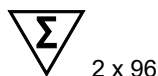


Luty 2018

# QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV ELISA

## Ulotka dołączona do opakowania



Test wydzielania interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) w krwi pełnej oparty na pomiarze odpowiedzi na antygeny peptydowe ludzkiego cytomegalowirusa

**IVD** Do diagnostyki 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,  
NIEMCY

1075110PL Wer. 05



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



# Spis treści

Przeznaczenie .....	5
Podsumowanie i objaśnienie .....	5
Zasada procedury .....	6
<b>Czas wymagany do przeprowadzenia testu</b> .....	<b>8</b>
Materiały dostarczone w zestawie .....	9
<b>Zawartość zestawu</b> .....	<b>9</b>
Materiały wymagane, ale niedostarczone .....	10
Uwagi i środki ostrożności .....	10
<b>Informacje dotyczące bezpieczeństwa</b> .....	<b>12</b>
Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami .....	13
Pobranie próbek i postępowanie z próbkami .....	14
Procedura .....	17
<b>Etap 1: Inkubacja krwi i zbieranie osocza</b> .....	<b>17</b>
<b>Etap 2: Test QuantiFERON-CMV ELISA wydzielania ludzkiego IFN-<math>\gamma</math></b> .....	<b>18</b>
Obliczenia i interpretacja wyników testu .....	23
<b>Utworzenie krzywej wzorcowej (jeśli nie jest używane oprogramowanie     analityczne QF-CMV)</b> .....	<b>23</b>
<b>Kontrola jakości testu</b> .....	<b>24</b>
Interpretacja wyników .....	25
Ograniczenia .....	26
Wartości oczekiwane .....	26
Charakterystyka działania testu .....	29

---

Wydajność kliniczna .....	29
Próg testu .....	30
Badania kliniczne .....	30
Swoistość .....	31
Czułość .....	31
Badania podkreślające użyteczność kliniczną.....	32
Wypracowane międzynarodowe wytyczne w zakresie zarządzania cytomegalowirusem w przypadku przeszczepów narządów litych .....	37
Charakterystyka działania testu.....	38
Informacje techniczne.....	40
Wyniki nieokreślone .....	40
Skrzepięte próbki osocza .....	40
Przewodnik rozwiązywania problemów .....	41
Bibliografia.....	43
Symbole .....	45
Informacje kontaktowe.....	46
Skrócony opis procedury testu ELISA .....	47
Etap 1: Inkubacja krwi .....	47
Etap 2: Test IFN- $\gamma$ ELISA .....	47
Historia zmian w instrukcji .....	50

# Przeznaczenie

QuantIFERON-CMV ELISA (QF-CMV) to test *in vitro*, w którym wykorzystywany jest koktajl peptydowy imitujący białka ludzkiego cytomegalowirusa (cytomegalovirus, CMV) w celu stymulacji komórek w heparynizowanej krwi pełnej. Wykrywanie interferonu gamma (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ ) za pomocą testu immunoenzymatycznego (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) służy do ilościowego oznaczenia odpowiedzi na antygeny peptydowe w warunkach *in vitro*. Odpowiedzi te są powiązane z kontrolą zakażenia wirusem CMV przez układ odpornościowy. Utrata tej funkcji układu odpornościowego może wiązać się z rozwojem cytomegalii. Test QF-CMV jest przeznaczony do monitorowania poziomu odpowiedzi immunologicznej pacjenta przeciwko wirusowi CMV.

Test QF-CMV nie jest przeznaczony do wykrywania zakażenia wirusem CMV i nie powinien być wykorzystywany do wykluczenia zakażenia wirusem CMV.

## Podsumowanie i objaśnienie

Wirus CMV to herpeswirus, którym zakażone jest około 50–85% populacji osób dorosłych. Zakażenie jest częstym powikłaniem leczenia immunosupresyjnego, szczególnie po przeszczepach, i może znacząco przyczynić się do zachorowalności i umieralności wśród biorców narządów. Obecnie dostępne terapie immunosupresyjne stosowane w celu zapobiegania odrzuceniu przeszczepionego narządu mają szkodliwy wpływ na limfocyty T i odpowiedź odpornościową komórkową (Cell-Mediated Immune, CMI), co prowadzi do zwiększenia podatności na zakażenia wirusowe po przeszczepach. Znaczenie komórek T w hamowaniu replikacji wirusa CMV podkreśla również fakt, że cytotoksyczne limfocyty T (cytotoxic T-lymphocytes, CTLs) CD8<sup>+</sup> CMV swoiste mogą chronić przed patogenezą związaną z zakażeniem wirusem. Oznaczenie ilościowe komórek CTL CD8<sup>+</sup> CMV swoistych oraz wydzielania IFN- $\gamma$  u pacjentów leczonych immunosupresyjnie może służyć

---

do prognozowania ryzyka rozwoju cytomegalii. Test wydzielania IFN- $\gamma$  może być stosowany zamiennie z identyfikacją komórek CTL CMV swoistych.

QF-CMV to test odpowiedzi CMI na antygeny peptydowe imitujące białka wirusa CMV. Peptydy wirusa CMV są wytworzone w taki sposób, aby atakować komórki T CD8<sup>+</sup>, w tym haplotypy HLA klasy I: A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 i Cw6 (A30, B13), które występują u >98% ludzkiej populacji. We krwi osób zakażonych wirusem CMV na ogół obecne są limfocyty CD8<sup>+</sup>, które rozpoznają te antygeny. Ten proces rozpoznawania wiąże się z produkcją i wydzielaniem cytokiny — IFN- $\gamma$ . Istotą tego testu jest wykrycie, a następnie ilościowe oznaczenie IFN- $\gamma$ .

## Zasada procedury

Test QF-CMV jest wykonywany w dwóch etapach. W pierwszym etapie krew pełna jest pobierana do każdej próbki do pobierania krwi QF-CMV, w tym do próbki z kontrolą ujemną, próbki z antygenem CMV oraz próbki z mitogenem.

Próbka z mitogenem służy w teście QF-CMV jako kontrola dodatnia. Wykorzystanie w teście takiej kontroli jest szczególnie uzasadnione w przypadku, gdy nie ma pewności co do stanu układu odpornościowego badanej osoby. Probówka z mitogenem może służyć również jako kontrola prawidłowego postępowania z krwią i prawidłowego przebiegu inkubacji.

Próbki należy możliwie jak najszybciej inkubować w temperaturze 37°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania próbek. Po upłygnięciu 16–24-godzinnego okresu inkubacji należy zwirować próbki, zebrać osocze i wykonać pomiar ilości IFN- $\gamma$  (IU/ml) za pomocą testu QF-CMV ELISA.

Ilość IFN- $\gamma$  otrzymana dla próbek osocza znajdujących się w próbkach z antygenem CMV oraz z mitogenem może często przekraczać górne granice większości czytników

---

ELISA, także wtedy, gdy stan immunosupresji badanej osoby jest umiarkowany. W celu uzyskania wyników jakościowych należy użyć wartości obliczonych dla czystego osocza. W celu uzyskania wyników ilościowych, gdy wymagane są rzeczywiste wartości wyrażone w IU/ml, próbki osocza należy rozcieńczyć w stosunku 1/10 za pomocą zielonego rozcieńczalnika i wykonać test ELISA wraz z czystym osoczem.

**Uwaga:** W przypadku próbek, których wartości znajdują się w zakresie testu QF-CMV ELISA (tj. do 10 IU/ml), należy korzystać z wyniku uzyskanego dla próbki czystego osocza. W przypadku takich stężeń IFN- $\gamma$  wartości uzyskane dla próbek osocza rozcieńczonych w stosunku 1/10 mogą być niedokładne.

Uznaje się, że odczyt IFN- $\gamma$  w próbówce z antygenem CMV istotnie wyższy niż odczyt IFN- $\gamma$  (IU/ml) w próbówce z kontrolą ujemną, oznacza reaktywną odpowiedź na antygeny wirusa. Stymulowana mitogenem próbka osocza służy jako kontrola dodatnia IFN- $\gamma$  dla wszystkich testowanych próbek. Jeśli dla próbki otrzymano niereaktywną odpowiedź na antygeny wirusa CMV i jednocześnie słabą odpowiedź na mitogen, wynik próbki jest nieokreślony. Taka sytuacja może wystąpić w przypadku niewystarczającej ilości limfocytów, zmniejszonej aktywności limfocytów spowodowanej nieprawidłowym postępowaniem z próbką, nieprawidłowego napełnienia/mieszania próbki z mitogenem lub niezdolności do produkcji IFN- $\gamma$  przez limfocyty pacjenta, co występuje na przykład u pacjentów po niedawno przebytej operacji przeszczepu. Kontrola ujemna jest korygowana z uwzględnieniem tła lub nieswoistego IFN- $\gamma$ , który znajduje się w próbkach krwi. Stężenie IFN- $\gamma$  w próbówce z kontrolą ujemną jest odejmowane od stężenia IFN- $\gamma$  w próbkach z antygenem CMV i z mitogenem (instrukcje dotyczące sposobu interpretacji wyników testu QF-CMV zawiera sekcja „Interpretacja wyników” na stronie 25 niniejszej ulotki dołączonej do opakowania).

---

## Czas wymagany do przeprowadzenia testu

Poniżej przedstawiono szacunkowy czas wymagany do przeprowadzenia testu QF-CMV; przedstawiono również czas testowania wielu próbek podzielonych na partie:

Inkubacja próbek z krwią w temperaturze 37°C: 16–24 godziny

Test ELISA: około 3 godziny na jedną płytkę ELISA  
mniej niż 1 godzina pracy  
plus 10–15 minut na każdą dodatkową płytkę



# Materiały dostarczone w zestawie

## Zawartość zestawu

<b>Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)</b>	
<b>Nr katalogowy</b>	<b>0192-0301</b>
<b>Liczba przygotowań</b>	<b>1</b>
QuantiFERON Nil Control (Probówka QuantiFERON z kontrolą ujemną) (szara zatyczka)	1 probówka
QuantiFERON CMV Antigen (Probówka QuantiFERON z antygenem wirusa CMV) (niebieska zatyczka)	1 probówka
QuantiFERON Mitogen Control (Probówka QuantiFERON z mitogenem) (fioletowa zatyczka)	1 probówka
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania próbek do pobierania krwi QF-CMV)	1

<b>QuantiFERON-CMV ELISA</b>	<b>Zestaw ELISA zawierający 2 płytki</b>
<b>Nr katalogowy</b>	<b>0350-0201</b>
Paski mikropłytkowe (12 x 8 studzienek) opłaszczone mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko ludzkiemu IFN- $\gamma$	2 zestawy pasków mikropłytkowych po 12 x 8 studzienek
Human IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (Wzorec (standard) ludzkiego IFN- $\gamma$ , liofilizowany) (zawiera rekombinowany, ludzki IFN- $\gamma$ , kazeinę wołową, tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 fiołka (8 IU/ml po zrekonstruowaniu)
Green Diluent (Zielony rozcieńczalnik) (zawiera kazeinę wołową, prawidłową surowicę myśią, tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (100x stężony koncentrat koniugatu, liofilizowany) (mysie przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu IFN- $\gamma$ sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP), zawiera tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (20x stężony koncentrat buforu płuczającego) (pH 7,2, zawiera ProClin <sup>®</sup> 300 o stężeniu objętościowym 0,05%)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztwór substratu enzymu) (zawiera H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Roztwór zatrzymujący reakcję enzymatyczną) (zawiera 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu QF-CMV ELISA)	1

\* Zawiera kwas siarkowy. Środki ostrożności – patrz strona 10.

# Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy z substancjami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i gogle ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS) dostępnymi u dostawcy produktu.

- Inkubator ustawiony na temperaturę 37°C; atmosfera CO<sub>2</sub> nie jest wymagana
- Skalibrowane pipety o zmiennej objętości, przeznaczone do dozowania obj. 10–1000 µl, z jednorazowymi końcówkami
- Skalibrowane pipety wielokanałowe umożliwiające dozowanie obj. 50 µl i 100 µl, z jednorazowymi końcówkami
- Wytrząsarka do mikroplętek
- Woda dejonizowana lub destylowana, 2 litry
- Płuczka mikroplętek (zalecana płuczka automatyczna)
- Czytnik mikroplętek wyposażony w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm

## Uwagi i środki ostrożności

Do diagnostyki in vitro

Podczas pracy z substancjami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i gogle ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym, kompaktowym formacie PDF pod adresem **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN®.

**OSTRZEŻENIE**

Ludzką krew należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny. Należy przestrzegać odpowiednich wytycznych dotyczących postępowania z krwią.

Do elementów testu QuantiFERON-CMV ELISA mają zastosowanie następujące zwroty wskazujące na zagrożenia i określające środki ostrożności.

**QuantiFERON Enzyme Stopping Solution**

Zawiera: kwas siarkowy. Uwaga! Może powodować korozję metali. Działa drażniąco na skórę. Działa drażniąco na oczy. Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.

**QuantiFERON Enzyme Substrate Solution**

Uwaga! Powoduje słabe podrażnienie skóry. Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.

**QuantiFERON Green Diluent**

Zawiera: trójsodowy związek kwasu 4-(4'-sulfo-1'-fenylazo)-(1-(4'-sulfofenilo)-5-hydroksypirazolokarboksylowego-3). Zawiera: tartrazyna. Uwaga! Może powodować reakcję alergiczną skóry. Stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ ochronę oczu/ ochronę twarzy.

**QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate**

Zawiera: ProClin 300. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. Unikać uwolnienia do środowiska.

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

### Dodatkowe informacje

- Postępowanie w inny sposób niż określony w ulotce dołączonej do opakowania testu QF-CMV może spowodować otrzymanie błędnych wyników. Przed użyciem należy dokładnie przeczytać instrukcje.
- Nie korzystać z zestawu, jeśli przed użyciem którakolwiek z butelek z odczynnikami nosi ślady uszkodzeń lub wycieka z niej płyn.
- Ważne: Przed użyciem sprawdzić fiołki. Nie używać fiołek zawierających koniugat lub wzorzec IFN- $\gamma$ , jeśli widoczne są oznaki uszkodzenia lub jeśli doszło do naruszenia gumowej plombki. Nie używać pękniętych fiołek. Aby w bezpieczny sposób zutylizować fiołki, należy postępować zgodnie z odpowiednimi środkami ostrożności.

**Zalecenie:** Aby ograniczyć do minimum ryzyko urazu spowodowanego przez metalowy kapsel, przy otwieraniu fiołek z koniugatem lub wzorcem IFN- $\gamma$  należy używać narzędzia do zdejmowania kapsli.

- Nie łączyć i nie używać pasków mikropłytkowych, wzorca ludzkiego IFN- $\gamma$ , zielonego rozcieńczalnika lub 100x stężonego koncentratu koniugatu z różnych partii zestawów QF-CMV. Pozostałe odczynniki (20x stężony koncentrat buforu płuczającego, roztwór substratu enzymu i roztwór zatrzymujący reakcję enzymatyczną) można wymieniać między zestawami pod warunkiem, że nie upłynęła ich data ważności i zapisano szczegółowe informacje dla danej partii.
- Niezużyte odczynniki i próbki biologiczne należy zutylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi i krajowymi przepisami.
- Nie używać probówek do pobierania krwi QF-CMV ani zestawów QF-CMV ELISA po upłynięciu ich daty ważności.
- Upewnić się, że wyposażenie laboratoryjne, takie jak płuczki do płytek i czytniki, zostało skalibrowane/zatwierdzone do użycia.

# Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami

## Probówki do pobierania krwi

- Probówki do pobierania krwi QF-CMV należy przechowywać w temperaturze 4–25°C.
- Probówki do pobierania krwi QF-CMV w momencie napełniania ich krwią powinny mieć temperaturę 17–25°C.
- Dopuszczalny okres magazynowania probówek do pobierania krwi QF-CMV wynosi maksymalnie 15 miesięcy od daty produkcji, w przypadku przechowywania ich w temperaturze 4–25°C.

## Odczynniki zestawu ELISA

- Zestaw należy przechowywać w temperaturze 2–8°C.
- Należy zawsze chronić roztwór substratu enzymu przed bezpośrednim światłem słonecznym.

## Zrekonstruowane i niezużyte odczynniki

Instrukcje dotyczące sposobu zrekonstruowania odczynników zawiera sekcja „Etap 2: Test QuantiFERON-CMV ELISA wydzielania ludzkiego IFN- $\gamma$ ” (kroki 3 i 5 na stronach 18 i 20).

- Zrekonstruowany wzorec ludzkiego IFN- $\gamma$  można przechowywać przez maksymalnie 3 miesiące w temperaturze 2–8°C.  
Należy zapisać datę zrekonstruowania wzorca ludzkiego IFN- $\gamma$ .
- Po zrekonstruowaniu niezużyty 100x stężony koncentrat koniugatu należy przechowywać w temperaturze 2–8°C i zużyć w ciągu 3 miesięcy.  
Należy zapisać datę rekonstrukcji koniugatu.
- Koniugat w stężeniu roboczym należy zużyć w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
- Bufor do płukania w stężeniu roboczym można przechowywać w temperaturze pokojowej (22°C  $\pm$  5°C) przez maksymalnie 2 tygodnie.

# Pobranie próbek i postępowanie z próbkami

W zestawie QF-CMV znajdują się następujące probówki do pobierania krwi:

- Probówka z kontrolą ujemną (szara zatyczka)
- Probówka z antygenem wirusa CMV (niebieska zatyczka)
- Probówka z mitogenem (fioletowa zatyczka)

Na wewnętrznej stronie probówek do pobierania krwi znajdują się liofilizowane antygeny, z tego względu kluczowe jest dokładne wymieszanie zawartości probówki z krwią. Probówki należy możliwie jak najszybciej przenieść do inkubatora ustawionego na temperaturę 37°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania próbek.

Aby uzyskać optymalne wyniki należy postępować zgodnie z następującą procedurą:

1. Od każdego pacjenta należy pobrać 1 ml krwi bezpośrednio do każdej probówki do pobierania krwi QF-CMV poprzez wkłucie dożylnie. Tę procedurę powinna wykonywać osoba przeszkolona w zakresie pobierania krwi z żył.

Probówek do pobierania krwi QF-CMV można używać na wysokościach do 810 metrów (2650 stóp).

W przypadku używania probówek do pobierania krwi QF-CMV na wysokościach powyżej 810 metrów lub w przypadku pobrania zbyt małej objętości krwi, można ją pobrać strzykawką i natychmiast przenieść po 1 ml do wszystkich trzech probówek. Ze względów bezpieczeństwa czynność tę najlepiej jest wykonać w następujący sposób: zdjąć igłę strzykawki i, przestrzegając odpowiednich procedur bezpieczeństwa, zdjąć zatyczki z trzech probówek QF-CMV, a następnie przelać po 1 ml krwi do każdej z nich (do czarnego znacznika po bocznej stronie etykiety). Szczelnie zamknąć probówki zatyczkami i wymieszać ich zawartość w opisany poniżej sposób. Probówki o pojemności 1 ml stosunkowo wolno napełniają się krwią, z tego względu po

zakończeniu napełniania probówki należy pozostawić probówkę na igle przez 2–3 sekundy, aby upewnić się, że pobrano odpowiednią objętość krwi.

Czarny znacznik umieszczony z boku probówek wskazuje objętość napełnienia równą 1 ml. Probówki do pobierania krwi QF-CMV zostały zwalidowane dla objętości z zakresu od 0,8 do 1,2 ml. Jeśli poziom krwi w którejkolwiek probówce nie jest blisko znacznika, należy pobrać nową próbkę krwi.

W przypadku wykorzystania igły motylkowej do pobrania krwi należy użyć probówki wstępnej, aby przed pobraniem krwi do probówek QF-CMV upewnić się, że rurka jest wypełniona krwią.

Można również pobrać krew do jednej, ogólnej probówki do pobierania krwi zawierającej heparynę litową jako antykoagulant, a następnie przenieść ją do probówek do pobierania krwi QF-CMV. Jako antykoagulantu krwi należy używać wyłącznie heparyny litowej, gdyż inne antykoagulanty zakłócają wyniki testu. Napełnić probówkę do pobierania krwi (minimalna objętość 5 ml) i delikatnie wymieszać jej zawartość, obracając probówkę kilka razy, aby rozpuścić heparynę. Tę procedurę powinna wykonywać osoba przeszkolona w zakresie pobierania krwi z żył. Przed przeniesieniem krwi do probówek do pobierania krwi QF-CMV w celu inkubacji należy utrzymywać ją w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Inkubację należy rozpocząć w ciągu 16 godzin od pobrania krwi.

2. Natychmiast po napełnieniu probówek do pobierania krwi QF-CMV należy potrząsnąć probówkami 10 razy, na tyle silnie, aby cała wewnętrzna powierzchnia była pokryta krwią. Umożliwia to rozpuszczenie antygenów, które znajdują się na ściankach probówek.

Podczas napełniania krwią probówki powinny mieć temperaturę 17–25°C.

Zbyt intensywne potrząsanie może uszkodzić żel i doprowadzić do otrzymania nieprawidłowych wyników.

W przypadku pobrania krwi do probówki z heparyną litową należy równomiernie rozmieszczać próbki przed rozdzieleniem ich do probówek do pobierania krwi QF-CMV.

---

Upewnić się, że krew została równomiernie wymieszana, delikatnie obracając probówkę przed rozdzieleniem próbek. Wlać porcję krwi o objętości 1 ml (po jednej na każdą probówkę do pobierania krwi QF-CMV) do odpowiednich probówek z kontrolą ujemną, antygenem CMV i mitogenem. Tę czynność należy wykonać w sposób aseptyczny, przestrzegając odpowiednich procedur bezpieczeństwa, zdejmując zatyczki z trzech probówek do pobierania krwi QF-CMV, a następnie dodając po 1 ml krwi do każdej probówki (do poziomego czarnego znacznika z boku etykiety). Dobrze zamknąć probówki zatyczkami i wymieszać ich zawartość w opisany powyżej sposób.

3. Prawidłowo oznaczyć probówki, naklejając na nie etykietę.

Upewnić się, że każdą probówkę (z kontrolą ujemną, antygenem CMV i mitogenem) można zidentyfikować na podstawie etykiety lub w inny sposób.

4. Po napełnieniu, wstrząśnięciu i oznaczeniu probówek należy możliwie jak najszybciej przenieść je do inkubatora ustawionego na temperaturę  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania krwi. Przed inkubacją należy przechowywać probówki w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Nie chłodzić i nie zamrażać próbek krwi.



# Procedura

## Etap 1: Inkubacja krwi i zbieranie osocza

1. Inkubować próbówki w pozycji PIONOWEJ w temperaturze  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  przez 16–24 godziny. Inkubator nie musi być wyposażony w atmosferę  $\text{CO}_2$  lub funkcję nawilżania.

**Ważne:** Jeśli krew nie zostanie poddana inkubacji niezwłocznie po pobraniu, przed inkubacją należy ponownie wymieszać zawartość próbówki, odwracając próbówkę 10 razy.

Po inkubacji, a przed zwirowaniem, próbówki do pobierania krwi można przechowywać w temperaturze  $4\text{--}27^{\circ}\text{C}$  przez maksymalnie 3 dni.

2. Po inkubacji próbek w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  próbki są wirowane przez 15 minut przy  $2000\text{--}3000$  RCF (g), aby ułatwić zebranie osocza. Czop żelowy oddzieli komórki od osocza. Jeśli tak się nie stanie, próbówki należy ponownie odwirować.

Możliwe jest zebranie osocza bez uprzedniego odwirowania próbek, jednak w takim przypadku należy zachować szczególną ostrożność, aby nie naruszyć komórek.

3. Po odwirowaniu i przed zebraniem osocza należy unikać pipetowania i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.

**Ważne:** Próbkę osocza należy zbierać wyłącznie za pomocą pipety.

Próbki osocza można przenieść bezpośrednio z próbek z odwirowaną krwią na płytkę ELISA testu QF-CMV, także w przypadku korzystania z automatycznych stacji roboczych ELISA.

Próbki osocza można przechowywać w próbkach do pobierania krwi poddanych wirowaniu przez maksymalnie 28 dni w temperaturze  $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$  lub, w przypadku zebranego osocza, w temperaturze poniżej  $-20^{\circ}\text{C}$  (najlepiej niższej niż  $-70^{\circ}\text{C}$ ) przez dłuższy czas.

W celu zapewnienia odpowiedniej objętości próbek badanych należy zebrać co najmniej  $150\ \mu\text{l}$  osocza.

## Etap 2: Test QuantiFERON-CMV ELISA wydzielania ludzkiego IFN- $\gamma$

Informacje na temat materiałów wymaganych do przeprowadzenia testu ELISA zostały zamieszczone w sekcji „Zawartość zestawu” na stronie 9 oraz w sekcji „Materiały wymagane, ale niedostarczone” na stronie 10.

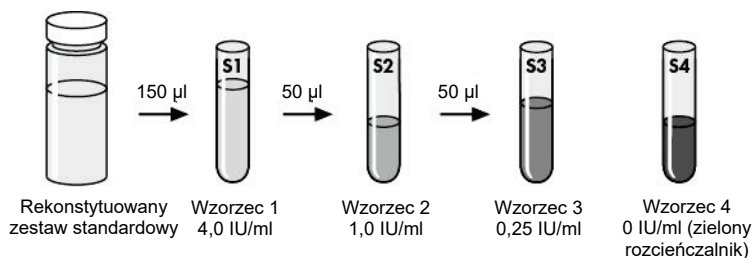
1. Przed użyciem wszystkie próbki osocza i odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). W tym celu należy odczekać co najmniej 60 minut.
2. Wyjąć z ramki zbędne paski płytki ELISA, zamknąć w torebce foliowej i włożyć do lodówki w celu przechowywania ich do momentu, gdy ponownie będą potrzebne. Pozostawić co najmniej jeden pasek dla wzorca QF-CMV ELISA oraz liczbę pasków odpowiednią do liczby badanych pacjentów. Po użyciu należy zachować ramkę i pokrywę do ponownego użycia z pozostałymi paskami.
3. Zrekonstruować wzorec ludzkiego IFN- $\gamma$ , dodając objętość wody dejonizowanej lub destylowanej określonej na etykiecie fiołki. Delikatnie wymieszać zawartość fiołki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie odczynnika. Zrekonstruowanie wzorca IFN- $\gamma$  odpowiednią objętością wody spowoduje otrzymanie roztworu o stężeniu 8,0 IU/ml.

**Uwaga:** Objętość rekonstrukcji wzorca ludzkiego IFN- $\gamma$  (wzorec zestawu) różni się między partiami.

Korzystając ze zrekonstruowanego wzorca, przygotować serię rozcieńczeń o czterech stężeniach IFN- $\gamma$  za pomocą zielonego rozcieńczalnika (Green Diluent, GD) (Rysunek 1, na kolejnej stronie). S1 (wzorec 1) ma stężenie 4,0 IU/ml, S2 (wzorec 2) ma stężenie 1,0 IU/ml, S3 (wzorec 3) ma stężenie 0,25 IU/ml, a S4 (wzorec 4) ma stężenie 0 IU/ml (sam GD). Wzorce należy oznaczyć w przynajmniej dwóch powtórzeniach. Dla każdej serii testu ELISA należy przygotowywać świeże rozcieńczenia wzorca zestawu.

### Przykładowa procedura przygotowania dwóch powtórzeń wzorców

Przykładowa procedura przygotowania dwóch powtórzeń wzorców	
A	Oznaczyć cztery probówki: S1, S2, S3, S4
B	Dodać po 150 $\mu$ l GD do probówek S1, S2, S3, S4
C	Dodać 150 $\mu$ l wzorca zestawu do probówki S1 i dokładnie wymieszać
D	Przenieść 50 $\mu$ l roztworu z probówki S1 do probówki S2 i dokładnie wymieszać
E	Przenieść 50 $\mu$ l roztworu z probówki S2 do probówki S3 i dokładnie wymieszać
F	Sam GD służy jako wzorec zerowy (S4)



Rysunek 1. Przygotowanie krzywej wzorcowej metodą seryjnych rozcieńczeń.

4. Zrekonstruować liofilizowany 100x stężony koncentrat koniugatu, dodając 0,3 ml dejonizowanej lub destylowanej wody. Delikatnie wymieszać zawartość fiołki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie koniugatu.

Stężenie robocze koniugatu jest przygotowywane poprzez rozcieńczenie zielonym rozcieńczalnikiem wymaganej ilości zrekonstruowanego 100x stężonego koncentratu koniugatu (patrz Tabela 1 na kolejnej stronie).

Wymieszać dokładnie, ale delikatnie, aby uniknąć spieniania.

Nieużyty 100x stężony koncentrat koniugatu należy przenieść do temperatury 2–8°C niezwłocznie po użyciu.

Używać wyłącznie zielonego rozcieńczalnika.

Tabela 1. Przygotowywanie stężenia roboczego koniugatu

Liczba pasków	Objętość 100x stężonego koncentratu koniugatu	Objętość zielonego rozcieńczalnika
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Próbkę osocza zebrane z próbek do pobierania krwi, a następnie zamrożone lub przechowywane dłużej niż 24 godziny przed wykonaniem testu należy dokładnie wymieszać przed dodaniem ich do studzienki na płytce ELISA.

**Ważne:** W przypadku dodawania próbek osocza bezpośrednio z odwirowanych próbek do pobierania krwi QF-CMV należy unikać mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.

6. Jeśli wymagane są wyniki ilościowe, rozcieńczyć osocza znajdujące się w próbce z CMV i mitogenem w stosunku 1/10, używając zielonego rozcieńczalnika (10 µl osocza + 90 µl GD). Nie należy rozcieńczać osocza, które znajduje się w próbce z kontrolą ujemną.

Zaleca się równoległe testowanie następujących próbek:

próbka w próbce z kontrolą ujemną, z antygenem CMV, mitogenem, antygenem CMV (1/10), mitogenem (1/10)

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

próbka w próbówce z kontrolą ujemną, z antygenem CMV, z mitogenem,

próbka w próbówce z kontrolą ujemną, z antygenem CMV (1/10), mitogenem (1/10),

próbka w próbówce z kontrolą ujemną, z antygenem CMV, mitogenem, antygenem CMV (1/10),

próbka w próbówce z kontrolą ujemną, z antygenem CMV (1/10), mitogenem.

7. Używając pipety wielokanałowej, dodać po 50 µl świeżo przygotowanego koniugatu w stężeniu roboczym do odpowiednich studzienek na płytce ELISA.
8. Dodać po 50 µl badanych próbek osocza do odpowiednich studzienek. Na końcu dodać po 50 µl wzorców od 1 do 4 do odpowiednich studzienek. Wzorce należy oznaczyć w przynajmniej dwóch powtórzeniach.
9. Przykryć płytkę ELISA i dokładnie mieszać roztwór koniugatu z próbkami osocza/wzorcami na wytrząsarce do mikropłytek przez 1 minutę przy od 500 do 1000 obr./min. Unikać rozbryzgiwania.
10. Przykryć płytkę ELISA i inkubować ją w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) przez  $120 \pm 5$  minut.  
  
Podczas inkubacji nie należy narażać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego. Odchylenie od określonego zakresu temperatury może spowodować otrzymanie nieprawidłowych wyników.
11. Podczas inkubacji należy przygotować stężenie robocze buforu do płukania. Rozcieńczyć jedną obj. 20x stężonego buforu do płukania, dodając 19 obj. dejonizowanej lub destylowanej wody, a następnie dokładnie wymieszać. Dostarczona objętość 20x stężonego buforu do płukania wystarcza do przygotowania 2 litrów buforu do płukania w stężeniu roboczym.
12. Po zakończeniu inkubacji płytki ELISA przepłukać studzienki, używając 400 µl buforu do płukania w stężeniu roboczym, wykonując co najmniej sześć cykli płukania. Zalecane jest używanie płuczki automatycznej.

---

**Ważne:** Dokładne przepłukanie studzienek ma bardzo duży wpływ na wydajność oznaczenia. Podczas każdego cyklu płukania należy upewnić się, czy studzienki są całkowicie wypełnione buforem do płukania. Między cyklami zalecane jest pozostawienie płytki do odcieknięcia na 5 sekund.

Do zbiornika na ścieki należy dodać standardowy laboratoryjny środek dezynfekujący. Należy przestrzegać obowiązujących procedur w zakresie odkażania potencjalnie zakaźnego materiału.

13. Położyć płytki skierowane górną częścią w dół na papierowym ręczniku niepozostawiającym kłaczków, aby usunąć resztki buforu do płukania. Dodać po 100  $\mu$ l roztworu substratu enzymu do każdej studzienki, przykryć płytkę pokrywką i dokładnie mieszać na wyrząsarce do mikroplatek przez 1 minutę przy od 500 do 1000 obr./min.

14. Przykryć wszystkie płytki i inkubować w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) przez 30 minut.

Podczas inkubacji nie należy narażać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

15. Po 30-minutowej inkubacji dodać po 50  $\mu$ l roztworu zatrzymującego reakcję enzymatyczną do każdej studzienki, w takiej samej kolejności, w jakiej dodawano substrat, a następnie mieszać na wyrząsarce do mikroplatek przez 1 minutę przy od 500 do 1000 obr./min.

16. W ciągu 5 minut od zatrzymania reakcji zmierzyć gęstość optyczną (Optical Density, OD) roztworu w każdej studzience, używając czytnika mikroplatek wyposażonego w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm. Wartości OD są używane do obliczenia wyników.

# Obliczenia i interpretacja wyników testu

Oprogramowanie do analizy QuantiFERON-CMV służące do analizy danych pierwotnych i obliczania wyników jest dostępne w witrynie firmy QIAGEN pod adresem **www.QuantiFERON.com**. Należy upewnić się, że używana jest najnowsza wersja oprogramowania do analizy QF-CMV.

Oprogramowanie wykonuje kontrolę jakości oznaczenia, tworzy krzywą wzorcową oraz podaje wynik testu dla każdego pacjenta, co opisano w sekcji „Interpretacja wyników” na stronie 25. Oprogramowanie raportuje najniższe rozcieńczenie, dla którego, po uwzględnieniu współczynnika rozcieńczenia, został wygenerowany wynik mieszczący się w zakresie testu ELISA QF-CMV.

Zamiast korzystania z oprogramowania do analizy QF-CMV wyniki można również uzyskać następującą metodą.

## Utworzenie krzywej wzorcowej (jeśli nie jest używane oprogramowanie analityczne QF-CMV)

Określić średnie wartości OD dla powtórzeń wzorca zestawu znajdujących się na każdej płycie.

Wyznaczyć krzywą wzorcową  $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ , wykreślając  $\log_{(e)}$  ze średniej wartości OD (oś y) względem  $\log_{(e)}$  ze stężenia wzorca IFN- $\gamma$  wyrażonego w IU/ml (oś x), pomijając w tych obliczeniach wzorzec zerowy. Obliczyć parametry prostej o najlepszym dopasowaniu do krzywej wzorcowej, stosując analizę metodą regresji.

Na podstawie krzywej wzorcowej określić stężenie IFN- $\gamma$  (IU/ml) dla każdej badanej próbki osocza, korzystając z wartości OD próbek.

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

Należy raportować wynik najniższego rozcieńczenia, dla którego został wygenerowany wynik mieszczący się w zakresie testu ELISA QF-CMV. Należy upewnić się, że tam gdzie było to konieczne, uwzględniono współczynnik rozcieńczenia.

## Kontrola jakości testu

Dokładność wyników testu zależy od utworzenia dokładnej krzywej wzorcowej. W związku z tym przed interpretacją wyników próbek badanych należy sprawdzić wyniki otrzymane dla próbek wzorcowych.

Aby test ELISA był ważny:

- Średnia wartość OD wzorca 1 musi być  $\geq 0,600$ ;
- %CV wartości OD uzyskanych dla powtórzeń wzorca 1 i 2 musi być  $< 15\%$ ;
- Wartości OD uzyskane dla powtórzeń wzorca 3 i 4 nie mogą różnić się od ich średniej o więcej niż 0,040 jednostki gęstości optycznej;
- Współczynnik korelacji (r) obliczony na podstawie średnich wartości absorbancji wzorców musi być  $\geq 0,98$ .

Oprogramowanie do analizy QF-CMV oblicza i raportuje te parametry kontroli jakości. Jeśli nie są spełnione powyższe kryteria, test nie jest ważny i należy go powtórzyć.

Średnia wartość OD dla wzorca zerowego (zielony rozcieńczalnik) powinna być  $\leq 0,150$ . Jeśli średnia wartość OD jest  $> 0,150$ , należy sprawdzić, czy procedura płukania płytki została wykonana poprawnie.



# Interpretacja wyników

Wyniki testu QuantiFERON-CMV są interpretowane zgodnie z kryteriami przedstawionymi w tabeli Tabela 2.

**Tabela 2. Interpretacja wyników testu QuantiFERON-CMV**

Wynik dla kontroli ujemnej (IU/ml)	Wynik dla próbki z CMV minus wynik dla kontroli ujemnej (IU/ml)	Wynik dla próbki z mitogenem minus wynik dla kontroli ujemnej (IU/ml)*	Wynik testu QF-CMV	Raport/interpretacja
≤8,0	≥0,20 i ≥25% kontroli ujemnej	Dowolny	Reaktywny <sup>†</sup>	Wykryta odporność na wirusa CMV
	<0,20 <b>LUB</b> ≥0,20 i <25% kontroli ujemnej	≥0,5	Niereaktywny	NIE wykryto odporności na wirusa CMV
>8,0 <sup>§</sup>	Dowolny	<0,5	Wynik nieokreślony <sup>‡</sup>	Wyniki odpowiedzi na wirusa CMV są nieokreślone
		Dowolny	Wynik nieokreślony <sup>‡</sup>	Wyniki odpowiedzi na wirusa CMV są nieokreślone

\* Wyniki odpowiedzi na kontrolę dodatnią zawierającą mitogen (i czasem na próbkę z antygenami wirusa CMV) mogą często wykraczać poza zakres odczytu czynnika mikroptytek. Nie ma to wpływu na wyniki testu.

<sup>†</sup> Jeśli zakażenie cytomegalowirusem nie jest podejrzewane, a uzyskano wstępne wyniki dodatnie, można je potwierdzić, ponownie badając oryginalne próbki osocza w dwóch powtórzeniach za pomocą testu QF-CMV ELISA. Jeśli wynik jednego lub obu powtórzeń jest dodatni, należy uznać, że próbka pacjenta jest reaktywna.

<sup>‡</sup> Informacje na temat możliwych przyczyn zostały zamieszczone w sekcji „Przewodnik rozwiązywania problemów” (strona 41).

W badaniach klinicznych (1) wykazano, że wyniki nieokreślone raportowane wśród pacjentów po przeszczepie narządów litych, gdy dawca był CMV-reaktywny, ale dla kontroli dodatniej, mitogenu, uzyskano wartość niższą niż 0,5 IU/ml, były istotne klinicznie. Tacy pacjenci są obciążeni najwyższym ryzykiem rozwoju cytomegalii.

<sup>§</sup> W badaniach klinicznych u mniej niż 0,25% pacjentów zaraportowano stężenie IFN- $\gamma$  >8,0 IU/ml dla kontroli ujemnej.

**Uwaga:** Podczas oceny odpowiedzi układu immunologicznego na antygeny wirusa CMV ze zmierzonego stężenia IFN- $\gamma$  należy korzystać w kontekście stanu klinicznego, historii medycznej oraz wyników innych badań diagnostycznych pacjenta. Test QF-CMV nie jest przeznaczony do wykrywania zakażenia wirusem CMV i nie powinien być wykorzystywany do wykluczenia zakażenia wirusem CMV.

# Ograniczenia

Z wyników testów QuantiFERON-CMV należy korzystać w kontekście historii epidemiologicznej, obecnego stanu klinicznego oraz wyników innych badań diagnostycznych pacjenta.

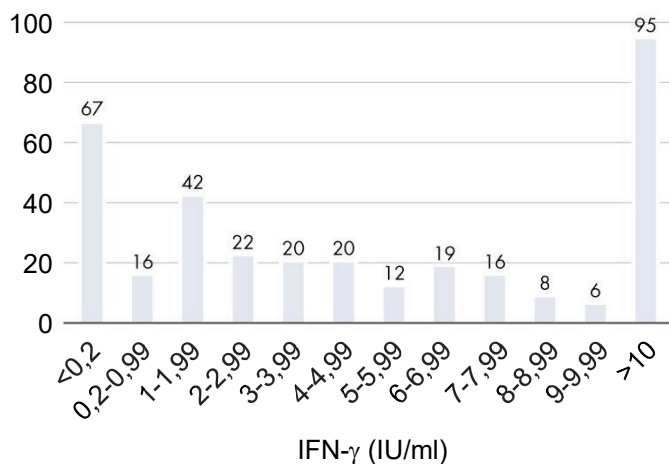
Niepewne lub nieokreślone wyniki mogą być spowodowane:

- odstępstwem od procedury opisanej w ulotce dołączonej do opakowania testu QuantiFERON-CMV ELISA;
- zbyt wysokim stężeniem IFN- $\gamma$  w próbce kontrolnej;
- przekroczeniem 16 godzin między pobraniem próbki krwi a inkubacją w temperaturze 37°C.

# Wartości oczekiwane

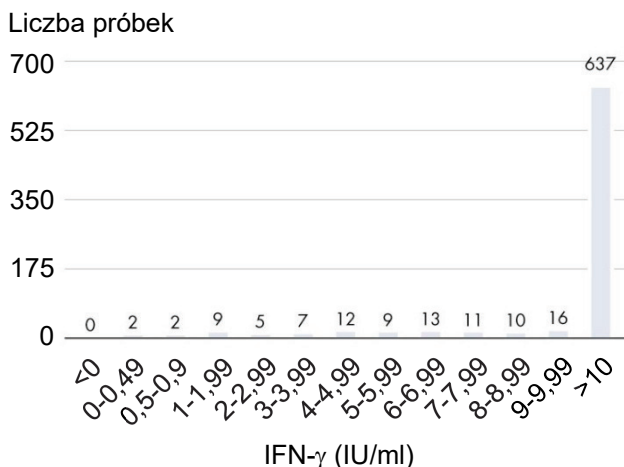
Oczekiwane wartości IFN- $\gamma$  uzyskano badając 591 próbek pobranych od zdrowych osób za pomocą testu QuantiFERON-CMV. Dla 343 próbek uzyskano wynik seropozytywny na obecność przeciwciał anti-CMV IgG, a dla 248 próbek wynik seronegatywny. Status serologiczny względem wirusa CMV był nieznanym w momencie wykonywania testu QF-CMV. Wśród 248 próbek pobranych od pacjentów CMV-seronegatywnych, dla 100% (248/248) testowanych próbek uzyskano wynik niereaktywny w teście QF-CMV ELISA, dając odpowiedź IFN- $\gamma$  w próbce z antygenem CMV na poziomie  $<0,2$  IU/ml (po odjęciu kontroli ujemnej). Na rysunku (Rysunek 2) przedstawiono rozkład odpowiedzi IFN- $\gamma$  w próbce z antygenem CMV (po odjęciu kontroli ujemnej) dla 343 pacjentów CMV-seropozytywnych.

Liczba próbek



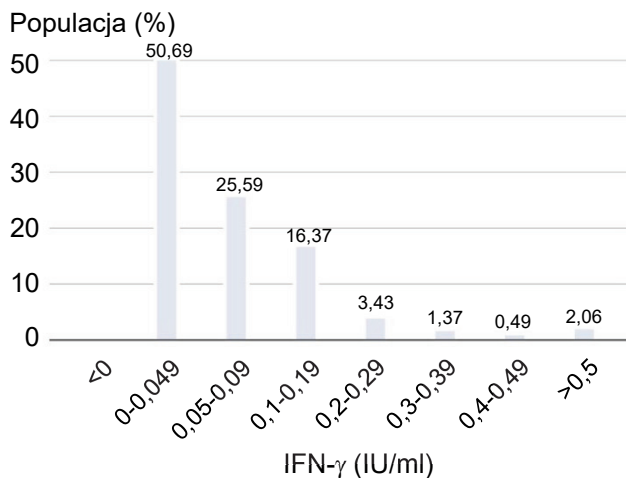
**Rysunek 2. Rozkład odpowiedzi QF-CMV IFN- $\gamma$  (po odjęciu kontroli ujemnej) u zdrowych seropozytywnych pacjentów (n=343).**

Rozkład odpowiedzi IFN- $\gamma$  na mitogen (po odjęciu kontroli ujemnej) określono za pomocą 733 próbek pobranych od zdrowych dorosłych osób, używając testu QF-CMV ELISA, niezależnie od wyniku badania serologicznego na obecność przeciwciał anty-CMV IgG (Rysunek 3). Wynik uzyskany w próbce z mitogenem (po odjęciu kontroli ujemnej) niższy niż 0,5 IU/ml wskazuje na błąd testu lub oznacza, że pacjent ma obniżoną odporność. U zdrowej populacji jedynie 2 z 733 wyników zaliczono do tej kategorii.



Rysunek 3. Rozkład odpowiedzi IFN-γ na mitogen (po odjęciu kontroli ujemnej) u zdrowych osób (n=733).

Rozkład odpowiedzi IFN-γ w próbce z kontrolą ujemną określono za pomocą 1020 próbek osocza pobranych od zdrowych osób, używając testu QF-CMV ELISA, niezależnie od wyniku badania serologicznego na obecność przeciwciał anti-CMV IgG (Rysunek 4).



Rysunek 4. Rozkład odpowiedzi IFN-γ w próbce z kontrolą ujemną u zdrowych osób (n=1020) wyrażony jako odsetek populacji.

# Charakterystyka działania testu

## Wydajność kliniczna

Próg wykrywalności wcześniejszej ekspozycji na wirusa CMV ustalono na podstawie analizy wyników otrzymanych dla grupy zdrowych osób (n=223), w której porównano wyniki uzyskane za pomocą testu QF-CMV z wynikami badań serologicznych na obecność przeciwciał anty-CMV IgG. Za pomocą analizy ROC określono, że próg testu równy 0,04 IU/ml (po odjęciu kontroli ujemnej) zapewniał optymalne dodatnie i ujemne wartości predykcyjne dla testu QF-CMV (obszar pod krzywą = 0,9679 [95%CI: 0,9442–0,9915, p<0,0001]) i z tego względu odzwierciedlał próg, przy którym test był najbardziej skuteczny u zdrowej populacji.

Wydajność testu QF-CMV porównano z testem serologicznym na obecność przeciwciał anty-CMV IgG SeraQuest™ (Quest International). Test QF-CMV był zgodny z porównawczym testem serologicznym na obecność przeciwciał anty-CMV IgG wykonywanym u zdrowych osób na poziomie 95% (u 294 spośród 310 osób). Dla żadnego ze 149 seronegatywnych dawców nie otrzymano wyniku reaktywnego w teście QF-CMV. Dla 145 spośród 161 seropozytywnych dawców otrzymano odpowiedź reaktywną w teście QF-CMV. Ogólna zgodność dodatnich wyników wynosiła 90%, natomiast zgodność ujemnych wyników 100%. W tabeli Tabela 3 przedstawiono poziom zgodności wyników otrzymanych dla zdrowych dawców między odpowiedziami w teście QF-CMV oraz serologicznym statusem w badaniu na obecność przeciwciał anty-CMV IgG.

**Tabela 3. Zgodność pomiędzy testem QuantiFERON-CMV a testem serologicznym na obecność przeciwciał anty-CMV IgG u zdrowych osób**

		Badanie serologiczne CMV		Łącznie
		Dodatni	Ujemny	
QuantiFERON-CMV	Reaktywny	145	0	<b>145 (46,8%)</b>
	Niereaktywny	16	149	<b>165 (53,2%)</b>
	Łącznie	<b>161 (51,9%)</b>	<b>149 (48,1%)</b>	<b>310 (100%)</b>

## Próg testu

Zalecany próg tego testu w zastosowaniach klinicznych wynosi 0,2 IU/ml dla próbki z antygenem CMV (po odjęciu kontroli ujemnej), jednak w różnych środowiskach klinicznych można zwalidować różne wartości progów.

## Badania kliniczne

W związku z brakiem standardowej metody potwierdzającej lub wykluczającej zakażenie cytomegalowirusem nie można ocenić czułości i swoistości diagnostycznej testu QF-CMV w praktyce. Swoistość i czułość diagnostyczną testu QF-CMV oszacowano poprzez ocenę poziomu zgodności między odpowiedzią uzyskaną w teście QF-CMV oraz statusem serologicznym określonym w badaniu na obecność przeciwciał anti-CMV IgG u zdrowych osób.

Swoistość testu QF-CMV oszacowano, oceniając wskaźnik wyników fałszywie dodatnich (reaktywna odpowiedź w teście QF-CMV) w próbkach pobranych od zdrowych dawców bez historii ekspozycji na wirusa CMV (osób CMV-seronegatywnych). Czułość oszacowano, oceniając odpowiedź uzyskaną w teście QF-CMV dla próbek pobranych od zdrowych dawców z zarejestrowaną wcześniejszą ekspozycją na wirusa CMV (osób CMV-seropozytywnych). Test QF-CMV wykorzystuje dużą liczbę epitopów swoistych dla wirusa CMV, pochodzących z różnych białek wirusa CMV. W związku z tym uwzględnia szerokie spektrum zróżnicowanych haplotypów HLA klasy I występujących w populacji (około 98% populacji). W związku z tym, że nie były znane haplotypy HLA pacjentów, u których wykonywane były badania serologiczne na obecność wirusa CMV, oczekiwano, że niewielki odsetek próbek pobranych od osób seropozytywnych nie będzie dawać odpowiedzi w próbkach do pobierania krwi QF-CMV.

## Swoistość

W badaniu obejmującym 591 próbek pobranych od zdrowych osób nie zarejestrowano fałszywie dodatnich wyników testu QF-CMV u osób CMV-seronegatywnych. Dla 248 z 248 badanych próbek uzyskano wynik niereaktywny w teście QF-CMV ELISA i ujemny w teście serologicznym na obecność przeciwciał anti-CMV IgG. W związku z tym uzyskano 100-procentową zgodność wyników uzyskanych za pomocą testu QF-CMV z wynikami testu serologicznego na obecność przeciwciał anti-CMV IgG.

We wszystkich pozostałych ocenach swoistości przeprowadzonych u biorców narządów litych (1–8), biorców hematopoetycznych komórek macierzystych (9,10) oraz pacjentów zarażonych wirusem HIV (11) poziom zgodności wyników testu QF-CMV z wynikami badania na obecność przeciwciał anti-CMV IgG również wynosił 100%.

## Czułość

W badaniu przeprowadzonym na 343 próbkach pobranych od zdrowych osób, u których wykonano badanie serologiczne na obecność przeciwciał anti-CMV IgG i uzyskano wynik seropozytywny poziom zgodności odpowiedzi w teście QF-CMV z wynikami badania serologicznego wyniósł 80,5%, gdzie dla 276 z 343 przetestowanych próbek uzyskano wynik reaktywny w teście QF-CMV i dodatni w badaniu serologicznym. Zaobserwowana niezgodność może być spowodowana wynikami fałszywie dodatnimi badania serologicznego oraz brakiem reaktywnych typów HLA u badanych osób.

Wykazano, że poziomy zgodności w ocenach czułości przeprowadzonych u biorców narządów litych (1–8), biorców hematopoetycznych komórek macierzystych (9, 10) oraz pacjentów zakażonych wirusem HIV (11) są niższe, co może wynikać z fałszywie dodatnich wyników badania serologicznego, braku reaktywnych typów HLA u badanych osób albo braku reaktywnych komórek T u takich pacjentów z powodu immunosupresji.

---

## Badania podkreślające użyteczność kliniczną

Celem badania serologicznego na obecność przeciwciał anty-CMV IgG, jak i testu QF-CMV jest wykrycie odporności na wirusa CMV. W przypadku przeszczepów badanie serologiczne CMV jest powszechnie wykonywane przed przeszczepem w celu określenia ryzyka powikłań spowodowanych wirusem CMV występujących po przeszczepie u biorcy. Badanie to jednak ma ograniczoną wartość w okresie po przeszczepie. Możliwe jest również wykonywanie testu QF-CMV u biorców przeszczepów w celu oceny poziomu odporności na wirusa CMV u pacjentów obarczonych ryzykiem rozwoju objawowego zakażenia i/lub cytomegalii w związku z leczeniem immunosupresyjnym (12–15).

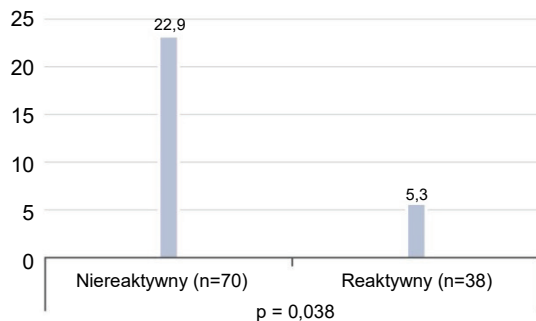
Szereg opublikowanych badań klinicznych dotyczących różnych grup osób po przeszczepie wykazał użyteczność testu QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

W ramach dużego badania, w którym brało udział 108 biorców narządów litych (4), u pacjentów z reaktywnym wynikiem testu QF-CMV po zakończeniu leczenia profilaktycznego przeciwko wirusowi CMV występował znacznie niższy odsetek rozwoju cytomegalii (3,3% lub 1/30 przy zastosowaniu progu 0,2 IU/ml) w porównaniu do pacjentów, dla których uzyskano niereaktywny wynik w teście QF-CMV (21,8% lub 17/78  $p=0,044$ ) (Rysunek 5).

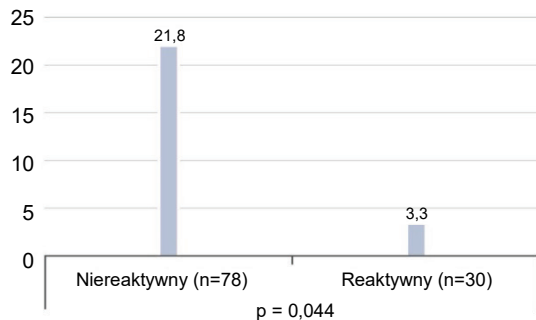


**A**

Częstość późniejszego występowania choroby CMV (%)

Choroba CMI po zakończeniu profilaktyki (IFN- $\gamma$  IU/ml)  
Wartość graniczna 0,1 IU/ml**B**

Częstość późniejszego występowania choroby CMV (%)

Choroba CMI po zakończeniu profilaktyki (IFN- $\gamma$  IU/ml)  
Wartość graniczna 0,2 IU/ml

**Rysunek 5. Porównanie ryzyka późnego rozwoju cytomegalii u pacjentów z reaktywnym wynikiem w teście QuantiFERON-CMV w stosunku do pacjentów z niereaktywnym wynikiem w teście QuantiFERON-CMV po zakończeniu leczenia profilaktycznego. Dane bazowe pochodzące z publikacji Kumara i wsp. (4).**

---

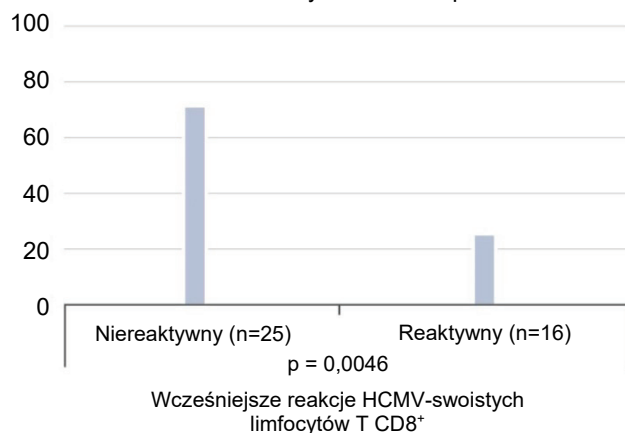
Ponadto u CMV-seronegatywnych biorców przeszczepianych narządów, którzy otrzymali narząd od CMV-pozytywnego dawcy (D+R-), dla którego próbki uzyskano wynik reaktywny w teście QF-CMV, po zakończeniu leczenia profilaktycznego w większej liczbie przypadków nie stwierdzano obecności wirusa CMV przez dłuższy okres, co wskazuje na to, że test QF-CMV można stosować do identyfikacji osób zagrożonych późnym rozwojem cytomegalii.

To badanie pokazało także, że w tej grupie pacjentów po przeszczepie, odznaczającej się najwyższym ryzykiem rozwoju cytomegalii (D+/R-), uzyskanie reaktywnego wyniku w teście CMV w dowolnym momencie po zakończeniu leczenia profilaktycznego było powiązane z większą szansą na dalszy brak rozwoju cytomegalii.

W badaniu 37 pacjentów po przeszczepach narządów litych (6) ocena odpowiedzi komórek T CD8<sup>+</sup> CMV swoistych za pomocą testu QF-CMV wspomogła przewidywanie spontanicznego usunięcia wirusa w porównaniu do postępowania cytomegalii, następującego po wzroście wiremii wirusa CMV. W tym badaniu wśród 24 z 26 pacjentów (92,3%) z reaktywnym wynikiem testu QF-CMV (przy użyciu wartości progowej testu IFN- $\gamma$   $\geq 0,2$  IU/ml) wystąpiło spontaniczne usunięcie wirusa CMV, natomiast u pacjentów z niereaktywnym wynikiem testu QF-CMV taki sam skutek zaobserwowano jedynie u 5 z 11 pacjentów (45,5%).

W ramach badania 67 biorców płuc dokonano oceny epizodów wiremii po przeszczepie (7). Zaobserwowano, że 18 spośród 25 (72%) epizodów wiremii CMV było poprzedzonych niereaktywnym wynikiem testu QF-CMV, natomiast 4 spośród 16 epizodów (25%) było poprzedzone reaktywnym wynikiem testu QF-CMV (dokładny test Fishera,  $p=0,0046$ ; Rysunek 6).

% wystąpienia DNAemii spowodowanej wirusem HCMV z ładunkiem wirusowym > 1000 kopii/ml



**Rysunek 6. Analiza statystyczna odpowiedzi komórek T CD8<sup>+</sup> CMV swoistych wykrywanych przez test QuantiFERON-CMV i rozwoju wirerii CMV (dokładny test Fishera, p=0,0046).** Dane bazowe pochodzące z publikacji Weseslindtnera i wsp. (7).

W ramach dużego wielośrodkowego badania prospektywnego przebadano 127 dawców CMV-seronegatywnych, CMV-seronegatywnych biorców narządów litych (8), zapewniając każdemu z nich profilaktyczne leczenie antywirusowe. U pacjentów z reaktywnym wynikiem testu QF-CMV (stosując próg testu 0,1 IU/ml) w dowolnym punkcie czasowym po zakończeniu leczenia profilaktycznego przeciwko wirusowi CMV wykazano istotnie niższą częstość występowania późnego ataku choroby w ciągu 12 miesięcy od przeszczepu (6,4%) w porównaniu z osobami, dla których otrzymano niereaktywny wynik w teście QF-CMV (22,2%) i wynik nieokreślony (58,3%,  $p < 0,001$ ). Podczas klasyfikacji nieokreślonych wyników jako „niereaktywnych” częstość późniejszego rozwoju cytomegalii wyniosła odpowiednio 6,4% i 26,8% przy  $p = 0,024$ . Predykcyjne wartości dodatnie i ujemne testu QF-CMV pod względem ochrony przed cytomegalią wyniosły odpowiednio 0,90 (przy przedziale ufności 95%: 0,74–0,98) oraz 0,27 (przy przedziale ufności 95%: 0,18–0,37). W ramach tego badania dowiedziono, że test QF-CMV może być skuteczny w prognozowaniu ryzyka rozwoju choroby CMV po leczeniu profilaktycznym.

---

W prospektywnym badaniu 55 biorców narządów litych (8), w ramach którego zbadano związek pomiędzy wynikami testu QF-CMV przed przeszczepem i replikacją wirusa CMV po przeszczepie, odkryto, że replikacja CMV po przeszczepie częściej występuje u biorców CMV-seropozytywnych, dla których przed przeszczepem uzyskano wynik niereaktywny (przy zastosowaniu wartości progowej testu 0,2 IU/ml) w teście QF-CMV (7 z 14 biorców, 50%) niż u biorców CMV-seropozytywnych, dla których przed przeszczepem uzyskano wynik niereaktywny (4 z 30, 13,3%,  $p=0,021$ ).

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

Na całym świecie ukończono także szereg badań (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) lub trwają prace nad wykrywaniem odpowiedzi komórek T CD8<sup>+</sup> CMV swoistych za pomocą testu QF-CMV w grupie biorców organów.

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

Znaczenie monitorowania CMV-swoistej odpowiedzi immunologicznej zostało uznane i opisane w artykule *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Międzynarodowe wytyczne w zakresie leczenia zakażenia cytomegalowirusem w przypadku przeszczepów narządów litych) (12). Te międzynarodowe wytyczne opracowane przez panel specjalistów w dziedzinie wirusa CMV i przeszczepów organów litych, powołany przez organizację The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society (Sekcja Chorób Zakaźnych Towarzystwa Transplantacyjnego), odzwierciedlają powstałe w oparciu o opinie specjalistów wytyczne w zakresie zarządzania wirusem CMV, w tym: diagnostykę, immunologię, profilaktykę i leczenie.

Wytyczne są zakończone wnioskiem: „monitorowanie odpowiedzi immunologicznej komórek T CMV swoistych może umożliwić przewidzenie ryzyka rozwoju cytomegalii po przeszczepie i może być użyteczne w planowaniu leczenia profilaktycznego i terapii wyprzedzających” (12).

Ponadto wytyczne zawierają zalecenia dotyczące cech idealnego oznaczenia monitorującego działanie układu immunologicznego, do których należy:

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

Test QF-CMV spełnia wszystkie kryteria określone w tych wytycznych i stanowi jedyny znormalizowany test monitorujący działanie układu immunologicznego za pomocą którego można wykrywać IFN- $\gamma$  swoisty dla wirusa CMV.

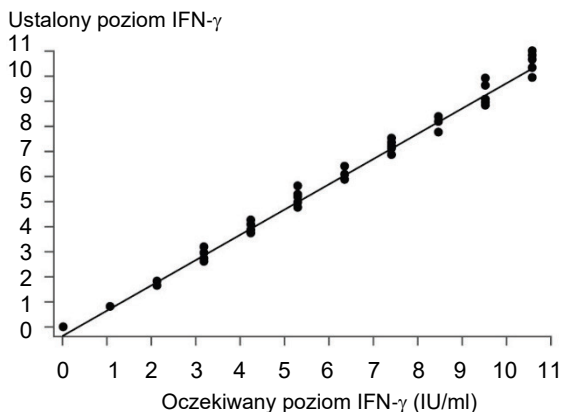
# Charakterystyka działania testu

W teście QF-CMV ELISA wykorzystywany jest wzorzec rekombinowanego ludzkiego IFN- $\gamma$ , który oceniano w odniesieniu do referencyjnego preparatu IFN- $\gamma$  (nr ref. NIH: Gxg01-902-535). Wyniki próbek testowych są podawane w jednostkach międzynarodowych (International Units, IU) w odniesieniu do krzywej wzorcowej przygotowanej poprzez przetestowanie rozcieńczeń drugorzędowego wzorca dostarczonego razem z zestawem.

Znany jest zakłócający wpływ na testy immunologiczne przeciwciał heterofilnych (np. ludzkich przeciwciał anty-mysich), które występują w surowicy lub osoczu niektórych osób. Wpływ przeciwciał heterofilnych na test QF-CMV ELISA można zminimalizować, dodając prawidłową surowicę mysia do zielonego rozcieńczalnika i wykorzystując fragmenty F(ab')<sub>2</sub> przeciwciała monoklonalnego jako przeciwciała wychwytyjące IFN $\gamma$ , którymi opłaszczono są studzienki mikro płytki.

Próg wykrywalności testu QF-CMV ELISA wynosi 0,065 IU/ml. Nie wykazano występowania efektu haka (wysokiej dawki; zjawiska prozona) przy stężeniu IFN- $\gamma$  do 10 000 IU/ml. Wykazano, że przeciwciała wykorzystywane w teście QF-CMV ELISA nie reagują krzyżowo z badanymi cytokinami, w tym z IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 i IL12.

Liniowość testu QF-CMV ELISA wykazano poprzez losowe naniesienie na płytkę ELISA 5 powtórzeń 11 puł osocza o znanym stężeniu IFN- $\gamma$ . Prosta regresji liniowej ma nachylenie równe  $1,002 \pm 0,011$  i współczynnik korelacji wynoszący 0,99 (rysunek 7).



**Rysunek 7. Profil liniowości testu QF-CMV ELISA określono na podstawie przebadania pięciu powtórzeń 11 próbek osocza o znanych stężeniach IFN- $\gamma$ .**

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

Niedokładność wewnątrz serii lub wewnątrz testu oszacowano poprzez wyznaczenie średniego współczynnika zmienności wyrażonego w % (%CV) dla każdej serii płytek (n=9) z badanymi osoczami zawierającymi IFN- $\gamma$ . Poziom niedokładności wahał się od 4,1 do 9,1 %CV. Średni %CV wewnątrz serii ( $\pm 95\%$  CI) wyniósł  $6,6 \pm 0,6\%$ . Współczynnik zmienności wzorca zerowego IFN- $\gamma$  wyniósł średnio 14,1 %CV.

Niedokładność całkowitą lub pomiędzy oznaczeniami określono, porównując 27 obliczonych stężeń IFN- $\gamma$  dla każdej próbki osocza. Współczynnik zmienności wahał się

od 6,6% do 12,3% CV. Całkowity średni %CV ( $\pm 95\%$  CI) wyniósł  $8,7 \pm 0,7\%$ . Współczynnik zmienności wzorca zerowego osocza IFN- $\gamma$  wyniósł 26,1 %CV. Oczekiwano takiego poziomu zmienności, ponieważ obliczone stężenie IFN- $\gamma$  jest niskie i wahania wokół niskiej wartości szacunkowej są większe niż w przypadku wysokiego stężenia.

## Informacje techniczne

### Wyniki nieokreślone

Wyniki nieokreślone mogą być związane ze stanem immunologicznym badanej osoby, ale mogą być także spowodowane szeregiem czynników technicznych:

- przekroczenie 16 godzin między pobraniem krwi a inkubacją w temperaturze 37°C;
- przechowywanie krwi w temperaturze wykraczającej poza zalecany zakres ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ );
- niewystarczające wymieszanie zawartości próbek z pobraną krwią;
- niedokładne przepłukanie płytki ELISA.

W przypadku podejrzenia problemów technicznych dotyczących pobrania lub postępowania z próbkami należy powtórzyć cały test QF-CMV, używając nowych próbek krwi. Powtórzenie testu ELISA osocza po stymulacji można wykonać w przypadku podejrzenia odchylenia od procedury testu ELISA. Wyniki nieokreślone (z niskimi wartościami dla próbki z mitogenem) nie ulegną zmianie podczas powtórzenia testu, chyba że popełniono błąd podczas testu ELISA.

### Skrzepnięte próbki osocza

Jeśli przy długotrwałym przechowywaniu próbek osocza dojdzie do wytrącenia skrzepu fibryny, należy odwirować próbki, aby strącić skrzep i umożliwić pipetowanie osocza.



# Przewodnik rozwiązywania problemów

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

## Komentarze i propozycje

---

### Niska gęstość optyczna odczytów wzorców

- |                                                    |                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Błąd rozcieńczania wzorca                       | Upewnić się, że rozcieńczenia wzorca zestawu zostały przygotowane zgodnie z ulotką dołączoną do opakowania testu QF-CMV ELISA.                                                              |
| b) Błąd pipetowania                                | Upewnić się, że pipety są skalibrowane i używane zgodnie z zaleceniami producenta.                                                                                                          |
| c) Zbyt niska temperatura inkubacji                | Inkubacja płytki ELISA powinna przebiegać w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).                                                                          |
| d) Zbyt krótki czas inkubacji                      | Inkubacja płytki z koniugatem, wzorcami i próbkami powinna trwać $120 \pm 5$ minut. Inkubacja roztworu substratu enzymu na płytce trwa 30 minut.                                            |
| e) Zastosowano nieprawidłowy filtr czytnika płytek | Płytkę należy odczytać przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm.                                                                                                              |
| f) Zbyt niska temperatura odczynników              | Przed wykonaniem testu wszystkie odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową. Zajmuje to około 1 godzinę.                             |
| g) Przetknięty zestaw/składniki                    | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorec i 100x stężony koncentrat koniugatu zostanie zużyty w ciągu 3 miesięcy od daty zrekonstruowania. |

### Rozwój nieswoistej barwy

- |                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki        | Przeplukać płytkę co najmniej 6 razy, używając 400 $\mu\text{l}$ buforu do płukania na jedną studzienkę. W zależności od wykorzystywanej płuczki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania płytka powinna odciekać przez 5 sekund. |
| b) Krzyżowe zanieczyszczenie dołków ELISA | Aby zminimalizować ryzyko, należy uważać podczas pipetowania i mieszania próbek.                                                                                                                                                                                           |
| c) Przetknięty zestaw/składniki           | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorec i 100x stężony koncentrat koniugatu zostanie zużyty w ciągu 3 miesięcy od daty zrekonstruowania.                                                                                |

## Komentarze i propozycje

- |                                                                 |                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu                     | W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki z odczynnikami są czyste.                                                                      |
| e) Wymieszanie osocza w odwirowanych probówkach przed pobraniem | Upewnić się, że próbki osocza są ostrożnie pobierane z powierzchni żelu (bez pobierania próbki i ponownego wpuszczania jej do próbówki), uważając aby nie naruszyć materiału na powierzchni żelu. |

### Duży szum tła

- |                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki          | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając 400 µl buforu do płukania na jedną studzienkę. W zależności od wykorzystywanej płuczki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania płytka powinna odciekać przez 5 sekund. |
| b) Zbyt wysoka temperatura inkubacji        | Inkubacja płytki ELISA powinna przebiegać w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).                                                                                                                                              |
| c) Przeteterminowany zestaw/składniki       | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu zostanie zużyty w ciągu 3 miesięcy od daty zrekonstruowania.                                                                    |
| d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu | W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki z odczynnikami są czyste.                                                                                                                                    |

### Nieliniowa krzywa wzorcowa i różnice między wynikami powtórzeń

- |                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki                                          | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając 400 µl buforu do płukania na jedną studzienkę. W zależności od wykorzystywanej płuczki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania płytka powinna odciekać przez 5 sekund. |
| b) Błąd rozcieńczania wzorca                                                | Upewnić się, że rozcieńczenia wzorca zestawu przygotowano zgodnie z ulotką dołączoną do opakowania.                                                                                                                                                             |
| c) Niedokładne wymieszanie                                                  | Dokładnie wymieszać odczynniki poprzez odwracanie fiolek lub łagodne wytrząsanie przed dodaniem ich na płytkę.                                                                                                                                                  |
| d) Niespójna technika pipetowania lub przerwa podczas przeprowadzania testu | Dodawanie próbki i wzorca powinno być wykonywane w sposób ciągły. Wszystkie odczynniki należy przygotować przed wykonaniem testu.                                                                                                                               |

Informacje na temat produktu i wytyczne techniczne można otrzymać bezpłatnie od firmy QIAGEN za pośrednictwem dystrybutora lub odwiedzając stronę [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).















# Bibliografia

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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4<sup>+</sup> 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.

# Symbole

Na opakowaniu i ulotce mogą znajdować się następujące symbole:

Symbol	Definicja
	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Termin ważności
	Znak CE
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału
	Globalny numer jednostki handlowej
	Zakres temperatury
	Nie używać ponownie
	Chronić przed światłem słonecznym
	Zapoznać się z instrukcją obsługi
	Producent
	Upoważniony przedstawiciel na terytorium Unii Europejskiej

---

## Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić nasze Centrum Pomocy Technicznej na stronie **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub z lokalnymi dystrybutorami (patrz tylna okładka lub strona **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Skrócony opis procedury testu ELISA

## Etap 1: Inkubacja krwi

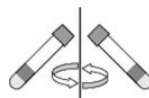
1. Pobrać krew pacjenta do probówek do pobierania krwi i potrząsnąć nimi dziesięć (10) razy, na tyle silnie, aby cała wewnętrzna powierzchnia była pokryta krwią. Umożliwia to rozpuszczenie antygenów, które znajdują się na ściankach probówek.



2. Inkubować probówki w pozycji pionowej w temperaturze  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  przez okres od 16 do 24 godzin.



3. Po inkubacji wirować probówki przez 15 minut przy 2000–3000 RCF (g) w celu oddzielenia osocza od czerwonych krwinek.



4. Po odwirowaniu i przed zebraniem osocza należy unikać pipetowania i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.



## Etap 2: Test IFN- $\gamma$ ELISA

1. Pozostawić składniki testu ELISA, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, w temperaturze pokojowej na co najmniej 60 minut.

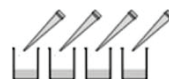


2. Zrekonstruować wzorzec zestawu do stężenia 8,0 IU/ml, używając destylowanej lub dejonizowanej wody. Przygotować cztery (4) rozcieńczenia wzorca.

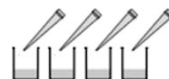


3. Zrekonstruować liofilizowany 100x stężony koncentrat koniugatu, używając destylowanej lub dejonizowanej wody.

4. Przygotować stężenie robocze koniugatu za pomocą zielonego rozcieńczalnika i dodać po 50 µl roztworu do każdej studzienki.



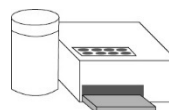
5. Dodać po 50 µl badanych próbek osocza i po 50 µl rozcieńczeń wzorca do odpowiednich studzienek. Wymieszać na wytrząsarce.



6. Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej.



7. Przemyć studzienki co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu do płukania na studzienkę.



8. Dodać po 100 µl roztworu substratu enzymu do studzienek. Wymieszać na wytrząsarce.



9. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.

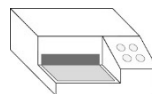




10. Dodać po 50  $\mu$ l roztworu zatrzymującego reakcję enzymatyczną do każdej studzienki. Wymieszać na wytrząsarce.



11. Odczytać wyniki przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm.



12. Przeprowadzić analizę wyników.



## Historia zmian w instrukcji

<b>Dokument</b>	<b>Zmiany</b>	<b>Data</b>
L1075110-R5	Dodano informacje dotyczące bezpiecznego postępowania z rozbitymi fiołkami Zaktualizowano tabelę 2, Interpretacja wyników testu QF-CMV, strona 25.	Luty 2018
L1075110-R5	Zaktualizowano informacje GHS, strona 11.	Luty 2018

---

Strona celowo pozostawiona pusta

---

Strona celowo pozostawiona pusta

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

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

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

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołem dołączonym do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie z elementami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania elementów niniejszego zestawu z elementami nienależącymi do zestawu za wyjątkiem elementów opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane, ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Zestaw oraz jego elementy są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego elementów.

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

Lut-18 © 2018 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

---

Składanie zamówień [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Pomoc techniczna [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Strona WWW  
[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)