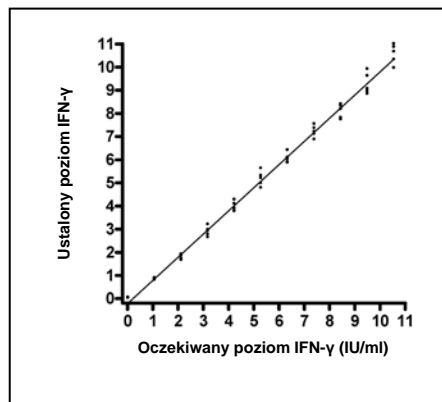
- możliwość oceny ilości i funkcjonowania komórek T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T biorcy przeszczepu;
- możliwość pomiaru poziomu IFN- $\gamma$ ;
- łatwość przeprowadzenia, niski koszt oraz powtarzalność;
- krótki czas przeprowadzania;
- łatwość wysyłki próbek do specjalizowanych laboratoriów.

Test QF-CMV spełnia wszystkie kryteria określone w tych wytycznych i stanowi jedyny standardowy test immunologiczny potrafiący wykrywać IFN- $\gamma$  specyficzny dla wirusa CMV.

## Charakterystyka działania testu

Metoda pomiaru stężenia IFN- $\gamma$  w ramach testu QF-CMV ELISA charakteryzuje się liniowością w przypadku wartości z przedziału od 0 do 10 IU/ml (Rysunek 9). Badanie liniowości przeprowadzono poprzez losowe umieszczenie na płycie ELISA 5 powtórzeń 11 zbiorników osocza o znanym stężeniu IFN- $\gamma$ .

Badanie QF-CMV ELISA nie wykazało występowania efektu zahamowania reakcji serologicznej wskutek nadmiaru antygenu („efektu prozony”) w przypadku stężenia IFN- $\gamma$  wynoszącego do 100 000 IU/ml.



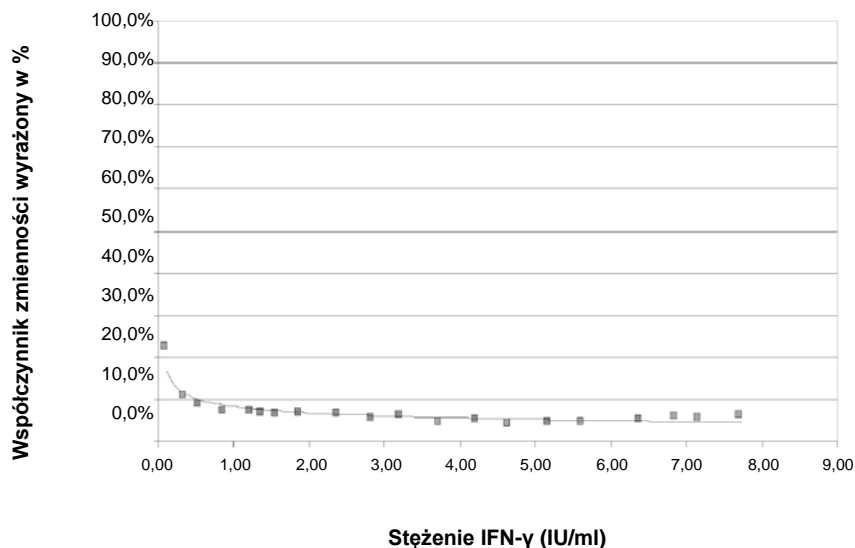
**Rysunek 9. Profil liniowości testu QF-CMV ELISA został określony na podstawie testów 5 powtórzeń 11 próbek osocza o znanych stężeniach IFN- $\gamma$ .** Prosta regresji liniowej posiada nachylenie równe  $1,002 \pm 0,011$  i współczynnik korelacji wynoszący 0,99.

Niedokładność wewnątrzpróbkowa i międzypróbkowa (współczynnik zmienności wyrażony w %) testu QF-CMV ELISA została oszacowana po przetestowaniu 20 próbek osocza o różnym stężeniu IFN- $\gamma$ . Każdy test został przeprowadzony trzykrotnie, w 3 laboratoriach, podczas 3 dni nienastępujących po sobie, przez 3 różnych operatorów. W ten sposób każda próbka została przetestowana 27 razy w ramach 9 niezależnych testów. Jedna próbka stanowiła próbkę zerową o obliczonym stężeniu IFN- $\gamma$  wynoszącym 0,08 (przy przedziale ufności 95%: 0,07–0,09) IU/ml. Wśród 19 pozostałych próbek osocza stężenie wahało się od 0,33 (0,31–0,34) do 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

Niedokładność wewnątrzpróbkowa została oszacowana poprzez wyznaczenie średniego współczynnika zmienności wyrażonego w % w przypadku poszczególnych serii płytek ( $n = 9$ ) z osoczami testowymi zawierającymi IFN- $\gamma$ . Średni współczynnik zmienności wyniósł od 4,1 do 9,1%. Średni wewnątrzpróbkowy współczynnik zmienności w % (przy przedziale ufności  $\pm 95\%$ ) wyniósł  $6,6\% \pm 0,6\%$ . Współczynnik zmienności wzorca zerowego IFN- $\gamma$  wyniósł średnio 14,1%.

Całkowitą i wewnątrzpróbkową niedokładność określono poprzez porównanie 27 obliczonych stężeń IFN- $\gamma$  dla każdej próbki osocza. Współczynnik zmienności wahał się od 6,6% do 12,3%. Ogólny średni współczynnik zmienności w % (przy przedziale ufności  $\pm 95\%$ ) wyniósł  $8,7\% \pm 0,7\%$ . Współczynnik zmienności wzorca zerowego osocza IFN- $\gamma$  wyniósł 26,1%. Ten poziom zmienności jest spodziewany, ponieważ obliczone stężenie IFN- $\gamma$  jest niskie i wahania wokół niskiej wartości szacunkowej są większe niż w przypadku wysokiego stężenia.

Profil precyzji testu QF-CMV ELISA został przedstawiony na Rysunku 10 i pokazuje, że niedokładność nie zwiększa się w przypadku wyższych wartości stężenia IFN- $\gamma$ .



**Rysunek 10. Profil precyzji testu QF-CMV ELISA określony na podstawie trzykrotnych testów 20 próbek osocza przeprowadzonych podczas 3 dni nienastępujących po sobie, w 3 laboratoriach, przez 3 różnych operatorów.** Linia trendu została wyznaczona za pomocą dopasowania metodą najmniejszych kwadratów.

Badanie zostało przeprowadzone w celu określenia powtarzalności testów QF-CMV z wykorzystaniem próbek krwi pochodzących od 8 różnych osób z nieznanym statusem zarażenia wirusem CMV. Krew wszystkich osób została pobrana do trzech zestawów próbek QF-CMV (3 x próbówka zerowa, 3 x próbówka z CMV oraz 3 x próbówka z mitogenem). Następnie przeprowadzono inkubację trzech zestawów próbek w trzech różnych lokalizacjach (jeden zestaw składający się z próbówki zerowej, próbówki z CMV i z mitogenem przypadający na lokalizację) w sposób opisany w ulotce informacyjnej. Po trwającej 16–24 godzin inkubacji próbówki zostały odwirowane i pobrano osocze.

Testy ELISA zostały kolejno przeprowadzone trzykrotnie w trzech lokalizacjach, w efekcie czego otrzymano po trzy wyniki QF-CMV dla wszystkich osób w poszczególnych lokalizacjach (łącznie 9 wyników dla wszystkich lokalizacji). We wszystkich lokalizacjach kontrolę sprawował inny operator. Płytki wykorzystane w badaniu niekoniecznie miały ten sam numer partii, ale ich termin ważności jeszcze nie upłynął.

Dla każdej próbki krwi określono powtarzalność, zarówno pod względem statusu diagnostycznego (reaktywny, niereaktywny lub niekonkluzyjny), jak i wartości liczbowej. Powtarzalność wartości liczbowej została oceniona tylko w przypadku próbek reaktywnych (jako współczynnik zmienności wyrażony w %), ponieważ poziomy IFN- $\gamma$  były zbyt niskie w próbkach niereaktywnych, aby uzyskać istotne oszacowanie precyzji.

Podsumowując, powtarzalność diagnostyczna wynosiła 100% w przypadku odtworzenia statusu diagnostycznego testu QF-CMV dla wszystkich 8 ochotników we wszystkich lokalizacjach i okolicznościach, bez zgłoszonych próbek niekonkluzyjnych. Powtarzalność próbek reaktywnych była na dopuszczalnym poziomie zarówno w danej lokalizacji, jak i pomiędzy lokalizacjami. Średni współczynnik zmienności dla poszczególnych lokalizacji testowych wyniósł 4,5% (Lokalizacja 1), 5,9% (Lokalizacja 2) i 7,3% (Lokalizacja 3). Ogólny współczynnik zmienności pomiędzy lokalizacjami wyniósł 5,9% dla wszystkich 5 próbek reaktywnych. Uważa się, że wartość procentowa współczynnika zmienności wynosząca poniżej 10% jest bardzo korzystna.



# Informacje techniczne

## Wyniki niekonkluzywne

Wyniki niekonkluzywne mogą być związane z testowaniem statusu immunologicznego danej osoby, ale mogą być także spowodowane szeregiem czynników technicznych:

- wynoszącym więcej niż 16 godzin odstępem czasowym pomiędzy pobraniem krwi i inkubacją w temperaturze 37°C;
- przechowywaniem krwi w temperaturze wykraczającej poza zalecany zakres (od 17°C to 27°C);
- niewystarczającym wymieszaniem zawartości próbek z pobraną krwią.

W przypadku podejrzenia problemów technicznych z pobraniem lub obsługą próbek należy powtórzyć cały test QF-CMV z wykorzystaniem nowych próbek krwi. Powtórzenie testu ELISA osocza po stymulacji można wykonać w przypadku podejrzenia naruszenia procedur testu ELISA. Wyniki niekonkluzywne (wynikające z niskiego poziomu mitogenu) nie ulegną zmianie, chyba że popełniono błąd podczas testu ELISA.

## Przewodnik rozwiązywania problemów

Przewodnik może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Więcej informacji zamieszczono w sekcji Informacje techniczne, dostępnej pod adresem: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Informacje kontaktowe znajdują się na stronie 28 oraz tylnej stronie okładki.

### Rozwiązywanie problemów z testem ELISA

---

#### *Niska gęstość optyczna odczytów wzorców*

<b>Możliwa przyczyna</b>	<b>Rozwiązanie</b>
a) Standardowy błąd rozcieńczenia	Sprawdzić, czy rozcieńczenia zestawu standardowego zostały przygotowane zgodnie z ulotką informacyjną.
b) Błąd pipetowania	Pipety należy kalibrować i wykorzystywać zgodnie z zaleceniami producenta.
c) Zbyt niska temperatura inkubacji	Inkubacja ELISA powinna być przeprowadzana w temperaturze pokojowej (od 17°C do 27°C).
d) Zbyt krótki czas inkubacji	Inkubacja płytki z koniugatem, wzorcami i próbkami powinna trwać $120 \pm 5$ minut. Inkubacja roztworu substratu enzymu na płytce trwa 30 minut.
e) Zastosowano nieprawidłowy filtr płytki	Pomiar za pomocą płytki powinien być przeprowadzany przy filtrze 450 nm oraz filtrze referencyjnym 620–650 nm.
f) Zbyt niska temperatura odczynników	Przed wykonaniem testu wszystkie odczynniki, z wyjątkiem koncentratu koniugatu 100X, muszą osiągnąć temperaturę pokojową. Zajmuje to około godziny.
g) Przetknięty zestaw/składniki	Sprawdzić, czy nie minęła data ważności zestawu. Sprawdzić, czy rekonstruowany wzorzec i koncentrat koniugatu 100X są wykorzystywane w ciągu 3 miesięcy od daty rekonstruowania.

#### *Nieswoiste wywoływanie kolorów/duży szum tła*

<b>Możliwa przyczyna</b>	<b>Rozwiązanie</b>
a) Niedokładne wymycie płytki	Wymyć płytkę co najmniej 6 razy z wykorzystaniem 400 µl buforu do płukania na jeden dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może zachodzić konieczność wykonania więcej niż 6 cykli mycia. Zalecany jest czas absorpcji wynoszący co najmniej 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami.
b) Zbyt wysoka temperatura inkubacji	Inkubacja ELISA powinna być przeprowadzana w temperaturze pokojowej (od 17°C do 27°C).
c) Przetknięty zestaw/składniki	Sprawdzić, czy nie minęła data ważności zestawu. Sprawdzić, czy rekonstruowany wzorzec i koncentrat koniugatu 100X są wykorzystywane w ciągu trzech miesięcy od daty rekonstruowania.
d) Skażony roztwór substratu enzymu	W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Sprawdzić, czy wykorzystywane zbiorniki z odczynnikami są czyste.
e) Mieszanie osocza w odwirowywanych probówkach przed pobraniem	Upewnić się, że próbki osocza są ostrożnie pobierane z powierzchni żelu bez pipetowania i uważać na materiał umieszczony na powierzchni żelu.

# Bibliografia

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. Nr* **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- $\gamma$  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.* (Praca przyjęta w listopadzie 2012 roku).
16. Cantisán S. et al. (2012) Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Praca przyjęta w listopadzie 2012 roku).

# Serwis

[www.QuantiFERON.com](http://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

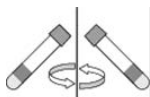
**Brazil** ■ techsebr@qiagen.com

Ta strona została celowo pozostawiona pusta.

# Skrócona procedura testowa

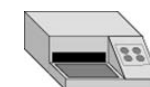
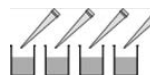
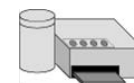
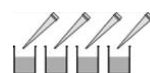
## Etap 1 — inkubacja krwi

1. Pobrać krew pacjenta do probówek na pobraną krew i potrząsnąć nimi dziesięć (10) razy tak mocno, aby cała wewnętrzna powierzchnia była pokryta krwią, w celu rozpuszczenia antygenów na ściankach probówki.
2. Przeprowadzić inkubację probówek przez kres od 16 do 24 godzin w pozycji pionowej w temperaturze  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
3. Po inkubacji wirować probówki przez 15 minut przy względnej sile odśrodkowej (RCF) wynoszącej od 2000 do 3000 jednostek w celu oddzielenia osocza od czerwonych krwinek.
4. Po odwirowaniu i przed pobraniem należy koniecznie unikać pipetowania i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać na materiał umieszczony na powierzchni żelu.



## Etap 2 — test ELISA IFN- $\gamma$

1. Pozwolić, aby składniki testu ELISA, z wyjątkiem koncentratu koniugatu 100X, osiągnęły temperaturę pokojową. Co najmniej 60 minut.
2. Z wykorzystaniem wody destylowanej lub dejonizowanej przeprowadzić rekonstruowanie zestawu standardowego do stężenia 8,0 IU/ml. Przygotować cztery (4) wzorcowe rozcieńczenia.
3. Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego koncentratu koniugatu 100X z wykorzystaniem wody destylowanej lub dejonizowanej.
4. Przygotować koniugat w stężeniu roboczym przy zastosowaniu zielonego rozcieńczalnika i dolać 50  $\mu\text{l}$  roztworu do każdego dołka.
5. Dolać 50  $\mu\text{l}$  testowych próbek osocza i 50  $\mu\text{l}$  wzorca do odpowiednich dołków. Wymieszać za pomocą wstrząsarki.
6. Przeprowadzić inkubację przez 120 minut w temperaturze pokojowej.
7. Wymyć dołki co najmniej 6 razy z wykorzystaniem 400  $\mu\text{l}$  buforu do płukania na jeden dołek.
8. Dolać 100  $\mu\text{l}$  roztworu substratu enzymu do dołków. Wymieszać za pomocą wstrząsarki.
9. Przeprowadzić inkubację przez 30 minut w temperaturze pokojowej.
10. Dolać 50  $\mu\text{l}$  roztworu powstrzymującego działanie enzymu do dołków. Wymieszać za pomocą wstrząsarki.
11. Dokonać odczytu wyników przy filtrze 450 nm oraz filtrze referencyjnym 620–650 nm.
12. Przeprowadzić analizę wyników.



Znaki towarowe: QIAGEN®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

#### **Umowa ograniczonej licencji dla zestawu QuantiFERON-CMV ELISA**

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Ten produkt może być stosowany wyłącznie zgodnie z wytycznymi dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie z elementami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu z elementami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem elementów opisanych w wytycznych dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych wytycznych dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe wytyczne zostały sformułowane przez użytkowników usług QIAGEN z myślą o innych użytkownikach usług QIAGEN. Te wytyczne nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw innych podmiotów.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Zestaw oraz jego elementy są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie są przeznaczone do ponownego użycia, regeneracji ani odsprzedaży.
4. Poza wyraźnie określonymi licencjami firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyraźnych ani dorozumianych.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań mogących doprowadzić do opisanych wyżej czynności zabronionych lub ich umożliwienia. Firma QIAGEN może wnosić roszczenia wynikające z niniejszej Umowy ograniczonej licencji do dowolnego sądu i będzie rościć prawa do zwrotu wszelkich kosztów postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub praw własności intelektualnej w zakresie zestawu i/lub jego elementów.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są w witrynie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2012 Cellestis, firma grupy QIAGEN. Wszelkie prawa zastrzeżone.

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

E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)

