

Prospectul testului QuantiFERON[®]-CMV


 2 x 96

Testul pentru interferon gamma al sângelui integral cu
măsurarea răspunsurilor la peptide cu rol de antigeni
asociate cu virusul citomegalic uman

IVD

CE

REF 0350-0201

 Cellestis, o companie 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, GERMANIA

1075110RO Rev. 01



www.QuantiFERON.com

Cuprins

Domeniul de utilizare	5
Introducere	5
Principiile testului	6
Timpul necesar pentru efectuarea testului	6
Reactivii și modul de păstrare	7
Materiale necesare, dar nefurnizate	8
Păstrare și manipulare	8
Avertizări și precauții	9
Recoltarea și manipularea probelor	10
Instrucțiuni de utilizare	11
Etapa 1 — Incubarea sângelui și recoltarea plasmei	11
Etapa 2 — Testul ELISA QuantiFERON-CMV pentru IFN- γ uman	11
Calculule și interpretarea testului	14
Interpretarea rezultatelor	15
Limitări	15
Valori prognozate	16
Caracteristici de performanță	17
Testare comparativă	17
Valoarea limită a testului	18
Studii clinice	18
Specificitate	18
Sensibilitate	19
Studii care evidențiază utilitatea clinică	19
Îndrumări consensuale internaționale privind gestionarea virusului citomegalic în transplantul de organe solide	22
Caracteristicile de performanță ale testului	22
Informații tehnice	24
Rezultate nedeterminate	24
Ghid de remediere a problemelor	25
Bibliografie	26
Servicii de asistență tehnică	27

Procedura de test abreviată	30
Etapa 1 — Incubarea sângelui	30
Etapa 2 — Testul ELISA pentru IFN- γ	30

Domeniul de utilizare

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) este un test de diagnosticare in vitro care utilizează un cocktail de peptide care simulează proteinele virusului citomegalic (VCM) uman pentru a stimula celulele din sângele integral heparinizat. Detectarea interferonului gamma (IFN- γ) prin intermediul testului Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (măsurare imunoenzimatică utilizând un antigen adsorbit, ELISA) este utilizată pentru cuantificarea răspunsurilor in vitro la aceste peptide cu rol de antigeni care sunt asociate cu controlul imunologic al infecției cu CMV. Pierderea acestei funcții imunitare poate fi asociată cu dezvoltarea bolii induse de CMV. Domeniul de utilizare a testului QF-CMV este reprezentat de monitorizarea nivelului de imunitate anti-CMV al pacientului.

QF-CMV nu este un test destinat determinării infecției cu CMV și nu trebuie utilizat pentru a exclude infecția cu CMV.

Introducere

CMV este un virus herpetic care infectează între 50% și 85% din populația adultă. Aceasta este o complicație frecventă a imunosupresiei, care apare mai ales în urma unui transplant, și poate contribui semnificativ la morbiditatea și mortalitatea în rândul recipienților organelor transplantate. Terapiile curente cu imunosupresive folosite pentru a preveni respingerea unui organ transplantat au efecte negative asupra răspunsurilor imune ale limfocitelor T și celor mediate celular, având drept rezultat creșterea susceptibilității la infecții virale post-transplant. Importanța funcției celulelor T în suprimarea replicării CMV este de asemenea subliniată prin faptul că limfocitele T citotoxice (LTC) CD8⁺ specifice CMV pot proteja împotriva patogenezei asociate virusului. Număratoarea LTC-urilor CD8⁺ specifice CMV la pacienții imunosupresați și producția de IFN- γ pot avea caracter predictiv pentru riscul de dezvoltare a bolii induse de CMV. Producția de IFN- γ poate fi un substitut funcțional pentru identificarea LTC-urilor specifice CMV.

QF-CMV este un test pentru răspunsurile imune mediate celular la peptidele cu rol de antigeni care simulează proteinele CMV. Peptidele CMV au rolul de a ținti celulele T CD8⁺, inclusiv haplotipurile HLA din Clasa I A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 și Cw6 (A30, B13) care acoperă >98% din populația umană. Persoanele infectate cu CMV prezintă de obicei în sânge limfocite CD8⁺ care recunosc acești antigeni. Acest proces de recunoaștere implică producția și secreția citokinei, IFN- γ . Detectarea și cuantificarea ulterioară a IFN- γ formează baza acestui test.

Principiile testului

Testul QF-CMV este efectuat în două etape. Mai întâi, sângele integral este recoltat în fiecare dintre tuburile QF-CMV de recoltare a sângelui, și anume un tub pentru Control Nil, un tub pentru Antigen CMV și un tub pentru Mitogen.

Tubul pentru Mitogen este utilizat în testul QF-CMV drept control pozitiv. Acesta poate fi util în special în cazul în care există un dubiu referitor la starea de imunitate a individului.

Tuburile trebuie incubate la 37 °C cât mai curând posibil, în interval de 16 ore de la recoltare. După o perioadă de incubare de 16 până la 24 de ore, tuburile sunt centrifugate, plasma este îndepărtată, iar cantitatea de IFN- γ (UI/ml) este măsurată cu ajutorul testului ELISA QF-CMV.

Cantitatea de IFN- γ din probele de plasmă din tuburile pentru Antigen CMV și Mitogen poate depăși adesea limitele superioare ale celor mai multe cititoare ELISA, chiar dacă indivizii suferă de o imunosupresie moderată. Pentru rezultate **calitative**, utilizați valorile calculate pentru plasma nediluată. Pentru rezultate **cantitative**, unde sunt necesare valorile efective în UI/ml, probele de plasmă trebuie diluate 1/10 în Diluant Verde și analizate în cititorul ELISA împreună cu plasma nediluată.

Notă: Pentru probele care se încadrează în intervalul testului ELISA QF-CMV (adică până la 10 UI/ml), trebuie utilizat rezultatul obținut cu proba de plasmă nediluată. Pentru astfel de concentrații ale IFN- γ valorile obținute folosind diluarea 1/10 a probelor de plasmă pot fi inexacte.

Se consideră că un test este pozitiv (reactiv) pentru răspunsul IFN- γ atunci când valoarea indicată de tubul Antigen CMV depășește considerabil valoarea IFN- γ în UI/ml din tubul Nil. Proba de plasmă stimulată de Mitogen servește drept control pozitiv al IFN- γ pentru fiecare probă testată. O reacție slabă la Mitogen indică un rezultat nedeterminat atunci când o probă de sânge are, de asemenea, un răspuns negativ (non-reactiv) la antigenii CMV. Acest model poate apărea în caz de limfocite insuficiente, activitate scăzută a limfocitelor ca urmare a manipulării necorespunzătoare a probei, umplerii/omogenizării incorecte a tubului Mitogen sau a incapacității limfocitelor pacientului de a produce IFN- γ , cum este cazul pacienților care au suferit recent un transplant. Proba Nil se ajustează pentru fond sau IFN- γ nespecific din probele de sânge. Nivelul IFN- γ din tubul Nil este scăzut din nivelul IFN- γ din tubul Antigen CMV și tubul Mitogen (consultați „Interpretarea rezultatelor” de la pagina 15 a acestui prospect pentru descrierea modului de interpretare a rezultatelor testului QF-CMV).

Timpul necesar pentru efectuarea testului

Timpul necesar pentru efectuarea testului QF-CMV este estimat mai jos; durata testării probelor multiple atunci când acestea sunt prelucrate pe loturi este, de asemenea, indicată:

Incubarea tuburilor cu sânge la 37 °C:	16–24 de ore
ELISA:	Aprox. 3 ore pentru o placă ELISA
	Mai puțin de 1 oră de lucru
	Se adaugă 10–15 minute pentru fiecare placă suplimentară

Reactivii și modul de păstrare

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) [Tuburi de recoltare a sângelui cu CMV și antigen de control (trusă pentru un pacient)]

Nr. de catalog 0192-0301

Număr de preparări 1

QuantiFERON Nil Control
(Control Nil QuantiFERON) (capac gri) 1 tub

CMV Antigen (Antigen CMV) (capac albastru) 1 tub

QuantiFERON Mitogen Control
(Control Mitogen QuantiFERON) (capac mov) 1 tub

Prospect 1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (Componentele trusei QuantiFERON-CMV ELISA)

Nr. de catalog 0350-0201

Benzi microplăci 24 x 8 godeuri

Human IFN- γ Standard (Standard IFN- γ uman), liofilizat 1 x flacon

Green Diluent (Diluant Verde) 1 x 30 ml

QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate
(Conjugat QuantiFERON concentrat 100X), liofilizat 1 x 0,3 ml

QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate
(Soluție tampon de spălare QuantiFERON concentrată 20X) 1 x 100 ml

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(Soluție de substrat pentru enzime QuantiFERON) 1 x 30 ml

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(Soluție de stopare a enzimelor QuantiFERON) 1 x 15 ml

Materiale necesare, dar nefurnizate

- Incubator setat la 37 °C; CO₂ nu este necesar
- Pipete cu volum variabil calibrate pentru eliberarea a 10 µl până la 1.000 µl, cu vârfuri de unică folosință
- Pipete multicanal calibrate, capabile să elibereze 50 µl și 100 µl, cu vârfuri de unică folosință
- Agitator pentru microplăci
- Apă deionizată sau distilată, 2 litri
- Spălător pentru microplăci (este recomandat un spălător automat)
- Cititor pentru microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință de 620 nm până la 650 nm

Păstrare și manipulare

Tuburi de recoltare a sângelui

- Păstrați tuburile de recoltare a sângelui la temperaturi cuprinse între 4 °C și 25 °C.
- Termenul de valabilitate al tuburilor de recoltare a sângelui QuantiFERON-CMV este de maximum 15 luni de la data fabricării, dacă sunt păstrate la temperaturi cuprinse între 4 °C și 25 °C.

Reactivii din trusa ELISA

- Păstrați trusa la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C.
- Protejați în permanență soluția de substrat pentru enzime de lumina solară directă.

Reactivii reconstituiți și neutilizați

Pentru instrucțiuni privind modul de reconstituire a reactivilor, vă rugăm să consultați „Instrucțiuni de utilizare — Etapa 2” (pașii 3 și 5 de la paginile 11 și 12).

- Standardul din trusă reconstituit poate fi păstrat cel mult 3 luni, dacă este păstrat la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C.

Notați data la care a fost reconstituit standardul din trusă.

- Odată reconstituit, conjugatul QuantiFERON concentrat 100X neutilizat trebuie păstrat în continuare la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C și utilizat în cel mult 3 luni.

Notați data la care a fost reconstituit conjugatul.

- Conjugatul în concentrație de lucru trebuie utilizat în cel mult 6 ore de la preparare.
- Soluția tampon de spălare în concentrație de lucru poate fi păstrată la temperatura camerei (între 17 °C și 27 °C) timp de cel mult 2 săptămâni.

Avertizări și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea *in vitro*.

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (FDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărei truse și componente a trusei QIAGEN.



ATENȚIE: Manipulați sângele uman ca și cum ar avea potențial infecțios. Urmați îndrumările relevante referitoare la manipularea sângelui.

Următoarele fraze de risc și siguranță se aplică pentru componentele trusei ELISA QF-CMV.

QuantIFERON Enzyme Stopping Solution (Soluție de stopare a enzimelor QuantIFERON)



Conține acid sulfuric: Iritant. Fraze de risc și siguranță:* R36/38, S26-36/37/39

- **Diluantul Verde** conține ser normal de șoarece și cazeină, care pot declanșa reacții alergice; evitați contactul cu pielea.

Pentru situații de urgență care implică substanțe chimice

Vărsare, scurgere, expunere sau accident

Contactați CHEMTREC 24 de ore din 24

În SUA și Canada: 1-800-424-9300

În afara SUA și Canada +1-703-527-3887 (apeluri cu taxă inversă acceptate)

Informații suplimentare

Fișe cu date de securitate: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Iritant pentru piele și ochi; S26: În cazul contactului cu ochii, clătiți imediat cu apă din abundență și solicitați asistență medicală; S36/37/39: Purtați îmbrăcăminte de protecție, mănuși și măști de protecție pentru ochi/față adecvate.

Recoltarea și manipularea probelor

Informații importante înainte de a începe:

Abaterile de la prospectul testului QF-CMV pot genera rezultate incorecte. Vă rugăm să citiți cu atenție instrucțiunile înainte de utilizare.

- Nu utilizați trusa dacă unul dintre flacoanele de reactivi prezintă semne de deteriorare sau scurgeri înainte de utilizare.
- Nu amestecați și nu utilizați reactivi ELISA din truse ELISA QF-CMV aparținând altor loturi.
- Eliminați reactivii neutilizați și probele biologice conform reglementărilor locale, naționale și federale.
- Nu utilizați tuburile de recoltare a sângelui QF-CMV sau trusele ELISA QF-CMV după data de expirare.

Testul QF-CMV utilizează următoarele tuburi de recoltare a sângelui:

1. Nil Control (Control Nil) (capac gri)
2. CMV Antigen (Antigen CMV) (capac albastru)
3. Mitogen Control (Control Mitogen) (capac mov)

Antigenii au fost fixați prin uscare pe peretele interior al tuburilor de recoltare a sângelui, prin urmare este esențial ca sângele să fie bine omogenizat cu conținutul tuburilor. Tuburile trebuie transferate cât mai curând posibil într-un incubator setat la 37 °C, în cel mult 16 ore de la recoltare.

Pentru obținerea unor rezultate optime, trebuie respectate următoarele proceduri:

1. **Pentru fiecare pacient, recoltați 1 ml de sânge prin puncție venoasă, direct în fiecare dintre tuburile de recoltare a sângelui QF-CMV.**
 - Întrucât sângele se recoltează relativ lent în tuburile de 1 ml, păstrați tubul pe ac timp de 2–3 secunde după ce tubul pare să se fi umplut, pentru a vă asigura că volumul recoltat este corect.
Marcajul negru de pe partea laterală a tuburilor indică nivelul de umplere corespunzător pentru 1 ml. Tuburile de recoltare a sângelui QF-CMV au fost validate pentru volume de la 0,8 la 1,2 ml. În cazul în care nivelul de sânge din oricare dintre tuburi nu este aproape de marcajul negru, se recomandă recoltarea unei alte probe de sânge.
 - Tuburile de recoltare a sângelui QF-CMV au fost validate să extragă între 0,8 ml și 1,2 ml la altitudini cuprinse între nivelul mării și 810 metri. La altitudini mai mari, utilizatorii trebuie să se asigure că sângele este extras în fiecare tub respectând aceste limite. Dacă volumul de sânge extras este redus, se poate recolta sânge cu ajutorul unei seringi și în fiecare dintre cele 3 tuburi se poate transfera câte 1 ml de sânge. Din motive de siguranță, este ideal ca această operațiune să fie efectuată scoțând acul seringii, urmând procedurile de siguranță corespunzătoare, îndepărtând capacele celor trei tuburi QF-CMV și adăugând câte 1 ml de sânge în fiecare tub (până la marcajul negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Montați la loc și fixați bine capacele tuburilor și omogenizați așa cum este descris mai jos.
 - Dacă pentru recoltarea sângelui se folosește un ac cu aripioare, trebuie utilizat un tub de purjare, pentru a vă asigura că tubul este umplut cu sânge înainte ca tuburile de recoltare a sângelui QF-CMV să fie utilizate.

2. **Imediat după umplere, agitați tuburile de zece (10) ori cu suficientă fermitate pentru a vă asigura că întreaga suprafață interioară a tubului este acoperită cu sânge, pentru a dizolva antigenii de pe pereții tubului.**
 - Tuburile trebuie să aibă temperatura cuprinsă între 17 °C și 25 °C în momentul umplerii.
 - O agitare prea energică poate cauza distrugerea gelului și poate duce la rezultate aberante.
3. **Etichetați tuburile în mod corespunzător.**
4. **Tuburile trebuie transferate cât mai curând posibil într-un incubator setat la 37 °C ± 1 °C, în cel mult 16 ore de la recoltare. Nu refrigerați și nu congelați probele de sânge.**

Instrucțiuni de utilizare

Etapa 1 — Incubarea sângelui și recoltarea plasmei

1. **Dacă sângele nu este incubat imediat după recoltare, omogenizarea tuburilor trebuie repetată chiar înainte de incubare, așa cum este descris la pasul 2 al secțiunii anterioare.**
2. **Incubați tuburile în poziție VERTICALĂ la 37 °C timp de 16 până la 24 de ore. Incubatorul nu necesită CO₂ sau umidificare.**
3. **După incubare, tuburile de recoltare a sângelui pot fi păstrate la temperaturi între 2 °C și 27 °C timp de cel mult 3 zile înainte de următorul pas. După incubarea tuburilor la 37 °C, centrifugați tuburile timp de 15 minute la 2.000 până la 3.000 RCF (g). Dopul de gel va separa celulele de plasmă. În caz contrar, tuburile trebuie centrifugate din nou la o viteză mai mare.**
 - Recoltarea plasmei fără centrifugare este posibilă, însă este necesară o atenție sporită pentru îndepărtarea plasmei fără afectarea celulelor.
4. **După centrifugare, evitați pipetarea verticală sau amestecarea plasmei în orice fel înaintea recoltării. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.**
 - Probele de plasmă trebuie recoltate exclusiv cu pipeta.
 - Probele de plasmă pot fi încărcate din tuburile de recoltare a sângelui centrifugate direct pe placa ELISA QF-CMV, inclusiv atunci când se utilizează stații de lucru automate ELISA.
 - Probele de plasmă pot fi păstrate cel mult 28 de zile la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C, sau, dacă au fost recoltate, la temperaturi sub -20 °C (de preferință sub -70 °C) pe perioade de timp îndelungate, în tuburi sau recipiente de păstrare a plasmei.

Etapa 2 — Testul ELISA QuantiFERON-CMV pentru IFN-γ uman

1. **Toate probele de plasmă și toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100X, trebuie aduse la temperatura camerei (între 17 °C și 27 °C) înainte de utilizare. Lăsați-le cel puțin 60 de minute pentru echilibrare.**
2. **Scoateți de pe suport benzile care nu sunt necesare, ambalați-le la loc în punga din folie și păstrați-le în frigider cât timp este necesar.**

Alocați cel puțin o bandă pentru standardele ELISA QF-CMV și benzi suficiente pentru numărul de pacienți supuși testării. După utilizare, păstrați suportul și capacul în vederea utilizării împreună cu benzile rămase.
3. **Reconstituiți standardul din trusă liofilizat cu volumul de apă deionizată sau distilată indicat pe eticheta flaconului standardului. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura resolubilizarea completă. Prin reconstituirea standardului la volumul indicat se va obține o soluție cu o concentrație de 8,0 UI/ml.**

4. Curba standard este preparată folosind 3 diluții cu standard din trusă și Diluantul Verde simplu ca Standard 4 (0 UI/ml).

Utilizați standardul din trusă reconstituit pentru a obține o serie de diluții cu 3 concentrații de IFN- γ . Diluați în Diluantul Verde (DV) din trusă (consultați Figura 1). Standardele trebuie să fie testate cel puțin în duplicat; urmând pașii de mai jos puteți obține un volum suficient pentru această operațiune.

- Etichetați 4 tuburi cu „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.
- Adăugați 150 μ l de Diluant Verde în cele 4 tuburi (S1–S4).
- Adăugați 150 μ l de standard din trusă în tubul S1 și omogenizați bine.
- Transferați 50 μ l din tubul S1 în tubul S2 și omogenizați bine.
- Transferați 50 μ l din tubul S2 în tubul S3 și omogenizați bine.
- Diluantul Verde simplu servește ca standard zero (S4).

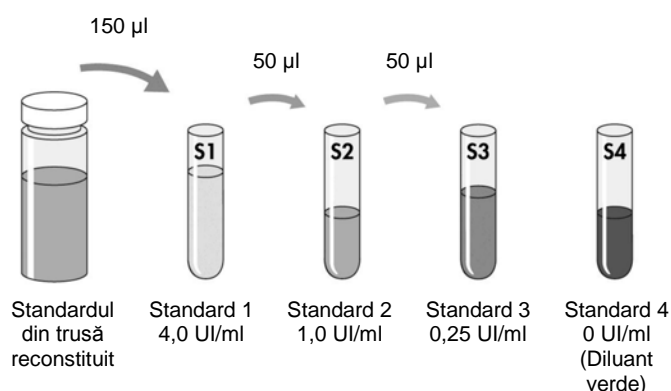


Figura 1. Prepararea curbei standard. Preparați diluții proaspete cu standard din trusă pentru fiecare sesiune de testare ELISA.

- Reconstituiți conjugatul QuantiFERON concentrat 100X liofilizat cu 0,3 ml de apă deionizată sau distilată. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura solubilizarea completă a conjugatului.**
- Concentrația de lucru a conjugatului se obține prin diluarea cantității necesare de conjugat concentrat 100X reconstituit în Diluant Verde, așa cum este precizat în Tabelul 1 — Prepararea conjugatului.**
 - Amestecați bine, dar cu atenție, pentru a evita spumarea.
 - Reduceți conjugatul concentrat 100X neutilizat la o temperatură între 2 °C și 8 °C imediat după utilizare.
 - Utilizați doar Diluant Verde.

Tabelul 1. Prepararea conjugatului

Numărul de benzi	Volumul de conjugat concentrat 100X	Volumul de Diluant Verde
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. **Înainte de efectuarea testului, probele de plasmă trebuie omogenizate pentru a vă asigura că IFN- γ este distribuit uniform în fiecare probă. De asemenea, diluați probele de plasmă cu CMV și Mitogen în proporție de 1/10 cu Diluant Verde (10 µl de plasmă amestecată cu 90 µl DV), dacă doriți rezultate cantitative. Plasma cu Nil nu trebuie diluată.**

Este recomandată testarea următoarelor probe:

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

Totuși, software-ul pentru analiză QuantiFERON-CMV acceptă și următoarele opțiuni pentru probele de la pacient:

- 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. **Adăugați 50 µl de conjugat în concentrație de lucru proaspăt preparat în godeurile ELISA dorite folosind o pipetă multicanal.**
9. **Adăugați 50 µl din probele de plasmă de testat în godeurile corespunzătoare folosind o pipetă multicanal. În final, adăugați câte 50 µl din fiecare dintre standardele de la 1 la 4.**
10. **Omogenizați temeinic conjugatul și probele de plasmă/standardele folosind un agitator pentru microplăci timp de 1 minut.**
11. **Acoperiți fiecare placă cu un capac și incubați la temperatura camerei (între 17 °C și 27 °C) timp de 120 ± 5 minute.**
- Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării.

12. **În timpul incubării, diluați o parte soluție tampon de spălare concentrată 20X în 19 părți de apă deionizată sau distilată și omogenizați temeinic. A fost furnizată o cantitate suficientă de soluție tampon de spălare concentrată 20X pentru a prepara 2 litri de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru.**
- Spălați godeurile cu **400 µl** de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru timp de cel puțin 6 cicluri. Este recomandat un spălător de plăci automat.
- Spălarea temeinică este foarte importantă pentru reușita testului. Asigurați-vă că fiecare godeu este **umplut în întregime** cu soluție tampon de spălare până în partea superioară a godeului pentru fiecare ciclu de spălare. Este recomandată o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
 - În rezervorul pentru efluent trebuie adăugat dezinfectant standard de laborator, iar pentru decontaminarea materialelor potențial infecțioase trebuie urmate procedurile omologate.
13. **Loviți ușor plăcile așezate cu fața în jos pe un prosop absorbant pentru a elimina soluția tampon de spălare reziduală. Adăugați 100 µl de soluție de substrat pentru enzime în fiecare godeu și amestecați bine, folosind un agitator pentru microplăci.**
14. **Acoperiți fiecare placă cu un capac și incubați la temperatura camerei (între 17 °C și 27 °C) timp de 30 de minute.**
- Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării.
15. **După 30 de minute de incubare, adăugați câte 50 µl de soluție de stopare a enzimelor în fiecare godeu și amestecați.**
- Soluția de stopare a enzimelor trebuie adăugată în godeuri în aceeași ordine și cu aproximativ aceeași viteză ca și substratul de la pasul 13.
16. **Măsurați Densitatea Optică (DO) a fiecărui godeu în cel mult 5 minute de la stoparea reacției, utilizând un cititor de microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință de 620 nm până la 650 nm. Valorile DO sunt utilizate pentru calcularea rezultatelor.**

Calculule și interpretarea testului

Software-ul pentru analiză QuantiFERON-CMV, pentru analizarea datelor brute și calcularea rezultatelor, este oferit de QIAGEN la adresa www.QuantiFERON.com.

Software-ul efectuează o evaluare a controlului calității testului, generează o curbă standard și furnizează rezultatul testului pentru fiecare pacient, așa cum este detaliat în secțiunea Interpretarea rezultatelor.

Ca o alternativă la utilizarea software-ului pentru analiză QF-CMV, rezultatele pot fi obținute folosind metoda de mai jos.

Generarea curbei standard

Determinați media valorilor DO ale duplicatelor standardului din trusă de pe fiecare placă.

Construiți o curbă standard $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ reprezentând grafic valoarea $\log_{(e)}$ a mediei DO (axa y) în raport cu valoarea $\log_{(e)}$ a concentrației de IFN- γ a standardelor în UI/ml (axa x), omițând standardul zero din aceste calcule. Calculați linia care corespunde cel mai bine curbei standard prin analiza de regresie.

Utilizați curba standard pentru determinarea concentrației de IFN- γ (UI/ml) pentru fiecare dintre probele de plasmă testate, utilizând valoarea DO a fiecărei probe.

Aceste calcule pot fi efectuate utilizând pachetele software disponibile împreună cu cititoarele de microplăci și un program de calcul tabelar sau un software statistic standard (ca de exemplu Microsoft® Excel®). Este recomandat ca aceste pachete să fie utilizate pentru a calcula analiza de regresie, coeficientul de variație (CV%) al standardelor și coeficientul de corelație (r) al curbei standard.

Controlul calității testului

Acuratețea rezultatelor testului depinde de generarea unei curbe standard exacte. Din acest motiv, rezultatele obținute pe baza standardelor trebuie examinate înainte ca rezultatele probelor testate să poată fi interpretate.

Pentru ca testul ELISA să fie valid:

- Valoarea medie a DO pentru Standardul 1 trebuie să fie $\geq 0,600$.
- CV% pentru valorile DO duplicate pentru Standardul 1 și Standardul 2 trebuie să fie $< 15\%$.
- Valorile DO duplicate pentru Standardele 3 și 4 nu trebuie să varieze cu mai mult de 0,040 unități de densitate optică față de media lor.
- Coeficientul de corelație (r) calculat pe baza valorilor mediane de absorbantă ale standardelor trebuie să fie $\geq 0,98$.

Dacă criteriile de mai sus nu sunt îndeplinite, execuția testului este nevalidă și trebuie repetată.

Valoarea medie a DO pentru Standardul zero (Diluantul Verde) trebuie să fie $\leq 0,150$. Dacă valoarea medie a DO este $> 0,150$, trebuie analizată procedura de spălare a plăcilor.

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele testului QuantiFERON-CMV sunt interpretate pe baza următoarelor criterii:

CMV minus Nil (UI/ml)*	Mitogen minus Nil (UI/ml)	Rezultatul testului QF-CMV	Raport/Interpretare
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Non-reactiv	Imunitate anti-CMV NE-detectată
$\geq 0,2$	Orice valoare	Reactiv	Imunitate anti-CMV detectată
$< 0,2$	$< 0,5$	Nedeterminat [†]	Rezultatul este nedeterminat pentru reacția la CMV

* Răspunsurile IFN- γ la controlul pozitiv cu Antigenul CMV și Mitogen pot depăși frecvent intervalul cititorului de microplăci. Acest lucru nu influențează rezultatele calitative.

[†] Consultați secțiunea Remedierea problemelor pentru cauzele posibile.

Limitări

Rezultatele testului QuantiFERON-CMV trebuie interpretate împreună cu istoricul epidemiologic, starea curentă de sănătate și alte evaluări pentru diagnosticare ale fiecărui individ.

Rezultatele nefiabile sau nedeterminate se pot datora:

- Abaterii de la procedura descrisă în Prospect.
- Nivelurilor excesive de IFN- γ în tubul Nil.
- Scurgerii unui interval de timp de peste 16 ore de la recoltarea probei de sânge la incubarea la 37 °C.

Valori prognozate

Valorile estimate pentru IFN- γ la utilizarea testului QuantiFERON-CMV au fost obținute pe baza a 591 de probe obținute de la adulți sănătoși, dintre care 341 seropozitivi CMV și 250 seronegativi. În cazul celor 250 de subiecți adulți sănătoși neinfecțați cu CMV, după cum s-a determinat pe baza serologiei anti-CMV (CMV seronegativi), 100% dintre subiecți au manifestat răspunsuri IFN- γ de $< 0,2$ UI/ml la tubul Antigen CMV (minus Nil). Distribuția din tubul Antigen CMV (minus Nil) pentru cei 341 de subiecți sănătoși infectați cu CMV, după cum s-a determinat pe baza serologiei anti-CMV (CMV seropozitivi), este prezentată în Figura 2.

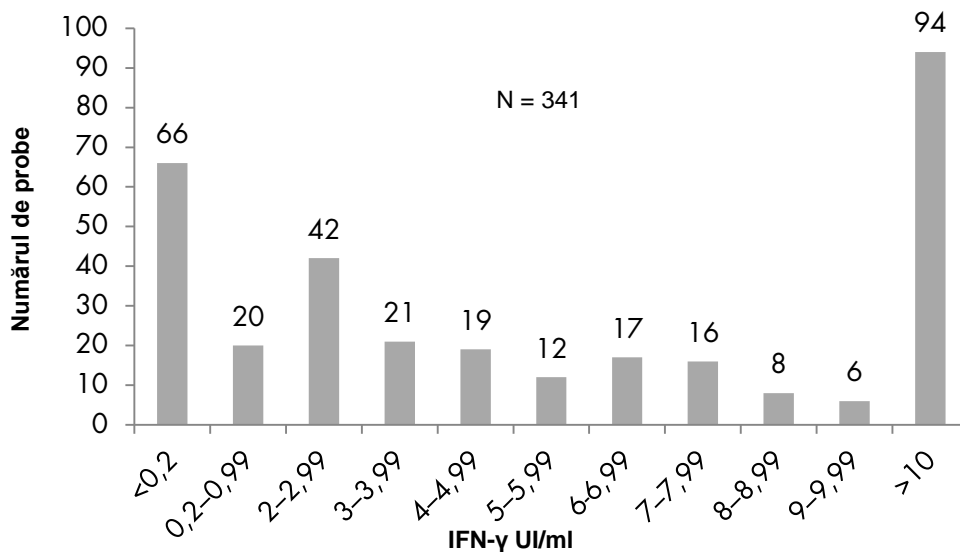


Figura 2. Distribuția răspunsurilor la CMV-Nil IFN- γ la subiecți sănătoși seropozitivi (n = 341).

Rezultatele distribuției din tubul Mitogen (minus fond Nil) pentru 731 de probe de sânge normale de la subiecți adulți sănătoși, indiferent de infecția CMV identificată, sunt prezentate în Figura 3. Rezultatele pentru tubul Mitogen (minus Nil) cu o valoare sub 0,5 UI/ml indică eșuarea testului sau faptul că persoana respectivă este imunocompromisă. În cazul unei populații sănătoase, numai 2/731 de rezultate s-au încadrat în această categorie.

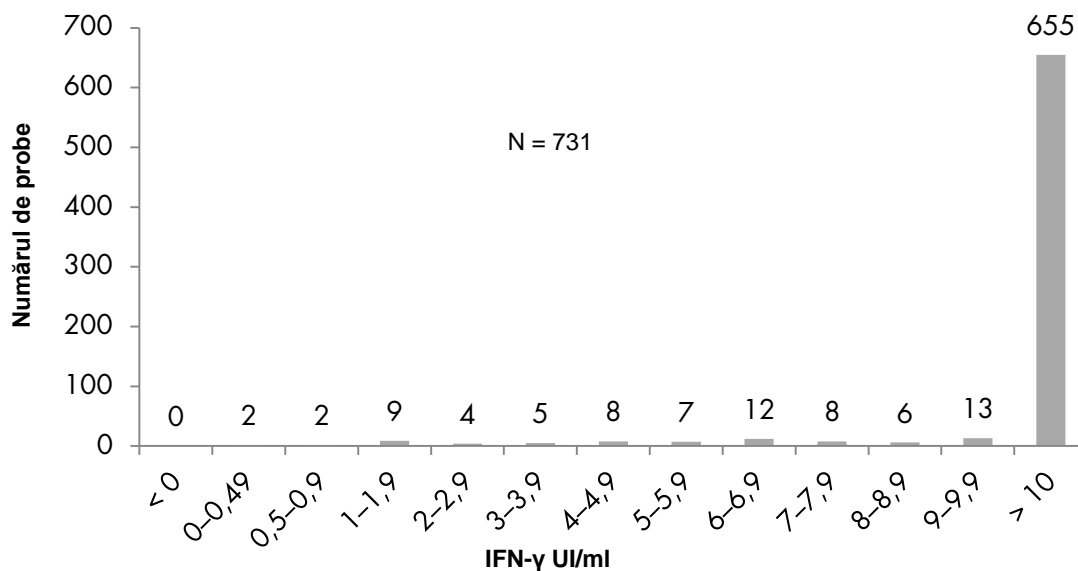


Figura 3. Distribuția răspunsurilor IFN- γ la Mitogen-Nil la subiecți adulți sănătoși (n = 731).

Valorile estimate pentru tuburile Nil sunt prezentate în Figura 4. Datele au fost generate pe baza a 1.020 de probe de plasmă obținute de la subiecți adulți sănătoși, testate folosind testul ELISA QuantiFERON-CMV.

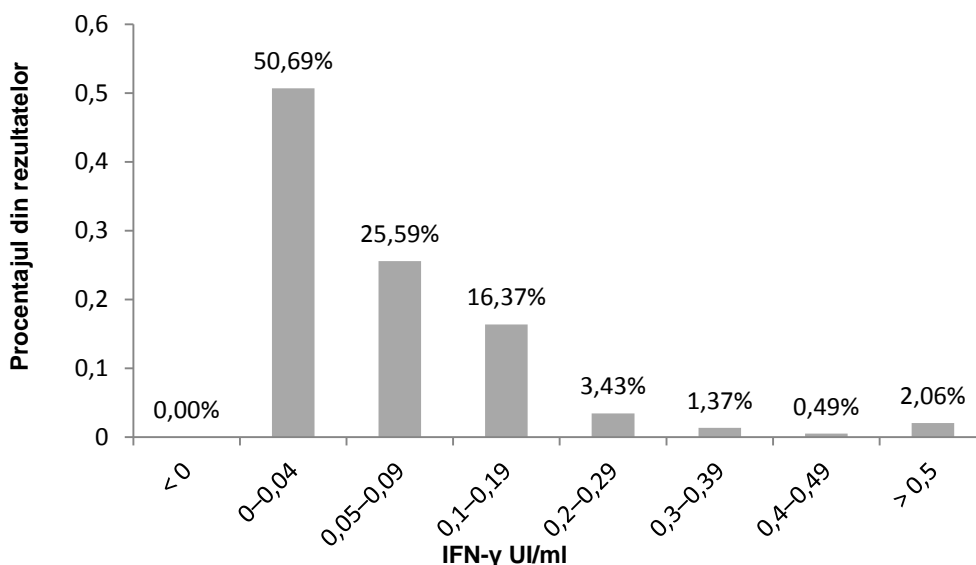


Figura 4. Distribuția (exprimată ca % din populație) răspunsurilor IFN- γ la Nil la subiecți adulți sănătoși (n = 1.020).

Caracteristici de performanță

Testare comparativă

Valoarea limită a testului pentru detectarea expunerii anterioare la CMV cu ajutorul testului QF-CMV a fost stabilită în urma unei analize a rezultatelor obținute pe un grup de subiecți sănătoși (n = 223), în care rezultatele testului QF-CMV au fost comparate cu rezultatele serologice pentru CMV. Analiza ROC a determinat faptul că pentru o valoare limită a testului de 0,04 UI/ml (după scăderea Nil) s-au obținut valori predictive pozitive și negative optime pentru testul QF-CMV (aria de sub curbă = 0,9679 [95%Î = 0,9442–0,9915, $p < 0,0001$]), și, prin urmare, aceasta a reprezentat limita la care acest test își atinge în cel mai eficient mod scopul pentru care a fost creat pe o populație sănătoasă.

În cadrul unui test comparativ, performanța testului QF-CMV a fost comparată cu cea a testului de serologie SeraQuest CMV IgG (Quest International). Testul QF-CMV a demonstrat o concordanță de 95% (294/310 indivizi) cu testul serologic anti-HCMV comparativ la indivizii sănătoși și niciunul dintre cei 149 de donatori seronegativi nu a manifestat vreo reacție la testul QF-CMV, iar 145 dintre cei 161 de donatori seropozitivi au manifestat un răspuns IFN- γ pozitiv. Procentul total de valori concordante a fost de 90%, iar procentul de valori neconcordante a fost de 100%. Nivelul de concordanță între răspunsurile IFN- γ la peptidele CMV, măsurat cu ajutorul testului QF-CMV, la voluntarii sănătoși, și starea serologică anti-CMV a acestora, determinată cu ajutorul testului serologic SeraQuest CMV IgG, este prezentat în Tabelul 2.

Tabelul 2. Concordanța între testul QuantiFERON-CMV și testul serologic CMV IgG la subiecți sănătoși.

		Serologia CMV		Totală
		Pozitivă	Negativă	
QuantiFERON-CMV	Reactiv	145	0	145 (46,8%)
	Non-reactiv	16	149	165 (53,2%)
	Totală	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Valoarea limită a testului

Valoarea limită recomandată pentru acest test clinic este de 0,2 UI/ml pentru tubul Antigen CMV (minus Nil), deși pot fi validate valori limită diferite pentru situații clinice diferite. Motivul îl constituie diferențele imunologice fundamentale între o populație de test normală și populațiile la care testul este considerat util din punct de vedere clinic, în special persoanele imunosupresate care, din cauza imunosupresiei, prezintă riscul de a dezvolta o infecție simptomatică și/sau boală indusă de CMV. La aceste persoane cu risc ridicat, utilitatea clinică a testului QF-CMV rezidă în detectarea precisă a nivelului de imunitate anti-CMV al acestor subiecți, deoarece lipsa imunității poate fi asociată cu dezvoltarea bolii induse de CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

Studii clinice

Deoarece nu există un standard definitiv pentru confirmarea sau excluderea diagnosticului de infecție cu virusul citomegalic, sensibilitatea și specificitatea testului QF-CMV nu pot fi practic evaluate. Specificitatea și sensibilitatea testului QF-CMV au fost approximate prin evaluarea nivelului de concordanță între răspunsurile IFN- γ la peptidele CMV, măsurat cu ajutorul testului QF-CMV la voluntari sănătoși, și starea serologică anti-CMV a acestora, determinată cu ajutorul unui test serologic CMV IgG.

Specificitatea testului QF-CMV a fost aproximată prin evaluarea ratelor rezultatelor fals pozitive (răspuns pozitiv la testul QF-CMV) la voluntari sănătoși fără antecedente de expunere la CMV (indivizi CMV-seronegativi). Sensibilitatea a fost aproximată prin evaluarea voluntarilor sănătoși cu antecedente de expunere la CMV (indivizi CMV-seropozitivi). Deși testul QF-CMV utilizează un număr mare de epitopi specifici CMV din diferite proteine ale CMV, asigurând astfel o largă aplicabilitate clinică pentru o gamă largă de persoane cu diferite haplotipuri HLA din Clasa I, acoperirea acestor peptide nu este de 100%. Întrucât haplotipurile HLA ale subiecților testați serologic pentru CMV sunt necunoscute, s-a estimat că un procent mic de găsite ca persoane seropozitive la examenul serologic nu va reacționa la tuburile testului QF-CMV.

Specificitate

Într-un studiu efectuat pe subiecți sănătoși fără antecedente de expunere la CMV (indivizi CMV-seronegativi, unde $n = 250$), nivelul de concordanță între răspunsurile IFN- γ la peptidele CMV, măsurat cu ajutorul testului QF-CMV, și datele serologice anti-CMV a fost de 100%.

În toate celelalte evaluări ale specificității efectuate pe persoanele care au primit transplanturi de organe solide (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), persoanele care au primit transplanturi de celule stem hematopoietice (7, 13) și pacienții infectați cu HIV (2), s-a demonstrat că nivelul de concordanță între răspunsurile IFN- γ la peptidele CMV, măsurat cu ajutorul testului QF-CMV, și serologia anti-CMV a fost în mod constant de 100%.

Sensibilitate

Într-un studiu efectuat pe subiecți sănătoși cu antecedente de expunere la CMV (indivizi CMV-seropozitivi, unde $n = 341$), nivelul de concordanță între răspunsurile IFN- γ la peptidele CMV, măsurat cu ajutorul testului QF-CMV, și serologia anti-CMV a fost de 80,6% (275/341). Neconcordanța observată se poate datora utilizării unei valori limită mai mari pentru test (0,2 UI/ml), reacției serologice fals pozitive la CMV sau lipsei de reacție a subiecților la peptidele CMV incluse în test.

În cadrul evaluărilor sensibilității efectuate pe persoanele care au primit transplanturi de organe solide (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), persoanele care au primit transplanturi de celule stem hematopoietice (7, 13) și pacienții infectați cu HIV (2), s-au constatat niveluri ușor mai scăzute de concordanță între răspunsurile IFN- γ la peptidele CMV, măsurate cu ajutorul testului QF-CMV, și răspunsurile CMV-seropozitive la ale acestor pacienți. Nivelul de concordanță mai scăzut poate fi o urmare a reacției serologice fals pozitive la CMV, a lipsei de reacție a pacienților la peptidele CMV incluse în test sau a absenței celulelor T reactive la acești pacienți din cauza imunopresiei de care suferă.

Studii care evidențiază utilitatea clinică

Atât serologia, cât și testul QF-CMV au ca domeniu de utilizare detectarea imunității la CMV. În cazul unui transplant, serologia pentru CMV este utilizată la scară largă anterior transplantului, pentru a determina riscul de apariție a complicațiilor CMV post-transplant la beneficiarul transplantului, însă are, în sine, o valoare post-transplant limitată. Ca alternativă, testul QF-CMV poate fi utilizat la primitorii de organe transplantate pentru a evalua nivelul de imunitate la CMV al pacienților care prezintă risc de dezvoltare a unei infecții simptomatice și/sau a bolii induse de CMV din cauza imunopresiei (6, 9–11).

Câteva studii clinice publicate efectuate pe o varietate de cohorte care au suferit un transplant au demonstrat utilitatea testului QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

Într-un studiu amplu efectuat pe 108 pacienți care au primit un transplant de organ solid (4), în rândul pacienților care au obținut un rezultat pozitiv la testul QF-CMV la terminarea tratamentului profilactic anti-CMV a existat un procent considerabil mai mic de cazuri de debut târziu al bolii, comparativ cu pacienții care au obținut un rezultat negativ la testul QF-CMV (5,3% comparativ cu 22,9%, $p = 0,044$) (Figura 5).

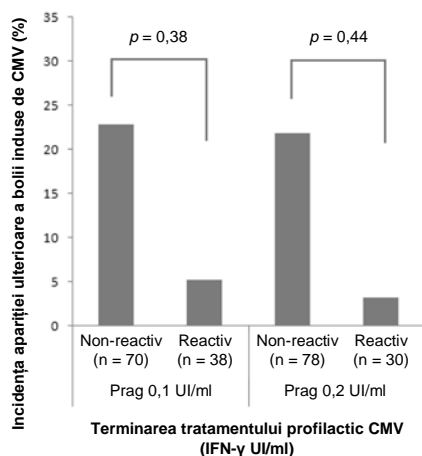


Figura 5. Procentele cazurilor de debut târziu al bolii induse de CMV la pacienții care au obținut un rezultat pozitiv la testul QuantiFERON-CMV, comparativ cu pacienții care au obținut un rezultat negativ la testul QuantiFERON-CMV la terminarea tratamentului profilactic. Date reproduse din Kumar et al.(4)

În plus, pacienții care au obținut un rezultat pozitiv la testul QF-CMV după terminarea tratamentului profilactic au experimentat mai des și pentru mai mult timp situația de lipsă a bolii induse de CMV (Figura 6), ceea ce indică faptul că testul QF-CMV poate fi utilizat pentru a identifica persoanele care prezintă risc de dezvoltare a bolii induse de CMV cu debut târziu.

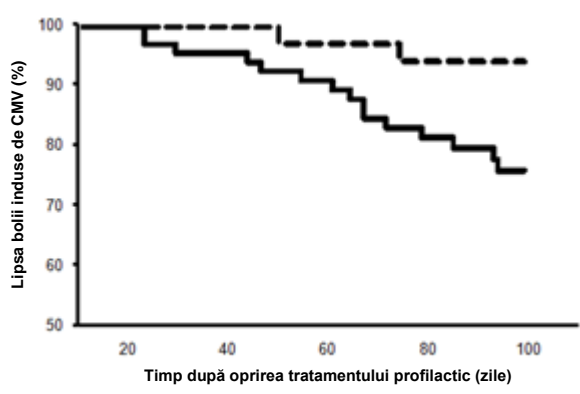


Figura 6. Intervalul de timp până la apariția bolii induse de CMV la pacienții care au obținut un rezultat pozitiv la testul QuantiFERON-CMV (marcat prin linia punctată), comparativ cu pacienții care au obținut un rezultat negativ la testul QuantiFERON-CMV (marcat prin linia continuă) după terminarea tratamentului profilactic. Date reproduse din Kumar et al.(4)

Acest studiu a evidențiat de asemenea faptul că în grupul de pacienți cu transplant care prezentau cel mai mare risc de a dezvolta boala indusă de CMV (pacienți cu transplant CMV-seronegativi care au primit un organ de la un donator CMV-seropozitiv, adică D+/R-), rezultatul pozitiv la testul QF-CMV obținut în orice moment post-tratament profilactic a fost asociat cu o probabilitate de 90% de a nu dezvolta boala indusă de CMV.

Într-un studiu efectuat pe 37 de pacienți care au primit un transplant de organ solid (12), evaluarea răspunsurilor celulelor T CD8⁺ specifice CMV cu ajutorul testului QF-CMV a ajutat la estimarea predictivă a clearance-ului viral spontan, comparativ cu evoluția bolii induse de CMV, în urma creșterii viremiei CMV. În acest studiu, 24/26 de pacienți (92,3%) care au obținut un rezultat pozitiv la testul QF-CMV au eliminat spontan virusul CMV, în timp ce la numai 5/11 pacienți (45,5%) care au obținut un rezultat negativ la testul QF-CMV s-a constatat aceeași reacție.

Un studiu efectuat pe 67 de pacienți beneficiari de transplant pulmonar care evaluează episoadele de viremie CMV post-transplant (14), a relevat faptul că 18/25 (72%) de episoade de viremie CMV au fost precedate de un rezultat negativ la testul QF-CMV, comparativ cu 4/16 (25%) episoade precedate de un rezultat pozitiv la testul QF-CMV (testul de exactitate Fischer, $p = 0,0046$, consultați Figura 7).

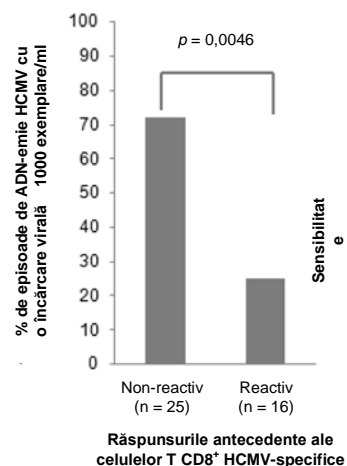


Figura 7. Analiza statistică a răspunsurilor celulelor T CD8⁺ CMV-specifice detectate cu ajutorul testului QuantiFERON-CMV și evoluția viremiei CMV (testul de exactitate Fisher, $p = 0,0046$). Date reproduse din Weseslindtner et al (14).

Într-un studiu prospectiv multicentric amplu efectuat pe 127 de persoane cu transplant de organe solide D+/R- (15) care au primit tratament antiviral profilactic, în rândul pacienților care au obținut un rezultat pozitiv la testul QF-CMV (folosind o valoare limită a testului de 0,1 UI/ml) în orice moment după terminarea tratamentului antiviral profilactic a existat un procent considerabil mai mic de cazuri de debut tardiv al bolii la 12 luni post-transplant, comparativ cu pacienții care au obținut un rezultat negativ și un rezultat nedeterminat la testul QF-CMV (6,4% comparativ cu 22,2% și respectiv comparativ cu 58,3%, $p < 0,001$). La clasificarea rezultatelor nedeterminate ca fiind și „Non-reactive”, incidența apariției ulterioare a bolii induse de CMV a fost de 6,4% comparativ cu 26,8%, $p = 0,024$ (consultați Figura 8). Valorile predictive pozitive și negative ale testului QF-CMV pentru protecția împotriva bolii induse de CMV au fost de 0,90 (95% ÎI 0,74–0,98) și, respectiv, 0,27 (95% ÎI 0,18–0,37), indicând faptul că un rezultat pozitiv la testul QuantiFERON-CMV în orice moment post-tratament profilactic a fost asociat cu o probabilitate de 90% de a nu dezvolta boala indusă de CMV. Acest studiu a demonstrat că testul QF-CMV poate fi util pentru a estima predictiv dacă pacienții prezintă risc redus, mediu sau crescut de a dezvolta ulterior boala indusă de CMV după tratamentul profilactic.

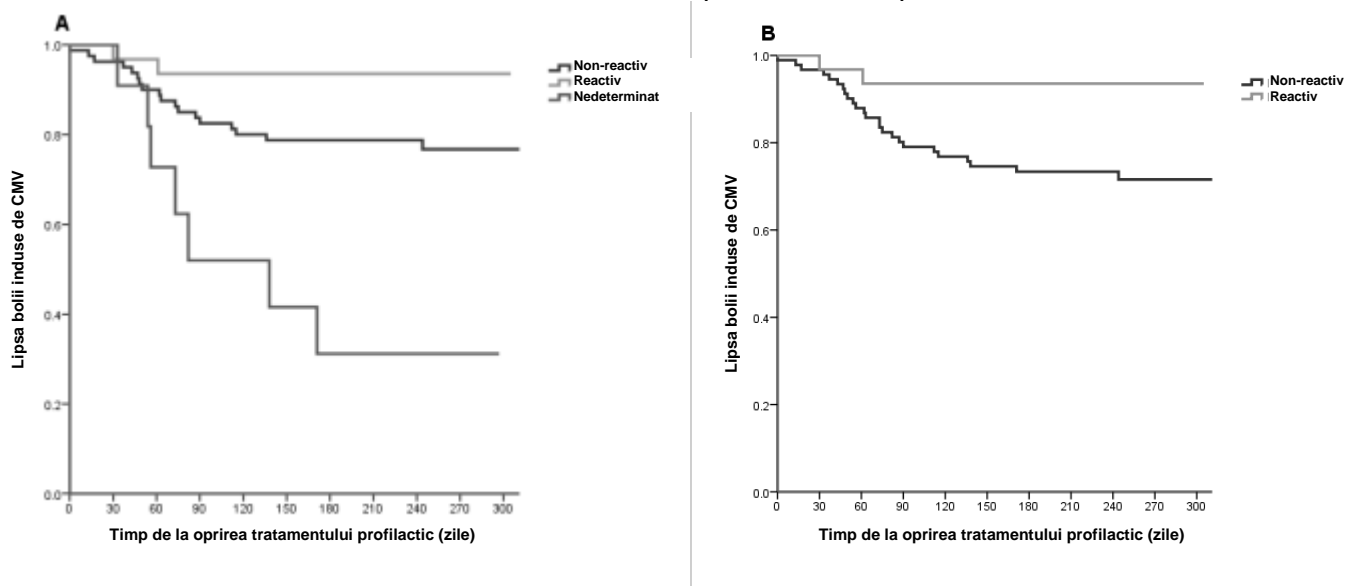


Figura 8. Curbele Kaplan-Meier pentru incidența bolii induse de CMV pe baza rezultatului la testul QF-CMV.

A Rezultatele Reactive comparativ cu Non-reactive comparativ cu Nedeterminate ale testului QF-CMV (test log rank, $p < 0,001$).

B Rezultatele Reactive comparativ cu Non reactive, unde rezultatele Nedeterminate au fost considerate „Non-reactive” (test log rank, $p = 0,024$).

Într-un studiu prospectiv efectuat pe 55 de persoane care au primit un transplant de organe solide (16), studiu care a analizat legătura dintre rezultatele testului QF-CMV pre-transplant și episoadele de replicare CMV post-transplant, s-a descoperit că recipienții R(+) care au obținut un rezultat non-reactiv la testul QF-CMV efectuat pre-transplant (7/14 sau 50%) au prezentat o incidență mai mare a replicării CMV post-transplant comparativ cu recipienții R(+) care au obținut un rezultat reactiv la testul QF-CMV (4/30 sau 13,3%).

Acest studiu a descoperit că recipienții non-reactivi la testul QF-CMV efectuat pre-transplant care au primit un organ de la un donator CMV-seropozitiv au prezentat un risc de replicare CMV de zece ori mai mare decât recipienții reactivi la testul QF-CMV efectuat pre-transplant (raportul șanselor ajustat 10,49, 95% ÎI 1,88–58,46), și că efectuarea testului QF-CMV pre-transplant poate fi utilă pentru estimarea predictivă a riscului de replicare a CMV în urma transplantului, permițând astfel individualizarea gestionării infecției cu CMV după transplantarea unui organ solid.

Alte câteva studii care cercetează detectarea răspunsurilor celulelor T CD8⁺ CMV-specifice cu ajutorul testului QF-CMV pe o cohortă de beneficiari de transplant au fost efectuate (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) sau sunt în curs de desfășurare în întreaga lume.

Îndrumări consensuale internaționale privind gestionarea virusului citomegalic în transplantul de organe solide

Importanța monitorizării imunologice specifice CMV a fost recunoscută și publicată în „Îndrumări consensuale internaționale privind gestionarea virusului citomegalic în transplantul de organe solide” (6). Aceste îndrumări internaționale, elaborate de un grup de experți în CMV și transplantul de organe solide, aprobate de Departamentul de Boli Infecțioase al Societății de Transplant, sunt recomandări consensuale, bazate pe dovezi și pe opinia experților, privind gestionarea CMV, inclusiv: diagnosticare, imunologie, prevenire și tratament.

Concluzia acestor îndrumări este că „Monitorizarea răspunsurilor imune ale celulelor T specifice CMV poate identifica predictiv persoanele care prezintă risc de apariție a bolii induse de CMV post-transplant și poate fi utilă în stabilirea tratamentului profilactic și a terapiilor preventive” (6).

În plus, îndrumările oferă și recomandări privind caracteristicile testului ideal de monitorizare imunologică, care includ:

- Capacitatea de a evalua cantitatea și funcția celulelor T CD4⁺ și CD8⁺ ale unui beneficiar de transplant
- Capacitatea de a măsura IFN- γ
- Ușurință în utilizare, eficiență din punct de vedere al costurilor și caracter reproductibil
- Rapiditate de efectuare
- Transportarea ușoară a probelor către laboratoare specializate de referință

Testul QF-CMV îndeplinește practic toate criteriile specificate în aceste îndrumări și este singurul test de monitorizare imunologică standardizat capabil să detecteze IFN- γ CMV-specific.

Caracteristicile de performanță ale testului

S-a demonstrat că metoda de măsurare a concentrației de IFN- γ cu ajutorul testului ELISA QF-CMV este liniară, de la 0 la 10 UI/ml (Figura 9). Analiza liniarității a fost efectuată prin poziționarea aleatorie a 5 duplicate pentru 11 probe de plasmă cu concentrații IFN- γ cunoscute pe placa ELISA.

Testul ELISA QF-CMV nu relevă niciun efect de rezultate fals negative la doză ridicată (prozonă) pentru concentrații de IFN- γ de până la 100.000 UI/ml.

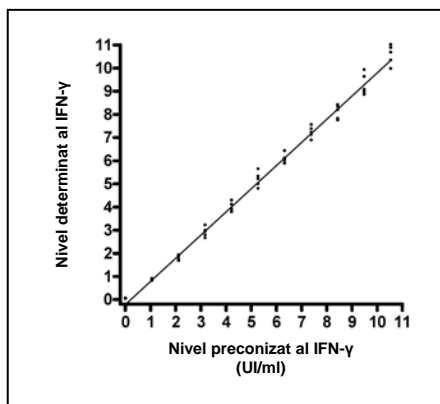


Figura 9. Profilul liniarității testului ELISA QF-CMV determinat în urma testării a 5 duplicate pentru 11 probe de plasmă cu concentrații de IFN- γ cunoscute. Linia regresiei liniare are o pantă de $1,002 \pm 0,011$ și un coeficient de corelație de 0,99.

Imprecizia intra-test și inter-teste (CV%) a testului ELISA QF-CMV a fost estimată în urma efectuării unui test pe 20 de probe de plasmă cu concentrații de IFN- γ diferite în câte 3 duplicate, în 3 laboratoare, în 3 zile neconsecutive, de către 3 operatori. Așadar, fiecare probă a fost testată de 27 de ori, în cadrul a 9 execuții de teste independente. Una dintre probe a fost un control Nil, iar concentrația de IFN- γ calculată pentru aceasta a fost de 0,08 (95% ÎI 0,07–0,09) UI/ml. Pentru cele 19 probe de plasmă rămase, intervalul de concentrații a fost cuprins între 0,33 (0,31–0,34) și 7,7 UI/ml (7,48–7,92).

Imprecizia intra-test și inter-teste a fost estimată prin calcularea mediei CV% pentru fiecare probă de plasmă testată care conținea IFN- γ din cadrul fiecărei analize a plăcii (n = 9), iar aceasta era cuprinsă în intervalul 4,1–9,1 CV%. Media CV% (\pm 95% ÎI) din cadrul testului a fost de 6,6% \pm 0,6%. Media pentru plasma cu zero IFN- γ a fost de 14,1 CV%.

Imprecizia totală sau imprecizia inter-teste a fost determinată prin compararea celor 27 de concentrații de IFN- γ calculate pentru fiecare probă de plasmă, și a avut valori cuprinse între 6,6 și 12,3 CV%. Media totală a CV% (\pm 95% ÎI) a fost de 8,7% \pm 0,7%. Plasma cu zero IFN- γ a avut un CV% de 26,1. Acest nivel de variație este preconizat deoarece concentrația de IFN- γ calculată este mică, iar variația în jurul unei valori mici estimate pentru concentrație va fi mai mare decât în cazul concentrațiilor mai mari.

Profilul preciziei pentru testul ELISA QF-CMV este ilustrat în Figura 10 și indică faptul că imprecizia nu crește la concentrații de IFN- γ mai mari.

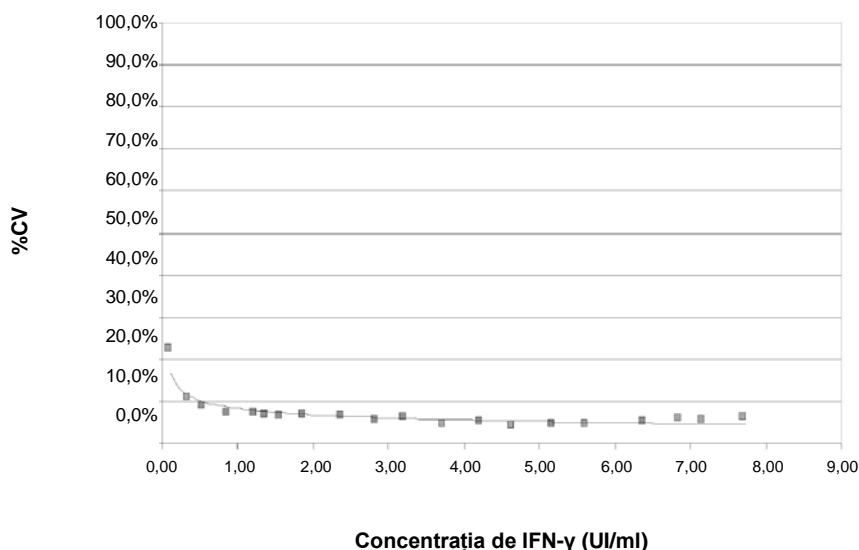


Figura 10. Profilul preciziei pentru testul ELISA QF-CMV determinat în urma efectuării unui test pe 20 de probe de plasmă în triplicat, în 3 zile consecutive, în 3 laboratoare și de către 3 operatori.

Linia de tendință este calculată pe baza metodei celor mai mici pătrate.

S-a efectuat un studiu pentru a determina caracterul reproductibil al testului QF-CMV folosind probe de sânge provenite de la 8 subiecți cu stare CMV necunoscută. Sângele fiecărui subiect a fost recoltat în trei seturi de tuburi QF-CMV (3 x Nil, 3 x CMV, și 3 x Mitogen). Cele trei seturi de tuburi au fost apoi incubate în trei centre diferite (un set de Nil, CMV, și Mitogen pentru fiecare centru), conform indicațiilor de pe Prospect. După 16-24 de ore de incubare, tuburile au fost centrifugate și a fost recoltată plasma.

Ulterior, s-a efectuat testul ELISA de trei ori în fiecare din cele trei centre, generând trei rezultate ale testului QF-CMV pentru fiecare subiect în fiecare centru (în total 9 rezultate pentru toate centrele). Fiecare centru a utilizat un operator diferit. Plăcile folosite pentru studiu nu au făcut neapărat parte din același lot, dar toate erau în termenele lor de valabilitate.

Caracterul reproductibil, relativ la starea diagnosticului (Reactiv, Non-reactiv sau Nedeterminat) și la valoarea numerică, a fost determinat pentru fiecare probă de sânge. Caracterul reproductibil al valorii numerice a fost evaluat numai pentru probele reactive (exprimat ca CV%), întrucât nivelurile de IFN- γ din probele „Non-reactive” erau prea scăzute pentru a putea face o estimare relevantă a preciziei.

Per ansamblu, caracterul reproductibil al diagnosticului a fost de 100%, starea diagnosticului testului QF-CMV pentru toți cei 8 voluntari fiind reprodusă în toate centrele de fiecare dată, fără să fie raportate probe Nedeterminate. Caracterul reproductibil al probelor Reactive a fost acceptabil, atât intra-centru, cât și inter-centre. Media CV% pentru fiecare dintre centrele de testare a fost de 4,5% (Centrul 1), 5,9% (Centrul 2), și 7,3% (Centrul 3). Per ansamblu, CV% inter-centre a fost de 5,9% pentru toate cele 5 probe reactive. Valorile coeficientului de variație exprimat procentual mai mici de 10% sunt considerate excelente.

Informații tehnice

Rezultate nedeterminate

Rezultatele nedeterminate pot fi legate de starea imunitară a individului care este testat, dar pot fi, de asemenea, legate de un număr de factori tehnici:

- Scurgerea unui interval de timp de peste 16 ore de la recoltarea probei de sânge până la incubarea la 37 °C.
- Păstrarea sângelui în afara intervalului de temperatură recomandat (între 17 °C și 27 °C).
- Amestecarea insuficientă a tuburilor de recoltare a sângelui.

Dacă sunt suspectate probleme tehnice legate de recoltarea sau manipularea probelor de sânge, repetați întregul test QF-CMV cu probe de sânge noi. Repetarea testului ELISA asupra probelor de plasmă stimulată poate fi realizată dacă este suspectată vreo abatere de la procedurile testului ELISA. Nu este de așteptat ca rezultatele nedeterminate (bazate pe valori Mitogen scăzute) să se schimbe la repetare, cu excepția cazului în care a survenit o eroare în timpul testului ELISA.

Ghid de remediere a problemelor

Acest ghid de remediere a problemelor poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, consultați și Informațiile tehnice furnizate la adresa: www.QuantiFERON.com. Pentru informații de contact, consultați pagina 27 și coperta spate.

Remediarea problemelor survenite la trusa ELISA

Valori scăzute ale densității optice a standardelor

Cauză posibilă	Soluție
a) Eroare la diluarea standardului	Asigurați-vă că diluțiile standardului din trusă sunt preparate corect, conform Prospectului.
b) Eroare la pipetare	Asigurați-vă că pipetele sunt calibrate și utilizate conform instrucțiunilor producătorului.
c) Temperatură de incubare prea mică	Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (între 17 °C și 27 °C).
d) Timp de incubare prea scurt	Incubarea plăcii cu conjugat, standarde și probe trebuie să dureze 120 ± 5 minute. Soluția de substrat pentru enzime este incubată pe placă timp de 30 de minute.
e) Filtru necorespunzător utilizat pentru cititorul de plăci	Placa trebuie citită la 450 nm, cu un filtru de referință de 620 până la 650 nm.
f) Reactivii sunt prea reci	Toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100X, trebuie aduși la temperatura camerei înainte de începerea testării. Această operațiune durează aproximativ 1 oră.
g) Trusa/componentele a(u) expirat	Asigurați-vă că utilizați trusa înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii.

Colorare nespecifică / fond ridicat

Cauză posibilă	Soluție
a) Spălare insuficientă a plăcii	Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 µl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
b) Temperatură de incubare prea mare	Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (între 17 °C și 27 °C).
c) Trusa/componentele a(u) expirat	Asigurați-vă că utilizați trusa înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult trei luni de la data reconstituirii.
d) Soluția de substrat pentru enzime este contaminată	Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi.
e) Amestecarea plasmei în tuburile de centrifugare înaintea recoltării	Asigurați-vă că probele de plasmă sunt recoltate cu atenție de la suprafața gelului fără pipetare verticală, procedând cu atenție pentru a nu afecta materialul de la suprafața gelului.

Bibliografie

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).

Servicii de asistență tehnică

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

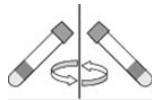
Această pagină a fost lăsată liberă în mod intenționat.

Această pagină a fost lăsată liberă în mod intenționat.

Procedura de test abreviată

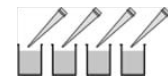
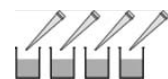
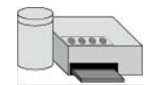
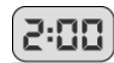
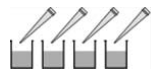
Etapa 1 — Incubarea sângelui

1. Recoltați sângele pacientului în tuburile de recoltare a sângelui și agitați tuburile de zece (10) ori cu suficientă fermitate pentru a vă asigura că întreaga suprafață interioară a tubului este acoperită cu sânge, pentru a dizolva antigenii de pe pereții tubului.
2. Incubați tuburile în poziție verticală la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 16 până la 24 de ore.
3. După incubare, centrifugați tuburile timp de 15 minute la 2.000 până la 3.000 RCF (g) pentru a separa plasma și hematiile.
4. După centrifugare, evitați pipetarea verticală sau amestecarea plasmei în orice fel înaintea recoltării. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.



Etapa 2 — Testul ELISA pentru IFN- γ

1. Aduceți componentele trusei ELISA, cu excepția conjugatului concentrat 100X, la temperatura camerei timp de cel puțin 60 de minute.
2. Reconstituiți standardul din trusă la o concentrație de 8,0 UI/ml cu apă distilată sau deionizată. Preparați patru (4) diluții ale standardului.
3. Reconstituiți conjugatul concentrat 100X liofilizat cu apă distilată sau deionizată.
4. Preparați conjugatul în concentrație de lucru în Diluant Verde și adăugați 50 μ l în toate godeurile.
5. Adăugați 50 μ l din probele de plasmă pentru testare și 50 μ l de standarde în godeurile corespunzătoare. Amestecați folosind agitatorul.
6. Incubați timp de 120 de minute la temperatura camerei.
7. Spălați godeurile de cel puțin 6 ori cu 400 μ l de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu.
8. Adăugați 100 μ l de soluție de substrat pentru enzime în godeuri. Amestecați folosind agitatorul.
9. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei.
10. Adăugați 50 μ l de soluție de stopare a enzimelor în toate godeurile. Amestecați folosind agitatorul.
11. Citiți rezultatele la 450 nm folosind un filtru de referință de 620 până la 650 nm.
12. Analizați rezultatele.



Mărci comerciale: QIAGEN[®], QuantiFERON[®] (QIAGEN Group); Microsoft[®], Excel[®] (Microsoft).

Acord de licență limitată pentru trusa QuantiFERON-CMV ELISA

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în trusă. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în această trusă cu orice componentă care nu este inclusă în această trusă, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com. Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că această trusă și/sau utilizarea(utilizările) acesteia nu încalcă drepturile terților.
3. Această trusă și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul trusei acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de trusă și/sau componentele acesteia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, o companie QIAGEN, toate drepturile rezervate.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

