

QuantiFERON[®]-CMV

Инструкция-вкладыш 2 x 96

Тест для определения клеточного ответа на
цитомегаловирусные пептидные антигены по уровню
интерферона гамма в цельной крови человека

IVD

CE

REF 0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2,

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia (Австралия)

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

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, Германия

1075110RU Ред. 01



www.QuantiFERON.com



Содержание

Назначение	5
Введение	5
Принципы анализа	6
Время, необходимое для выполнения анализа	6
Реагенты и хранение	7
Необходимые материалы, не входящие в комплект набора	8
Хранение и обращение	8
Предупреждения и меры предосторожности	9
Сбор и обработка образцов	10
Инструкция по применению	11
Этап 1. Инкубация крови и сбор плазмы	11
Этап 2. QuantiFERON-CMV ELISA для IFN- γ человека	12
Расчеты и интерпретация результатов анализа	15
Интерпретация результатов	16
Ограничения	16
Ожидаемые значения	17
Аналитические характеристики	18
Предикативное тестирование	18
Порог теста	19
Клинические исследования	19
Специфичность	20
Чувствительность	20
Исследования, подтверждающие клиническую полезность	20
Публикация «International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation»	24
Аналитические характеристики	24
Техническая информация	26
Неопределенные результаты	26
Руководство по устранению неполадок	27
Перечень литературы	28
Техническое обслуживание	29

Краткое описание процедуры анализа	30
Этап 1. Инкубация крови	30
Этап 2. ELISAIFN-γ ELISA	30

Назначение

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) — анализ *in vitro* с использованием пептидной смеси, моделирующей белки цитомегаловируса человека (ЦМВ), для стимуляции клеток в гепаринизированной цельной крови. Обнаружение интерферона гамма (IFN γ) путем фермент-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA) используется для количественного определения клеточного ответа *in vitro* на эти пептидные антигены, связанного с иммунным контролем цитомегаловирусной инфекции. Снижение данной иммунной функции может быть связано с развитием заболевания ЦМВ. Назначение QF-CMV — мониторинг уровня иммунитета к ЦМВ у пациента.

QF-CMV не является анализом для определения ЦМВИ. Его не следует использовать для исключения ЦМВИ.

Введение

ЦМВ является герпесвирусом, которым инфицированы 50—85 % взрослой популяции. ЦМВ является часто встречающимся осложнением при иммуносупрессивных состояниях, особенно после трансплантации, и может в значительной степени способствовать повышению уровня осложнений и смертности реципиентов после трансплантации. Виды иммуносупрессивной терапии, используемые в настоящее время для предотвращения отторжения пересаженного органа, оказывают пагубное влияние на Т-клеточно-опосредованный иммунный ответ (СМІ), в результате чего повышается восприимчивость к вирусным инфекциям в период после трансплантации. Важность функции Т-клеток в подавлении репликации ЦМВ подтверждается тем фактом, что CD8⁺ ЦМВ-специфические цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) могут защищать от прогрессии заболевания, вызванного вирусом. Подсчет CD8⁺ ЦМВ-специфических ЦТЛ у больных с иммуносупрессией и уровень продукции IFN- γ могут использоваться для прогноза развития заболевания ЦМВ. IFN- γ может заменять определение ЦМВ-специфических ЦТЛ.

Метод QF-CMV предназначен для определения СМІ ответа на пептидные антигены, стимулированного ЦМВ белками. Подобраны ЦМВ пептиды, направленные на CD8⁺ Т-клетки, включая A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 и Cw6 (A30, B13) гаплотипы HLA I класса, включающие >98 % популяции человека. В кровотоке у людей, инфицированных ЦМВ, обычно циркулируют CD8⁺ лимфоциты, распознающие эти антигены. Этот процесс распознавания включает образование и секрецию цитокина IFN- γ . Данный тест основан на обнаружении и последующем количественном определении IFN- γ .

Принципы анализа

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

Пробирка «митоген» используется в тесте QF-CMV в качестве положительного контроля. Это может быть особенно оправдано, когда есть сомнения относительно иммунного статуса пациента.

Пробирки следует как можно скорее (в течение 16 часов после сбора крови) инкубировать при температуре 37 °С. После периода инкубирования от 16 до 24 часов пробирки центрифугируют, удаляют плазму и с помощью QF-CMV ELISA определяют количество IFN-γ (МЕ/мл).

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

Примечание. Для образцов, находящихся в пределах аналитического диапазона метода QF-CMV ELISA (т. е. до 10 МЕ/мл), следует использовать результат, полученный на неразведенном образце плазмы. При таких концентрациях IFN-γ значения, полученные с использованием образцов плазмы, разведенных в отношении 1:10, могут быть неточными.

Тест на IFN-γ гответ считается реактивным, когда показания в пробирке «антиген ЦМВ» значительно превышают значение в МЕ/мл для IFN-γ в пробирке «ноль-контроль». Митоген-стимулированный образец плазмы выступает в качестве положительного контроля IFN-γ для каждого исследуемого образца. Слабый ответ на митоген указывает на неопределенный результат, когда образец крови также имеет нереактивный ответ на антигены ЦМВ. Такой вариант может возникнуть при недостатке лимфоцитов, снижении активности лимфоцитов из-за неправильной обработки образца, неправильного заполнения/перемешивания пробирки «митоген» или невозможности лимфоцитов пациента продуцировать IFN-γ, как у пациентов после недавней трансплантации. Образец «ноль-контроль» используется для учета фонового или неспецифического IFN-γ в образцах крови. Уровень IFN-γ в пробирке «ноль-контроль» вычитается из уровня IFN-γ в пробирках «антиген ЦМВ» и «митоген» (порядок интерпретации результатов QF-CMV см. на стр. 16 данной инструкции-вкладыша в разделе «Интерпретация результатов»).

Время, необходимое для выполнения анализа

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

Инкубирование пробирок с кровью
при температуре 37 °С

от 16 до 24 часов

ELISA

прибл. 3 часа на 1 планшет ELISA

менее 1 человеко-часа

добавьте 10—15 мин на каждый дополнительный планшет

Реагенты и хранение

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) [Пробирки для сбора крови для анализа на ЦМВ и контрольного антигена (упаковка для одного пациента)]	
№ по каталогу	0192-0301
Количество образцов для приготовления	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON «ноль-контроль») (серый колпачок)	1 пробирка
CMV Antigen («антиген ЦМВ») (синий колпачок)	1 пробирка
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON «митоген») (фиолетовый колпачок)	1 пробирка
Инструкция-вкладыш	1
QuantiFERON-CMV ELISA Components (Компоненты набора QuantiFERON-CMV ELISA)	
№ по каталогу	0350-0201
Стрипы микропланшета	24 стрипа 8-луночных
Human IFN- γ Standard (стандарт IFN- γ человека), лиофилизированный	1 x флакон
Green Diluent (зеленый разбавитель)	1 x 30 мл
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата QuantiFERON), лиофилизированный	1 x 0,3 мл
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (20-кратный концентрат промывочного буфера QuantiFERON)	1 x 100 мл
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (раствор ферментного субстрата QuantiFERON)	1 x 30 мл
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (останавливающий ферментативную реакцию раствор QuantiFERON)	1 x 15 мл

Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- Инкубатор на 37 °С; CO₂ не требуется
- Калиброванные пипетки переменного объема для дозирования от 10 мкл до 1000 мкл со сменными наконечниками
- Калиброванная многоканальная пипетка, способная дозировать от 50 до 100 мкл, со сменными наконечниками
- Шейкер для микропланшетов
- Деионизированная или дистиллированная вода, 2 литра
- Промыватель микропланшетов (рекомендуется автоматический промыватель)
- Считывающее устройство для микропланшетов, оснащенное фильтром 450 нм и эталонным фильтром от 620 нм до 650 нм

Хранение и обращение

Пробирки для сбора крови

- Пробирки для сбора крови хранить при температуре от 4 °С до 25 °С.
- Срок годности пробирок для сбора крови QuantiFERON-CMV составляет не более 15 месяцев с даты изготовления при хранении при температуре от 4 °С до 25 °С.

Реагенты набора ELISA

- Набор хранить при температуре от 2 °С до 8 °С.
- Всегда защищайте Enzyme Substrate Solution (раствор ферментного субстрата) от воздействия прямых солнечных лучей.

Восстановленные и неиспользованные реагенты

Инструкции по восстановлению реагентов см. в разделе «Инструкция по применению — Этап 2» (пункты 3 и 5 на стр. 12 и 13).

- Восстановленный стандарт набора может храниться до 3 месяцев при температуре от 2 °С до 8 °С.

Запишите дату, когда стандарт набора был восстановлен.

- Неиспользованный после восстановления QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата QuantiFERON) необходимо вернуть на хранение при температуре от 2 °С до 8 °С и использовать в течение трех месяцев.

Запишите дату, когда Conjugate (конъюгат) был восстановлен.

- Рабочий раствор конъюгата следует использовать в течение 6 часов с момента приготовления.
- Рабочий раствор Wash Buffer (промывочного буфера) может храниться при комнатной температуре (от 17 °С до 27 °С) в течение двух недель.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики In Vitro.

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



ВНИМАНИЕ. С человеческой кровью следует обращаться как с потенциально инфицированной. Соблюдайте соответствующие инструкции по правилам работы с кровью.

Следующие фразы риска и безопасности относятся к компонентам набора QF-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (останавливающий ферментативную реакцию раствор QuantiFERON)



Содержит серную кислоту: Обладает раздражающим действием. Фразы риска и безопасности:*
R36/38, S26-36/37/39

- **Green Diluent** (зеленый разбавитель) содержит нормальную мышиную сыворотку и казеин, которые могут вызвать аллергические реакции. Избегать контакта с кожей.

При чрезвычайной ситуации, вызванной химическими веществами

При разлиии, протечке, воздействии или несчастном случае

Звоните CHEMTREC круглосуточно

На территории США и Канады: 1-800-424-9300

На территории других стран: +1-703-527-3887 (принимаются телефонные вызовы за счет вызываемого абонента)

Дополнительная информация

Паспорта безопасности: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Раздражает глаза и кожу; S26: В случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу; S36/37/39: Надевайте соответствующую защитную одежду, перчатки и защиту для глаз/лица.

Сбор и обработка образцов

Важные замечания перед началом работы.

Отклонения от следования инструкции-вкладышу QF-CMV могут привести к ошибочным результатам. Перед использованием внимательно прочитайте инструкцию.

- Не используйте набор, если перед использованием на какой-либо бутылки с реагентом обнаружены признаки повреждения или утечки.
- Не смешивайте реагенты и не используйте реагенты для ELISA из других партий набора QF-CMV ELISA.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и биологические образцы в соответствии с местным, региональным и федеральным законодательством.
- Не используйте пробирки для сбора крови QF-CMV или наборы QF-CMV ELISA после истечения срока годности.

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

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

Антигены были высушены на внутренней стенке пробирки для сбора крови, поэтому очень важно тщательно перемешать содержимое пробирки с кровью. Пробирки следует как можно скорее (в течение 16 часов после сбора крови) переместить в инкубатор с температурой 37 °С.

Для достижения оптимального результата необходимо соблюдать следующие процедуры.

1. **Для каждого пациента отбирайте 1 мл крови венепункцией непосредственно в каждую из пробирок для сбора крови QF-CMV.**
 - Так как кровь набирается в 1 мл пробирку относительно медленно, как только будет пробирка будет выглядеть заполненной, подержите ее на игле в течение 2—3 секунд, чтобы убедиться в наполнении нужного объема.
Черная метка на стенке пробирки обозначает объем 1 мл. Пробирки для сбора крови для теста QF-CMV были проверены для объемов от 0,8 до 1,2 мл. Если уровень крови в любой пробирке не находится рядом с индикаторной линией, рекомендуется получить другой образец крови.
 - Пробирки для сбора крови для теста QF-CMV были проверены на отбор от 0,8 мл до 1,2 мл на высотах над уровнем моря до 810 метров. На больших высотах пользователям необходимо убедиться, что в каждую пробирку кровь берется в этих пределах. Если происходит недостаточный отбор крови, можно взять кровь с помощью шприца и перенести по 1 мл в каждую из трех пробирок. Из соображений безопасности это лучше всего делать, сняв со шприца иглу, и с выполнением соответствующих процедур обеспечения безопасности, сняв колпачки с трех пробирок QF-CMV и добавив по 1 мл крови в каждую из них (до черной метки на наклейке на пробирку). Плотнo закройте пробирки колпачками и перемешайте, как описано ниже.
 - Если при заборе крови используется катетер типа "бабочка", необходимо использовать «пробную» пробирку, чтобы убедиться в наполнении трубки кровью прежде, чем использовать пробирку для сбора крови для теста QF-CMV.

2. **Сразу после наполнения пробирок встряхните их десять (10) раз так, чтобы вся их внутренняя поверхность покрылась кровью для растворения антигенов на их стенках.**
 - Температура пробирок во время забора крови должна составлять от 17 °С до 25 °С.
 - Слишком сильное встряхивание может привести к неверным результатам из-за разрушения геля.
3. **Маркируйте пробирки соответствующим образом.**
4. **Пробирки следует как можно скорее (в течение 16 часов после сбора крови) переместить в инкубатор с температурой 37 °С ± 1 °С. Не помещайте в холодильник и не замораживайте образцы крови.**

Инструкция по применению

Этап 1. Инкубация крови и сбор плазмы

1. **Если кровь не инкубировали сразу после сбора, непосредственно перед инкубацией необходимо повторить перемешивание содержимого пробирки, как описано в пункте 2 предыдущего раздела.**
2. **Инкубируйте пробирки В ВЕРТИКАЛЬНОМ ПОЛОЖЕНИИ при температуре 37 °С в течение 16—24 часов. Инкубатор не требует использования CO₂ или увлажнения.**
3. **После инкубации до выполнения следующего шага пробирки для сбора крови можно хранить при температуре от 2 °С до 27 °С в течение 3 дней. После инкубации пробирок при температуре 37 °С их в течение 15 минут центрифугируют при 2000—3000 RCF (g). Гелевая пробка отделит клетки от плазмы. Если этого не происходит, необходимо центрифугировать пробирки повторно при более высокой скорости.**
 - Можно собирать плазму без центрифугирования, но требуется особая осторожность, чтобы удалить плазму, не взбалтывая клетки.
4. **После центрифугирования перед сбором плазмы всеми способами избегайте ее пипетирования или перемешивания. Необходимо проявлять осторожность, чтобы не взболтать материал на поверхности геля.**
 - Образцы плазмы необходимо собирать только с помощью пипетки.
 - После центрифугирования образцы плазмы из пробирок для сбора крови можно загружать непосредственно на планшет QF-CMV ELISA, в том числе при использовании автоматизированных рабочих станций ELISA.
 - Собранные образцы для получения плазмы можно хранить до 28 дней при температуре от 2 °С до 8 °С или, если плазма уже собрана, в течение более продолжительного времени в пробирках или контейнерах для хранения плазмы при температуре ниже -20 °С (предпочтительно ниже -70 °С).

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

1. Все образцы плазмы и реагенты, за исключением Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата), перед использованием должны быть доведены до комнатной температуры (от 17 °C до 27 °C). На выравнивание температур выделите по меньшей мере 60 минут.
2. Снимите ненужные стрипы с рамки, запечатайте обратно в пакет из фольги и верните в холодильник для хранения, пока не потребуются.

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

3. Восстановите лиофилизированный стандарт набора Kit Standard указанным на этикетке флакона со стандартом набора объемом деионизированной или дистиллированной воды. Перемешайте осторожно, чтобы избежать вспенивания и обеспечить полное растворение. В результате восстановления стандартного образца до заявленного объема получится раствор с концентрацией 8,0 МЕ/мл.
4. Стандартную кривую получают, используя 3 разведения стандарта набора и Green Diluent (зеленый разбавитель) отдельно в качестве Стандарта 4 (0 МЕ/мл).

Используйте восстановленный стандарт набора для получения серии разведений в трех концентрациях IFN-γ. Разведите в Green Diluent (GD) (зеленом разбавителе) набора (см. рисунок 1). Стандарты необходимо проанализировать по меньшей мере в двух повторностях. На следующем шаге для этого будет получен достаточный объем.

- а. Пометьте четыре пробирки «S1», «S2», «S3», «S4».
- б. Добавьте 150 мкл Green Diluent (зеленого разбавителя) в четыре пробирки (S1—S4).
- в. Добавьте 150 мкл стандарта набора в пробирку «S1» и тщательно перемешайте.
- г. Перенесите 50 мкл из пробирки «S1» в пробирку «S2» и тщательно перемешайте.
- д. Перенесите 50 мкл из пробирки «S2» в пробирку «S3» и тщательно перемешайте.
- д. Green Diluent(зеленый разбавитель) сам по себе служит в качестве нулевого стандарта («S4»).

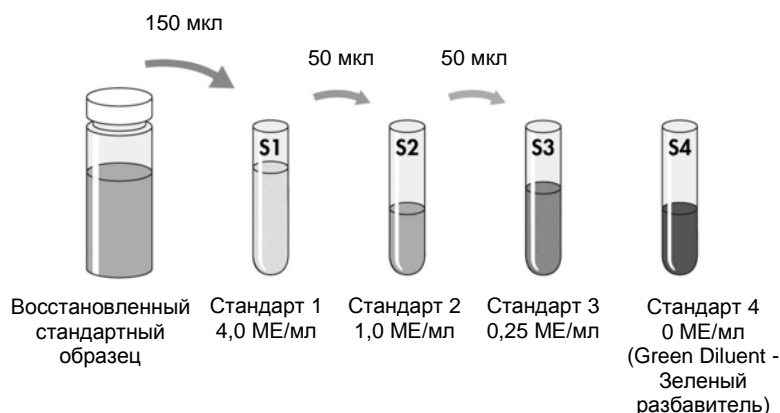


Рисунок 1. Получение стандартной кривой. Готовьте свежие разведения стандарта набора для каждого сеанса ELISA.

5. Восстановите лиофилизированный QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата QuantiFERON) 0,3 мл деионизированной или дистиллированной воды. Перемешайте осторожно, чтобы избежать вспенивания и обеспечить полное растворение конъюгата.
6. Рабочий раствор конъюгата получается путем разбавления необходимого количества восстановленного Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата) в Green Diluent (зеленом разбавителе), как изложено в таблице 1 «Подготовка конъюгата».
 - Перемешайте тщательно, но осторожно, чтобы избежать вспенивания.
 - Весь неиспользованный Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата) сразу же после использования верните на хранение при температуре от 2 °С до 8 °С.
 - Используйте только Green Diluent (зеленый разбавитель).

Таблица 1. Подготовка конъюгата

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

7. Прежде чем приступить к анализу, необходимо перемешать образцы плазмы, чтобы обеспечить равномерное распределение IFN- γ в каждом образце. Также, если необходимо получить количественные результаты, разбавьте образцы плазмы «ЦМВ» и «митоген» в отношении 1:10 Green Diluent (зеленым разбавителем) (10 мкл плазмы перемешать с 90 мкл GD). Плазму в пробирке «ноль-контроль» не разбавлять.

Рекомендуется выполнить анализ следующих образцов:

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

Тем не менее, при исследовании образца пациента следующие варианты также поддерживаются программным обеспечением для анализа QuantiFERON-CMV:

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

8. С помощью многоканальной пипетки в нужные лунки планшета ELISA добавьте по 50 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата.
9. С помощью многоканальной пипетки в соответствующие лунки добавьте по 50 мкл исследуемых образцов плазмы. Наконец, добавьте по 50 мкл каждого из стандартов 1—4.
10. На шейкере для микропланшетов тщательно перемешайте конъюгат и образцы плазмы/стандарты в течение одной минуты.
11. Каждый планшет накройте крышкой и инкубируйте при комнатной температуре (от 17 °C до 27 °C) в течение 120 ± 5 минут.
 - Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.
12. Во время инкубации разведите одну часть Wash Buffer 20X Concentrate (20-кратный концентрат промывочного буфера) 19 частями деионизированной или дистиллированной воды и тщательно перемешайте. Предоставленного количества Wash Buffer 20X Concentrate (20-кратный концентрат промывочного буфера) достаточно для приготовления двух литров рабочего промывочного буфера.

Выполните для лунок не менее шести циклов промывки с использованием 400 мкл рабочего раствора промывочного буфера. Рекомендуется использовать автоматическую мойку для планшетов.

 - Для проведения анализа очень важна тщательная промывка. Проследите, чтобы во время каждого цикла промывки каждая лунка была **до краев заполнена** промывочным буфером. Между циклами рекомендуется выдерживать по меньшей мере пятисекундный период выжидания.
 - Для обеззараживания потенциально инфекционных материалов в резервуар для отходов необходимо добавлять стандартное лабораторное дезинфицирующее средство и выполнять общепринятые процедуры.
13. Для удаления остатков промывочного буфера положите планшеты вверх дном на фильтровальную бумагу. В каждую лунку добавьте по 100 мкл Enzyme Substrate Solution (раствора ферментного субстрата) и тщательно перемешайте на шейкере для микропланшетов.
14. Каждый планшет накройте крышкой и инкубируйте при комнатной температуре (от 17 °C до 27 °C) в течение 30 минут.
 - Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.
15. После 30-минутной инкубации в каждую лунку добавьте по 50 мкл Enzyme Stopping Solution (останавливающий ферментативную реакцию раствор) и перемешайте.
 - Enzyme Stopping Solution (останавливающий ферментативную реакцию раствор) необходимо добавлять в лунки в том же порядке и примерно с той же скоростью, что и субстрат на шаге 13.
16. После остановки реакции при помощи микропланшетного считывающего устройства (ридера), оснащенного фильтром 450 нм и эталонным фильтром от 620 нм до 650 нм, в каждой лунке в течение пяти минут измерьте оптическую плотность (ОП). Значения ОП используются для расчета результатов.

Расчеты и интерпретация результатов анализа

Программное обеспечение для анализа QuantiFERON-CMV для анализа исходных данных и расчета результатов можно получить у компании QIAGEN по адресу www.QuantiFERON.com.

Программное обеспечение выполняет оценку контроля качества анализа, генерирует стандартную кривую и предоставляет результаты теста для каждого пациента, как указано в разделе «Интерпретация результатов».

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

Получение стандартной кривой

Для каждого планшета определите средние значения ОП для повторных измерений на стандарте набора.

Постройте стандартную кривую $\log_{(e)} - \log_{(e)}$, по оси y нанося $\log_{(e)}$ средних ОП, а по оси x — $\log_{(e)}$ концентрации IFN- γ в стандартах в МЕ/мл, исключив из этих расчетов нулевой стандарт. Методом регрессионного анализа рассчитайте максимально соответствующую стандартной кривой линию.

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

Эти расчеты можно выполнить с использованием программных пакетов, доступных со считывающими устройствами для микропланшетов, и с помощью стандартных электронных таблиц или статистического программного обеспечения (например, Microsoft® Excel®). Такие пакеты рекомендуется использовать для выполнения регрессионного анализа, расчета коэффициента вариации (%CV) для стандартов и коэффициента корреляции (r) стандартной кривой.

Контроль качества теста

Точность результатов теста зависит от получения точной стандартной кривой. Таким образом, прежде чем можно будет интерпретировать результаты анализа образцов, необходимо проверить результаты, полученные на стандартах.

Полученные методом ELISA результаты считаются действительными, если:

- среднее значение ОП для стандарта 1 $\geq 0,600$.
- %CV значений ОП для повторностей для стандартов 1 и 2 $< 15\%$;
- значения ОП при повторных измерениях на стандартах 3 и 4 не отличаются от среднего значения более чем на 0,040 единиц оптической плотности;
- коэффициент корреляции (r), рассчитанный по среднему значению поглощения стандартов, $\geq 0,98$.

Если указанные выше условия не соблюдаются, анализ является недействительным и должен быть повторен.

Среднее значение ОП для нулевого стандарта Green Diluent (зеленый разбавитель) должно быть $\leq 0,150$. Если среднее значение ОП $> 0,150$, необходимо проверить процедуру промывки.

Интерпретация результатов

Результаты QuantiFERON-CMV интерпретируются с использованием следующих критериев:

«антиген ЦМВ» минус «ноль-контроль» (МЕ/мл)*	«митоген» минус «ноль-контроль» (МЕ/мл)	Результат QF-CMV	Результат/Интерпретация
< 0,2	≥ 0,5	Нереактивный	Антитела к ЦМВ НЕ обнаружены
≥ 0,2	Любой	Реактивный	Антитела к ЦМВ обнаружены
< 0,2	< 0,5	Неопределенный [†]	Результат ответа на ЦМВ не определен

* Значение ответа IFN-γ на положительные контроли «антиген ЦМВ» и «митоген» обычно лежит вне диапазона считывания микропланшетного ридера. Это не оказывает влияния на качественные результаты.

[†] Возможные причины см. в разделе «Поиск и устранение неисправностей».

Ограничения

Результаты тестирования QuantiFERON-CMV необходимо использовать в сочетании с эпидемиологической историей каждого пациента, состоянием здоровья на момент исследования и другими диагностическими показателями.

Недостоверность или сомнительность результатов может возникнуть по следующим причинам.

- Отклонение от процедуры, описанной в инструкции-вкладыше.
- Чрезмерно высокий уровень IFN-γ в пробирке «ноль-контроль».
- Отобранный образец крови инкубировали при температуре 37 °С спустя более чем 16 часов после взятия.

■ Ожидаемые значения

Ожидаемые значения IFN- γ при использовании QuantiFERON-CMV были получены при тестировании 591 образца, взятых у здоровых взрослых индивидуумов, 341 из которых был серопозитивным к ЦМВ, а 250 — серонегативными. Из 250 здоровых взрослых субъектов без ЦМВИ, как показали серологические исследования на антитела к ЦМВ (ЦМВ серонегативных), 100 % субъектов давали ответ IFN- γ < 0,2 МЕ/мл в пробирке «антиген ЦМВ» (минус «ноль-контроль»). Распределение данных для пробирок «антиген ЦМВ» (минус «ноль-контроль») у 341 здорового субъекта с ЦМВИ, определенное в ходе серологических исследований на антитела к ЦМВ (ЦМВ серопозитивных), изображено на рисунке 2.

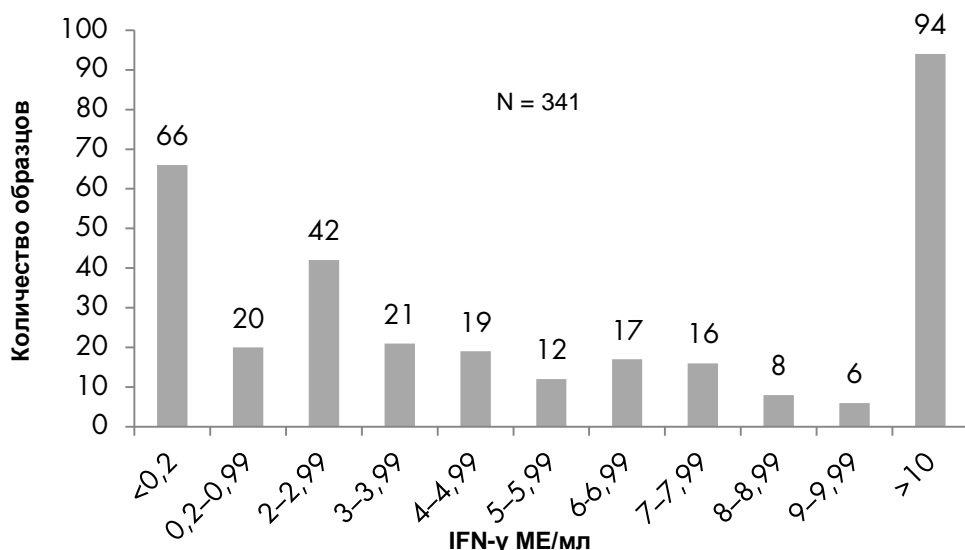


Рисунок 2. Распределение ЦМВ-ноль IFN- γ ответов у серопозитивных здоровых субъектов (n=341).

Распределение результатов для пробирок «митоген» (минус ноль-фон) для 731 нормальной пробы крови здоровых взрослых субъектов, не зависимо от известных случаев ЦМВИ, показано на рисунке 3. Результат «митоген» (минус «ноль-контроль») меньше 0,5 МЕ/мл указывает либо на ошибки теста, либо на то, что пациент является иммунокомпрометированным. В здоровой популяции лишь 2 из 731 результата попали в эту категорию.

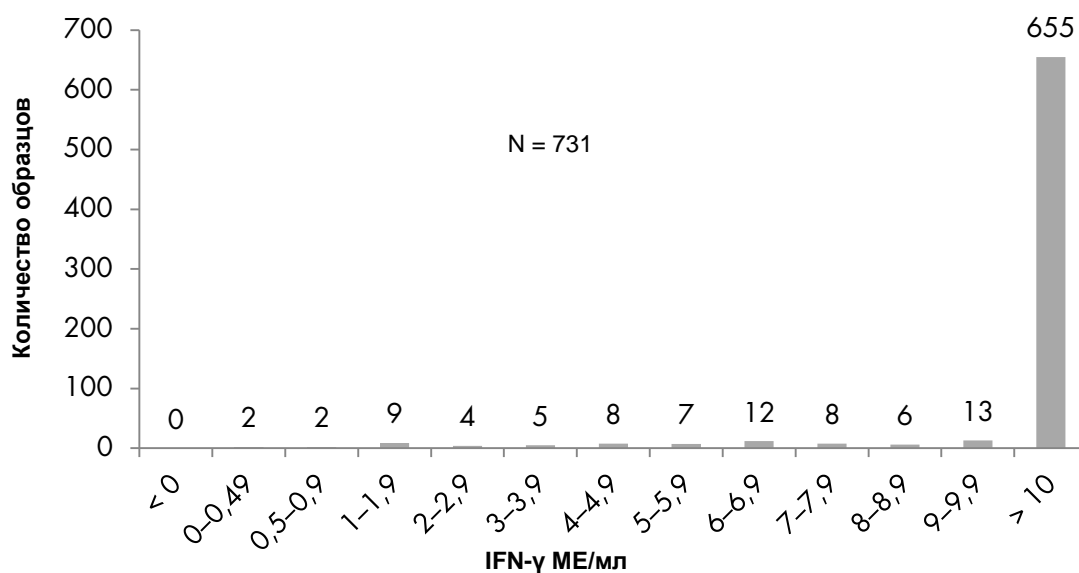


Рисунок 3. Распределение ответов Митоген-Ноль IFN- γ у здоровых взрослых субъектов (n = 731).

Ожидаемые значения для пробирок «ноль-контроль» изображены на рисунке 4. Данные получены на 1020 образцах плазмы здоровых взрослых субъектов, протестированных с помощью ELISA QuantiFERON-CMV.

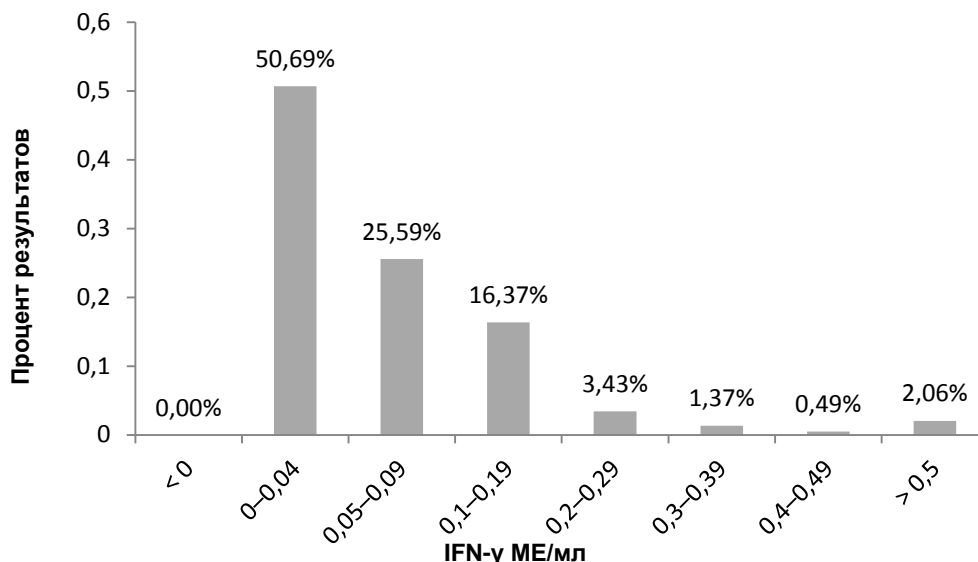


Рисунок 4. Распределение (выражено в процентном соотношении к популяции) ответов Ноль IFN-γ у здоровых взрослых субъектов (n = 1020).

Аналитические характеристики

Предикативное тестирование

Порог теста для обнаружения предшествующего воздействия ЦМВ с помощью QF-CMV был установлен после анализа результатов группы здоровых субъектов (n = 223), при котором результаты QF-CMV сравнивались с результатами серологических исследований на антитела к ЦМВ. При ROC-анализе установлено, что диагностический порог теста 0,04 МЕ/мл (после вычитания «ноль-контроля») показывает оптимальные положительные и отрицательные прогностические значения QF-CMV (площадь под кривой = 0,9679 [95 % ДИ = от 0,9442 до 0,9915, $p < 0,0001$]), и, таким образом, представляет собой порог, при котором анализ, выполненный по назначению в здоровой популяции, является наиболее эффективным.

В предикативном тестировании характеристики QF-CMV сравнивались с серологическим тестом SeraQuest CMV IgG (Quest International). Анализ показал 95 % (294 из 310 субъектов) согласие с предикативным серологическим тестом на антитела к ЦМВ у здоровых субъектов, отсутствие какой-либо реактивности по QF-CMV у 149 серонегативных доноров, и 145 из 161 серопозитивного донора, демонстрирующего реактивный ответ IFN-γ. Общий уровень согласия по положительным результатам составил 90 %, а по отрицательным результатам — 100 %. Уровень согласия между ответами IFN-γ на пептиды ЦМВ, измеренными с помощью QF-CMV у здоровых добровольцев, и серологическим статусом по антителам к ЦМВ этих субъектов, определенным с помощью серологического теста SeraQuest CMV IgG, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Согласие между QuantiFERON-CMV и серологическим тестом CMV IgG у здоровых людей.

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

Порог теста

Рекомендуемый клинический порог теста для этого анализа составляет 0,2 МЕ/мл в пробирке «антиген ЦМВ» (минус «ноль-контроль»), хотя для различных клинических условий могут быть подтверждены различные пороговые значения. Смысл заключается в фундаментальных иммунологических различиях между тестированием в нормальной популяции и популяциях, в которых тест считается клинически полезным — особенно у людей с ослабленным иммунитетом, которые в силу иммуносупрессии подвержены риску развития симптоматической ЦМВИ и (или) заболевания. В такой группе высокого риска клиническое применение QF-CMV заключается в точном определении у таких пациентов уровня иммунитета к ЦМВ, так как отсутствие иммунитета может быть связано с развитием ЦМВИ (1—5, 7, 8, 11—16).

Клинические исследования

Так как абсолютного стандарта для подтверждения или исключения диагноза цитомегаловирусной инфекции не существует, выполнить практическую оценку чувствительности и специфичности для QF-CMV невозможно. Специфичность и чувствительность QF-CMV аппроксимировались путем оценки уровня согласия между ответами IFN- γ на пептиды ЦМВ, измеряемыми при помощи QF-CMV у здоровых добровольцев, и серологического статуса на анти-ЦМВ этих субъектов с применением серологического теста на антитела класса IgG к ЦМВ.

Специфичность QF-CMV анализировалась путем оценки ложноположительных случаев (QF-CMV реактивный ответ) у здоровых добровольцев без признаков предварительного воздействия ЦМВ (ЦМВ серонегативных лиц). Чувствительность анализировалась путем оценки здоровых добровольцев с признаками предварительного воздействия ЦМВ (ЦМВ серопозитивных лиц). Хотя QF-CMV использует большое количество ЦМВ-специфичных эпитопов из различных белков ЦМВ, тем не менее, при обеспечении широкого клинического применения в широком диапазоне популяций с различными гаплотипами HLA I класса, не все эти пептиды были охвачены. Так как гаплотипы HLA субъектов, проходящих серологические исследования на антитела к ЦМВ, были неизвестны, ожидается небольшой процент серопозитивных лиц, не дающих ответ на антиген в пробирках QF-CMV.

Специфичность

В исследовании, проведенном на здоровых субъектах без признаков предварительного воздействия ЦМВ (ЦМВ серонегативных лиц, где $n = 250$), показано 100 % согласие между ответами IFN- γ на пептиды ЦМВ, измеренные с помощью QF-CMV, и результатами серологических исследований на антитела к ЦМВ.

Во всех других оценках специфичности, проводимых у реципиентов после трансплантации солидных органов (1, 3, 4, 8, 12, 14—16), реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (7, 13) и ВИЧ-инфицированных пациентов (2) степень согласия между ответами IFN- γ на пептиды ЦМВ, измеренными методом QF-CMV, и результатами серологических исследований на антитела к ЦМВ составила 100 %.

Чувствительность

В исследовании, проведенном на здоровых субъектах без признаков предварительного воздействия ЦМВ (ЦМВ серонегативных лиц, где $n = 341$), степень согласия между ответами IFN- γ на пептиды ЦМВ, измеренными методом QF-CMV, и результатами серологических исследований на антитела к ЦМВ составила 80,6 % (275 из 341). Наблюдаемое несоответствие может быть связано с применением более высокого порога теста (0,2 МЕ/мл), ложно-положительными результатами серологии на ЦМВ или отсутствием ответа субъекта на пептиды ЦМВ в данном тесте.

При оценках чувствительности, проводимых у реципиентов после трансплантации солидных органов (1, 3, 4, 8, 12, 14—16), реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (7, 13) и ВИЧ-инфицированных пациентов (2) у таких пациентов была обнаружена немного пониженный уровень согласия между ответами IFN- γ на пептиды ЦМВ, измеренными методом QF-CMV, и результатами серологических исследований на антитела к ЦМВ. Пониженный уровень согласия может быть результатом ложно-положительных результатов серологии на ЦМВ, отсутствием ответа субъекта на пептиды ЦМВ в анализе или отсутствие у таких пациентов реактивных Т-клеток из-за их иммуносупрессии.

Исследования, подтверждающие клиническую полезность

Как серология, так и метод QF-CMV при использовании по прямому назначению позволяют обнаружить иммунитет к ЦМВ. При трансплантации в качестве предтрансплантационной процедуры для выявления риска осложнений ЦМВ, возникающего у реципиента после трансплантации, широко используется серология на ЦМВ, но после трансплантации сама по себе она имеет ограниченную ценность. Кроме того, метод QF-CMV можно использовать у реципиентов трансплантата для оценки уровня иммунитета к ЦМВ у пациентов с риском развития симптоматической ЦМВ-инфекции и (или) заболеваний, связанных с иммуносупрессией (6, 9—11).

Ряд опубликованных данных клинических исследований в различных когортах после трансплантации продемонстрировал полезность QuantiFERON-CMV (1—5, 7, 8, 11—16).

При обширном исследовании среди 108 реципиентов после трансплантации солидных органов (4) у пациентов с реактивным результатом QF-CMV по завершении анти-ЦМВ профилактики выявлен значительно более низкий уровень позднего проявления заболевания по сравнению с пациентами с неактивным результатом QF-CMV (5,3 % против 22,9 %, соответственно, $p = 0,044$) (рисунок 5).

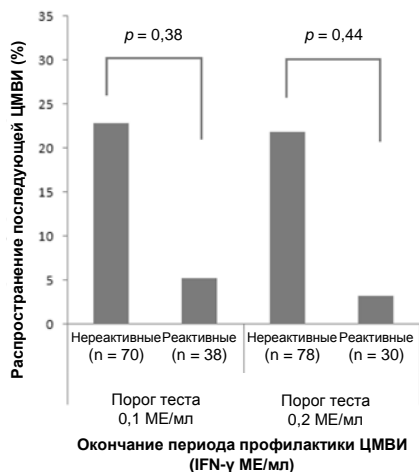


Рисунок 5. Соотношения позднего проявления ЦМВИ у пациентов с реактивным результатом QuantiFERON-CMV и неактивным результатом QuantiFERON-CMV в конце профилактики.

Данные заимствованы из Kumar et al.(4)

Кроме того, у пациентов с реактивным тестом QF-CMV после завершения профилактики заболевание ЦМВ не развивалось чаще и в течение более продолжительного времени (рисунок 6), что свидетельствует о пригодности метода QF-CMV для идентификации лиц, подвергающихся риску позднего развития ЦМВИ.

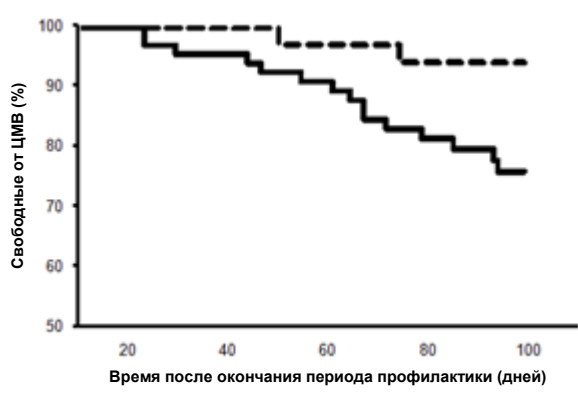


Рисунок 6. Соотношение времени развития ЦМВИ у пациентов с реактивным результатом QuantiFERON-CMV (пунктирная линия) и неактивным результатом QuantiFERON-CMV (сплошная линия) в конце профилактики. Данные заимствованы из Kumar et al.(4)

Данное исследование также подчеркивает, что в когорте пациентов после трансплантации с самым высоким риском развития ЦМВИ (ЦМВ серонегативные реципиенты после трансплантации, получившие орган от ЦМВ серопозитивных доноров, т. е. D+/R-) индикация реактивного результата QF-CMV в любое время после профилактики связана с 90 % вероятностью отсутствия развития заболевания ЦМВ.

При исследовании с участием 37 пациентов после трансплантации солидных органов (12) оценка ответов CD8⁺ ЦМВ-специфических Т-клеток методом QF-CMV помогала предсказать спонтанный клиренс вируса по сравнению с прогрессированием заболевания ЦМВ, с последующим увеличением вирусемии ЦМВ. В этом исследовании у 24 из 26 пациентов (92,3 %) с реактивным результатом QF-CMV произошел спонтанный клиренс вируса ЦМВ, в то время как тот же результат был только у 5 из 11 (45,5 %) пациентов с неактивным результатом QF-CMV.

В исследовании среди 67 реципиентов после трансплантации легкого, оценивающих эпизоды виремии ЦМВ (14) было обнаружено, что 18 из 25 (72 %) эпизодам виремии ЦМВ предшествовал нереактивный результат QF-CMV по сравнению с четырьмя из 16 (25 %) эпизодами, которым предшествовал реактивный ответ QF-CMV (точный критерий Фишера, $p = 0,0046$, см. рисунок 7).

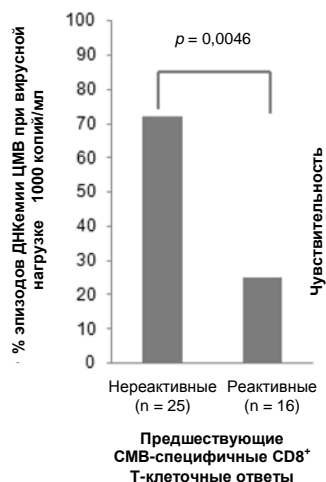


Рисунок 7. Статистический анализ ответов CD8⁺ ЦМВ-специфических Т-клеток, обнаруженных методом QuantiFERON-CMV, и развития виремии ЦМВ (точный критерий Фишера, $p = 0,0046$). Данные заимствованы из Weseslindtner et al (14).

Большое многоцентровое перспективное исследование среди 127 D+/R- реципиентов после трансплантации солидных органов (15), каждый из которых проходил антивирусную профилактику, показало, что пациенты с реактивным результатом QF-CMV (с использованием порога теста 0,1 МЕ/мл) в любой момент времени после завершения анти-ЦМВ профилактики имели значительно более низкий уровень позднего проявления заболевания через 12 месяцев после трансплантации, по сравнению с пациентами с нереактивным результатом QF-CMV и неопределенным результатом (6,4 % против 22,2 % и против 58,3 %, соответственно, $p < 0,001$). При классификации неопределенных результатов как являющихся также нереактивными распространение последующей ЦМВИ составило 6,4 % против 26,8 %, $p = 0,024$ (см. рисунок 8). Положительные и отрицательные прогностические значения QF-CMV для защиты от заболевания ЦМВ составляли 0,90 (95 % ДИ 0,74—0,98) и 0,27 (95 % ДИ 0,18—0,37), соответственно, что указывает на соответствие реактивного результата QuantiFERON-CMV в любое время после профилактики и 90 % вероятности отсутствия развития заболевания ЦМВ. Данное исследование показало, что метод QF-CMV может быть полезен для прогнозирования, если пациенты находятся в группе низкого, среднего или высокого риска последующего развития ЦМВИ после профилактики.

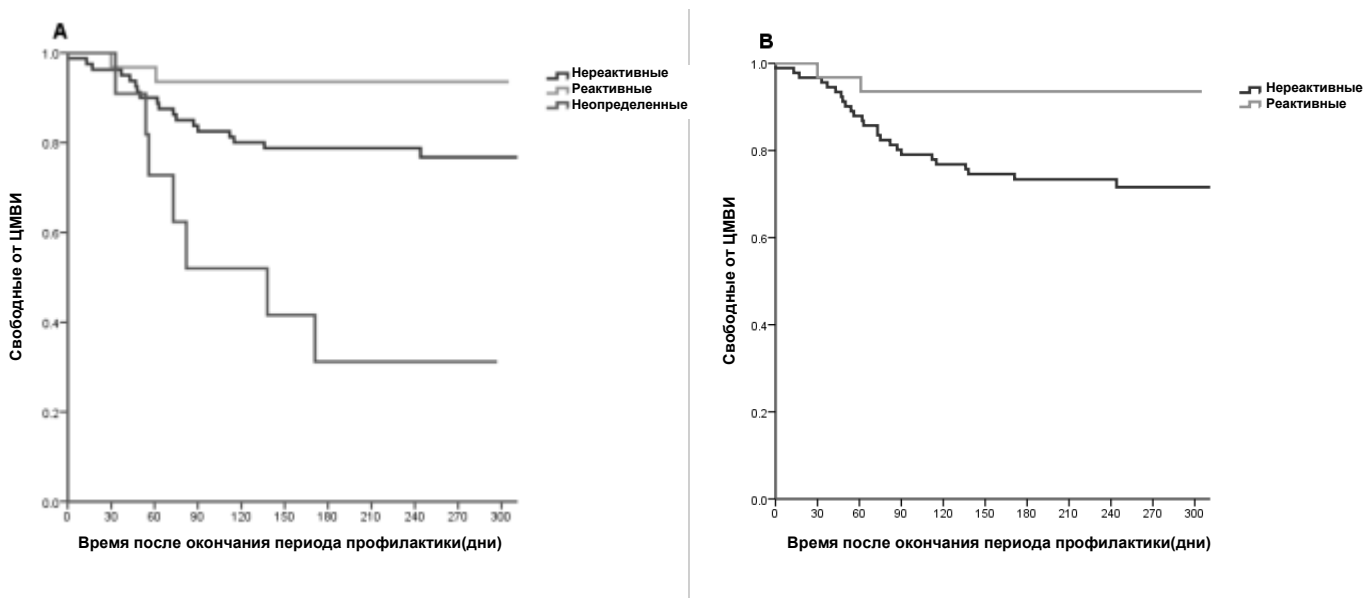


Рисунок 8. Кривые Каплана-Мейера заболеваемости ЦМВИ в соответствии с результатом QF-CMV анализа.

А Соотношение реактивных, нереактивных и неопределенных результатов QF-CMV (логарифмический ранговый критерий, $p < 0,001$).

Б Соотношение реактивных и нереактивных результатов, где неопределенные результаты отнесены к нереактивным (логарифмический ранговый критерий, $p = 0,024$).

При проведении проспективного исследования среди 55 реципиентов после трансплантации солидных органов (16), в котором было проанализировано соотношение между предтрансплантационным результатом QF-CMV и эпизодами репликации ЦМВ после трансплантации, было установлено, что у реципиентов R(+) с предтрансплантационным нереактивным результатом QF-CMV, наблюдается более высокий уровень репликации ЦМВ после трансплантации (7 из 14 или 50 %) по сравнению с реципиентами R(+) с реактивным результатом QF-CMV (4 из 30 или 13,3 %).

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

В настоящее время по всему миру завершены либо продолжаются другие исследования по обнаружению CD8⁺ ЦМВ-специфических Т-клеток методом QF-CMV в когорте реципиентов после трансплантации (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13).

Публикация «International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation»

Важность ЦМВ-специфического иммунологического мониторинга была признана и опубликована в публикации «International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation» (6). Эти международные основополагающие принципы, разработанные группой экспертов по ЦМВ и трансплантации солидных органов, созданной Отделением инфекционных заболеваний Общества трансплантации, представляют доказательства и основополагающие принципы на основе мнения экспертов в виде консенсуса в лечении ЦМВ, включая диагностику, иммунологию, профилактику и лечение.

В данных основополагающих принципах указано, что «С помощью иммунологического мониторинга ЦМВ-специфических Т-клеток можно предсказать риск развития ЦМВ-инфекции у пациентов после трансплантации. Он может быть полезным в качестве ориентиров при профилактике и превентивной терапии» (6).

Кроме того, основополагающие принципы также предоставляют рекомендации в отношении атрибутов идеального иммунологического мониторинга, среди которых:

- возможность оценивать количество и функцию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток реципиента после трансплантации;
- возможность определять IFN- γ
- простота выполнения, экономическая целесообразность и воспроизводимость;
- малая продолжительность цикла обработки;
- простота доставки образцов в специализированные лаборатории.

QF-CMV отвечает практически всем критериям, указанным в данных основополагающих принципах, и воплощает единственный стандартизированный иммунологический мониторинг, способный обнаруживать IFN- γ , специфичный к ЦМВ.

Аналитические характеристики

Измерение концентрации IFN- γ по методу ELISA QF-CMV показало линейность от нуля до 10 МЕ/мл (рисунок 9). Исследование линейности выполнялось путем случайного размещения на планшете ELISA пяти параллельных проб 11 пулов плазмы известных концентраций IFN- γ .

Метод ELISA QF-CMV не показал хук-эффекта для высоких концентраций (прозоны) при концентрации IFN- γ до 100 000 МЕ/мл.

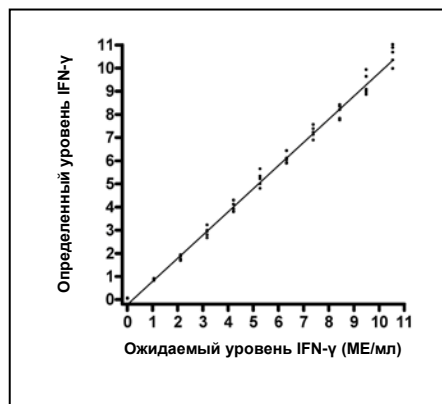


Рисунок 9. Профиль линейности метода ELISA QF-CMV, определенный при тестировании пяти параллельных проб 11 пулов плазмы известных концентраций IFN- γ . Линия по модели линейной регрессии имеет наклон $1,002 \pm 0,011$ и коэффициент корреляции 0,99.

Погрешность результатов метода ELISA QF-CMV внутри серии опытов и между сериями опытов (%CV) определялась путем тестирования 20 образцов плазмы с различными концентрациями IFN- γ по три повтора в трех лабораториях в течение трех непоследовательных дней тремя разными операторами. Таким образом, каждый образец подвергался тестированию 27 раз в 9 независимых сериях испытаний. Одним образцом выступал как «ноль-контроль» с рассчитанной концентрацией IFN- γ равной 0,08 (95 % CI 0,07—0,09) МЕ/мл. В остальных 19 образцах плазмы концентрация лежала в диапазоне от 0,33 (0,31—0,34) до 7,7 МЕ/мл (7,48—7,92).

Погрешность результатов внутри серии оценивалась путем усреднения значений %CV для каждой тестируемой плазмы, содержащей IFN- γ , из прогона каждого планшета ($n = 9$) и колебалась от 4,1 до 9,1 %CV. Среднее внутри серии %CV (± 95 % ДИ) составило 6,6 % \pm 0,6 %. Нулевая IFN- γ плазма в среднем 14,1 %CV.

Общая погрешность или погрешность между сериями анализов определялась путем сравнения 27 рассчитанных концентрации IFN- γ для каждого образца плазмы и колебалась от 6,6 до 12,3 %CV. Общее среднее %CV (± 95 % ДИ) составило 8,7 % \pm 0,7 %. Нулевая IFN- γ плазма в среднем 26,1 %CV. Такой уровень вариации является ожидаемым, поскольку расчетная концентрация IFN- γ является низкой, и вариации при низкой оценке концентрации будут большими, чем при более высоких концентрациях.

Профиль точности метода ELISA QF-CMV изображен на рисунке 10. Он показывает, что с увеличением концентрации IFN- γ погрешность не увеличивается.

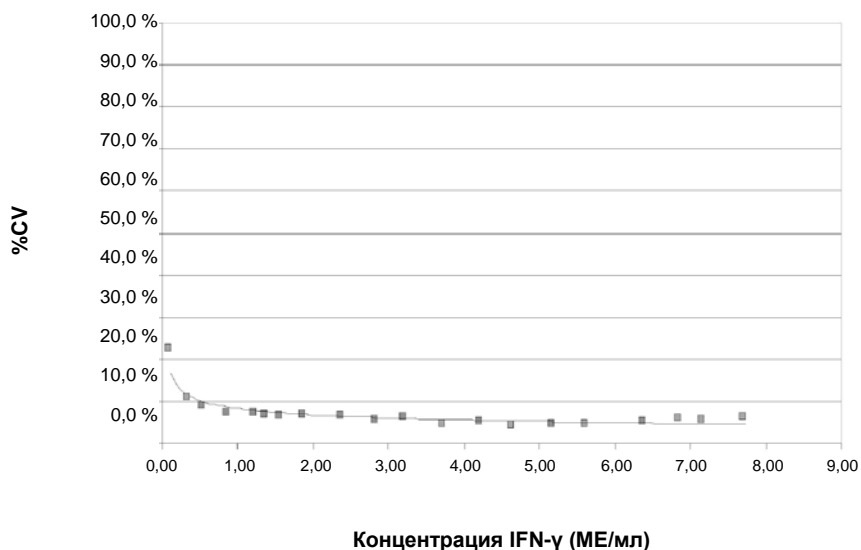


Рисунок 10. Профиль точности метода ELISA QF-CMV определяли по результатам тестирования 20 образцов плазмы в трех повторностях в течение трех непоследовательных дней в трех лабораториях тремя разными операторами. Линия тренда рассчитана по методу наименьших квадратов.

Для определения воспроизводимости теста QF-CMV проводилось исследование с использованием образцов крови 8 пациентов с неизвестным статусом ЦМВ. Кровь каждого субъекта собирали в три набора пробирок QF-CMV (3 x «ноль-контроль», 3 x «антиген ЦМВ» и 3 x «митоген»). Затем три набора пробирок инкубировали в трех различных лабораториях (по одному набору «ноль-контроль», «антиген ЦМВ» и «митоген» на лабораторию), как указано в инструкции-вкладыше. Через 16—24 часов инкубации пробирки центрифугировали и собирали плазму.

Затем по три раза в каждой из трех лабораторий был выполнен анализ ELISA, после чего было получено по три результата QF-CMV для каждого субъекта на лабораторию (всего девять результатов на все лаборатории). В каждой лаборатории каждый раз работал разный оператор. Планшеты для исследования не обязательно были из одной и той же партии, но срок годности у них у всех еще не истек.

Для каждого образца крови определяли воспроизводимость с точки зрения как результата диагностики (реактивность, нереактивность или неопределенность), так и числовых величин. Воспроизводимость числовых величин оценивали только в реактивных образцах (выражена в %CV), так как уровни IFN- γ в нереактивных образцах были слишком малы для проведения сколь-либо значимой оценки точности.

В целом, диагностическая воспроизводимость составила 100 %, результат диагностики QF-CMV у всех восьми добровольцев был воспроизведен во всех лабораториях, во всех случаях, о неопределенных образцах не сообщалось. Воспроизводимость реактивных образцов было приемлемым как внутри лаборатории, так и между лабораториями. Среднее значение %CV для каждой из испытательных лабораторий составляло 4,5 % (лаборатория 1), 5,9 % (лаборатория 2) и 7,3 % (лаборатория 3). В целом, значение %CV между лабораториями составило 5,9 % для всех пяти реактивных образцов. Процентные значения коэффициента вариации ниже 10 % считаются превосходными.

Техническая информация

Неопределенные результаты

Неопределенные результаты могут быть связаны с иммунным статусом проходящего исследование субъекта, но также они могут быть связаны с рядом технических факторов:

- отобранную кровь инкубировали при температуре 37 °C спустя более чем 16 часов после взятия;
- хранение крови производилось вне рекомендуемого диапазона температуры (от 17 °C до 27 °C);
- пробирки для сбора крови перемешивались недостаточно тщательно.

Если при заборе или обработке образцов крови есть подозрения на технические проблемы, повторите весь тест QF-CMV с новыми образцами крови. Если есть какие-либо подозрения на процедурные отклонения в тесте ELISA, можно выполнить повторный тест ELISA с использованием стимулированной антигеном плазмы. Если не было ошибок при выполнении теста ELISA, неопределенные результаты (из-за низких значений для пробирки «митоген») при повторе теста не изменятся.

Руководство по устранению неполадок

Данное руководство по устранению неполадок может быть полезным в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Дополнительную информацию также см. в Технической информации, расположенной по адресу: www.QuantiFERON.com. Контактную информацию см. на стр. 29 и на задней обложке.

Поиск и устранение неполадок при выполнении метода ELISA

Низкие показатели оптической плотности для стандартов

Возможная причина	Решение
а) Ошибка разбавления стандарта	Убедитесь, что растворы стандарта набора готовятся правильно в соответствии с инструкцией-вкладышем.
б) Ошибка дозирования	Убедитесь, что пипетки откалиброваны и используются в соответствии с инструкциями производителя.
в) Слишком низкая температура инкубации	Инкубация при проведении ELISA должна производиться при комнатной температуре (от 17 °C до 27 °C).
г) слишком малое время инкубации	Инкубация планшета с конъюгатом, стандартами и образцами должна продолжаться 120 ± 5 минут. Enzyme Substrate Solution (раствор ферментного субстрата) инкубируют на планшете в течение 30 минут.
д) Использование несоответствующего фильтра планшетного ридера	Считывание с планшета необходимо производить при 450 нм с эталонным фильтром между 620 и 650 нм.
е) Реагенты слишком холодные	Перед проведением анализа все реагенты за исключением Conjugate 100X Concentrate (100-кратного концентрата конъюгата) необходимо довести до комнатной температуры. Это занимает около 1 часа.
ж) Срок годности набора/компонентов истек	Используйте набор до истечения срока годности. Восстановленные стандарт и Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата) используйте в течение трех месяцев с даты восстановления.

Неспецифическое развитие окраски/высокий фон

Возможная причина	Решение
а) Незавершенная процедура промывки планшета	Промывайте планшеты по крайней мере шесть раз с использованием промывочного буфера из расчета 400 мкл/лунку. В зависимости от используемого промывателя может потребоваться применение более шести циклов промывки. Между циклами рекомендуется выдерживать хотя бы пятисекундный период выжидания.
б) Слишком высокая температура инкубации	Инкубация при проведении ELISA должна производиться при комнатной температуре (от 17 °C до 27 °C).
в) Срок годности набора/компонентов истек	Используйте набор до истечения срока годности. Восстановленные стандарт и Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата) используйте в течение трех месяцев с даты восстановления.
г) Загрязнен Enzyme Substrate Solution (раствор ферментного субстрата).	Утилизируйте субстрат при окрашивании в синий цвет. Используйте чистые емкости для реагента.
д) Смешивание плазмы в центрифужных пробирках до сбора	Убедитесь, что образцы плазмы аккуратно собраны сверху геля без пипетирования. Старайтесь не взболтать материал на поверхности геля.

Перечень литературы

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-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).

Техническое обслуживание

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

Краткое описание процедуры анализа

Этап 1. Инкубация крови

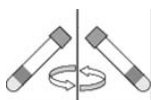
1. Соберите кровь пациента в пробирки для сбора крови и встряхните их десять (10) раз так, чтобы вся их внутренняя поверхность покрылась кровью для растворения антигенов на их стенках.



2. Инкубируйте пробирки в вертикальном положении при температуре 37 ± 1 °C в течение 16—24 часов.



3. После инкубации центрифугируйте пробирки в течение 15 минут при 2000—3000 RCF (g) для отделения плазмы от эритроцитов.



4. После центрифугирования перед сбором плазмы всеми способами избегайте ее пипетирования или перемешивания. Всегда будьте осторожны, чтобы не взболтать материал на поверхности геля.

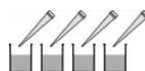


3. Восстановите лиофилизированный Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата) в деионизированной или дистиллированной воде.

4. Подготовьте рабочий конъюгат в Green Diluent (зеленом разбавителе) и добавьте по 50 мкл во все лунки.



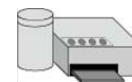
5. В соответствующие лунки добавьте по 50 мкл тестируемых образцов плазмы и по 50 мкл стандартов. Перемешайте на шейкере.



6. Инкубируйте в течение 120 минут при комнатной температуре.



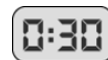
7. Промойте лунки по крайней мере шесть раз с использованием промывочного буфера из расчета 400 мкл/лунку.



8. Добавьте в лунки 100 мкл Enzyme Substrate Solution (раствора ферментного субстрата). Перемешайте на шейкере.



9. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре.



10. Добавьте в лунки 50 мкл Enzyme Stopping Solution (останавливающего ферментативную реакцию раствора). Перемешайте на шейкере.



11. Считывание проводите при 450 нм с эталонным фильтром между 620 и 650 нм

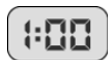


12. Проанализируйте результаты.



Этап 2. ELISAIFN-γ ELISA

1. В течение по меньшей мере 60 минут дайте всем компонентам ELISA, за исключением Conjugate 100X Concentrate (100-кратного концентрата конъюгата) нагреться до комнатной температуры.



2. Восстановите стандарт набора в деионизированной или дистиллированной воде до концентрации 8,0 МЕ/мл. Подготовьте четыре (4) разведения стандартов.



Товарные знаки: QIAGEN®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

Ограниченное лицензионное соглашение для набора ELISA QuantiFERON-CMV

Использование настоящего продукта означает согласие всех покупателей или пользователей продукта со следующими условиями.

1. Продукт может использоваться исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к продукту, и настоящим руководством и исключительно с компонентами, содержащимися в наборе. Компания QIAGEN не предоставляет лицензии в рамках своей интеллектуальной собственности использовать или объединять прилагаемые компоненты настоящего набора с любыми компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, поставляемых вместе с продуктом, данным руководством и дополнительных протоколах, доступных по адресу www.qiagen.com. Некоторые из таких дополнительных протоколов были предоставлены пользователями продукции компании QIAGEN для пользователей продукции компании QIAGEN. Такие протоколы не были всесторонне проверены или оптимизированы компанией QIAGEN. Компания QIAGEN не гарантирует их правильности и не подтверждает, что они не нарушают права третьих лиц.
2. Кроме оговоренных лицензий компания QIAGEN не предоставляет каких-либо гарантий, что данный набор и (или) его использование(я) не нарушает(ют) права третьих лиц.
3. Данный набор и его компоненты лицензированы для однократного использования и не могут быть использованы повторно, переделаны или перепроданы.
4. Компания QIAGEN отказывается от любых прочих лицензий, выраженных явно или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено прямо.
5. Покупатель и пользователь данного набора соглашается не предпринимать или не разрешать кому-либо предпринимать какие-либо меры, которые могут привести или способствовать любым действиям, запрещенным выше. Компания QIAGEN может требовать исполнения требований настоящего Ограниченного лицензионного соглашения в судебном порядке в любом суде и получать возмещения всех своих следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, за любые действия, направленные на исполнение требований настоящего Ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с набором и (или) его компонентами.

Актуальные условия лицензии см. на сайте по адресу www.qiagen.com.

© Cellestis, a QIAGEN Company, 2012. Все права защищены.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

