

Únor 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Příbalová informace



Interferon-gama (IFN- γ) test plné krve ke zjištění odpovědí na peptidové antigeny lidského cytomegaloviru

IVD Pro diagnostiku in vitro



REF 0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, USA +1-800-426-8157

EC **REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NĚMECKO

1075110CS Rev. 05



www.QuantiFERON.com



Obsah

Účel použití.....	5
Shrnutí a vysvětlení.....	5
Princip testu.....	6
Čas potřebný k provedení testu	7
Dodávané materiály	8
Obsah soupravy.....	8
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	9
Upozornění a bezpečnostní opatření	9
Bezpečnostní informace.....	11
Skladování činidel a manipulace s nimi	12
Odběr vzorku a manipulace.....	13
Postup	16
Fáze 1: Inkubace krve a sběr plazmy.....	16
Fáze 2: QuantiFERON-CMV ELISA pro lidský IFN- γ	17
Výpočty a interpretace testu	22
Vytvoření standardní křivky (pokud se nepoužívá analyzační software QF-CMV) ..	22
Kontrola kvality testu	23
Interpretace výsledků	24
Omezení.....	25
Očekávané hodnoty	25
Charakteristiky funkčních vlastností	28
Klinická účinnost	28

Prahová hodnota testu	29
Klinické studie	29
Specificita	30
Citlivost	30
Studie zdůrazňující klinický přínos	31
Mezinárodní konsenzus o léčbě infekce cytomegalovirem u pacientů s transplantovanými solidními orgány	36
Funkční vlastnosti	37
Technické údaje	39
Nejednoznačné výsledky	39
Sražení vzorků plazmy	39
Návod na řešení problémů	40
Literatura	42
Symboly	44
Kontaktní údaje	45
Zkrácený postup testu ELISA	46
Fáze 1: Inkubace krve	46
Fáze 2: IFN- γ ELISA	46
Historie revizí příručky	49

Účel použití

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

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

Shrnutí a vysvětlení

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

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

Princip testu

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

Zkumavka Mitogen se používá při testu QF-CMV jako pozitivní kontrola. Toho lze využít obzvláště v případech, kdy existují pochybnosti o stavu imunitního systému osoby. Zkumavka Mitogen může také sloužit jako kontrola pro správné zacházení s krví a inkubaci.

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

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

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

Test je považován za reaktivní na odezvu IFN- γ , pokud je hodnota zkumavky CMV Antigen významně vyšší než hodnota Nil IFN- γ IU/ml. Vzorky mitogenem stimulované plazmy slouží jako pozitivní kontrola IFN- γ pro každý testovaný vzorek. Nízká odezva na mitogen označuje nejednoznačný výsledek, pokud má vzorek krve také nereaktivní odezvu na antigeny CMV. K této situaci může docházet při nedostatku lymfocytů, snížené aktivitě lymfocytů v důsledku nesprávného zacházení se vzorkem, nesprávného plnění/mísení zkumavky Mitogen nebo neschopnosti lymfocytů pacienta vytvářet IFN- γ – například u pacientů, kteří v nedávné době podstoupili transplantaci. Vzorkem Nil se provádí korekce pozadí neboli nespecifického IFN- γ v krevních vzorcích. Hladina IFN- γ zkumavky Nil se odečte od hladiny IFN- γ pro zkumavku CMV Antigen a zkumavku Mitogen (informace o interpretaci výsledků QF-CMV viz „Interpretace výsledků“ na straně 24 této příbalové informace).

Čas potřebný k provedení testu

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

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

Dodávané materiály

Obsah soupravy

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
Katalogové č.	0192-0301
Počet prep.	1
QuantiFERON Nil Control (Kontrola QuantiFERON Nil)(šedý uzávěr)	1 zkumavka
QuantiFERON CMV Antigen (Antigen QuantiFERON CMV)(modrý uzávěr)	1 zkumavka
QuantiFERON Mitogen Control (Kontrola QuantiFERON Mitogen) (fialový uzávěr)	1 zkumavka
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Příbalová informace pro zkumavky QF-CMV pro odběr krve)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Souprava ELISA se 2 destičkami
Katalogové č.	0350-0201
Stripy s mikrotitračními destičkami (12 × 8 jamek) pokryté myší monoklonální protilátkou proti lidskému IFN- γ	2 sady stripů mikrotitračních destiček s 12 × 8 jamkami
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Standard soupravy pro lidský IFN- γ , lyofilizovaný) (obsahuje rekombinantní lidský IFN- γ , bovinní kasein, Thimerosal 0,01 % hm.)	1 × lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)
Green Diluent (Zelený ředící roztok) (obsahuje bovinní kasein, normální myší sérum, Thimerosal 0,01 % hm.)	1 × 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Konjugát 100× koncentrát, lyofilizovaný) (myší protilátkou proti lidskému IFN- γ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01 % hm.)	1 × 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (20× koncentrát promývacího činidla) (pH 7,2, obsahuje 0,05 % obj. ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztok enzymového substrátu) (obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetramethylbenzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Zastavovací roztok enzymů) (obsahuje 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (Příbalová informace QF-CMV ELISA)	1

* Obsahuje kyselinu sirovou. Bezpečnostní opatření viz strana 9.

Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

- Inkubátor 37 °C; CO₂ není vyžadován.
- Kalibrované pipety s proměnným objemem pro výdej 10–1 000 µl s jednorázovými špičkami.
- Kalibrovaná vícekanálová pipeta pro dávkování 50 a 100 µl s jednorázovými špičkami.
- Třepačka mikrotitračních destiček.
- Deionizovaná nebo destilovaná voda, 2 litry
- Promývačka mikrotitračních destiček (doporučuje se automatizovaná promývačka).
- Čtečka mikrotitračních destiček s filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro

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

UPOZORNĚNÍ



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

Na komponenty soupravy QuantiFERON-CMV ELISA se vztahují následující bezpečnostní věty a bezpečnostní opatření.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Obsahuje: kyselina sírová. Varování! Může být korozivní pro kovy. Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

QuantiFERON Green Diluent



Obsahuje: 5-hydroxy-1-(4-sulfofenyl)-4-(4-sulfofenylazo)pyrazol-3-karboxylát sodný. Obsahuje: tartrazin. Varování! Může vyvolat alergickou kožní reakci. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Obsahuje: ProClin 300. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

Bezpečnostní informace

Další informace

- Odchyly od informací uvedených v příbalové informaci QF-CMV mohou způsobit chybné výsledky. Před použitím si prosím pečlivě přečtete pokyny.
- Nepoužívejte soupravu, pokud jakákoliv láhev s činidlem vykazuje před použitím známky poškození nebo netěsnosti.
- **Důležité:** Před použitím zkontrolujte lahvičky. Nepoužívejte lahvičky s konjugátem nebo standardním IFN- γ , pokud vykazují známky poškození nebo pokud došlo k porušení pryžového těsnění. Nemanipulujte s poškozenými lahvičkami. S použitím náležitých bezpečnostních opatření lahvičky bezpečně zlikvidujte.
Doporučení: K otevření lahviček s konjugátem nebo standardním IFN- γ použijte odstraňovač kovových víček, aby bylo riziko zranění kovovým ochranným víčkem co nejmenší.
- Nepoužívejte společně stripy mikrotitračních destiček, standardní lidský IFN- γ , zelený ředící roztok nebo konjugát 100 \times koncentrát z různých šarží souprav QF-CMV. Ostatní činidla (promývací pufr 20 \times koncentrát, roztok enzymového substrátu a zastavovací roztok enzymů) mohou být používána z různých šarží souprav za předpokladu, že u činidel nevypršela doba použitelnosti a že jsou zaznamenány informace o dané šarži.
- Zlikvidujte nepoužitá činidla a biologické vzorky v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- Nepoužívejte zkumavky QF-CMV pro odběr krve ani soupravy QF-CMV ELISA po vypršení doby použitelnosti.
- Ujistěte se, že laboratorní vybavení, například promývačky destiček a čtečky, byly kalibrovány/validovány pro použití.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Zkumavky pro odběr krve

- Zkumavky QF-CMV pro odběr krve skladujte při teplotě 4–25 °C.
- Zkumavky QF-CMV pro odběr krve by v době plnění krví měly mít teplotu 17–25 °C.
- Doba skladovatelnosti zkumavek QF-CMV pro odběr krve je maximálně 15 měsíců od data výroby, pokud jsou skladovány při teplotě 4–25 °C.

Činidla soupravy ELISA

- Uchovávejte soupravu při teplotě 2–8 °C.
- Roztok enzymového substrátu vždy chraňte před přímým slunečním světlem.

Rekonstituovaná a nepoužitá činidla

Pokyny ke způsobu rekonstituce činidel naleznete v části „Fáze 2: QuantiFERON-CMV ELISA pro lidský IFN- γ “ (kroky 3 a 5 na stránkách 17 a 19).

- Rekonstituovaný standard soupravy pro lidský IFN- γ může být uchován až po dobu 3 měsíců, pokud je skladován při teplotě 2–8 °C.
Poznačte si datum, kdy byl standard soupravy pro lidský IFN- γ rekonstituován.
- Po rekonstituci musí být nespotřebovaný konjugát 100 \times koncentrát převeden zpět na skladovací teplotu 2–8 °C a musí být spotřebován do 3 měsíců.
Poznačte si datum, kdy byl konjugát rekonstituován.
- Pracovní roztok konjugátu musí být použit do 6 hodin od přípravy.
- Pracovní promývací pufr může být uchován při pokojové teplotě (22 °C \pm 5 °C) po dobu až 2 týdnů.

Odběr vzorku a manipulace

QF-CMV využívá následující zkumavky pro odběr krve:

- kontrola Nil (šedý uzávěr),
- CMV Antigen (modrý uzávěr),
- kontrola Mitogen (fialový uzávěr).

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

Pro získání optimálních výsledků dodržujte následující postupy:

1. Od každého pacienta odeberte 1 ml krve ze žíly přímo do každé ze zkumavek pro odběr krve QF-CMV. Tento postup musí provádět pracovník vyškolený ve flebotomii.

Zkumavky QF-CMV pro odběr krve mohou být používány do nadmořské výšky 810 metrů.

Pokud jsou zkumavky QF-CMV pro odběr krve použity v nadmořské výšce nad 810 m nebo v případě nízkého objemu odebrané krve je možné odebrat krev pomocí stříkačky a 1 ml ihned přenést do každé ze tří zkumavek. Z bezpečnostních důvodů je nejvhodnější odstranit jehlu ze stříkačky, zajistit náležitě bezpečnostní postupy, odstranit víčka ze tří zkumavek QF-CMV pro odběr krve a přidat 1 ml krve do každé z nich (po černou značku na boční straně štítku každé zkumavky). Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle níže uvedeného popisu. Vzhledem k tomu, že krev do zkumavek o objemu 1 ml vtéká relativně pomalu, udržujte zkumavku na jehle po dobu 2–3 sekund. Jakmile se zdá, že zkumavka je plná, ujistěte se, že je získán správný objem.

Černá značka na boční straně zkumavek označuje objem plnění 1 ml. Zkumavky QF-CMV pro odběr krve byly validovány pro objemy od 0,8 do 1,2 ml. Jestliže hladina krve v kterékoliv zkumavce není v blízkosti značky, je nutné odebrat nový vzorek krve. Jestliže se k odběru krve používá motýlková jehla, je nutné před použitím zkumavek QF-CMV pro odběr krve použít „odvzdušňovací“ zkumavku k zajištění, že je hadička naplněna krví.

Krev může být také odebrána do jedné běžné odběrové zkumavky obsahující heparin lithný jako antikoagulant a poté přenesena do zkumavek QF-CMV pro odběr krve. Jako antikoagulant používejte pouze heparin lithný, protože ostatní antikoagulanty mohou narušovat průběh testu. Naplňte zkumavku pro odběr krve (minimální objem 5 ml) a jemně promíchejte tak, že zkumavku několikrát převrátíte dnem vzhůru, aby došlo k rozpuštění heparinu. Tento postup musí provádět pracovník vyškolený ve flebotomii. Krev by měla být uchována při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), než bude přenesena do zkumavek QF-CMV pro odběr krve k inkubaci, která musí být zahájena do 16 hodin od odběru krve.

2. Ihned po naplnění zkumavek QF-CMV pro odběr krve 10krát dobře protřepejte zkumavky tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.

Zkumavky by v době plnění krví měly být uchovány při teplotě 17–25 °C.

Příliš silné třepání může narušit gel a mohlo by vést k neplatným výsledkům.

Pokud byla krev odebrána do zkumavky s heparinem lithným, je nutné vzorky před přenesením do zkumavky QF-CMV pro odběr krve rovnoměrně promíchat. Ujistěte se, že je krev důkladně promíchána jemným obrácením zkumavky těsně před dávkováním krve. Rozdělte alikvotní podíly o objemu 1 ml (jeden do každé zkumavky QF-CMV pro odběr krve) do příslušných zkumavek Nil, CMV Antigen a Mitogen. Je nutné toto provést asepticky, zajistit náležitá bezpečnostní postupy, odstranit víčka ze tří zkumavek QF-CMV pro odběr krve a přidat 1 ml krve do každé z nich (po černou značku na boční straně štítku každé zkumavky). Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle výše uvedeného popisu.

3. Označte zkumavky příslušným způsobem.

Ujistěte se, že je možné každou zkumavku (Nil, CMV Antigen, Mitogen) identifikovat štítkem nebo jinými prostředky.

4. Po naplnění, protřepání a označení štítkem musí být zkumavky co nejdříve přeneseny do inkubátoru při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (do 16 hodin od odběru). Před inkubací uchovávejte zkumavky při pokojové teplotě ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). Krevní vzorky nechladte ani nezmrazujte.

Postup

Fáze 1: Inkubace krve a sběr plazmy

1. Zkumavky inkubujte ve VZPŘÍMENÉ poloze při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 16–24 hodin. Inkubátor nevyžaduje CO_2 ani zvlhčování.

Důležité: Jestliže krev nebude inkubována ihned po odběru, před inkubací zkumavky opět promíchejte tak, že je 10krát převrátíte.

Po inkubaci mohou být zkumavky na odběr krve uchovány před odstředěním při teplotě $4\text{--}27\text{ °C}$ po dobu až 3 dnů.

2. Po inkubaci zkumavek při teplotě 37 °C usnadněte sběr plazmy tím, že zkumavky odstředíte po dobu 15 minut při 2 000–3 000 RCF (g). Gelová zátka oddělí buňky od plazmy. Pokud k tomu nedojde, je nutné zkumavky opětovně odstředít.

Plazmu je možné sbírat bez odstředění, avšak je nutné věnovat větší péči při odstraňování plazmy, aniž by došlo k rozvíření buněk.

3. Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

Důležité: Vzorky plazmy je možné odebrat pouze pomocí pipety.

Vzorky plazmy je možné naplnit přímo z odstředěných zkumavek pro odběr krve do destičky QF-CMV ELISA, včetně případů, kdy jsou použity automatizované pracovní stanice ELISA.

Vzorky plazmy je možné uchovat v odstředěných zkumavkách QF-CMV pro odběr krve až po dobu 28 dní při teplotě $2\text{--}8\text{ °C}$ nebo, pokud je sebrána, při teplotě nižší než -20 °C (nejlépe nižší než -70 °C) po delší dobu.

Pro dostatečný objem vzorků k testu odeberte alespoň 150 μl plazmy.

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

Materiál potřebný k provedení testu ELISA viz část „Obsah soupravy“, strana 8 a „Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy“, strana 9.

1. Všechny vzorky plazmy a činidla, kromě konjugátu 100× koncentrátu, musí být před použitím ohřáty na pokojovou teplotu ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nechte vytemperovat alespoň 60 minut.
2. Z rámečku destičky ELISA vyjměte stripy, které nejsou vyžadovány, opět zalepte fólií, a vraťte do chladničky do doby, kdy je budete potřebovat.
Ponechte alespoň jeden strip pro standardy QF-CMV ELISA a dostatečné množství stripů pro počet pacientů, které chcete testovat. Po použití rámeček uchovejte a uzavřete pro použití se zbývajícími stripy.
3. Rekonstituujte standard soupravy pro lidský IFN- γ pomocí objemu deionizované nebo destilované vody uvedeného na štítku lahvičky. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění, a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění. Rekonstitucí standardu IFN- γ na uvedený objem se získá roztok o koncentraci 8,0 IU/ml.

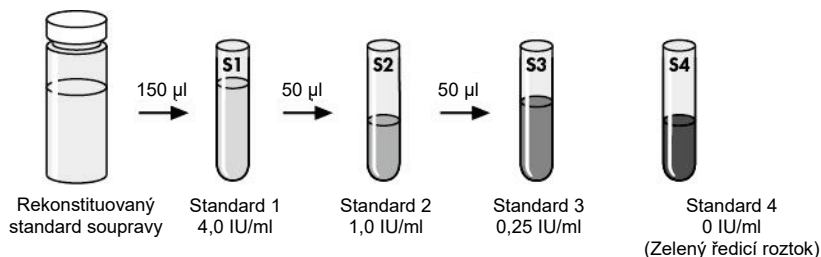
Poznámka: Rekonstituční objem standardu soupravy pro lidský IFN- γ se bude mezi jednotlivými dávkami lišit.

Pomocí rekonstituovaného standardu připravte řadu ředění čtyř koncentrací IFN- γ v zeleném ředícím roztoku (Green Diluent, GD) (Obrázek 1, další strana).

S1 (Standard 1) obsahuje 4,0 IU/ml, S2 (Standard 2) obsahuje 1,0 IU/ml, S3 (Standard 3) obsahuje 0,25 IU/ml a S4 (Standard 4) obsahuje 0 IU/ml (samotný zelený ředící roztok GD). Standardy musí být otestovány alespoň v duplikátu. Připravte čerstvá ředění standardu soupravy pro každou relaci testu ELISA.

Příklad postupu postup pro duplikát standardů

Příklad postupu postup pro duplikát standardů	
A	Označte čtyři zkumavky: S1, S2, S3, S4.
B	Přidejte 150 μ l GD do zkumavek S1, S2, S3, S4.
C	Přidejte 150 μ l standardu soupravy do zkumavky S1 a důkladně promíchejte.
D	Přeneste 50 μ l ze zkumavky S1 do S2 a důkladně promíchejte.
E	Přeneste 50 μ l ze zkumavky S2 do S3 a důkladně promíchejte.
F	Zelený ředící roztok (GD) samotný slouží jako nulový standard (S4).



Obrázek 1. Příprava standardní křivky sériovým ředěním.

4. Rekonstituujte lyofilizovaný konjugát 100 \times koncentrát pomocí 0,3 ml deionizované nebo destilované vody. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění konjugátu.

Pracovní konjugát se připravuje zředěním požadovaného množství rekonstituovaného konjugátu 100 \times koncentrátu v zeleném ředícím roztoku (viz Tabulka 1, další strana).

Důkladně avšak jemně promíchejte, aby nedošlo k napěnění.

Ihned po použití převedte případný nespotřebovaný konjugát 100 \times koncentrát na skladovací teplotu 2–8 $^{\circ}$ C.

Použijte pouze zelený ředící roztok.

Tabulka 1. Příprava pracovního konjugátu

Počet stripů	Objem konjugátu 100× koncentrátu	Objem zeleného ředícího roztoku
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

5. Vzorky plazmy shromážděné ze zkumavek na odběr krve, která byla následně zmrazena nebo uchována déle než 24 hodin před provedením testu, před přidáním do jamky testu ELISA důkladně promíchejte.

Důležité: Jestliže mají být vzorky plazmy přidány přímo z odstředěných zkumavek QF-CMV pro odběr krve, plazmu nepromíchejte. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

6. Jsou-li zapotřebí kvantitativní výsledky, zřeďte také plazmy CMV a Mitogen 1/10 v zeleném ředícím roztoku (10 µl plazmy + 90 µl zeleného ředícího roztoku). Plazma Nil nesmí být zředěna.

Doporučuje se paralelně otestovat následující vzorky:

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

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

Nil, Antigen CMV, Mitogen

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

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

Nil, Antigen CMV (1/10), Mitogen

7. Přidejte 50 µl čerstvě připraveného pracovního konjugátu do požadovaných jamek ELISA pomocí vícekanálové pipety.
8. Do příslušných jamek přidejte 50 µl testovaných vzorků plazmy. Nakonec do příslušných jamek přidejte 50 µl každého ze standardů 1 až 4. Standardy musí být otestovány alespoň v duplikátu.
9. Zakryjte destičku ELISA a promíchejte důkladně konjugát a vzorky plazmy/standardy pomocí třepačky mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty při otáčkách 500 až 1 000 ot/min. Zabraňte stříkání.
10. Zakryjte destičku ELISA a inkubujte při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 120 ± 5 minut.

Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu. Odchýlení od předepsaného rozmezí teplot může vést k chybným výsledkům.
11. Během inkubace připravte pracovní promývací pufr. Zředte jeden díl promývacího pufru 20× koncentrátu 19 díly deionizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte. K dispozici je dostatek promývacího pufru 20× koncentrátu k přípravě 2 litrů pracovního promývacího pufru.
12. Po dokončení inkubace destičky ELISA jamky promyjte 400 µl pracovního promývacího pufru alespoň v šesti cyklech. Doporučuje se použít automatizovanou promývačku destiček.

Důležité: Důkladné promytí je velmi důležité pro výkon testu. Ujistěte se, že je každá jamka při každém promývacím cyklu úplně naplněna promývacím pufrům až po okraj. Doporučuje se ponechat jamky mezi každým cyklem namočené alespoň po dobu 5 sekund.

Do odpadního zásobníku by měl být přidán standardní laboratorní dezinfekční prostředek a je nutné dodržovat zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.

-
13. Poklepejte destičkami otvory směrem dolů na absorpční utěrku nepouštějící vlas, abyste odstranili zbytky pufru. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku enzymového substrátu, zakryjte destičku víčkem a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty při otáčkách 500 až 1 000 ot/min.
 14. Zakryjte každou destičku a inkubujte při pokojové teplotě ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 30 minut.
Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.
 15. Po 30minutové inkubaci do každé jamky přidejte 50 µl zastavovacího roztoku enzymů ve stejném pořadí jako při přidávání substrátu a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrotitračních destiček při otáčkách 500 až 1 000 ot/min.
 16. Změřte optickou hustotu (Optical Density, OD) každé jamky během 5 minut od zastavení reakce pomocí čtečky mikrotitračních destiček s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem 620 nm až 650 nm. Hodnoty OD budou použity k výpočtu výsledků.

Výpočty a interpretace testu

Analyzační software QuantiFERON-CMV pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků je k dispozici u společnosti QIAGEN na adrese www.QuantiFERON.com. Ověřte, že používáte nejnovější verzi softwaru pro analýzu QF-CMV.

Software provádí vyhodnocení kontroly kvality testu, vytváří standardní křivku a poskytuje výsledky testu pro každého pacienta, jak je uvedeno v části „Interpretace výsledků“ na straně 24. Software vykazuje nejnižší ředění, které generuje výsledek v rozmezí testu QF-CMV ELISA, a bere v úvahu faktor ředění.

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

Vytvoření standardní křivky (pokud se nepoužívá analyzační software QF-CMV)

Určete střední hodnoty OD replikátů standardů soupravy na každé destičce.

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

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

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

Vykázaný výsledek je nutné použít z nejnižšího ředění, které generuje výsledek v rozmezí testu QF-CMV ELISA; zajistěte, že faktor ředění je vzat v úvahu tam, kde je to relevantní.

Kontrola kvality testu

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

Aby byl test ELISA platný:

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

Software pro analýzu QF-CMV vypočítá tyto parametry kontroly kvality a vytvoří zprávu. Pokud výše uvedená kritéria nejsou splněna, bude cyklus testu neplatný a musí být zopakován.

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

Interpretace výsledků

Výsledky testu QuantiFERON-CMV jsou interpretovány pomocí kritérií uvedených v Tabulka 2.

Tabulka 2. Interpretace výsledků testu QuantiFERON-CMV

Nil (IU/ml)	CMV minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Výsledek QF-CMV	Zpráva/Interpretace
≤ 8,0	≥ 0,20 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Jakýkoliv	Reaktivní†	Protilátky proti CMV detekovány
	< 0,20 NEBO ≥ 0,20 a < 25 % hodnoty Nil	≥ 0,5	Nereaktivní	Protilátky proti CMV NEBYLY detekovány
< 0,5		Nejednoznačný‡	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu CMV	
> 8,0§	Jakýkoliv	Jakýkoliv	Nejednoznačný‡	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu CMV

* Odezvy na pozitivní kontrolu Mitogen (a občas na antigeny CMV) mohou být běžně mimo rozsah čtečky mikrotitračních destiček. To nemá žádný dopad na výsledky testu.

† V případech, kdy neexistuje podezření na infekci cytomegalovirem, mohou být původně reaktivní výsledky potvrzeny opakovaným testováním původních vzorků plazmy v duplikátu testem QF-CMV ELISA. Pokud je opakované testování jednoho nebo obou replikátů pozitivní, musí být test dané osoby považován za reaktivní.

‡ Možné příčiny viz část „Návod na řešení problémů“ (strana 40).

V klinických studiích (1) bylo prokázáno, že nejednoznačný výsledek u příjemců transplantátů solidních orgánů, kdy je dárce reaktivní na CMV, ale kontrola Mitogen byla nižší než 0,5 IU/ml, je klinicky relevantní. U takových pacientů existuje nejvyšší riziko vzniku infekce CMV.

§ V klinických studiích mělo méně než 0,25 % subjektů hladiny IFN- γ > 8,0 IU/ml u hodnoty Nil.

Poznámka: Naměřená hladina IFN- γ musí být při stanovování imunitní odpovědi pacienta na antigeny CMV použita ve spojení s klinickým obrazem, zdravotní anamnézou a dalšími diagnostickými hodnoceními. QF-CMV není test k určení infekce CMV a neměl by být používán k vyloučení možnosti infekce CMV.

Omezení

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

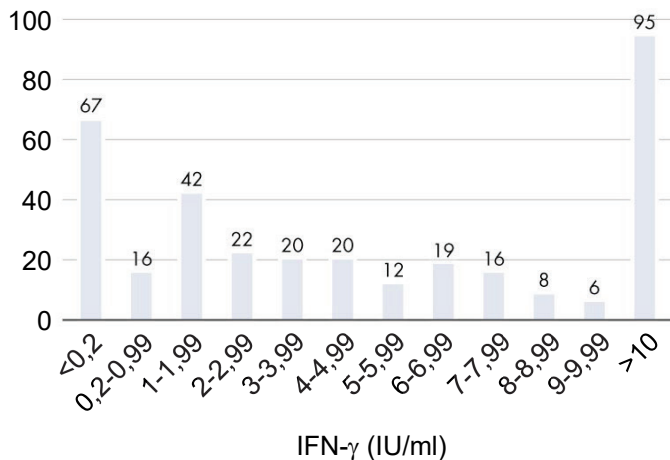
Nespolehlivé nebo neprůkazné výsledky se mohou objevit v důsledku:

- odchylky od postupu popsaného v příbalové informaci QuantiFERON-CMV ELISA,
- nadměrné hladiny IFN- γ v kontrolní zkumavce,
- uplynutí delší doby od odběru vzorku krve do inkubace při 37 °C než 16 hodin.

Očekávané hodnoty

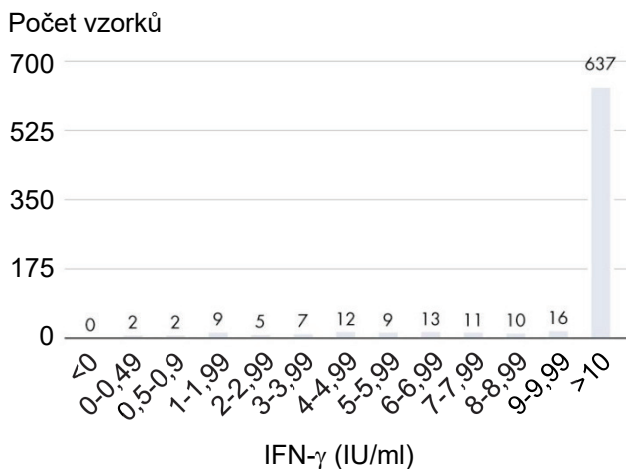
Očekávané hodnoty IFN- γ byly získány pomocí testu QuantiFERON-CMV při testování 591 vzorků od zdravých subjektů. 343 testovaných vzorků bylo séropozitivních a 248 bylo séronegativních na CMV IgG. V době testování QF-CMV nebyl znám sérologický stav CMV. Ve skupině 248 vzorků od subjektů séronegativních na CMV bylo 100 % (248/248) testovaných vzorků nereaktivních v testu QF-CMV ELISA s odpověďmi IFN- γ < 0,2 IU/ml na zkumavku CMV Antigen (mínus Nil). Distribuce odpovědí IFN- γ na zkumavku CMV Antigen (mínus Nil) u 343 séropozitivních subjektů na CMV je na Obrázek 2.

Počet vzorků



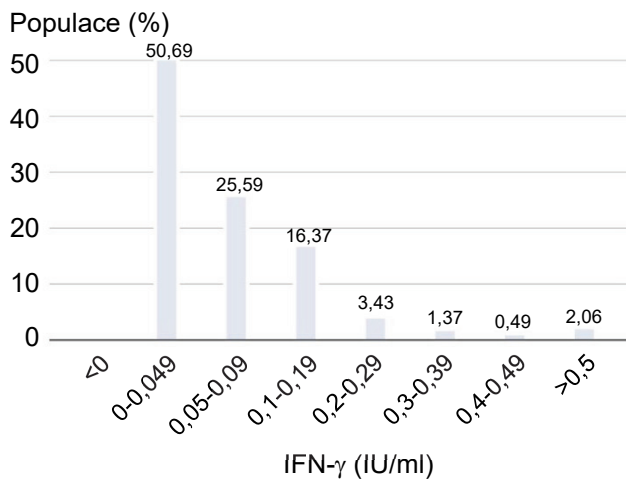
Obrázek 2. Distribuce odpovědí IFN- γ (mínus Nil) v testu QF-CMV u séropozitivních zdravých subjektů (n = 343).

Distribuce odpovědí IFN- γ na zkumavku Mitogen (mínus Nil) u 733 zdravých dospělých subjektů pomocí testu QF-CMV ELISA bez ohledu na sérologii CMV IgG (Obrázek 3). Výsledek Mitogen (mínus Nil) menší než 0,5 IU/ml označuje buď selhání testu nebo označuje, že subjekt je ve stavu snížené imunity. U zdravé populace do této kategorie spadá pouze 2 ze 733 výsledků.



Obrázek 3. Distribuce odpovědí Mitogen-IFN- γ (mínus Nil) u zdravých subjektů (n = 733).

Distribuce odpovědí IFN- γ na zkumavky Nil u 1020 vzorků plazmy od zdravých subjektů pomocí testu QF-CMV ELISA bez ohledu na sérologii CMV IgG (Obrázek 4).



Obrázek 4. Distribuce odpovědí Nil IFN- γ u zdravých subjektů (n = 1020) vyjádřená jako procentní podíl populace.

Charakteristiky funkčních vlastností

Klinická účinnost

Prahová hodnota testu pro detekci předchozího vystavení viru CMV pomocí testu QF-CMV byla stanovena s použitím analýzy výsledků od skupiny zdravých subjektů (n = 223), přičemž výsledky QF-CMV byly porovnány se sérologickými výsledky CMV IgG. Analýzou ROC bylo stanoveno, že prahová hodnota testu 0,04 IU/ml (po odečtení hodnoty Nil) poskytla optimální pozitivní a negativní prediktivní hodnoty testu QF-CMV (plocha pod křivkou = 0,9679 [95%CI: 0,9442–0,9915, p < 0,0001]), a představovala tedy prahovou hodnotu, při níž tento test nejučinněji splňoval určené použití u zdravé populace.

Účinnost testu QF-CMV byla porovnána se sérologickým testem SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). Test QF-CMV vykázal 95% (294/310 osob) shodu se sérologickým testem CMV IgG u zdravých subjektů, přičemž žádný ze 149 séronegativních vzorků dárců nevykazoval dle testu QF-CMV žádnou reaktivitu. 145 ze 161 séropozitivních vzorků dárců vykazalo v testu QF-CMV reaktivní odezvu. Celková shoda pozitivních výsledků byla 90 % a hodnota negativní shody byla 100 %. Úroveň shody u zdravých subjektů mezi odpověďmi QF-CMV a sérologickým stavem CMV IgG je v Tabulka 3.

Tabulka 3. Shoda mezi testem QuantiFERON-CMV a sérologickým testem CMV IgG u zdravých subjektů

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

Prahová hodnota testu

Doporučená prahová hodnota klinického testu pro tuto analýzu je 0,2 IU/ml u zkumavky CMV Antigen (mínus Nil), ačkoliv pro různá klinická prostředí mohou být validovány různé prahové hodnoty.

Klinické studie

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný definitivní standard pro potvrzení nebo vyloučení diagnózy infekce cytomegalovirem, nelze prakticky vyhodnotit odhad citlivosti a specifity pro QF-CMV. Přibližná specifita a citlivost testu QF-CMV byla stanovena vyhodnocením úrovně shody mezi odpověďmi QF-CMV a sérologickým stavem CMV IgG u zdravých subjektů.

Přibližná specifita testu QF-CMV byla stanovena vyhodnocením míry falešně pozitivních výsledků (reaktivní odpovědi QF-CMV) u vzorků zdravých dárců bez důkazu o předchozím vystavení CMV (CMV IgG séronegativní osoby). Přibližná citlivost byla stanovena vyhodnocením odpovědí QF-CMV u vzorků zdravých dárců s prokázaným předchozím vystavením CMV (CMV IgG séropozitivní osoby). Test QF-CMV využívá velké množství epitopů specifických pro CMV z různých bílkovin CMV a tak pokrývá široké spektrum populace s různými haplotypy HLA I. třídy (asi 98 % populace). Vzhledem k tomu, že haplotypy HLA testovaných subjektů oproti sérologii CMV nebyly známy, očekávalo se, že malé procento sérologicky pozitivních osob bude nereaktivní na zkumavky QF-CMV pro odběr krve.

Specifická

Ve studii 591 vzorků od zdravých subjektů nebyly detekovány žádné falešně pozitivní výsledky testu QF-CMV u jedinců séronegativních na CMV IgG. 248 z 248 testovaných vzorků bylo nereaktivních dle testu QF-CMV ELISA a negativních dle sérologického testu CMV IgG. Výsledky získané pomocí testu QF-CMV a sérologického testu CMV IgG vykazaly 100% shodu.

U všech ostatních vyhodnocení specifickosti provedených u příjemců transplantovaných solidních orgánů (1–8), příjemců hematopoetických kmenových buněk (9,10) a pacientů infikovaných HIV (11), byla shoda mezi testem QF-CMV a sérologickým testem CMV IgG rovněž 100 %.

Citlivost

Ve studii prováděné u 343 vzorků od zdravých subjektů séropozitivních na CMV IgG byla úroveň shody mezi odpověďmi testu QF-CMV a sérologickými výsledky testu CMV IgG 80,5 %; 276 ze 343 vzorků bylo reaktivních v testu QF-CMV a pozitivních v sérologickém testu CMV IgG. Pozorovaná neshoda může být způsobena použitím falešně pozitivního sérologického testu CMV nebo absencí responzivních typů HLA u testovaných jedinců.

Úroveň shody při vyhodnocení citlivosti provedených u příjemců transplantovaných solidních orgánů (1–8), příjemců hematopoetických kmenových buněk (9, 10) a pacientů infikovaných HIV (11) byla nižší a může být způsobena použitím falešně pozitivního sérologického testu CMV, absencí responzivních typů HLA u testovaných jedinců nebo absencí reaktivních T-buněk u těchto pacientů v důsledku jejich imunosuprese.

Studie zdůrazňující klinický přínos

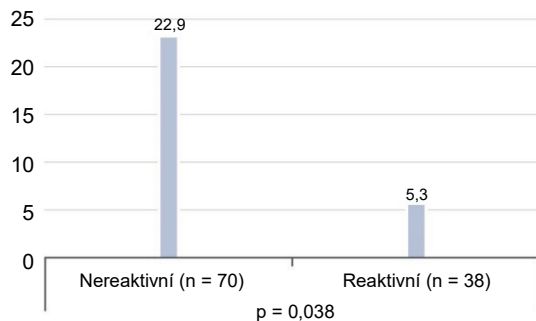
Popis určeného použití sérologického testu CMV IgG i testu QF-CMV uvádí jako možnost detekci imunity vůči CMV. V prostředí transplantací je sérologie CMV široce využívána před transplantací pro stanovení rizika komplikací souvisejících s CMV u příjemce po transplantaci, avšak samotná má po transplantaci omezenou hodnotu. Alternativně lze QF-CMV použít u příjemců transplantovaných orgánů k vyhodnocení úrovně imunity vůči CMV u pacientů, kteří jsou ohroženi rozvojem symptomatické infekce CMV a/nebo onemocnění v důsledku imunosuprese (12–15).

Množství publikovaných klinických studií prováděných v různých kohortách transplantací ukázalo přínos testu QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

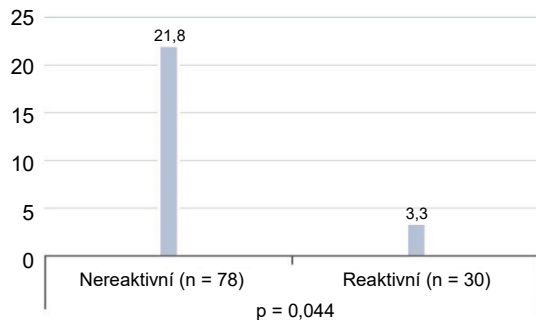
V rozsáhlé studii 108 příjemců transplantovaných solidních orgánů (4), měli pacienti s reaktivním výsledkem QF-CMV při dokončení profylaktické léčby infekce CMV významně nižší míru následného onemocnění CMV (3,3 % nebo 1/30; při použití prahové hodnoty 0,2 IU/ml) v porovnání s těmi, kteří měli nereaktivní výsledek QF-CMV (21,8 % nebo 17/78, $p = 0,044$) (Obrázek 5).

A

Incidence následného onemocnění CMV (%)

Dokončení profylaktické léčby CMI (IFN- γ IU/ml)
Prahová hodnota testu 0,1 IU/ml**B**

Incidence následného onemocnění CMV (%)

Dokončení profylaktické léčby CMI (IFN- γ IU/ml)
Prahová hodnota testu 0,2 IU/ml

Obrázek 5. Míra pozdního nástupu onemocnění CMV u pacientů s reaktivním výsledkem testu QuantiFERON-CMV versus nereaktivní výsledek testu QuantiFERON-CMV při dokončení profylaktické léčby. Základní údaje nalezeny v dokumentu autorů Kumar et al. (4).

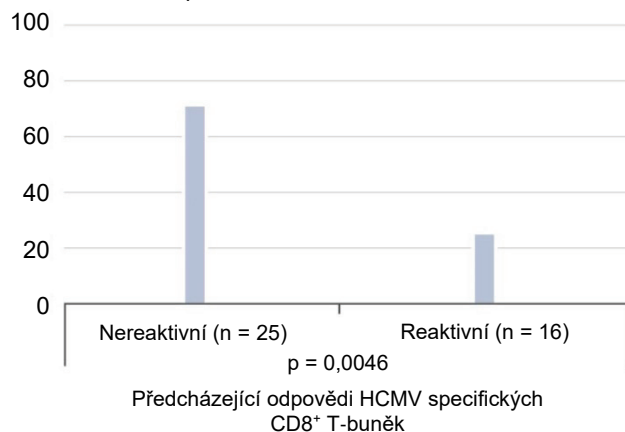
Navíc CMV séronegativní příjemci transplantovaných orgánů, kteří obdrželi orgán od CMV pozitivního dárce (tj. D+/R-) a měli reaktivní výsledek testu QF-CMV po dokončení profylaktické léčby, zůstávali bez onemocnění CMV častěji a po delší dobu, což znamená, že test QF-CMV může být použit pro identifikaci pacientů ohrožených pozdním nástupem onemocnění CMV.

Tato studie také upozornila na to, že v kohortě pacientů s transplantacemi s nejvyšším rizikem vzniku onemocnění CMV (D+/R-) byl reaktivní výsledek kdykoliv po profylaktické léčbě spojován s vyšší šancí, že onemocnění CMV nepropukne.

Ve studii 37 pacientů s transplantovaným solidním orgánem (6) vyhodnocení reakcí CMV specifických CD8⁺ T-buněk dle QF-CMV pomohlo při predikci spontánní virové clearance v porovnání s progresí onemocnění CMV po zvýšení virémie CMV. V této studii došlo u 24/26 pacientů (92,3 %) s reaktivním výsledkem testu QF-CMV (při použití prahové hodnoty testu IFN- γ \geq 0,2 IU/ml) ke spontánní clearanci viru CMV, zatímco pouze 5/11 (45,5 %) pacientů s nereaktivním výsledkem testu QF-CMV mělo stejný výsledek.

Ve studii 67 příjemců transplantátů plic vyhodnocující epizody virémie CMV po transplantaci (7) bylo zjištěno, že 18/25 (72 %) epizodám virémie CMV předcházela nereaktivní výsledek QF-CMV, oproti 4/16 (25 %) epizodám, kterým předcházela reaktivní reakce na test QF-CMV (Fisherův přesný test, $p = 0,0046$, Obrázek 6).

% epizod HCMV DNAemie s virovou zátěží > 1000 kopií/ml



Obrázek 6. Statistická analýza reakcí CMV specifických CD8⁺ T- buněk dle detekce při testu QuantiFERON-CMV a rozvoj virémie CMV (Fisherův přesný test, p = 0,0046). Základní údaje nalezeny v dokumentu autorů Weseslindtner et al (7).

Rozsáhlá multicentrická prospektivní studie 127 CMV séronegativních příjemců transplantátů solidních orgánů od CMV séropozitivních dárců (8), z nichž všichni dostávali antivirovou profylaktickou léčbu ukázala, že pacienti s reaktivním výsledkem QF-CMV (s použitím prahové hodnoty testu 0,1 IU/ml) v jakémkoliv časovém bodě po absolvování profylaktické léčby proti CMV měli významně nižší míru výskytu pozdního nástupu onemocnění 12 měsíců po transplantaci (6,4 %) v porovnání s pacienty s nereaktivním výsledkem QF-CMV (22,2 %) a neprůkazným výsledkem (58,3 %, p < 0,001). Při klasifikaci neprůkazných výsledků jako „nereaktivních“ byla incidence následného onemocnění CMV 6,4 % vs. 26,8 %, p = 0,024. Prediktivní hodnoty pozitivních a negativních výsledků testu QF-CMV pro ochranu před onemocněním CMV byly 0,90 (95% CI 0,74–0,98) a 0,27 (95% CI 0,18–0,37). Tato studie zjistila, že test QF-CMV může být užitečný k predikci, zda jsou pacienti vystaveni malému, střednímu, nebo vysokému riziku rozvoje onemocnění CMV po profylaktické léčbě.

V rámci prospektivní studie 55 příjemců transplantovaného solidního orgánu (8), v níž byla analyzována souvislost mezi výsledky testů QF-CMV před transplantací a epizod replikace CMV po transplantaci, bylo zjištěno, že vyšší incidence replikací CMV po transplantaci byla pozorována u CMV séropozitivních příjemců s nereaktivním (s použitím prahové hodnoty testu 0,2 IU/ml) výsledkem testu QF-CMV před transplantací (7/14 nebo 50 %), v porovnání s CMV séropozitivními příjemci s reaktivním výsledkem testu QF-CMV (4/30 nebo 13,3 %, $p = 0,021$).

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

Bylo uskutečněno několik dalších studií zabývajících se detekcí reakce CMV specifických CD8⁺ T-buněk pomocí QF-CMV v kohortě příjemců transplantovaných orgánů (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) nebo v současné době na celém světě probíhají.

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

Důležitost monitoringu imunity vůči CMV byla uznána a publikována v *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Aktualizovaný mezinárodní konsenzus o léčbě infekce cytomegalovirem u pacientů s transplantovanými solidními orgány) (12). Tyto mezinárodní pokyny vytvořené komisí odborníků na CMV a transplantace solidních orgánů, kterou svolala „The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society“, představuje konsenzus založený na důkazech a odborných názorech o léčbě CMV, včetně: diagnostiky, imunologie, prevence a léčby.

Závěr těchto pokynů je, že „Monitorování imunitní odpovědi CMV specifických T-buněk může predikovat osoby s rizikem onemocnění CMV po transplantaci a může být užitečné při řízení profylaxe a preventivní léčby“ (12).

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

- schopnost vyhodnotit množství a funkci CD4⁺ a CD8⁺ T-buněk příjemce transplantace,
- schopnost změřit IFN- γ ,
- jednoduchost provedení, efektivnost nákladů a reprodukovatelnost,
- rychlou dobu zpracování,
- snadné zaslání vzorků do specializovaných referenčních laboratoří.

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

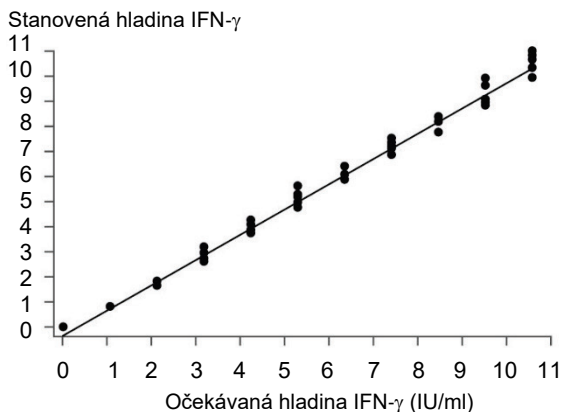
Funkční vlastnosti

Test QF-CMV ELISA využívá rekombinantní lidský IFN- γ standard, jenž byl srovnán s referenčním přípravkem IFN- γ (ref. NIH: Gxg01-902-535). Výsledky testu vzorků jsou uvedeny v mezinárodních jednotkách (International Units, IU) podle standardní křivky připravené testováním ředění sekundárního standardu dodaného spolu se soupravou.

Je známo, že heterofilní (např. lidské protimyšší) protilátky v séru nebo plazmě určitých jedinců způsobují interferenci s imunitními testy. Vliv heterofilních protilátek je v testu QF-CMV ELISA minimalizován přidáním normálního myššího séra do zeleného ředícího roztoku a použitím monoklonálních fragmentů protilátek F(ab')₂ jako protilátky k zachycení IFN- γ , kterou jsou potaženy jamky mikrotitračních destiček.

Detekční mez testu QF-CMV ELISA činila 0,065 IU/ml a nebyl prokázán žádný důkaz efektu „high-dose hook“ (prozóna) u koncentrací IFN- γ do 10 000 IU/ml. Ukázalo se, že protilátky QF-CMV ELISA nereagují zkříženě s žádnými testovanými cytokiny včetně IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 a IL12.

Linearita testu QF-CMV ELISA se prokázala náhodným umístěním pěti replikátů 11 směsí plazmy se známými koncentracemi IFN- γ na destičku ELISA. Křivka lineární regrese měla sklon $1,002 \pm 0,011$ a korelační koeficient 0,99 (obrázek 7).



Obrázek 7. Profil linearity testu QF-CMV ELISA určený z testování pěti replikátů 11 vzorků plazmy o známých koncentracích IFN- γ .

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

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

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

Technické údaje

Nejednoznačné výsledky

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

- uplynutí delší doby od odběru krve do inkubace při 37 °C než 16 hodin,
- skladování krve mimo doporučený rozsah teplot (22 °C ±5 °C).
- nedostatečné promíchání zkumavek s odebranou krví,
- nedokonalé promytí destičky ELISA.

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

Sražení vzorků plazmy

Pokud se při dlouhodobém skladování plazmy objeví ve vzorcích sraženiny fibrinu, odstředte vzorky, aby se sražený materiál usadil a napipetování bylo snadnější.

Návod na řešení problémů

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

Komentáře a návrhy

Nízké hodnoty optické hustoty pro standardy

- | | |
|---|--|
| a) Chyba ředění standardu | Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle pokynů v příbalové informaci QF-CMV ELISA. |
| b) Chyba pipetování | Ujistěte se, že je zařízení kalibrováno a používáno dle pokynů výrobce. |
| c) Příliš nízká teplota inkubace | Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (22 °C ±5 °C). |
| d) Příliš krátká doba inkubace | Inkubace destičky s konjugátem, standardy a vzorky musí trvat 120 ±5 minut. Roztok enzymového substrátu se inkubuje na destičce po dobu 30 minut. |
| e) Nesprávný filtr čtečky destiček | Hodnoty destičky musí být načteny s filtrem o vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem od 620 do 650 nm. |
| f) Příliš chladná činidla | Všechna činidla, s výjimkou konjugátu 100× koncentráту, musí být před zahájením testu temperována na pokojovou teplotu. To může trvat přibližně 1 hodinu. |
| g) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100× koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce. |

Nespecifické zbarvení

- | | |
|---|--|
| a) Nedokonalé promytí destičky | Promyjte destičku alespoň šestkrát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než šest promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Křížová kontaminace jamek ELISA | Při pipetování a mísení vzorku buďte opatrní, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. |
| c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100× koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce. |
| d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu | Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla. |

Komentáře a návrhy

- | | |
|--|---|
| e) Mísení plazmy v centrifugačních zkumavkách před odběrem | Ujistěte se, že jsou vzorky plazmy pečlivě odebrány z horní části gelu, aniž by byl obsah pipetován nahoru a dolů. Dbejte na to, aby se nenarušil materiál na povrchu gelu. |
|--|---|

Výrazné pozadí

- | | |
|---|--|
| a) Nedokonalé promytí destičky | Promyjte destičku alespoň šestkrát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než šest promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Příliš vysoká teplota inkubace | Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (22 °C ±5 °C). |
| c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100× koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce. |
| d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu | Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla. |

Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátu

- | | |
|---|--|
| a) Nedokonalé promytí destičky | Promyjte destičku alespoň šestkrát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než šest promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Chyba ředění standardu | Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle pokynů v této příbalové informaci. |
| c) Nedostatečné promíchání | Činidla důkladně promíchejte tak, že před jejich přidáním na destičku zkumavku převrátíte nebo lehce protřepete na třepačce. |
| d) Nejednotná technika pipetování nebo přerušení během přípravy testu | Přidání vzorku a standardu by mělo být provedeno bez přerušení procesu. Všechna činidla musí být připravena před zahájením testu. |

Informace o výrobku a technické pokyny jsou zdarma k dispozici u společnosti QIAGEN, prostřednictvím vašeho dodavatele nebo na www.QuantiFERON.com.















Literatura

1. Manuel, O., et al. (2013) 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.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (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. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. 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, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. 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.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

-
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4⁺ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
 12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
 13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
 14. 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, 735.
 15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
 16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

Symboly

Na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
 Σ <N>	Obsahuje dostatek činidel pro <N> reakcí.
	Použijte do
	Označení CE
	Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Globální číslo obchodní položky
	Teplotní omezení
	Nepoužívejte opakovaně
	Chraňte před slunečním světlem
	Viz návod k použití
	Výrobce
	Zplnomocněný zástupce pro Evropské společenství

Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na adrese **www.qiagen.com/Support** volejte 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení QIAGEN nebo naše místní distributory (viz poslední stránka obalu nebo navštivte **www.qiagen.com**).

Zkrácený postup testu ELISA

Fáze 1: Inkubace krve

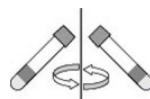
1. Odeberte krev pacienta do odběrových zkumavek a poté desetkrát (10) dobře protřepejte zkumavky tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.



2. Zkumavky inkubujte ve vzpřímené poloze při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 16 až 24 hodin.



3. Po inkubaci odstředte zkumavky po dobu 15 minut při 2 000–3 000 RCF (g), aby se oddělila plazma a červené krvinky.



4. Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.



Fáze 2: IFN- γ ELISA

1. Ponechte temperovat součásti testu ELISA, s výjimkou konjugátu 100x koncentrátu, na pokojovou teplotu alespoň po dobu 60 minut.
2. Rekonstituujte standard soupravy na 8,0 IU/ml pomocí deionizované nebo destilované vody. Připravte čtyři (4) standardní ředění.



3. Rekonstituujte lyofilizovaný konjugát 100× koncentrát pomocí destilované nebo deionizované vody.

4. Připravte pracovní roztok konjugátu v zeleném ředícím roztoku a do všech jamek přidejte 50 µl.



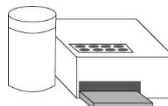
5. Do příslušných jamek přidejte 50 µl testovaných vzorků plazmy a 50 µl standardů. Promíchejte pomocí třepačky.



6. Inkubujte po dobu 120 minut při pokojové teplotě.



7. Promyjte jamky alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku.



8. Přidejte do jamek 100 µl roztoku enzymového substrátu. Promíchejte pomocí třepačky.



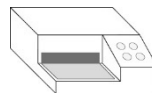
9. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě.



10. Přidejte do jamek 50 µl zastavovacího roztoku enzymů. Promíchejte pomocí třepačky.



11. Zjistěte výsledné hodnoty při 450 nm pomocí referenčního filtru 620 až 650 nm.



12. Provedte analýzu výsledků.



Historie revizí příručky

Dokument	Změny	Datum
L1075110-R5	Doplnění informací o bezpečnosti týkajících se poškozených lahvíček Aktualizace tabulky 2, Interpretace výsledků testu QF-CMV, strana 24.	Únor 2018
L1075110-R5	Aktualizace informací o systému GHS, strana 10	Únor 2018

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.); SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

Omezená licenční smlouva pro soupravu QuantiFERON-CMV ELISA

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

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v panelu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v tomto panelu, společně s kterýmžkoliv součástmi, které nejsou v tomto panelu obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživatelům výrobní společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tento panel a/nebo jeho použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tento panel a jeho komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoli další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakékoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat zájazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem a/nebo jeho součástmi.

Pro aktualizovanou licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

Únor 2018 © 2018 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com