
QuantiFERON[®]-CMV

Príbalový leták 2 x 96

Reakcie testovacieho merania interferónu-gama celej krvi na peptidové antigény ľudského cytomegalovírusu

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, spoločnosť skupiny QIAGEN

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Austrália

Tel.: (Austrália) +613 9840 9800, (Európa) +49 2103 29 12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NEMECKO

1075110SK Ver. 01



Obsah

Účel použitia	4
Úvod	4
Princípy analýzy	5
Čas potrebný na vykonanie analýzy	5
Činidlá a skladovanie	6
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú	7
Skladovanie a manipulácia	7
Varovania a preventívne opatrenia	8
Odber vzoriek a manipulácia s nimi	9
Pokyny na použitie	10
Fáza 1 – inkubácia krvi a odber plazmy	10
Fáza 2 – QuantiFERON-CMV ELISA pre ľudskú IFN- γ	10
Výpočty a interpretácia testu	13
Interpretácia výsledkov	14
Obmedzenia	14
Predpokladané hodnoty	15
Charakteristiky účinnosti	16
Komparatívne testovanie	16
Prahová hodnota analýzy	17
Klinické štúdie	17
Špecificita	17
Citlivosť	18
Štúdie zamerané na klinické využitie	18
Medzinárodná dohoda o pokynoch riadenia cytomegalovírusu v rámci transplantácií tuhých orgánov	21
Charakteristiky účinnosti analýzy	21
Technické informácie	23
Neurčité výsledky	23
Sprievodca riešením problémov	24

Použitá literatúra	25
Technický servis	26
Skrátený postup testovania	29
Fáza 1 – inkubácia krvi	29
Fáza 2 – IFN- γ ELISA	29

Účel použitia

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) je in-vitro analýza, v ktorej sa používa zmes peptidov simulujúcich proteíny ľudského cytomegalovírusu (CMV) na stimuláciu buniek v heparinizovanej celej krvi. Detekcia interferónu-gama (IFN- γ) pomocou enzymatickej imunisorbenčnej analýzy (ELISA) sa používa na kvantifikáciu in-vitro reakcií na tie peptidové antigény, ktoré súvisia s imunitnou reguláciou infekcie CMV. Strata tejto imunitnej funkcie môže súvisieť s rozvojom ochorenia CMV. Účelom použitia QF-CMV je monitorovanie úrovne anti-CMV imunity pacienta.

QF-CMV nepredstavuje test na stanovenie infekcie CMV a nesmie sa používať na účely vylúčenia prítomnosti infekcie CMV.

Úvod

CMV je herpesový vírus, ktorý infikuje 50 – 85 % dospelých ľudí v celej populácii. Ide o často sa vyskytujúcu komplikáciu imunosupresie (najmä po transplantácii), ktorá môže významným spôsobom prispievať k chorobnosti a úmrtnosti príjemcov transplantátov. V súčasnosti používané imunosupresívne terapie, ktoré sa používajú na zabránenie odmietnutia transplantovaných orgánov, majú škodlivé účinky na T-lymfocyty a imunitné reakcie sprostredkované bunkami (CMI), výsledkom čoho je zvýšená náchylnosť na vírusové infekcie po transplantácii. Dôležitosť funkcie T-buniek v oblasti potlačenia replikácie (opakovania) CMV podčiarkuje aj skutočnosť, že cytotoxické T-lymfocyty (CTL) špecifické pre CD8⁺ dokážu zabezpečiť ochranu pred patogenézami súvisiacimi s vírusom. Zoznam CTL špecifických pre CMV CD8⁺ u pacientov s imunosupresívnou terapiou a produkcia IFN- γ môžu slúžiť ako nástroj na stanovenie predpokladu rozvoja ochorenia CMV. Produkcia IFN- γ môže byť funkčnou náhradou za identifikáciu CTL špecifického pre CMV.

QF-CMV predstavuje analýzu týkajúcu sa reakcií CMI na peptidové antigény, ktoré simulujú proteíny CMV. Peptidy CMV sa zameriavajú na T-bunky CD8⁺ vrátane haplotypov HLA A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 a Cw6 (A30, B13) triedy I, ktoré sa vzťahujú na > 98 % ľudskej populácie. Jednotlivci infikovaní CMV zvyčajne majú lymfocyty CD8⁺ v krvi, ktoré rozpoznávajú tieto antigény. Proces rozpoznávania zahŕňa generovanie a vylučovanie cytokínu, IFN- γ . Základ tohto testu tvorí detekcia a následná kvantifikácia IFN- γ .

Princípy analýzy

Test QF-CMV sa vykonáva v 2 etapách (fázach). Najskôr sa odoberie celá krv do každej zo skúmaviek QF-CMV na odber krvi (ide o skúmavku s nulovou kontrolou, skúmavku s antigénom CMV a mitogénovú skúmavku).

Mitogénová skúmavka sa v rámci testu QF-CMV používa ako pozitívna kontrola. To môže byť užitočné najmä v prípadoch, kedy nastanú pochybnosti týkajúce sa stavu imunitného systému jednotlivca.

Skúmavky je potrebné inkubovať pri teplote 37 °C čo najskôr (najneskôr však do 16 hodín od odberu). Po uplynutí 16 až 24-hodinovej inkubácie sa skúmavky odstredia, plazma sa odstráni a pomocou analýzy QF-CMV ELISA sa odmeria množstvo IFN- γ (IU/ml).

Množstvo IFN- γ v plazmových vzorkách z CMV antigénových a mitogénových skúmaviek môže často presahovať horné limitné hodnoty väčšiny čítačiek ELISA, a to aj v prípade, ak jednotlivci podstupujú stredne intenzívnu imunosupresívnu terapiu. Pokiaľ ide o **kvalitatívne** výsledky, použite hodnoty vypočítané pre čistú plazmu. V prípade **kvantitatívnych** výsledkov, kedy sa vyžadujú skutočné hodnoty v IU/ml, je potrebné zriediť plazmové vzorky (1/10) v zelenom riedidle a analyzovať ich v rámci analýzy ELISA spolu s čistou plazmou.

Poznámka: V prípade vzoriek spadajúcich do analytického rozsahu analýzy QF-CMV ELISA (t. j. max. 10 IU/ml) je potrebné použiť výsledok získaný zo vzorky čistej plazmy. Pri takýchto koncentráciách IFN- γ môžu byť hodnoty získané použitím riedenia plazmových vzoriek (1/10) nepresné.

Test sa považuje za reaktívny vzhľadom na reakciu IFN- γ vtedy, keď sú výsledky z CMV antigénovej skúmavky výrazne vyššie než je hodnota IU/ml nulovej kontroly IFN- γ . Mitogénom stimulovaná vzorka plazmy slúži ako pozitívna kontrola IFN- γ pre každú testovanú vzorku. Nedostatočná reakcia na mitogén indikuje neurčitý výsledok v prípade, ak krvná vzorka taktiež vykazuje nereaktívnu reakciu na antigény CMV. K takémuto správaniu môže dochádzať v prípade nedostatočného počtu lymfocytov, zníženej aktivity lymfocytov v dôsledku nesprávnej manipulácie so vzorkami, nesprávneho plnenia/miešania mitogénovej skúmavky alebo neschopnosti lymfocytov pacienta generovať IFN- γ (napríklad pacienti s čerstvou transplantáciou). Nulová vzorka v krvných vzorkách sa upravuje vzhľadom na pozadie alebo nešpecifické IFN- γ . Úroveň IFN- γ nulovej skúmavky sa odpočíta od úrovne IFN- γ pre CMV antigénovú a mitogénovú skúmavku (prečítajte si časť „Interpretácia výsledkov“ na strane 14 tohto príbalového letáka, v ktorej nájdete informácie o spôsobe interpretácie výsledkov QF-CMV).

Čas potrebný na vykonanie analýzy

Odhad času potrebného na vykonanie analýzy QF-CMV je uvedený nižšie – súčasťou týchto informácií je aj čas potrebný na testovanie viacerých vzoriek v dávke:

Inkubácia krvných skúmaviek pri teplote 37 °C:	16 až 24 hodín
ELISA:	Približne 3 hodiny/1 platňa ELISA
	Menej než 1 hodina práce
	Pre každú ďalšiu platňu pridajte 10 až 15 minút

Činidlá a skladovanie

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (CMV a kontrolné antigénové skúmavky na odber krvi (balenie pre jedného pacienta))

Katalógové číslo 0192-0301

Počet príprav 1

QuantiFERON Nil Control
(Nulová kontrola QuantiFERON) (sivé viečko) 1 skúmavka

CMV Antigen (Antigén CMV) (modré viečko) 1 skúmavka

QuantiFERON Mitogen Control
(Mitogénová kontrola QuantiFERON) (purpurové viečko) 1 skúmavka

Príbalový leták 1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (Analytické súčasti QuantiFERON-CMV ELISA)

Katalógové číslo 0350-0201

Prúžky mikrotitračnej doštičky 24 prúžkov x 8 kalíškov

Human IFN- γ Standard (Štandardná ľudská IFN- γ), lyofilizovaná 1 liekovka

Green Diluent (Zelené riedidlo) 1 x 30 ml

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

QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate
(Premývací roztok QuantiFERON, koncentrácia 20x) 1 x 100 ml

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(Enzymatický substrátový roztok QuantiFERON) 1 x 30 ml

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(Enzymatický tlmiaci roztok QuantiFERON) 1 x 15 ml

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

- Inkubátor 37 °C, CO₂ sa nevyžaduje
- Kalibrované pipety s variabilným objemom na aplikáciu 10 µl až 1 000 µl s jednorazovými špičkami
- Kalibrované multikanálové pipety s možnosťou aplikácie objemu 50 µl a 100 µl s jednorazovými špičkami
- Trepáčka na mikrotitračné doštičky
- Deionizovaná alebo destilovaná voda, 2 litre
- Umývačka mikrotitračných doštičiek (odporúčame používať automatickú umývačku)
- Čítačka mikrotitračných doštičiek s filtrom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 nm až 650 nm

Skladovanie a manipulácia

Skúmavky na odber krvi

- Skúmavky na odber krvi skladujte pri teplote 4 °C až 25 °C.
- Skladovacia lehota skúmaviek na odber krvi QuantiFERON-CMV je maximálne 15 mesiacov od dátumu výroby v prípade ich skladovania pri teplote od 4 °C do 25 °C.

Činidlá súpravy ELISA

- Skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C.
- Enzymatický substrátový roztok vždy chráňte pred priamym slnečným svetlom.

Zriedené a nepoužívané činidlá

Pokyny na riedenie činidiel nájdete v časti „Návod na používanie – fáza 2“ (kroky 3 a 5 na stranách 10 a 11).

- Zriedenú štandardnú súpravu je možné uchovávať po dobu 3 mesiacov pri teplote 2 °C až 8 °C.

Zaznamenajte si dátum zriedenia štandardnej súpravy.

- Po zriedení sa nepoužitý konjugát QuantiFERON, koncentrácia 100×, musí uchovávať pri teplote 2 °C až 8 °C a spotrebovať do 3 mesiacov.

Zaznamenajte si dátum zriedenia konjugátu.

- Konjugát s požadovanou koncentráciou je potrebné spotrebovať do 6 hodín od prípravy.
- Premývací roztok s požadovanou koncentráciou môžete uchovávať pri izbovej teplote (17 °C až 27 °C) po dobu max. 2 týždne.

Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické účely in vitro.

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (SDS). Tieto materiály sú k dispozícii online v praktickom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť SDS pre každú súpravu QIAGEN a jej komponenty.



UPOZORNENIE: S ľudskou krvou manipulujte ako s potenciálne infekčným materiálom. Dodržiavajte príslušné pokyny na manipuláciu s krvou.

Na komponenty súpravy QF-CMV ELISA sa vzťahujú nasledovné rizikové a bezpečnostné vety.

Enzymatický tlmiaci roztok QuantiFERON



Obsahuje kyselinu sírovú: Dráždivý. Rizikové a bezpečnostné vety:* R36/38, S26 – 36/37/39

- **Zelené riedidlo** obsahuje normálne myšacie sérum a kazeín, ktoré môžu spúšťať alergické reakcie – vyhnite sa kontaktu tohto riedidla s pokožkou.

Núdzový stav týkajúci sa

rozliatia, úniku, expozície alebo nehody

Zatelefonujte do spoločnosti CHEMTREC (nonstop)

V USA a Kanade: 1 800 424 9300

Mimo USA a Kanady: +1 703 527 3887 (k dispozícii je možnosť volania na účet volaného)

Ďalšie informácie

Karty bezpečnostných údajov: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Dráždi oči a pokožku, S26: V prípade kontaktu s očami je potrebné ihneď ich vymyť s veľkým množstvom vody a vyhľadať lekársku pomoc, S36/37/39: Noste vhodný ochranný odev, noste vhodné rukavice, použite ochranu/tváre.

Odber vzoriek a manipulácia s nimi

Dôležité informácie pred začatím činnosti:

Odchýlky od údajov uvádzaných v príbalovom letáku k produktu QF-CMV môžu viesť k chybným výsledkom. Pred začatím si dôkladne prečítajte príslušné pokyny.

- Súpravu nepoužívajte, ak niektorá z fliaš s činidlami pred použitím vykazuje znaky poškodenia alebo únikov.
- Nemiešajte ani nepoužívajte činidlá ELISA z iných dávok súpravy QF-CMV ELISA.
- Nepoužitú činidlá a biologické vzorky zlikvidujte v súlade s miestnymi, štátnymi a federálnymi nariadeniami.
- Nepoužívajte skúmavky na odber krvi QF-CMV ani súpravy QF-CMV ELISA po uplynutí dátumu expirácie.

V rámci produktu QF-CMV sa používajú nasledovné skúmavky na odber krvi:

1. Nulová kontrola (sivé viečko)
2. CMV antigén (modré viečko)
3. Mitogénová kontrola (purpurové viečko)

Antigény sú na vnútornej stene skúmaviek na odber vzoriek, a preto je dôležité, aby ste obsah skúmaviek riadne premiešali s krvou. Skúmavky je potrebné čo najskôr preniesť do inkubátora s teplotou 37 °C (najneskôr však do 16 hodín od odberu).

Na dosiahnutie optimálnych výsledkov je potrebné postupovať podľa nasledovných postupov:

1. **Každému pacientovi odoberte 1 ml krvi formou venepunkcie priamo do skúmaviek na odber krvi QF-CMV.**
 - Keďže do skúmaviek s objemom 1 ml sa krv odoberá relatívne pomaly, ponechajte skúmavku pripojenú k ihle približne 2 – 3 sekundy po dokončení odberu (plná skúmavka) na zabezpečenie odobratia požadovaného objemu.
Čierna značka na bočnej strane skúmaviek označuje objem plnenia 1 ml. Skúmavky na odber krvi QF-CMV sú schválené na odber objemov v rozsahu 0,8 až 1,2 ml. Ak sa hladina krvi v ľubovoľnej skúmavke nepriblíži k indikačnej čiare, odporúčame odobrať ďalšiu vzorku krvi.
 - Skúmavky na odber krvi QF-CMV sú schválené na odbery s objemom 0,8 ml až 1,2 ml v nadmorských výškach do 810 m (2 650 stôp). V prípade prekročenia uvedenej nadmorskej výšky je potrebné dbať na to, aby odber krvi do každej skúmavky dosiahol požadovaný objem. Ak dochádza k odberu nedostatočného objemu krvi, krv môžete odobrať pomocou striekačky a do každej z 3 skúmaviek preniesť 1 ml krvi. Z bezpečnostných dôvodov sa tento postup najlepšie vykonáva tak, že odpojíte ihlu striekačky (s prihliadnutím na príslušné bezpečnostné pokyny), odpojíte viečka z troch skúmaviek QF-CMV a pridáte do každej z nich 1 ml krvi (až po čiernu značku na bočnej strane štítka skúmavky). Riadne uzavrite skúmavky viečkami a podľa pokynov uvádzaných nižšie premiešajte ich obsah.
 - Ak sa na odber krvi používa ihla s krídelkami, je potrebné použiť „odvzdušňovaciu“ skúmavku na zabezpečenie naplnenia hadičky krvou pred tým, než použijete skúmavky na odber krvi QF-CMV.

2. **Ihneď po naplnení skúmaviek riadne pretrepte ich obsah desať (10) krát, čo postačuje na to, aby sa celý vnútorný povrch skúmavky pokryl krvou a aby sa rozpustili antigény na stenách skúmavky.**
 - V čase plnenia by mala byť teplota skúmaviek v rozsahu 17 °C – 25 °C.
 - Nadmerné trepanie môže viesť k rozkladu gélu a k abnormálnym výsledkom.
3. **Skúmavky správnym spôsobom označte.**
4. **Skúmavky je potrebné čo najskôr preniesť do inkubátora s teplotou 37 °C ±1 °C (najneskôr však do 16 hodín od odberu). Krvné vzorky nechladte ani nezmrazujte.**

Pokyny na použitie

Fáza 1 – inkubácia krvi a odber plazmy

1. **Ak krv neinkubujete ihneď po odbere, miešanie obsahu skúmaviek je potrebné opakovať bezprostredne pred inkubáciou podľa pokynov v kroku 2 v predchádzajúcej časti.**
2. **Skúmavky inkubujte vo VZPRIAMENEJ polohe pri teplote 37 °C po dobu 16 – 24 hodín. Inkubátor nevyžaduje použitie CO₂ ani zvlhčovanie.**
3. **Po inkubácii je možné uchovávať skúmavky na odber krvi pri teplote od 2 °C do 27 °C po dobu max. 3 dní pred tým, než budete pokračovať ďalším krokom. Po dokončení inkubácie skúmaviek pri teplote 37 °C odstreďujte skúmavky 15 minút s otáčkami 2 000 až 3 000 RCF (g). Gélová zátka oddelí bunky od plazmy. Ak k tomu nedôjde, skúmavky je potrebné znova odstrediť pri vyšších otáčkach.**
 - Plazmu je možné odobrať bez odstreďovania, ale na odstránenie plazmy bez poškodenia buniek sa vyžaduje väčšia pozornosť.
4. **Po dokončení odstreďovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.**
 - Plazmové vzorky je potrebné odberať iba pomocou pipety.
 - Plazmové vzorky je možné vložiť priamo z odstredených skúmaviek na odber krvi do platne QF-CMV ELISA aj vtedy, keď sa používajú automatizované pracovné stanice ELISA.
 - Plazmové vzorky je možné uchovávať po dobu 28 dní pri teplote 2 °C až 8 °C. Po odbere je možné ich dlhodobo uchovávať pri teplote nižšej než -20 °C (odporúčame použiť teplotu nižšiu než -70 °C) v skúmavkách alebo nádobách na uchovávanie plazmy.

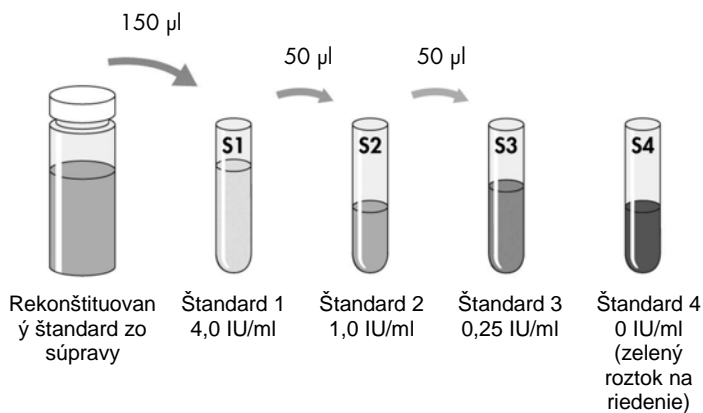
Fáza 2 – QuantiFERON-CMV ELISA pre ľudskú IFN- γ

1. **Je potrebné, aby všetky plazmové vzorky a činidlá (okrem konjugátu s koncentráciou 100 \times) pred použitím nadobudli izbovú teplotu (17 °C až 27 °C). Ekvilibrácia by mala trvať najmenej 60 minút.**
2. **Odstráňte z rámu prúžky, ktoré sa nevyžadujú, uzavrite fóliové vrečko a vráťte ho do chladničky. Použite najmenej jeden prúžok pre štandardy QF-CMV ELISA a dostatočný počet prúžkov vzhľadom na počet testovaných pacientov. Po dokončení si ponechajte rám a viečko na použitie s ďalšími prúžkami.**
3. **Zriedte mrazom vysušený štandard súpravy s deionizovanou alebo destilovanou vodou s objemom vyznačeným na štítku liekovky so štandardom. Jemne obsah premiešajte, aby sa nezačala tvoriť pena a zabezpečte úplný rozklad. Zriedenie štandardu na uvedený objem vedie k získaniu roztoku s koncentráciou 8,0 IU/ml.**

4. Krivka štandardu sa pripraví použitím 3 riedení štandardu súpravy a samotného zeleného riedidla ako štandard 4 (0 IU/ml).

Pomocou zriedeného štandardu pripravte sériu riedenia s 3 koncentraciami IFN- γ . Vykonajte riedenie v zelenom riedidle súpravy (GD) (pozrite obrázok 1). Štandardy je potrebné analyzovať najmenej duplicitne – pomocou nasledovných krokov získate dostatočný požadovaný objem na túto činnosť.

- Označte 4 skúmavky ako „S1“, „S2“, „S3“ a „S4“.
- Pridajte 150 μ l zeleného riedidla do 4 skúmaviek (S1 – S4).
- Pridajte 150 μ l štandardu súpravy do skúmavky S1 a jej obsah riadne premiešajte.
- Preneste 50 μ l zo skúmavky S1 do skúmavky S2 a obsah riadne premiešajte.
- Preneste 50 μ l zo skúmavky S2 do skúmavky S3 a obsah riadne premiešajte.
- Samotné zelené riedidlo slúži ako nulový štandard (S4).



Obrázok 1. Príprava krivky štandardu. Pripravte si čerstvé zriedené produkty štandardu súpravy na každú reláciu ELISA.

- Zried'te mrazom vysušený konjugát QuantiFERON s koncentráciou 100 \times s 0,3 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Jemne obsah premiešajte, aby sa nezačala tvoriť pena a zabezpečte úplný rozklad konjugátu.**
- Konjugát s požadovanou koncentráciou sa pripravuje zriedením požadovaného objemu konjugátu s koncentráciou 100 \times v zelenom riedidle (postupujte podľa tabuľky 1 – príprava konjugátu).**
 - Produkt riadne a súčasne opatrne premiešajte, aby sa nezačala tvoriť pena.
 - Nepoužitý konjugát s koncentráciou 100 \times ihneď po použití vráťte do skladovacieho priestoru s teplotou 2 $^{\circ}$ C až 8 $^{\circ}$ C.
 - Používajte iba zelené riedidlo.

Tabuľka 1. Príprava konjugátu

Počet prúžkov	Objem konjugátu s koncentráciou 100×	Objem zeleného riedidla
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. **Pred začatím analýzy je potrebné plazmy premiešať, aby sa dosiahla rovnomerná distribúcia IFN- γ v každej vzorke. Ak sa vyžadujú kvantitatívne výsledky, zriedte aj CMV a mitogénovú plazmu (1/10) v zelenom riedidle (10 µl plazmy s 90 µl GD). Nulová plazma sa neriedi.**

Odporúčame vykonať test nasledovných vzoriek:

- nulová, CMV antigén, mitogén, CMV antigén (1/10), mitogén (1/10).

Softvér na analýzu QuantiFERON-CMV taktiež podporuje použitie nasledovných typov vzoriek pacientov:

- nulová, CMV antigén, mitogén,
- nulová, CMV antigén (1/10), mitogén (1/10),
- nulová, CMV antigén, mitogén, CMV antigén (1/10),
- nulová, CMV antigén (1/10), mitogén.

8. **Pomocou multikanálovej pipety pridajte 50 µl čerstvo pripraveného konjugátu s požadovanou koncentráciou do príslušných kalíškov ELISA.**
9. **Pomocou multikanálovej pipety pridajte 50 µl testovacích plazmových vzoriek do príslušných kalíškov. Nakoniec pridajte 50 µl každého štandardu 1 až 4.**
10. **Pomocou trepačky na mikrotitračné doštičky dôkladne premiešajte konjugát a plazmové vzorky/štandardy (1 minútu).**
11. **Zakryte každú doštičku vekom a inkubujte pri izbovej teplote (17 °C až 27 °C) pod dobu 120 ± 5 minút.**
- Doštičky počas inkubácie nesmú byť vystavené priamemu slnečnému žiareniu.

12. **Počas inkubácie zriedte jeden diel premývacieho roztoku s koncentráciou 20x s 19 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody a zmes dôkladne premiešajte. K dispozícii je dostatok premývacieho roztoku s koncentráciou 20x na prípravu 2 litrov premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou.**
- Prepláchnite kalíšky **400 µl** premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou (najmenej 6 cyklov). Odporúčame používať automatizovanú umývačku doštičiek.
- Dôkladné prepláchnutie je veľmi dôležité z hľadiska účinnosti analýzy. Dbajte na **úplné naplnenie** každého kalíška premývacím roztokom (až po vrch kalíška) v každom premývacom cykle. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
 - Do odpadovej nádoby je vhodné pridať štandardný laboratórny dezinfekčný prostriedok a v prípade dekontaminácie potenciálne infekčného materiálu je potrebné postupovať podľa stanovených procedúr.
13. **Vyklepaním doštičiek na absorpčnú utierku odstráňte zvyškový premývací roztok. Do každého kalíška pridajte 100 µl enzymatického substrátového roztoku a premiešajte ich pomocou trepačky na mikrotitračné doštičky.**
14. **Zakryte každú doštičku vekom a inkubujte pri izbovej teplote (17 °C až 27 °C) pod dobu 30 minút.**
- Doštičky počas inkubácie nesmú byť vystavené priamemu slnečnému žiareniu.
15. **Po dokončení 30-minútovej inkubácie pridajte do každého kalíška 50 µl enzymatického tlmiaceho roztoku a riadne ho premiešajte.**
- Enzymatický tlmiaci roztok je potrebné pridávať do kalíškov v rovnakom poradí a približne rovnako rýchlo ako substrát v kroku 13.
16. **Odmerajte optickú hustotu (OD) každého kalíška do 5 minút od zastavenia reakcie pomocou čítačky mikrotitračných doštičiek vybavenej filtrom s filtračným rozsahom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 nm až 650 nm. Hodnoty OD sa používajú na výpočet výsledkov.**

Výpočty a interpretácia testu

Analytický softvér QuantiFERON-CMV, ktorý je určený na analýzu nespracovaných údajov a výpočet výsledkov, je k dispozícii od spoločnosti QIAGEN na adrese www.QuantiFERON.com.

Tento softvér slúži na hodnotenie kontroly kvality analýzy, generovanie krivky štandardu a poskytuje výsledok testu každého pacienta v súlade s informáciami uvádzanými v časti Interpretácia výsledkov.

Okrem použitia analytického softvéru QF-CMV je možné výsledky stanoviť aj pomocou nasledovnej metódy.

Generovanie krivky štandardu

Stanovte stredné hodnoty OD štandardu súpravy na každej platni.

Vytvorte logaritmickeú ($\log_{(e)} - \log_{(e)}$) krivku štandardu zakreslením hodnoty $\log_{(e)}$ priemeru OD (os y) voči hodnote $\log_{(e)}$ koncentrácie IFN- γ štandardov v jednotkách IU/ml (os x) a z týchto výpočtov vynechajte nulový štandard. Pomocou regresnej analýzy vypočítajte čiaru najlepšieho umiestnenia (prispôsobenia) krivky štandardu.

Pomocou krivky štandardu stanovte koncentráciu IFN- γ (IU/ml) každej z testovaných plazmových vzoriek a použite hodnotu OD každej vzorky.

Tieto výpočty je možné vykonávať pomocou softvérových balíkov dostupných spolu s čítačkami mikrotitračných doštičiek a štandardného tabuľkového alebo štatistického softvéru (napríklad programu Microsoft® Excel®). Odporúčame používať tieto balíky na výpočet regresnej analýzy, koeficientu variácie (% CV) štandardov a koeficientu korelácie (r) krivky štandardu.

Kontrola kvality testu

Správnosť výsledkov testu závisí od generovania správnej krivky štandardu. Z tohto dôvodu je výsledky odvodené od štandardov potrebné preskúmať pred tým, než budete môcť interpretovať výsledky testovacej vzorky.

Zabezpečenie platnosti analýzy ELISA:

- Stredná hodnota OD štandardu 1 musí byť $\geq 0,600$.
- % CV hodnôt OD replikátu štandardu 1 a štandardu 2 musí byť $< 15\%$.
- Hodnoty OD replikátu štandardov 3 a 4 sa nesmú odlišovať o viac než 0,040 jednotky optickej hustoty od ich strednej hodnoty.
- Koeficient korelácie (r) vypočítaný z hodnôt strednej absorbancie štandardov musí byť $\geq 0,98$.

Ak vyššie uvedené kritériá nie sú splnené, cyklus testovania je neplatný a je potrebné ho zopakovať.

Stredná hodnota OD nulového štandardu (zelené riedidlo) by mala byť $\leq 0,150$. Ak je stredná hodnota OD $> 0,150$, je potrebné preskúmať postup premývania platne.

Interpretácia výsledkov

Výsledky QuantiFERON-CMV sa interpretujú pomocou nasledovných kritérií:

CMV mínus nulový štandard (IU/ml)*	Mitrogén mínus nulový štandard (IU/ml)	Výsledok QF-CMV	Správa/interpretácia
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Nereaktívne	Imunita na anti-CMV NEBOLA zistená
$\geq 0,2$	Akokoľvek hodnota	Reaktívne	Imunita na anti-CMV bola zistená
$< 0,2$	$< 0,5$	Neurčitý výsledok [†]	Výsledok je z hľadiska reakcie na CMV neurčitý

* Reakcie IFN- γ na CMV antigén a mitogénovú pozitívnu kontrolu sa môžu bežne nachádzať mimo pásma dosahu čítačky mikrotitračných doštičiek. Nemá to však žiadny vplyv na kvalitatívne výsledky.

[†] Možné príčiny nájdete v časti Riešenie problémov.

Obmedzenia

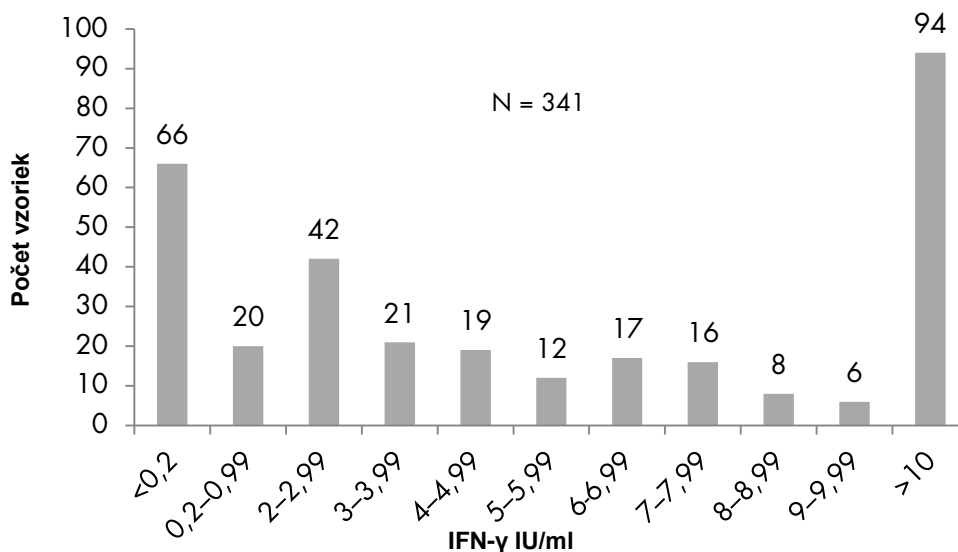
Výsledky testovania QuantiFERON-CMV sa musia používať spolu s epidemiologickou anamnézou, aktuálnym zdravotným stavom a ďalšími diagnostickými hodnoteniami každého pacienta.

Nespoľahlivé alebo neurčité výsledky môžu byť výsledkom:

- odchýlky od postupov uvádzaných v príbalovom letáku,
- nadmerného podielu IFN- γ v nulovej skúmavke,
- uplynutia viac než 16 hodín od odberu krvnej vzorky do inkubácie pri teplote 37 °C.

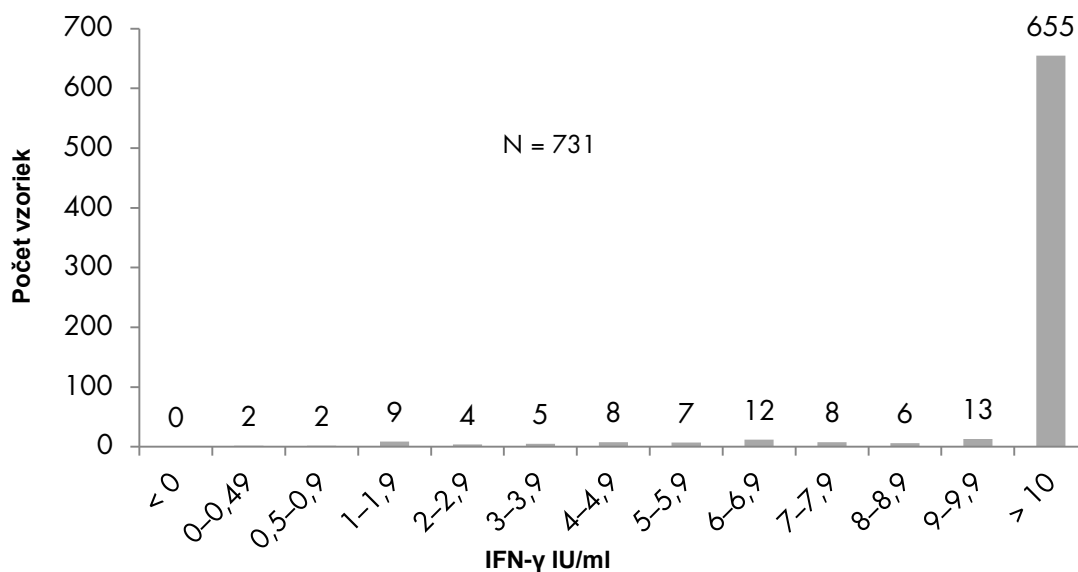
Predpokladané hodnoty

Predpokladané hodnoty IFN- γ pomocou analýzy QuantiFERON-CMV boli získané z testovania 591 vzoriek od zdravých dospelých jednotlivcov, z ktorých 341 bolo CMV séropozitívnych a 250 bolo séronegatívnych. U 250 zdravých dospelých jednotlivcov bez infekcie CMV (podľa stanovenia pomocou sérológie anti-CMV (CMV séronegatívny)) generovalo 100 % pacientov reakcie IFN- γ s hodnotou < 0,2 IU/ml na CMV antigénovú skúmavku (mínus nulová kontrola). Distribúcia CMV antigénovej skúmavky (mínus nulová kontrola) pre 341 zdravých pacientov s infekciou CMV (podľa stanoveniam pomocou sérológie anti-CMV (CMV séropozitívny)) je uvedená na obrázku 2.



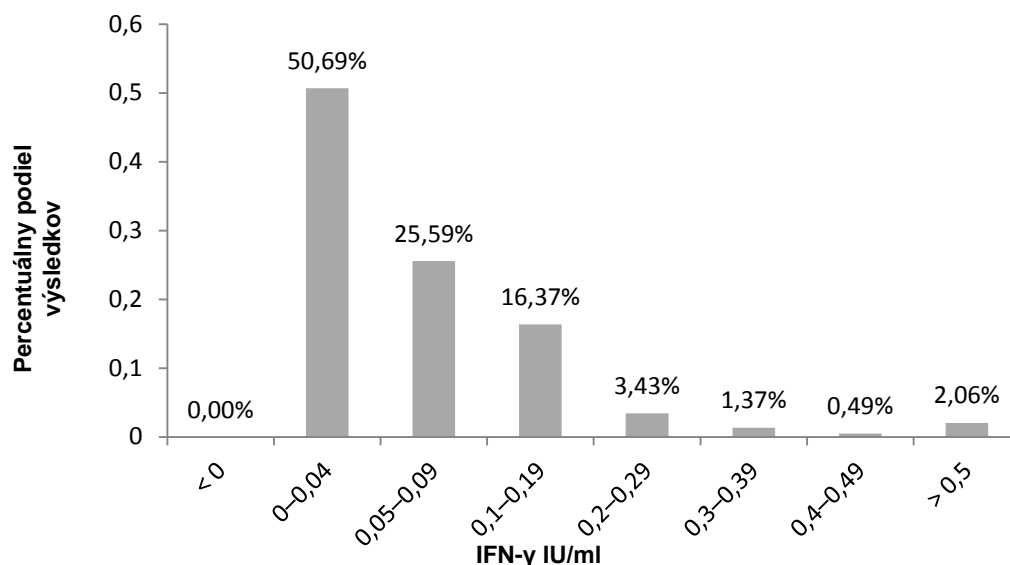
Obrázok 2. Distribúcia CMV-nulových IFN- γ reakcií u séropozitívnych zdravých pacientov (n = 341).

Distribúcia mitogénových výsledkov (mínus nulové pozadie) v 731 normálnych krvných vzorkách od dospelých zdravých jedincov, bez ohľadu na známu infekciu CMV, je uvedená na obrázku 3. Mitogénový výsledok (mínus nulová kontrola) menší než 0,5 IU/ml znamená buď zlyhanie testu, alebo skutočnosť, že daná osoba má narušenú imunitu. V rámci zdravej populácie do tejto kategórie spadali iba 2/731 výsledkov.



Obrázok 3. Distribúcia mitogén-nulových IFN- γ reakcií u zdravých dospelých osôb (n = 731).

Predpokladané hodnoty nulových skúmaní sú uvedené na obrázku 4. Údaje sú odvodené z 1 020 plazmových vzoriek od zdravých dospelých jedincov, ktorí boli testovaní pomocou testu QuantiFERON-CMV ELISA.



Obrázok 4. Distribúcia (vyjadrená ako percento populácie) nulových IFN- γ reakcií u zdravých dospelých jedincov (n = 1 020).

Charakteristiky účinnosti

Komparatívne testovanie

Prahová hodnota testovania na detekciu predchádzajúcej expozície CMV pomocou QF-CMV bola vytvorená použitím analytických výsledkov od skupiny zdravých jednotlivcov (n = 223), pričom výsledky QF-CMV boli porovnané so sérologickými výsledkami CMV. Analýza ROC dokázala, že prahová hodnota testovania 0,04 IU/ml (po odpočítaní nulovej kontroly) poskytla optimálne pozitívne a negatívne predikatívne hodnoty pre QF-CMV (oblasť pod krivkou = 0,9679 [95 % CI = 0,9442 až 0,9915, $p < 0,0001$]), a teda predstavovala prahovú hodnotu, pri ktorej bola účinnosť tejto analýzy, vykonávanej v súlade s účelom použitia, najvyššia u zdravej populácie.

V rámci predikatívneho testovania bola účinnosť QF-CMV porovnaná so sérologickým testom SeraQuest CMV IgG (Quest International). Analýza QF-CMV vykázala 95 % (294/310 jednotlivcov) zhodu s predikatívnym anti-HCMV sérologickým testom u zdravých jednotlivcov, pričom žiadny zo 149 séro-negatívnych darcov nevykázal žiadnu reaktivnosť podľa QF-CMV a 145 zo 161 séropozitívnych darcov vykazovalo reaktívnu reakciu IFN- γ . Celková pozitívna zhoda bola 90 % s hodnotou negatívnej zhody 100 %. Úroveň zhody medzi reakciami IFN- γ na peptidy CMV podľa merania pomocou QF-CMV u zdravých jedincov a sérologický stav anti-CMV týchto jedincov podľa sérologického testu SeraQuest CMV IgG sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2. Zhoda medzi QuantiFERON-CMV a sérologickým testom CMV IgG u zdravých jedincov.

Sérológia CMV				
	Pozitívne	Negatívne	Celkom	
QuantiFERON-CMV	Reaktívne	145	0	145 (46,8 %)
	Nereaktívne	16	149	165 (53,2 %)
	Celkom	161 (51,9%)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Prahová hodnota analýzy

Odporúčanou prahovou hodnotou klinických testov pre túto analýzu je 0,2 IU/ml v CMV antigénovej skúmvavke (mínus nulová kontrola). Vzhľadom na rôzne klinické nastavenia však môžu byť schválené aj iné prahové hodnoty. Dôvod spočíva v základných imunologických rozdieloch medzi normálnou populáciou testu a populáciami, v rámci ktorých sa test považuje za klinicky užitočný – ide najmä o osoby s imunosupresívnou terapiou, ktoré sú v jej dôsledku ohrozené rizikom rozvoja symptomatickej infekcie CMV alebo ochorenia. U takýchto jednotlivcov s vysokou mierou ohrozenia spočíva klinické využitie testu QF-CMV v presnej detekcii imunity na anti-CMV, pretože nedostatočná úroveň imunity môže súvisieť s rozvojom ochorenia CMV (1 – 5, 7, 8, 11 – 16).

Klinické štúdie

Keďže na potvrdenie alebo vylúčenie diagnózy cytomegalovírusovej infekcie neexistuje žiadny definitívny štandard, predpoklad citlivosti a špecificity týkajúcej sa QF-CMV nie je možné prakticky zhodnotiť. Špecificita a citlivosť QF-CMV bola odhadnutá formou zhodnotenia úrovne zhody reakcií IFN- γ na peptidy CMV podľa merania pomocou testu QF-CMV u zdravých dobrovoľníkov, a anti-CMV sérologického stavu týchto jedincov, stanoveného pomocou sérologického testu CMV IgG.

Špecificita QF-CMV bola odhadnutá formou hodnotenia nesprávnych pozitívnych výskytov (reaktívna reakcia na QF-CMV) u zdravých dobrovoľníkov bez predchádzajúceho výskytu CMV (CMV séronegatívni jedinci). Citlivosť bola odhadnutá formou hodnotenia zdravých dobrovoľníkov s dôkazom o existencii predchádzajúcej expozície CMV (CMV séropozitívni jedinci). Aj keď QF-CMV využíva vysoký počet epitopov špecifických pre CMV a ponúka rozsiahle klinické využitie pre širokú populáciu s rôznymi haplotypmi HLA triedy I, pokrytie týchto peptidov nie je 100 %. Keďže haplotypy HLA pacientov testovaných z hľadiska sérológie CMV boli neznáme, predpokladalo sa, že malé percento sérologicky pozitívnych jednotlivcov nebude reagovať na skúmvavky QF-CMV.

Špecificita

V štúdiu realizovanej u zdravých pacientov bez dôkazu o predchádzajúcej expozícii CMV (počet CMV séronegatívnych jedincov bol 250) bola úroveň zhody medzi reakciami IFN- γ na peptidy CMV podľa merania pomocou QF-CMV a anti-CMV sérologickými informáciami 100 %.

V rámci všetkých ostatných hodnotení špecificity u príjemcov tuhých transplantovaných orgánov (1, 3, 4, 8, 12, 14 – 16), príjemcov transplantovaných hematopietických kmeňových buniek (7, 13) a pacientov infikovaných vírusom HIV (2) bola úroveň zhody medzi reakciami IFN- γ na peptidy CMV podľa meraní pomocou testu QF-CMV a anti-CMV sérológiou trvalo vykazovaná na úrovni 100 %.

Citlivosť

V štúdiu realizovanej u zdravých pacientov s predchádzajúcou expozíciou CMV (počet CMV séropozitívnych jedincov bol 341) bola úroveň zhody medzi reakciami IFN- γ na peptidy CMV podľa merania pomocou testu QF-CMV a anti-CMV sérológiou 80,6 % (275/341). Pozorovaný nesúlad mohol byť spôsobený použitím vyššej prahovej hodnoty testu (0,2 IU/ml), nesprávnou pozitívnou sérológiou CMV alebo nereagovaním jednotlivcov na peptidy CMV zahrnuté v analýze.

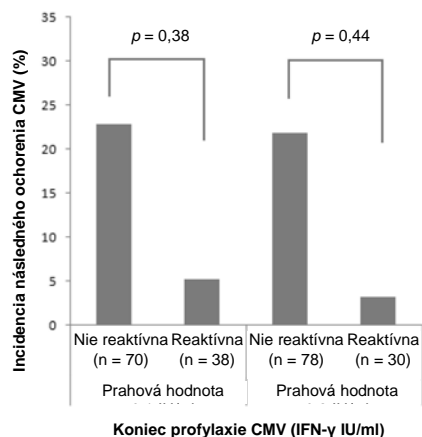
V rámci hodnotení citlivosti realizovaných u príjemcov transplantovaných tuhých orgánov (1, 3, 4, 8, 12, 14 – 16), príjemcov transplantovaných hematopietických kmeňových buniek (7, 13) a pacientov infikovaných vírusom HIV (2) boli vykázané niektoré mierne nižšie úrovne zhody medzi reakciami IFN- γ na peptidy CMV (podľa merania pomocou testu QF-CMV) a CMV séropozitívnymi reakciami u týchto pacientov. Nižšia úroveň zhody môže byť výsledkom nesprávnej pozitívnej CMV sérológie, nereagovania pacientov na peptidy CMV zahrnuté v analýze alebo neexistencie reaktívnych buniek T u týchto pacientov v dôsledku ich imunosupresie.

Štúdie zamerané na klinické využitie

Účelom použitia sérológie a QF-CMV je detekcia imunity na CMV. V prípade transplantácie sa sérológia CMV rozsiahle používa pred samotnou transplantáciou na stanovenie rizika komplikácií CMV u pacienta po transplantácii, jej hodnota po transplantácii je však obmedzená. QF-CMV je taktiež možné používať u príjemcov transplantátov na zhodnotenie úrovne imunity CMV u pacientov ohrozených rizikom rozvoja symptomatickej infekcie alebo ochorenia CMV v dôsledku imunosupresívnej terapie (6, 9 – 11).

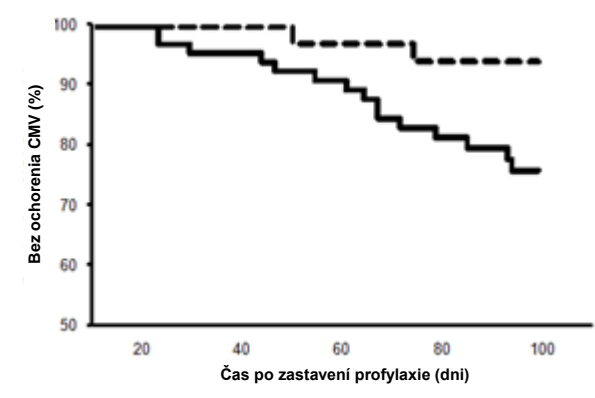
Využitie testu QuantiFERON-CMV bolo potvrdené v mnohých publikovaných klinických štúdiách v rámci širokej škály transplantačných kohort (1 – 5, 7, 8, 11 – 16).

V rámci rozsiahlej štúdie so 108 príjemcami transplantovaných tuhých orgánov (4) vykazovali pacienti s reaktívnym výsledkom na QF-CMV po dokončení anti-CMV profylaxie výrazne vyššiu mieru oneskoreného rozvoja choroby v porovnaní s pacientmi s nereaktívnym výsledkom na QF-CMV (5,3 % v porovnaní s 22,9 %, $p = 0,044$) (obrázok 5).



Obrázok 5. Miery výskytu oneskoreného rozvoja ochorenia CMV u pacientov s reaktívnymi výsledkami na QuantiFERON-CMV v porovnaní s nereaktívnymi výsledkami na QuantiFERON-CMV na konci profylaktického obdobia. Údaje reprodukované od autora Kumar a kol.(4)

Okrem toho sa u pacientov s reaktívnym testom QF-CMV po skončení profylaxie omnoho menej rozvíjalo ochorenie CMV a tento stav trval dlhšie (obrázok 6), či znamená, že test QF-CMV je možné používať na identifikáciu jednotlivcov s ohrozením oneskoreného rozvoja ochorenia CMV.

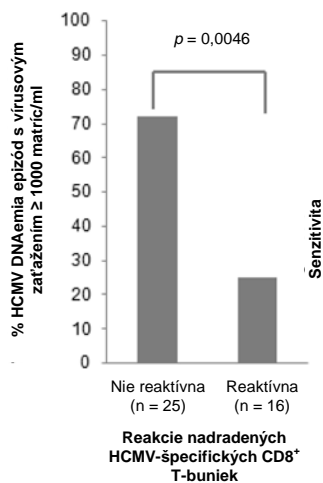


Obrázok 6. Doba do rozvoja ochorenia CMV u pacientov s reaktívnym výsledkom QuantiFERON-CMV (označené prerušovanou čiarou) v porovnaní s jednotlivcami s nereaktívnymi výsledkom QuantiFERON-CMV (označené nepretrúšanou čiarou) na konci profylaxie. Údaje reprodukované od autora Kumar a kol.(4)

Táto štúdia taktiež zistila, že v rámci kohorty pacientov s transplantátom, u ktorých je riziko rozvoja ochorenia CMV najvyššie (CMV séronegatívni príjemcovia transplantátov, ktorí dostali orgán od CMV séropozitívneho darcu, t. j. D+/R-), súvisel reaktívny výsledok QF-CMV kedykoľvek po ukončení profylaxie s 90 % pravdepodobnosťou nerozvinutia ochorenia CMV.

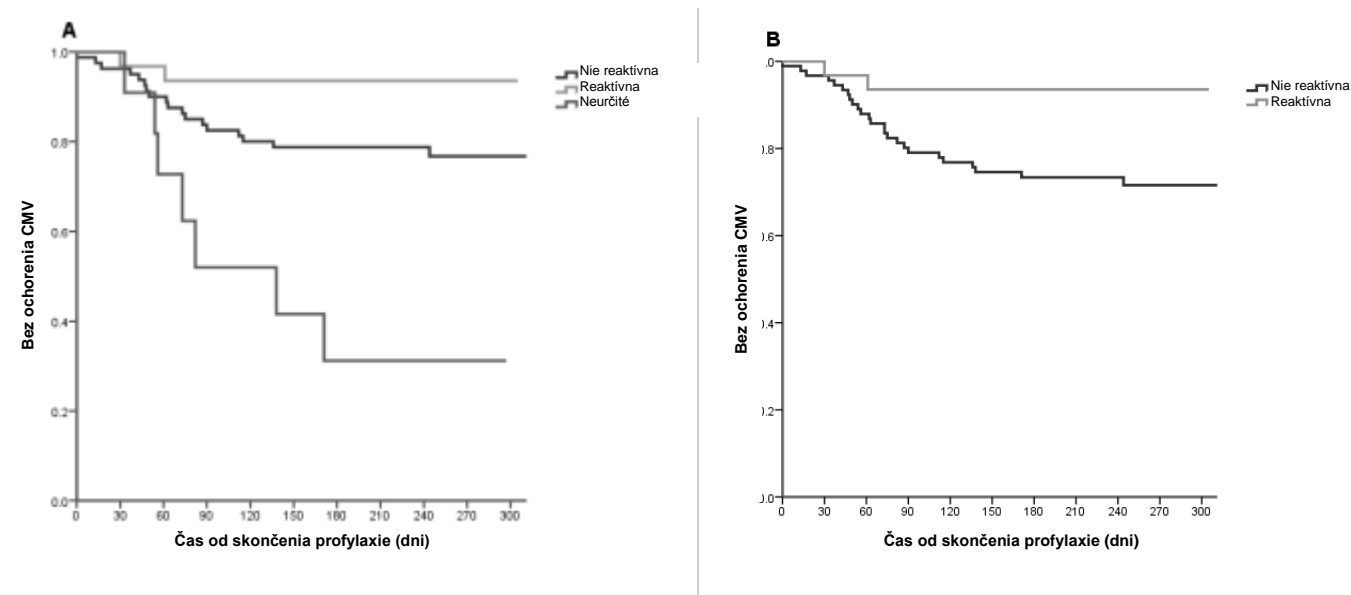
V rámci štúdie 37 pacientov s transplantáciou tuhých orgánov (12) bolo vykonané hodnotenie CMV-špecifických CD8⁺ T-bunkových reakcií podľa testu QF-CMV, ktoré slúžilo ako pomôcka pri predikcii spontánneho vymiznutia vírusu v porovnaní s progresiou ochorenia CMV po náraste virémie CMV. V tejto štúdii u 24/26 pacientov (92,3 %) s reaktívnym výsledkom QF-CMV spontánne vymizol vírus CMV, pričom rovnaký výstup bol dosiahnutý iba u 5/11 (45,5 %) pacientov s nereaktívnym výsledkom QF-CMV.

Štúdia 67 pacientov – príjemcov transplantovaných pľúc, ktorá bola zameraná na hodnotenie epizód virémie CMV po transplantácii (14) zistila, že 18/25 (72 %) epizód virémie CMV predchádzal nereaktívny výsledok QF-CMV v porovnaní so 4/16 (25 %) epizód, ktorým predchádzala reaktívna reakcia QF-CMV (Fisherov presný test, $p = 0,0046$, pozrite si obrázok 7).



Obrázok 7. Štatistická analýza CMV-špecifických reakcií T-buniek CD8⁺ podľa detekcie pomocou testu QuantiFERON-CMV a rozvoja virémie CMV (Fisherov presný test, $p = 0,0046$). Údaje reprodukované od autora Weseslindtner a kol. (14).

V rámci veľkej multicentrickej perspektívnej štúdie 127 D+/R– príjemcov transplantovaných tuhých orgánov (15), z ktorých všetci absolvovali antivírusovú profylaxiu, pacienti s reaktívnymi výsledkom QF-CMV (pri použití testovacej prahovej hodnoty 0,1 IU/ml) v ľubovoľnom časovom bode po ukončení profylaxie anti-CMV vykazovali významne nižšiu mieru výskytu oneskoreného rozvoja ochorenia v dobe 12 mesiacov po transplantácii v porovnaní s pacientmi s nereaktívnym výsledkom QF-CMV a neurčitým výsledkom (6,4 % – 22,2 % – 58,3 %, $p < 0,001$). V prípade klasifikácie neurčitých výsledkov ako nereaktívnych bol výskyt následného ochorenia CMV 6,4 % v porovnaní s 26,8 %, $p = 0,024$ (pozrite obrázok 8). Pozitívne a negatívne hodnoty QF-CMV na ochranu pred ochorením CMV boli 0,90 (95 % CI, 0,74 – 0,98) a 0,27 (95 % CI, 0,18 – 0,37), čo znamená, že reaktívny výsledok QuantiFERON-CMV v ľubovoľnej dobe po ukončení profylaxie súvisel s 90 % pravdepodobnosťou nerozvinutia ochorenia CMV. Táto štúdia zistila, že test QF-CMV môže byť užitočný na stanovenie predpokladu nízkeho, stredného alebo vysokého ohrozenia pacientov z hľadiska rozvoja následného ochorenia CMV po ukončení profylaxie.



Obrázok 8. Kaplanove-Meierove krivky výskytu ochorenia CMV na základe výsledkov analýzy QF-CMV.

A Porovnanie reaktívnych, nereaktívnych a neurčitých výsledkov QF-CMV (test logaritmickeho poradia, $p < 0,001$).

B Porovnanie reaktívnych a nereaktívnych výsledkov, kedy sa neurčité výsledky považovali za nereaktívne (test logaritmickeho poradia, $p = 0,024$).

V rámci perspektívnej štúdie 55 príjemcov tuhých transplantovaných orgánov (16), v ktorej sa analyzoval súvis medzi výsledkami QF-CMV pred transplantáciou a epizódami replikácie CMV po transplantácii sa zistilo, že vyšší výskyt replikácie CMV po transplantácii bol pozorovaný u príjemcov R(+) s nereaktívnym výsledkom QF-CMV pred transplantáciou (7/14 alebo 50 %) v porovnaní s príjemcami R(+) s reaktívnymi výsledkami QF-CMV (4/30 alebo 13,3 %).

Táto štúdia zistila, že QF-CMV nereaktívni príjemcovia pred transplantáciou, ktorí dostali orgán od CMV-séropozitívneho darcu, vykazovali desaťnásobne vyššie riziko replikácie CMV v porovnaní s QF-CMV reaktívnymi príjemcami (upravený pomer šancí OR 10,49, 95 % CI, 1,88 – 58,46), ako aj skutočnosť, že analýza QF-CMV pred transplantáciou môže byť užitočná v oblasti predpokladania rizika replikácie CMV po transplantácii a umožňuje individualizovať reguláciu infekcie CMV po transplantácii tuhých orgánov.

Mnohé iné štúdie zamerané na detekciu CMV-špecifických reakcií T-buniek CD8⁺ podľa analýzy QF-CMV v kohorte príjemcov transplantátov sa už uskutočnili (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) alebo sa momentálne na celom svete uskutočňujú.

Medzinárodná dohoda o pokynoch riadenia cytomegalovírusu v rámci transplantácií tuhých orgánov

Dôležitosť monitorovania imunity špecifickej pre CMV bola vyjadrená v dokumentácii „Medzinárodná dohoda o pokynoch riadenia cytomegalovírusu v rámci transplantácií tuhých orgánov“ (6). Tieto medzinárodné pokyny, ktoré boli vyvinuté panelom expertov na CMV a transplantácie tuhých orgánov a schválené spoločnosťou The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society, obsahujú dôkazy a konsenzuálne pokyny vychádzajúce z expertných názorov o regulácii CMV vrátane diagnostiky, imunológie, prevencie a liečby.

Záverom týchto pokynov je, že imunitné monitorovanie reakcií T-buniek špecifických pre CMV môže slúžiť ako nástroj na predpokladané stanovenie jednotlivcov ohrozených ochorením CMV po transplantácii a môže byť užitočné v oblasti riadenia profylaxie a včasnej aplikácie terapií (6).

Tieto pokyny obsahujú aj odporúčania týkajúce sa atribútov ideálnej analýzy imunitného monitorovania s nasledovnými súčasťami:

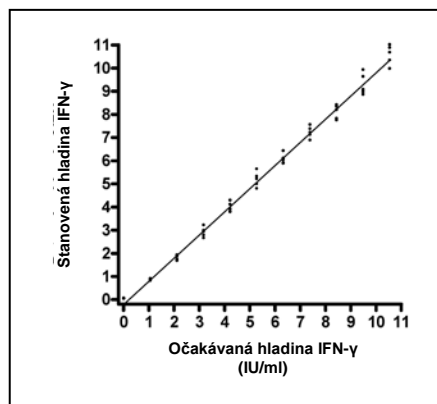
- schopnosť zhodnotiť množstvo a funkciu T-buniek CD4⁺ a CD8⁺ príjemcu,
- schopnosť odmerať IFN- γ ,
- jednoduchosť použitia, nákladová úspornosť a reprodukovateľnosť,
- krátky čas výkonu,
- jednoduchosť prepravy vzoriek do špecializovaných referenčných laboratórií.

QF-CMV spĺňa takmer všetky kritériá stanovené týmito pokynmi a predstavuje jedinú štandardizovanú analýzu na monitorovanie imunity, ktorá dokáže detegovať IFN- γ špecifické pre CMV.

Charakteristiky účinnosti analýzy

Je dokázané, že metóda merania koncentrácie IFN- γ pomocou analýzy QF-CMV ELISA má lineárny charakter od nulovej hodnoty po 10 IU/ml (obrázok 9). Uskutočnila sa štúdia lineárnosti, v rámci ktorej bolo náhodným spôsobom umiestnených 5 replikátov z 11 skupín plazmových vzoriek so známou koncentráciou IFN- γ na analytickú platňu ELISA.

Analýza QF-CMV ELISA neuvádza žiadny výskyt hákového efektu vysokej koncentrácie (prozónový efekt) pri koncentráciách IFN- γ do 100 000 IU/ml.



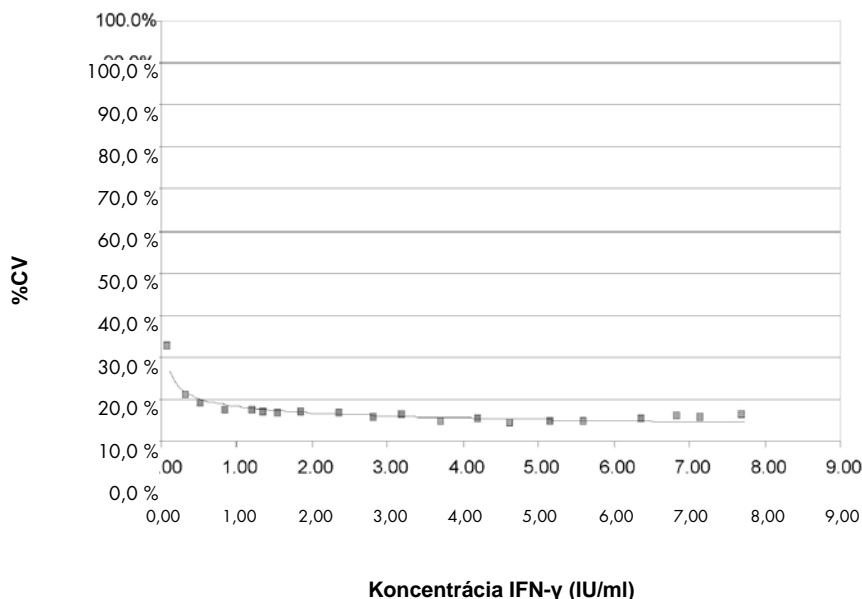
Obrázok 9. Profil lineárnosti analýzy QF-CMV ELISA stanovený pomocou testovania 5 replikátov z 11 plazmových vzoriek so známou koncentráciou IFN- γ . Čiara lineárnej regresie má strmosť $1,002 \pm 0,011$ a koeficient korelácie s hodnotou 0,99.

Vnútroanalytická a medzianalytická nepresnosť (% CV) analýzy QF-CMV ELISA bola odhadnutá formou testovania 20 plazmových vzoriek s premenlivými koncentráciami IFN- γ s 3 replikátmi v 3 laboratóriách v priebehu 3 po sebe nenasledujúcich dní 3 operátormi. To znamená, že každá vzorka bola testovaná 27-krát v rámci 9 nezávislých analytických cyklov. Jedna vzorka bola nulová kontrola s vypočítanou koncentráciou IFN- γ 0,08 (95 % CI, 0,07 – 0,09) IU/ml. V rámci zvyšných 19 plazmových vzoriek bol rozsah koncentrácií 0,33 (0,31 – 0,34) až 7,7 IU/ml (7,48 – 7,92).

Nepresnosť v rámci cyklu (vnútroanalytická nepresnosť) bola odhadnutá formou výpočtu priemeru hodnôt % CV pre každú testovanú plazmu obsahujúcu IFN- γ z každého cyklu spracovania platne (n = 9) a jej rozsah bol 4,1 až 9,1 % CV. Priemerná hodnota % CV v rámci cyklu (\pm 95 % CI) bola 6,6 % \pm 0,6 %. Priemerná hodnota % CV v plazme bez obsahu IFN- γ bola 14,1.

Celková alebo medzianalytická nepresnosť bola stanovená formou porovnania 27 vypočítaných koncentrácií IFN- γ pre každú plazmovú vzorku a jej rozsah bol 6,6 až 12,3 % CV. Celková priemerná hodnota % CV (\pm 95 % CI) bola 8,7 % \pm 0,7 %. Hodnota % CV v plazme bez obsahu IFN- γ bola 26,1. Túto úroveň variability je potrebné predpokladať, pretože vypočítaná koncentrácia IFN- γ je nízka a nízky predpoklad koncentrácie bude vyšší než v prípade vyšších koncentrácií.

Profil presnosti analýzy QF-CMV ELISA je uvedený na obrázku 10 a uvádza, že nepresnosť sa nezvyšuje spolu s vyššími koncentráciami IFN- γ .



Obrázok 10. Profil presnosti analýzy QF-CMV ELISA stanovený pomocou testovania 20 plazmových vzoriek v triplikátoch po dobu 3 po sebe nenasledujúcich dní v 3 laboratóriách 3 operátormi. Čiara trendu predstavuje výpočet prispôsobenia pomocou metódy najmenších štvorcov.

Uskutočnila sa štúdia zameraná na stanovenie reprodukovateľnosti testu QF-CMV použitím krvných vzoriek od 8 pacientov s neznámym stavom CMV. Krv každého pacienta bola odobratá do troch skupín skúmaviek QF-CMV (3 x nulová kontrola, 3 x CMV a 3 x mitogénová skúmavka). Tri skupiny skúmaviek boli následne inkubované v troch rôznych lokalitách (jedna súprava nulovej kontroly, CMV a mitogénovej kontroly v jednom stredisku) v súlade s informáciami v príbalovom letáku. Po uplynutí 16 až 24 hodín inkubácie boli skúmavky odstredené a bola z nich odobratá plazma.

Následne sa trikrát v každom z troch stredísk vykonala analýza ELISA, čím sa získali tri výsledky QF-CMV pre každého pacienta v každej lokalite (celkom 9 výsledkov vo všetkých strediskách). V každom stredisku pracoval na analýze iný operátor. Platne použité v rámci štúdie nevyhnutne nepochádzali zo šarže s rovnakým číslom, u žiadnej z nich však ešte neuplynul dátum expirácie.

Pre každú krvnú vzorku sa stanovovala reprodukovateľnosť z hľadiska diagnostického stavu (reaktívne, nereaktívne alebo neurčité) a príslušná číselná hodnota. Reprodukovateľnosť číselnej hodnoty bola hodnotená iba v rámci reaktívnych vzoriek (vyjadrená ako % CV), pretože úroveň IFN- γ v nereaktívnych vzorkách boli príliš malé na získanie zmysluplného odhadu presnosti.

Diagnostická reprodukovateľnosť vo všeobecnosti dosiahla hodnotu 100 %, pričom diagnostický stav QF-CMV všetkých 8 dobrovoľníkov bol reprodukovateľný vo všetkých strediskách a počas všetkých testov, a neboli vykázané žiadne vzorky s neurčitým výsledkom. Reprodukovateľnosť reaktívnych vzoriek bola na prijateľnej úrovni v rámci stredísk aj medzi nimi. Stredná hodnota % CV každého testovacieho strediska bola 4,5 % (stredisko 1), 5,9 % (stredisko 2) a 7,3 % (stredisko 3). Všeobecná hodnota % CV medzi strediskami bola 5,9 % pre všetkých 5 reaktívnych vzoriek. Percentuálny koeficient hodnôt rozptylu pod 10 % je považovaný za vynikajúci.

Technické informácie

Neurčité výsledky

Neurčité výsledky môžu súvisieť s imunitným stavom testovaného jedinca, môžu však súvisieť aj s mnohými technickými faktormi:

- uplynutie viac než 16 hodín od odberu krvi do inkubácie pri teplote 37 °C,
- uchovávanie krvi mimo odporúčaného teplotného rozsahu (17 °C až 27 °C),
- nedostatočné premiešanie obsahu skúmaviek na odber krvi.

Ak počas odberu krvných vzoriek alebo manipulácii s nimi predpokladáte výskyt technických problémov, opakujte celý test QF-CMV s novými krvnými vzorkami. Opakovanie testovania stimulovanej plazmy pomocou analýzy ELISA je možné vykonať v prípade, ak predpokladáte akúkoľvek procedurálnu odchýlku od testu ELISA. Zmena neurčitých výsledkov (počnúc nízkymi hodnotami mitogénovej kontroly) počas opakovania sa nepredpokladá, ak sa v rámci testovania ELISA nevyskytne žiadna chyba.

Spríevodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Ďalšie informácie nájdete aj v technických informáciách na webovej lokalite:

www.QuantiFERON.com. Kontaktné informácie nájdete na strane 26 a na zadnej strane.

Riešenie problémov s analýzou ELISA

Nízke hodnoty optickej hustoty štandardov

Možná príčina	Riešenie
a) Chyba riedenia štandardu	Dbajte na presný postup riedenia štandardu súpravy v súlade s informáciami v príbalovom letáku.
b) Chyba pipetovania	Pipety musia byť kalibrované a je potrebné ich používať v súlade s pokynmi výrobcu.
c) Príliš nízka teplota inkubácie	Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote (17 °C až 27 °C).
d) Príliš krátka doba inkubácie	Inkubácia platne s konjugátom, štandardmi a vzorkami by mala trvať 120 ± 5 minút. Enzymatický substrátový roztok sa inkubuje na doske 30 minút.
e) Nesprávny použitý filter čítačky platne	Platňa by sa mala načítať s vlnovou dĺžkou 450 nm s referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 až 650 nm.
f) Činidlá sú príliš studené	Všetky činidlá s výnimkou konjugátu s koncentráciou 100× musia nadobudnúť izbovú teplotu pred tým, než začnete s analýzou. Trvá to približne 1 hodinu.
g) Uplynul dátum expirácie súpravy/komponentov	Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do 3 mesiacov od zriadenia.

Vytvorenie nešpecifickej farby/vysoké hodnoty na pozadí

Možná príčina	Riešenie
a) Neúplné prepláchnutie platne	Platňu prepláchnite najmenej 6-krát so 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
b) Príliš vysoká teplota inkubácie	Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote (17 °C až 27 °C).
c) Uplynul dátum expirácie súpravy/komponentov	Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do troch mesiacov od zriadenia.
d) Overte, či enzymatický substrátový roztok nie je kontaminovaný	Ak sa vytvorí modré sfarbenie, substrát zlikvidujte. Používajte výlučne čisté nádoby na činidlá.
e) Miešanie plazmy v skúmavkách do odstredivky pred odobratím plazmy	Dbajte na starostlivé odobratie plazmových vzoriek z vrchnej gélovej časti bez pipetovania nahor a nadol a nenarušte materiál na povrchu gélovej vrstvy.

Použitá literatúra

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).

Technický servis

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

Táto strana je zámerne prázdna.

Táto strana je zámerne prázdna.

Skrátený postup testovania

Fáza 1 – inkubácia krvi

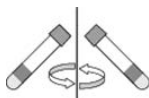
1. Odoberte krv do skúmaviek na odber krvi a pretrepte ich obsah desať (10) krát, čo postačuje na to, aby sa celý vnútorný povrch skúmavky pokryl krvou a aby sa rozpustili antigény na stenách skúmavky.



2. Skúmavky inkubujte vo vzpriamenej polohe pri teplote $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 16 až 24 hodín.



3. Po dokončení inkubácie odstredujte skúmavky 15 minút pri otáčkach 2 000 až 3 000 RCF (g) na účely oddelenia plazmy a červených krviniek.



4. Po dokončení odstredovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.



Fáza 2 – IFN-γ ELISA

1. Vykonajte ekvilibráciu komponentov ELISA s výnimkou konjugátu s koncentráciou $100\times$ na izbovú teplotu po dobu najmenej 60 minút.



2. Zriedte štandard súpravy na $8,0\text{ IU/ml}$ s destilovanou alebo deionizovanou vodou. Pripravte si štyri (4) riedenia (dilúcie) štandardu.

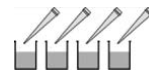


3. Rozriedte mrazom vysušený konjugát s koncentráciou $100\times$ s destilovanou alebo deionizovanou vodou.

4. Pomocou zeleného riedidla si pripravte konjugát požadovanej koncentrácie a pridajte $50\text{ }\mu\text{l}$ do všetkých kalíškov.



5. Pridajte $50\text{ }\mu\text{l}$ testovaných plazmových vzoriek a $50\text{ }\mu\text{l}$ štandardov do príslušných kalíškov. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



6. Inkubujte 120 minút pri izbovej teplote.



7. Kalíšky prepláchnite najmenej 6-krát so $400\text{ }\mu\text{l}$ premývacieho roztoku na jeden kalíšok.



8. Do kalíškov pridajte $100\text{ }\mu\text{l}$ enzymatického substrátového roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



9. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote.



10. Do všetkých kalíškov pridajte $50\text{ }\mu\text{l}$ enzymatického tlmiaceho roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



11. Načítajte výsledky pri vlnovej dĺžke 450 nm s použitím referenčného filtra s filtračným výkonom $620\text{ až }650\text{ nm}$.



12. Analyzujte výsledky.



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

Obmedzená licenčná zmluva vzťahujúca sa na súpravu QuantiFERON-CMV ELISA

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a touto príručkou, a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy s akýmkoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tejto príručke a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com. Niektoré z týchto protokolov boli poskytnuté používateľmi produktov od spoločnosti QIAGEN pre používateľov produktov od spoločnosti QIAGEN. Tieto protokoly neboli podrobne testované ani optimalizované spoločnosťou QIAGEN. Spoločnosť QIAGEN na ne neposkytuje žiadne záruky a neručí za to, že ich použitím nedôjde k porušeniu práv tretích strán.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že túto súprava alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolí vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrenie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese www.qiagen.com.

Autorské práva © 2012 spoločnosť Cellestis (spoločnosť skupiny QIAGEN). Všetky práva vyhradené.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

