

Февраль 2018 г.

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Инструкция-вкладыш



2 × 96

Тест для определения клеточного ответа на цитомегаловирусные пептидные антигены по уровню интерферона гамма (IFN-γ) в цельной крови человека



Для диагностики in vitro



0350-0201



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

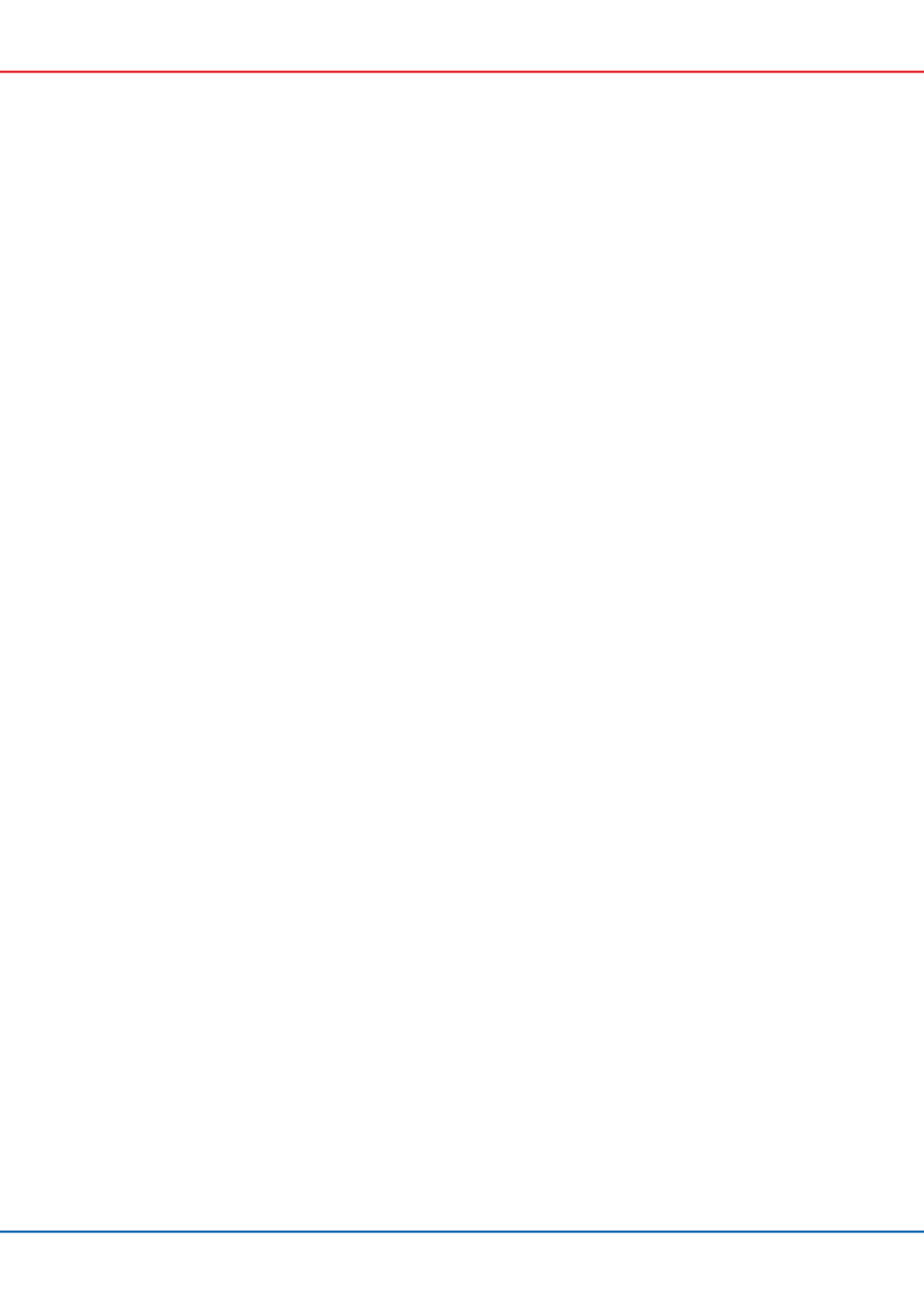


QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY (ГЕРМАНИЯ)

1075110RU, ред. 05



www.QuantiFERON.com



Комплектация

Назначение	5
Краткое описание	5
Принцип проведения процедуры.....	6
Время, необходимое для проведения теста	8
Материалы, входящие в комплект поставки.....	9
Комплектация набора	9
Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки.....	10
Предупреждения и меры предосторожности	10
Информация о технике безопасности	12
Хранение реактивов и обращение с ними	13
Отбор и обработка образцов	14
Порядок работы	17
Этап 1. Инкубация крови и отбор плазмы	17
Этап 2. QuantiFERON-CMV ELISA для IFN-γ человека	18
Расчеты и интерпретация результатов теста	23
Получение стандартной кривой (если программное обеспечение для анализа QF-CMV не используется).....	23
Контроль качества теста	24
Интерпретация результатов	26
Ограничения	27
Ожидаемые значения.....	27
Рабочие характеристики	31

Клиническая эффективность.....	31
Порог теста	32
Клинические исследования	32
Специфичность	33
Чувствительность.....	34
Исследования, подтверждающие клиническую полезность	34
Публикация International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation.....	40
Аналитические характеристики	41
Техническая информация.....	43
Неопределенные результаты.....	43
Образование сгустков в плазме крови.....	44
Руководство по поиску и устранению неполадок.....	45
Литература.....	47
Условные обозначения	49
Контактная информация	50
Краткое описание порядка выполнения теста ELISA	51
Этап 1. Инкубация крови.....	51
Этап 2. ELISA для определения уровня IFN- γ	52
История изменения руководства.....	54

Назначение

QuantIFERON-CMV ELISA (QF-CMV) — это тест-система для анализа *in vitro* с использованием пептидной смеси, моделирующей белки цитомегаловируса человека (ЦМВ) для стимуляции клеток в гепаринизированной цельной крови. Обнаружение интерферона гамма (interferon-gamma, IFN- γ) методом твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) используется для количественного определения *in vitro* клеточного ответа на эти пептидные антигены, связанного с иммунным контролем над ЦМВ-инфекцией. На фоне снижения этой иммунной функции может развиваться ЦМВ-инфекция (ЦМВИ) как заболевание. Назначение QF-CMV — мониторинг уровня иммунитета к ЦМВ у пациента.

Тест-система QF-CMV не предназначена для определения наличия ЦМВИ. Ее не следует использовать для исключения ЦМВИ.

Краткое описание

ЦМВ — это герпес-вирус, которым инфицировано 50–85 % взрослой популяции. ЦМВИ — часто встречающееся осложнение при иммуносупрессивных состояниях, особенно после трансплантации, и может в значительной степени способствовать повышению заболеваемости и смертности у реципиентов после трансплантации. Виды иммуносупрессивной терапии, используемые в настоящее время для предотвращения отторжения пересаженного органа, оказывают негативное влияние на Т-лимфоциты и клеточно-опосредованный иммунный ответ (cell-mediated immunity, CMI), в результате чего повышается восприимчивость к вирусным инфекциям в период после трансплантации. Важность функции Т-клеток в подавлении репликации ЦМВ подтверждается тем фактом, что ЦМВ-специфические цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) CD8⁺ могут защищать от развития

заболевания, вызванного вирусом. Данные подсчета ЦМВ-специфических ЦТЛ CD8⁺ у больных с иммуносупрессией и данные об уровне выработки IFN- γ могут служить средством прогнозирования риска развития ЦМВИ. Определение уровня выработки IFN- γ может заменять выявление ЦМВ-специфических ЦТЛ.

Тест-система QF-CMV предназначена для определения СMI-ответа на пептидные антигены, моделирующие белки ЦМВ. Подобраны ЦМВ-пептиды, нацеленные на Т-клетки CD8⁺, включая гаплотипы HLA I класса A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 и Cw6 (A30, B13), охватывающие > 98 % человеческой популяции. В крови индивидов, инфицированных ЦМВ, обычно присутствуют лимфоциты CD8⁺, распознающие эти антигены. Этот процесс распознавания предполагает производство и секрецию цитокина, IFN- γ . Данный тест основан на обнаружении и последующем количественном анализе концентрации форм IFN- γ .

Принцип проведения процедуры

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

Пробирка «митоген» используется в рамках теста QF-CMV в качестве положительного контроля. Это особенно целесообразно в том случае, когда есть сомнения относительно иммунного статуса пациента. Кроме того, пробирка с митогеном может быть использована в качестве контроля в целях обеспечения правильного обращения с пробой крови и ее надлежащей инкубации.

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

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

Примечание. Для образцов, находящихся в пределах диапазона измерений тест-системы QF-CMV ELISA (до 10 МЕ/мл), следует использовать результат, полученный для неразведенного образца плазмы. При таких концентрациях IFN- γ значения, полученные с использованием образцов плазмы, разведенных в соотношении 1 : 10, могут быть неточными.

Результат теста на IFN- γ -ответ считается реактивным, если показания для пробирки «антиген ЦМВ» значительно превышают значение в МЕ/мл для IFN- γ в пробирке «ноль-контроль». Митоген-стимулированный образец плазмы выступает в качестве IFN- γ -положительного контроля для каждого исследуемого образца. Слабый ответ на митоген указывает на неопределенный результат, если образец крови также дает нереактивный ответ на антигены ЦМВ. Такая картина возможна при недостатке лимфоцитов, снижении активности лимфоцитов из-за неправильной обработки образца, неправильного заполнения либо неправильного перемешивания содержимого пробирки «митоген» или неспособности лимфоцитов пациента вырабатывать IFN- γ , как, например, у пациентов, недавно перенесших трансплантацию. Нулевой образец используется для учета содержания фонового

или неспецифического IFN- γ в образцах крови. Значение уровня IFN- γ в пробирке с нулевым образцом вычитается из показателя уровня IFN- γ в пробирках «антиген ЦМВ» и «митоген» (порядок интерпретации результатов QF-CMV см. в разделе «Интерпретация результатов» на стр. 26 настоящей инструкции-вкладыша).

Время, необходимое для проведения теста

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

Инкубация пробирок с кровью при температуре 37 °C

От 16 до 24 часов

ELISA

Прибл. 3 часа на каждый планшет ELISA

Менее 1 человеко-часа

Добавить 10–15 мин на каждый дополнительный планшет

Материалы, входящие в комплект поставки

Комплектация набора

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
№ по каталогу	0192-0301
Количество образцов для приготовления	1
QuantIFERON Nil Control («ноль-контроль» QuantIFERON) (серый колпачок)	1 пробирка
QuantIFERON CMV Antigen («антиген ЦМВ» QuantIFERON) (синий колпачок)	1 пробирка
QuantIFERON Mitogen Control («митоген-контроль» QuantIFERON) (фиолетовый колпачок)	1 пробирка
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (инструкция-вкладыш к пробиркам для забора крови QF-CMV)	1

QuantIFERON-CMV ELISA	Набор из двух планшетов ELISA
№ по каталогу	0350-0201
Microplate strips (микропланшетные стрипы) (12 x 8 лунок), покрытые мышинными моноклональными антителами мыши к IFN- γ человека	2 набора микропланшетных стрипов 12 x 8 лунок
Human IFN- γ Standard, lyophilized (стандарт IFN- γ человека, лиофилизат) (содержит рекомбинантный IFN- γ человека, бычий казеин и 0,01 % [м/о] тимеросала)	1 флакон (8 МЕ/мл после разведения)
Green Diluent (зеленый разбавитель) (содержит бычий казеин, нормальную мышиную сыворотку и 0,01 % [м/о] тимеросала)	1 x 30 мл
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (концентрат конъюгата (100-кратная концентрация), лиофилизат) (конъюгат мышинных антител к IFN- γ человека с пероксидазой хрена, содержит 0,01 % [м/о] тимеросала)	1 x 0,3 мл
Wash Buffer 20x Concentrate (концентрат промывочного буфера) (20-кратная концентрация) (pH 7,2, содержит 0,05 % [о/о] ProClin® 300)	1 x 100 мл
Enzyme Substrate Solution (раствор ферментного субстрата) (содержит H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' тетраметилбензидин)	1 x 30 мл
Enzyme Stopping Solution (стоп-реактив для ферментативной реакции) (содержит 0,5 M H ₂ SO ₄ *)	1 x 15 мл
QF-CMV ELISA Package Insert (инструкция-вкладыш для QF-CMV ELISA)	1

* Содержит серную кислоту. Меры предосторожности см. на стр. 10.

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

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

Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Дополнительную информацию см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ). Для каждого набора QIAGEN® и каждого компонента набора их можно найти, просмотреть и распечатать

в Интернете по адресу www.qiagen.com/safety, где они размещены в удобном и компактном формате PDF.

ВНИМАНИЕ



С кровью человека следует обращаться как с потенциально инфицированной. Соблюдайте соответствующие инструкции по работе с кровью.

Следующие заявления об опасных факторах и мерах предосторожности относятся к компонентам набора QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Содержит: серная кислота. Осторожно! Может вызывать коррозию металлов. При попадании на кожу вызывает раздражение. При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение. Использовать перчатки/спецодежду/средства защиты глаз/лица.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Осторожно! При попадании на кожу вызывает слабое раздражение. Использовать перчатки/спецодежду/средства защиты глаз/лица.

QuantiFERON Green Diluent



Содержит: тринатрия 5-гидрокси-1-(4-сульфофенил)-4-(4-сульфофенилазо)пиразол-3-карбоксилат. Содержит: тартразин. Осторожно! При контакте с кожей может вызывать аллергическую реакцию. Использовать перчатки/спецодежду/средства защиты глаз/лица.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Содержит: ProClin 300. Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. Избегать попадания в окружающую среду.

Информация о технике безопасности

Дополнительная информация

- Несоблюдение указаний, содержащихся в инструкции-вкладыше для QF-CMV может привести к получению ошибочных результатов. Перед использованием изделия внимательно прочитайте инструкции.
- Не используйте набор, если перед использованием у какого-либо флакона с реактивом обнаружены признаки повреждения или признаки утечки содержимого.
- **Важно!** Осматривайте флаконы перед использованием. Не используйте флаконы с конъюгатом или стандартом IFN- γ , имеющие признаки повреждений или дефекты резиновой пробки. Не работайте с разбитыми флаконами. Утилизируйте флаконы, принимая необходимые меры предосторожности.

Рекомендация. Открывайте флаконы с конъюгатом или стандартом IFN- γ с помощью приспособления для снятия обжимных крышек, чтобы свести к минимуму риск травмы от металлической обжимной крышки.

- Не смешивайте и не используйте микропланшетные стрипы, стандарт IFN- γ человека, зеленый разбавитель или концентрат конъюгата (100x) из разных партий наборов QF-CMV. Другие реактивы (концентрат промывочного буфера [20x], раствор ферментного субстрата и стоп-реактив для ферментативной реакции) можно заменять аналогами из других наборов при условии соблюдения сроков годности и записи сведений о партии.
- Утилизируйте неиспользованные реактивы и биологические образцы в соответствии с местным, региональным и федеральным законодательством.
- Не используйте пробирки для забора крови QF-CMV и наборы QF-CMV ELISA после истечения срока годности.
- Убедитесь в том, что лабораторное оборудование, например промыватели микропланшетов и считывающие устройства, откалиброваны/разрешены к применению.

Хранение реактивов и обращение с ними

Пробирки для забора крови

- Пробирки для забора крови QF-CMV подлежат хранению при температуре 4–25 °С.
- Во время заполнения кровью температура пробирок для забора крови QF-CMV должна составлять 17–25 °С.
- Срок годности пробирок для сбора крови QF-CMV составляет не более 15 месяцев с даты изготовления при условии хранения при температуре 4–25 °С.

Реактивы набора ELISA

- Набор подлежит хранению при температуре от 2–8 °С.
- Раствор ферментного субстрата необходимо всегда защищать от воздействия прямых солнечных лучей.

Разведенные и неиспользованные реактивы

Инструкции по разведению реактивов см. в разделе «Этап 2. QuantiFERON-CMV ELISA для IFN- γ человека» (этапы 3 и 5 на стр. 18 и 20).

- Восстановленный стандарт IFN- γ человека можно хранить до трех месяцев при температуре от 2–8 °С.
Запишите дату разведения стандарта IFN- γ человека.
- Не использованный после разведения концентрат конъюгата (100 \times) подлежит хранению при температуре от 2–8 °С и использованию в течение 3 месяцев.
Запишите дату разведения конъюгата.
- Рабочий раствор конъюгата необходимо использовать в течение 6 часов с момента приготовления.
- Рабочий промывочный раствор подлежит хранению при комнатной температуре (22 \pm 5 °С) не более 2 недель.

Отбор и обработка образцов

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

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

На внутреннюю поверхность пробирок для забора крови нанесены высушенные антигены, поэтому важно тщательно перемешивать содержимое таких пробирок с кровью. После забора крови пробирки следует как можно скорее (не позднее 16 часов после забора крови) помещать в инкубатор с температурой 37 °С.

Для достижения оптимальных результатов необходимо соблюдать следующие инструкции.

1. У каждого пациента отбирайте 1 мл крови венепункцией непосредственно в каждую из пробирок для забора крови QF-CMV. Эта процедура должна выполняться квалифицированным флеботомистом.

Пробирки для забора крови QF-CMV можно использовать на высоте над уровнем моря не более 810 м.

При использовании пробирок для забора крови QF-CMV на высоте более 810 м над уровнем моря, а также при недостаточном объеме поступающей крови забор крови можно произвести с помощью шприца. Сразу после этого перенесите по 1 мл крови в каждую из трех пробирок. Из соображений безопасности это лучше всего делать сняв со шприца иглу и с соблюдением надлежащих мер безопасности. Необходимо снять колпачки со всех трех пробирок для забора крови QF-CMV и внести по 1 мл крови в каждую из них (до наклеенной на пробирку черной метки). Затем плотно закройте пробирки колпачками

и перемешайте их содержимое, как описано ниже. Поскольку кровь набирается в пробирку 1 мл относительно медленно, когда пробирка будет выглядеть заполненной, подержите ее на игле в течение 2–3 секунд, чтобы убедиться в получении нужного объема.

Черная метка на пробирке указывает объем заполнения 1 мл. Пробирки для забора крови QF-CMV валидированы применительно к объему от 0,8 до 1,2 мл. Если уровень крови в пробирке не доходит до метки, необходимо получить еще один образец крови.

Если для забора крови используется игла типа «бабочка», необходимо использовать «пробную» пробирку, чтобы убедиться в наполнении трубки кровью, прежде чем использовать пробирку для забора крови QF-CMV.

Вместо этого можно собрать кровь в отдельную обычную пробирку, содержащую литий-гепарин в качестве антикоагулянта, а затем перенести кровь в пробирки для забора крови QF-CMV. В качестве антикоагулянта используйте только литий-гепарин, так как другие антикоагулянты оказывают влияние на результаты анализа. Заполните пробирки для забора крови (минимальный объем — 5 мл) и осторожно перемешайте содержимое, перевернув пробирку несколько раз, чтобы растворить гепарин. Эта процедура должна выполняться квалифицированным флеботомистом. Пробирки для забора крови QF-CMV необходимо поместить в инкубатор не позднее 16 часов с момента забора крови. Перед инкубацией кровь должна находиться при комнатной температуре (22 ± 5 °C).

2. Сразу после заполнения пробирок для забора крови QF-CMV встряхните их 10 раз так, чтобы вся их внутренняя поверхность покрылась кровью для растворения антигенов на их стенках.

Во время забора крови пробирки должны находиться при температуре от 17–25 °C.

Слишком сильное встряхивание пробирок может привести к получению неверных результатов из-за разрушения геля.

Если кровь была отобрана в пробирку с литий-гепарином, то перед разливом в пробирки для забора крови QF-CMV образцы необходимо равномерно перемешать. Непосредственно перед разливом обязательно тщательно перемешайте кровь, осторожно переворачивая пробирку. Внесите аликвоты 1 мл (по одной в каждую пробирку для забора крови QF-CMV) в соответствующие нулевую контрольную пробирку, пробирку с антигеном ЦМВ и пробирку с митогеном. Это следует делать асептическим способом, принимая надлежащие меры обеспечения безопасности. Снимите колпачки со всех трех пробирок забора крови QF-CMV и внесите по 1 мл крови в каждую из них (до наклеенной на пробирку черной метки). Плотнo закройте пробирки колпачками и перемешайте их содержимое, как описано выше.

3. Промаркируйте пробирки надлежащим образом.

Убедитесь, что каждую пробирку (нулевую, с антигеном ЦМВ, с митогеном) можно идентифицировать по этикетке или иным способом.

4. После заполнения, перемешивания и маркировки пробирки необходимо как можно скорее (не позднее 16 часов после отбора крови) поместить в инкубатор с температурой 37 ± 1 °C. Перед инкубацией пробирки должны находиться при комнатной температуре (22 ± 5 °C). Не помещайте образцы крови в холодильную камеру и не замораживайте их.

Порядок работы

Этап 1. Инкубация крови и отбор плазмы

1. Инкубируйте пробирки В ВЕРТИКАЛЬНОМ ПОЛОЖЕНИИ при температуре 37 ± 1 °C в течение 16–24 часов. Инкубатор не требует использования CO₂ или увлажнения.

Важно! Если инкубация крови производится не сразу после ее забора, то непосредственно перед помещением в инкубатор необходимо повторно перемешать содержимое пробирок, перевернув их 10 раз.

После инкубации пробирки для забора крови можно хранить при температуре от 4–27 °C в течение 3 суток перед центрифугированием.

2. После инкубации пробирок при температуре 37 °C их в течение 15 минут центрифугируют при ОСЦ 2000–3000 (*g*) для отделения плазмы. Гелевая ловушка отделит клетки от плазмы. Если этого не произойдет, необходимо центрифугировать пробирки повторно.

Можно отделить плазму без центрифугирования, но в этом случае требуется особая осторожность, чтобы удалить плазму, не взбаламутив клетки.

3. После центрифугирования перед сбором плазмы не допускайте ее набора и выпуска пипеткой или перемешивания. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не взбаламутить материал на поверхности геля.

Важно! Собирать образцы плазмы следует только с помощью пипетки.

После центрифугирования образцы плазмы из пробирок для сбора крови можно помещать непосредственно на планшет ELISA QF-CMV, в том числе при использовании автоматизированных рабочих станций ELISA.

Образцы плазмы можно хранить в центрифугированных пробирках для забора крови QF-CMV до 28 суток при температуре от 2–8 °C или, если плазма уже собрана, в течение более продолжительного времени при температуре ниже –20 °C (предпочтительно ниже –70 °C).

Для получения необходимого для анализа количества образца необходимо собрать не менее 150 мкл плазмы.

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

О материалах, необходимых для проведения ELISA, см. в разделе «Комплектация набора» на стр. 9 и разделе «Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки» на стр. 10.

1. Перед проведением анализа все образцы плазмы и реактивы, кроме 100-кратного концентрата конъюгата, должны быть доведены до комнатной температуры (22 ± 5 °C). На выравнивание температур выделите не менее 60 минут.
2. Снимите ненужные стрипы планшета ELISA с рамки, запечатайте обратно в пакет из фольги и снова поместите в холодильную камеру для хранения, пока не они потребуются.

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

3. Разведите стандарт IFN- γ человека указанным на этикетке флакона объемом деионизированной или дистиллированной воды. Перемешайте осторожно, чтобы свести к минимуму вспенивание и обеспечить полное растворение. При разведении стандарта IFN- γ надлежащим объемом получается раствор концентрацией 8,0 МЕ/мл.

Примечание. Объем разведенного стандарта IFN- γ человека (из набора) различен в разных партиях.

С помощью разведенного стандарта приготовьте серию разведений с четырьмя уровнями концентрации IFN- γ в зеленом разбавителе (Green Diluent, GD) (Рис. 1, следующая страница). S1 (стандарт 1) содержит 4,0 МЕ/мл, S2 (стандарт 2) содержит 1,0 МЕ/мл, S3 (стандарт 3) содержит 0,25 МЕ/мл, а S4 (стандарт 4) содержит 0 МЕ/мл (чистый GD). Анализ стандартов необходимо проводить как минимум в двух повторностях. Готовьте свежие разведения стандарта набора для каждого цикла ELISA.

Пример процедуры для анализа стандартов в двух повторностях

Пример процедуры для анализа стандартов в двух повторностях	
А	Промаркируйте четыре пробирки: S1, S2, S3, S4.
Б	Внесите 150 мкл GD в S1, S2, S3, S4.
В	Добавьте 150 мкл стандарта из набора в S1 и тщательно перемешайте.
Г	Перенесите 50 мкл из S1 в S2 и тщательно перемешайте.
Д	Перенесите 50 мкл из S2 в S3 и тщательно перемешайте.
Е	Чистый GD служит нулевым стандартом (S4).

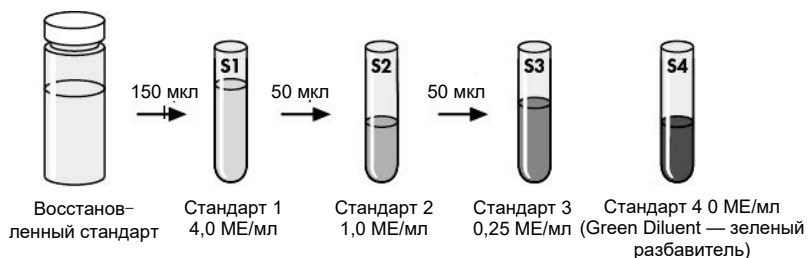


Рис. 1. Приготовление стандартных растворов методом последовательного разведения

4. Разведите лиофилизированный 100-кратный концентрат конъюгата в 0,3 мл деионизированной или дистиллированной воды. Осторожно перемешайте, сведя к минимуму образование пены, и убедитесь, что конъюгат полностью растворился.

Рабочий раствор конъюгата готовится путем разбавления необходимого количества разведенного 100-кратного концентрата конъюгата зеленым разбавителем (см. Таблица 1, следующая страница).

Перемешайте полученный раствор тщательно, но осторожно во избежание вспенивания.

Весь неиспользованный 100-кратный концентрат конъюгата сразу после использования снова поместите на хранение при температуре от 2–8 °С.

Используйте только зеленый разбавитель.

Таблица 1. Приготовление рабочего раствора конъюгата

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

5. Образцы плазмы, отобранные из пробирок для забора крови, а затем замороженные или хранившиеся более 24 часов до момента проведения анализа, необходимо тщательно перемешать перед внесением в лунки планшета для ELISA.

Важно! Если образцы плазмы добавляются непосредственно из центрифугированных пробирок для забора крови QF-CMV, необходимо избегать перемешивания плазмы каким-либо образом. Необходимо соблюдать осторожность во избежание взбалачивания материала на поверхности геля.

6. Если необходимо получить количественные результаты, разбавьте образцы плазмы «ЦМВ» и «митоген» в соотношении 1 : 10 зеленым разбавителем (GD) (10 мкл плазмы + 90 мкл GD). Плазму в пробирке «ноль-контроль» разбавлять не следует.

Рекомендуется выполнить параллельно анализ следующих образцов:

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

Однако программное обеспечение для анализа QuantiFERON-CMV поддерживает также следующие варианты анализа образцов пациентов:

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

7. С помощью многоканальной пипетки внесите 50 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата в соответствующие лунки планшета для ELISA.
8. Внесите в надлежащие лунки по 50 мкл образцов плазмы для анализа. В последнюю очередь внесите в соответствующие лунки 50 мкл каждого стандарта (1–4). Анализ стандартов необходимо проводить как минимум в двух повторностях.
9. Закройте планшет для ELISA и тщательно перемешивайте конъюгат и образцы плазмы/стандарты с помощью шейкера для микропланшетов в течение 1 минуты со скоростью 500–1000 об/мин. Не допускайте расплескивания содержимого.
10. Накройте планшет для ELISA крышкой и инкубируйте при комнатной температуре (22 ± 5 °C) в течение 120 ± 5 минут.
Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей. Отклонение от указанного температурного диапазона может привести к получению ошибочных результатов.
11. Во время инкубации приготовьте рабочий промывочный буфер. Разведите одну часть 20-кратного концентрата промывочного буфера 19 частями деионизированной или дистиллированной воды и тщательно перемешайте. В комплект поставки входит количество 20-кратного концентрата промывочного

буфера, достаточное для приготовления 2 литров рабочего промывочного буфера.

12. Когда инкубация планшета для ELISA будет завершена, проведите не менее шести циклов промывки лунок 400 мкл рабочего промывочного буфера. Рекомендуется использовать автоматическую мойку для планшетов.

Важно! Для проведения анализа очень важна тщательная промывка.

Проследите, чтобы во время каждого промывочного цикла каждая лунка была до краев заполнена промывочным буфером. Между циклами рекомендуется выдерживать по меньшей мере пятисекундный период замачивания.

Для обеззараживания потенциально инфекционных материалов в резервуар для отходов необходимо добавлять стандартное лабораторное дезинфицирующее средство и соблюдать установленные процедуры.

13. Для удаления остатков промывочного буфера поместите планшеты вверх дном на бязовую впитывающую салфетку. Внесите по 100 мкл раствора ферментного субстрата в каждую лунку, закройте планшет крышкой и тщательно перемешивайте содержимое с помощью шейкера для микропланшетов в течение 1 минуты со скоростью 500–1000 об/мин.

14. Закройте каждый планшет и инкубируйте при комнатной температуре (22 ± 5 °C) в течение 30 минут.

Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.

15. После 30-минутной инкубации внесите в каждую лунку по 50 мкл стоп-реактива для ферментативной реакции в том же порядке, в котором вносился субстрат, и тщательно перемешайте содержимое с помощью шейкера для микропланшетов со скоростью 500–1000 об/мин.

16. В течение 5 минут после остановки реакции измерьте оптическую плотность (ОП) в каждой лунке с помощью микропланшетного считывающего устройства (ридера), оснащенного фильтром 450 нм и эталонным фильтром 620–650 нм. Значения ОП необходимы для расчета результатов.

Расчеты и интерпретация результатов теста

Программное обеспечение для анализа QuantiFERON-CMV, предназначенное для анализа необработанных данных и расчета результатов, можно получить у компании QIAGEN по адресу www.QuantiFERON.com. Убедитесь, что вы используете самую свежую версию программного обеспечения для анализа QF-CMV.

Программное обеспечение выполняет оценку контроля качества теста, строит стандартную кривую и выдает результат анализа для каждого пациента, как описано в разделе «Интерпретация результатов» на стр. 26. Программное обеспечение выдает значение наименьшего разведения, при котором результат анализа находится в диапазоне, предусмотренном для тест-системы QF-CMV ELISA с учетом коэффициента разведения.

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

Получение стандартной кривой (если программное обеспечение для анализа QF-CMV не используется)

Для каждого планшета определите средние значения ОП по результатам анализа стандартов набора в двух повторностях.

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

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

Эти расчеты можно выполнить с использованием программных пакетов, прилагаемых к считывающим устройствам для микропланшетов, а также с помощью стандартных электронных таблиц или статистического программного обеспечения (например, Microsoft® Excel®). Такие пакеты рекомендуется использовать для выполнения регрессионного анализа, расчета коэффициента вариации (coefficient of variation, %CV) для стандартов и коэффициента корреляции (r) стандартной кривой.

Для отчета используйте результаты анализа при наименьшем разведении, достаточном для получения результата в диапазоне измерений тест-системы QF-CMV ELISA. Необходимо обязательно учитывать коэффициент разведения там, где это необходимо.

Контроль качества теста

Точность результатов теста зависит от точности полученной стандартной кривой. Поэтому, прежде чем интерпретировать результаты анализа образцов, необходимо проверить результаты, полученные на стандартах.

Полученные методом ELISA результаты считаются действительными, если:

- среднее значение оптической плотности (ОП) для стандарта 1 составляет $\geq 0,600$;
- коэффициент вариации (CV%) значений ОП для репликатов стандартов 1 и 2 $< 15\%$;
- значения ОП, полученные для репликатов стандартов 3 и 4 при параллельном анализе, не отличаются от соответствующего среднего значения более чем на 0,040 единицы оптической плотности;

-
- коэффициент корреляции (r), рассчитанный по средним значениям оптической плотности стандартов, составляет $\geq 0,98$.

Программное обеспечение для анализа QF-CMV рассчитывает эти параметры контроля качества и выдает результаты расчетов. Если указанные выше условия не соблюдаются, анализ является недействительным и его необходимо повторить.

Среднее значение ОП для нулевого стандарта (зеленый разбавитель) должно быть $\leq 0,150$. Если этот показатель $> 0,150$, то необходимо проверить, правильно ли проводилась процедура промывки.

Интерпретация результатов

Результаты теста QuantiFERON-CMV интерпретируются с использованием критериев, приведенных в Таблица 2.

Таблица 2. Интерпретация результатов теста QuantiFERON-CMV

Нулевой контроль (МЕ/мл)	Антиген ЦМВ минус нулевой контроль (МЕ/мл)	Митоген минус нулевой контроль (МЕ/мл)*	Результат QF-CMV	Результат/интерпретация
≤ 8,0	≥ 0,20 и ≥ 25 % от значения нулевого контроля	Любой показатель	Реактивный †	Антитела к ЦМВ обнаружены
	< 0,20 ИЛИ ≥ 0,20 и < 25 % от значения нулевого контроля	≥ 0,5	Нереактивный	Антитела к ЦМВ НЕ обнаружены
< 0,5		Неопределенный ‡	Получены неопределенные результаты в отношении ответа на ЦМВ	
> 8,0 §	Любой показатель	Любой показатель	Неопределенный ‡	Получены неопределенные результаты в отношении ответа на ЦМВ

* Значения ответа на положительный контроль с митогеном (а иногда и антигены ЦМВ) часто могут находиться вне рабочего диапазона считывающего устройства для микропланшетов. Это не оказывает влияния на результаты теста.

† При отсутствии подозрения на цитомегаловирусную инфекцию изначально положительный результат может быть подтвержден повторным анализом исходных образцов плазмы в двух повторностях с помощью тест-системы QF-CMV ELISA. Если результат повторного анализа в одной или обеих повторностях окажется положительным, то результат анализа индивида следует считать реактивным.

‡ Возможные причины см. в разделе «Руководство по поиску и устранению неполадок» (стр. 45).

В клинических исследованиях (1) показана клиническая значимость неопределенного результата у пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов, в случаях когда донор реактивен к ЦМВ, однако для контроля с митогеном получено значение ниже 0,5 МЕ/мл. У таких пациентов риск развития ЦМВИ наиболее высок.

§ В клинических исследованиях менее 0,25 % участников имели уровень IFN-γ > 8,0 МЕ/мл применительно к нулевому контролю.

Примечание. При оценке иммунного ответа на антигены ЦМВ измеренное значение уровня IFN-γ следует рассматривать в совокупности с клинической картиной, историей болезни и другими диагностическими показателями. Тест-система QF-CMV не предназначена для определения наличия ЦМВИ. Ее не следует использовать для исключения ЦМВИ.

Ограничения

Результаты теста QuantiFERON-CMV необходимо рассматривать в совокупности с эпидемиологической историей пациента, его текущим состоянием здоровья и другими диагностическими показателями.

Недостоверность или неопределенность результатов возможна по следующим причинам:

- отступление от порядка проведения процедуры анализа, изложенного в инструкции-вкладыше для QuantiFERON-CMV ELISA (QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert);
- слишком высокая концентрация IFN- γ в пробирке с контролем;
- с момента забора образца крови до его инкубации при температуре 37 °C прошло более 16 часов.

Ожидаемые значения

Ожидаемые значения уровня IFN- γ при использовании тест-системы QuantiFERON-CMV были получены при анализе 591 образца, взятого у здоровых индивидов. 343 образца были определены как серопозитивные, 248 образцов — как серонегативные в отношении IgG к ЦМВ. До анализа QF-CMV ЦМВ-серологический статус испытуемых был неизвестен. Из 248 образцов, взятых у ЦМВ-серонегативных испытуемых, 100 % (248/248), оказались нереактивными по результатам анализа с помощью тест-системы QF-CMV ELISA — концентрация IFN- γ , который вырабатывался в ответ на антиген ЦМВ в соответствующей пробирке (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем), была ниже 0,2 МЕ/мл. На Рис. 2 показано распределение IFN- γ -ответов на содержимое пробирки «антиген ЦМВ» (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) у 343 ЦМВ-серопозитивных испытуемых.

Количество образцов

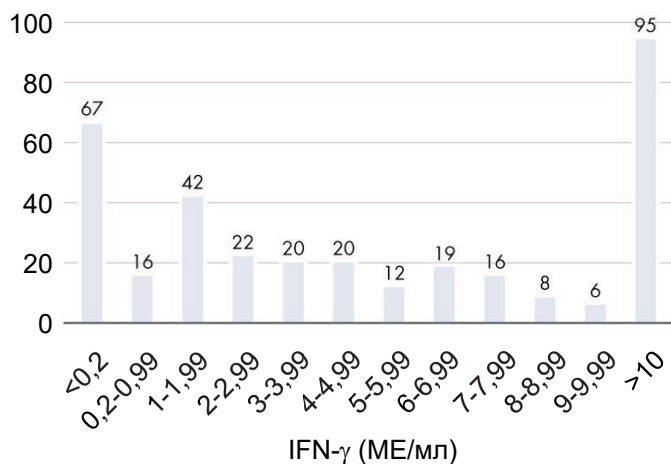


Рис. 2. Распределение IFN- γ -ответов при проведении теста QF-CMV (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) у серопозитивных здоровых испытуемых (n = 343)

Распределение IFN- γ -ответов на содержимое пробирки «митоген» (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) было получено путем анализа 733 образцов крови здоровых взрослых испытуемых. Анализ проводился с использованием тест-системы QF-CMV ELISA, без учета серологического статуса по IgG к ЦМВ (Рис. 3). Результат для пробирки «митоген» (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) менее 0,5 ME/мл указывает либо на сбой при проведении теста, либо на то, что у пациента ослаблен иммунитет. В здоровой популяции в эту категорию попало лишь 2 из 733 результатов.

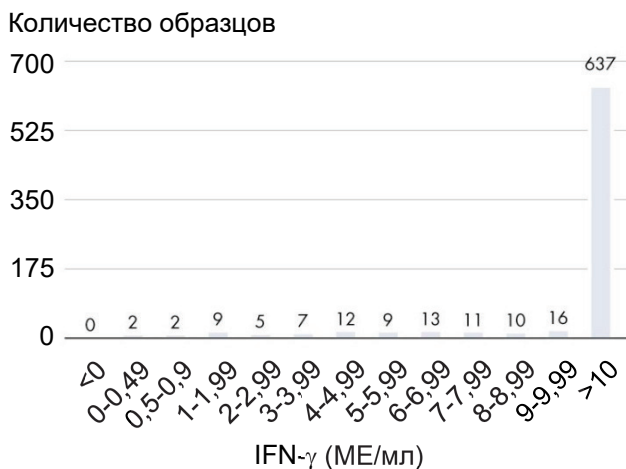


Рис. 3. Распределение IFN- γ -ответов на митоген (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем) у здоровых испытуемых (n = 733)

Распределение IFN- γ -ответов на содержимое пробирок с нулевым контролем было получено путем анализа 1020 образцов плазмы крови здоровых испытуемых. Анализ проводился с использованием тест-системы QF-CMV ELISA, без учета серологического статуса по IgG к ЦМВ (Рис. 4).

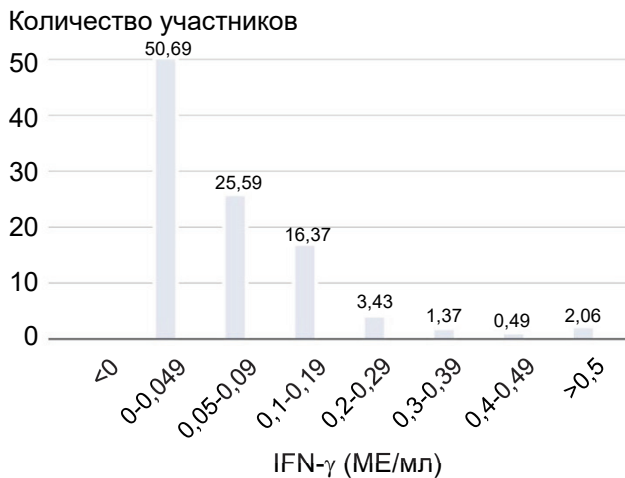


Рис. 4. Распределение IFN- γ -ответов на содержимое пробирок с нулевым контролем у здоровых испытуемых (n = 1020), в процентах от популяции

Рабочие характеристики

Клиническая эффективность

Порог теста для обнаружения предшествующей сенсibilизации к ЦМВ с помощью QF-CMV был установлен после анализа результатов для группы здоровых индивидов ($n = 223$), при котором результаты теста QF-CMV сравнивались с результатами серологических исследований на антитела (IgG) к ЦМВ. ROC-анализ показал, что порог теста в 0,04 МЕ/мл (после вычета значения для пробирки с нулевым контролем) давал оптимальную прогностичность положительного и отрицательного результатов для QF-CMV (площадь под кривой = 0,9679 [95 % ДИ: 0,9442–0,9915, $p < 0,0001$]), и таким образом, данное значение являлось порогом, при котором данная тест-система наиболее эффективно выполняла свое назначение в здоровой популяции.

Рабочие характеристики теста QF-CMV сравнивались с характеристиками серологического теста SeraQuest™ CMV IgG производства Quest International. В отношении теста QF-CMV было продемонстрировано 95%-ное (294/310 индивидов) совпадение с результатами серологического теста на IgG к ЦМВ у здоровых субъектов. При этом ни у одного из 149 серонегативных доноров не было выявлено реактивности по результатам QF-CMV. у 145 из 161 из серопозитивных доноров был выявлен реактивный ответ методом QF-CMV. Общий показатель совпадения по положительным результатам составил 90 %, а по отрицательным результатам — 100 %.

В Таблица 3 показана степень совпадения ответа по результатам теста QF-CMV и серологического статуса по IgG к ЦМВ у здоровых индивидов.

Таблица 3. Совпадение результатов теста QuantiFERON-CMV и серологического теста на IgG к ЦМВ у здоровых субъектов

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

Порог теста

Рекомендуемый клинический порог теста для данного анализа составляет 0,2 МЕ/мл в пробирке «антиген ЦМВ» (за вычетом значения для пробирки с нулевым контролем), хотя для различных клинических условий могут быть утверждены разные пороговые значения.

Клинические исследования

Поскольку абсолютного стандарта для подтверждения или исключения диагноза «цитомегаловирусная инфекция» не существует, выполнить практическую оценку чувствительности и специфичности для QF-CMV невозможно. Специфичность и чувствительность теста QF-CMV были приблизительно определены путем оценки степени совпадения результатов теста QF-CMV и серологического статуса по IgG к ЦМВ у здоровых испытуемых.

Специфичность QF-CMV определялась приблизительно путем оценки частоты ложноположительных результатов (реактивный ответ по результатам QF-CMV) для образцов здоровых доноров без признаков предшествующей сенсибилизации к ЦМВ (индивидов, серонегативных по IgG к ЦМВ). Чувствительность определялась приблизительно путем оценки QF-CMV-реактивности для образцов здоровых доноров с признаками предшествующей сенсибилизации к ЦМВ (индивидов, серопозитивных по IgG к ЦМВ). QF-CMV предполагает использование большого количества ЦМВ-специфичных эпитопов из разных белков ЦМВ. Это позволяет охватить весьма большую часть населения с разными гаплотипами HLA I класса (приблизительно 98 % популяции). Поскольку гаплотипы HLA субъектов, проходивших анализ, результаты которого сопоставлялись с серологическим статусом по ЦМВ, были неизвестны, ожидалось, что у небольшого процента серопозитивных индивидов будет отсутствовать ответ на антиген в пробирках для забора крови QF-CMV.

Специфичность

При анализе 591 образца крови здоровых испытуемых не было получено ложноположительных результатов теста QF-CMV у индивидов, серонегативных по результатам серологического исследования на IgG к ЦМВ. Все образцы (248 из 248) оказались нереактивными при анализе с помощью тест-системы QF-CMV ELISA и негативными по результатам серологического анализа на IgG к ЦМВ. Таким образом, результаты, полученные с помощью теста QF-CMV, на 100 % совпали с результатами серологического теста на IgG к ЦМВ.

Также на 100 % совпали результаты этих двух анализов и в рамках других исследований специфичности с участием пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов (1–8); пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (9, 10), а также ВИЧ-инфицированных пациентов (11).

Чувствительность

В рамках исследования 343 образцов крови здоровых испытуемых, серопозитивных по IgG к ЦМВ, определялась степень совпадения результатов теста QF-CMV и серологического анализа на IgG к ЦМВ. Она составила 80,5 %: 276 из 343 образцов были реактивны по результатам теста QF-CMV и позитивны по результатам серологического анализа на IgG к ЦМВ. Наблюдаемое несоответствие, возможно, обусловлено наличием ложноположительных результатов серологического анализа на ЦМВ или отсутствием реактивных типов HLA у испытуемых.

Показатели совпадения результатов оценки чувствительности были ниже в рамках других исследований чувствительности — с участием пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов (1–8); пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (9, 10), а также ВИЧ-инфицированных пациентов (11). Это, возможно, обусловлено наличием ложноположительных результатов серологического анализа на ЦМВ, отсутствием реактивных типов HLA у испытуемых либо отсутствием у таких пациентов реактивных Т-клеток в связи с угнетением иммунитета.

Исследования, подтверждающие клиническую полезность

Как серологический метод определения антител IgG к ЦМВ, так и метод QF-CMV при использовании по прямому назначению позволяют выявить наличие иммунитета к ЦМВ. При трансплантации серологический анализ на ЦМВ широко используется в качестве предтрансплантационной процедуры для определения риска развития осложнений, связанных с ЦМВ, после трансплантации, но в период после трансплантации ценность данного метода ограничена. В качестве альтернативы у реципиентов трансплантатов можно использовать метод QF-CMV для оценки уровня иммунитета к ЦМВ при наличии риска развития симптоматической ЦМВ-инфекции и (или) заболевания в связи с угнетением иммунитета (12–15).

Ряд опубликованных данных клинических исследований в разных когортах пациентов, которым выполнялась трансплантация, демонстрирует полезность тест-системы QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

В рамках масштабного исследования с участием 108 реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов (4) было выявлено, что по завершении анти-ЦМВ-профилактики у пациентов с реактивным результатом QF-CMV частота последующего развития ЦМВИ была значительно ниже (3,3 %, или 1 из 30, при пороговом значении 0,2 МЕ/мл) по сравнению с пациентами с нереактивным результатом QF-CMV (21,8 %, или 17 из 78, $p = 0,044$) (Рис. 5).

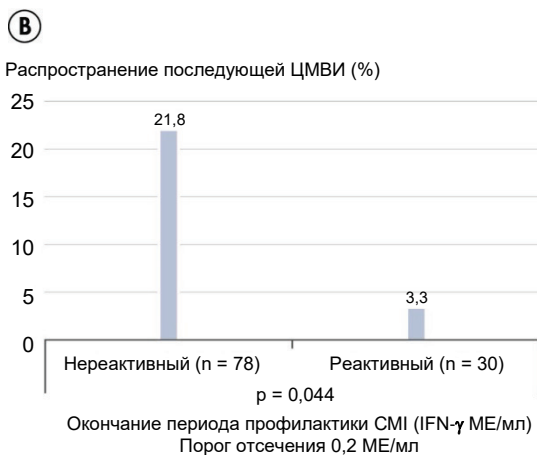
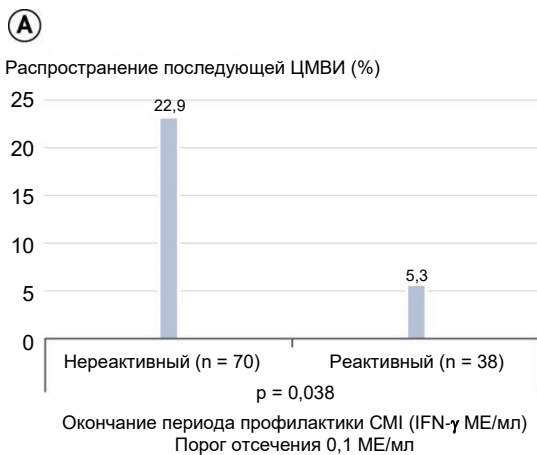


Рис. 5. Частота ЦМВИ с поздним началом у пациентов с реактивным результатом QuantiFERON-CMV и нереактивным результатом QuantiFERON-CMV в конце профилактики По данным публикации Kumar et al. (4).

Кроме того, ЦМВ-серонегативные реципиенты трансплантатов, получившие орган от ЦМВ-позитивного донора (D+R-) с реактивным результатом QF-CMV, по завершении профилактики были в меньшей степени подвержены развитию ЦМВИ, и этот

показатель сохранялся у них в течение более длительного срока. Это свидетельствует о пригодности метода QF-CMV для выявления лиц с риском развития ЦМВИ с поздним началом.

В работе, посвященной этому исследованию, также подчеркивается, что в данной когорте перенесших трансплантацию пациентов с наиболее высоким риском развития ЦМВИ (D+R-) получение реактивного результата в любое время после профилактики соотносилось с более высокой вероятностью того, что ЦМВИ не разовьется.

В рамках исследования с участием 37 пациентов, которым выполнялась трансплантация паренхиматозных органов (6), оценка ответов ЦМВ-специфических Т-клеток CD8⁺ методом QF-CMV помогала прогнозировать спонтанный клиренс вируса в сопоставлении с прогрессированием ЦМВИ, после подъема вiremии ЦМВ. В этом исследовании у 24 из 26 пациентов (92,3 %) с реактивным результатом QF-CMV (при пороговом значении концентрации IFN- γ \geq 0,2 МЕ/мл в рамках теста) имел место спонтанный клиренс вируса ЦМВ. Тот же результат наблюдался лишь у 5 из 11 (45,5 %) пациентов с нереактивным результатом QF-CMV.

В ходе исследования с участием 67 реципиентов трансплантатов легкого, с целью оценки случаев вiremии ЦМВ после трансплантации (7), было обнаружено, что нереактивный результат QF-CMV предшествовал вiremии ЦМВ в 18 случаях из 25 (72 %), тогда как реактивный ответ QF-CMV предшествовал 4 случаям из 16 (25 %) (точный критерий Фишера, $p = 0,0046$, см. Рис. 6).

% эпизодов ДНКемии ЦМВ при вирусной нагрузке > 1000 копий/мл

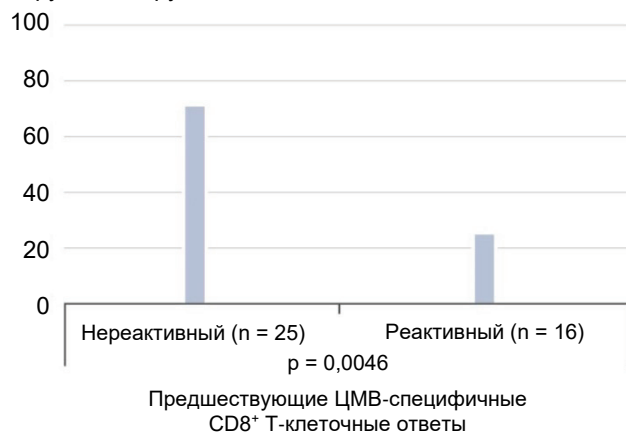


Рис. 6. Статистический анализ ответов ЦМВ-специфических Т-клеток CD8⁺ по результатам теста QuantiFERON-CMV и развитие виремии ЦМВ (точный критерий Фишера, p = 0,0046) По данным публикации Weseslindtner et al (7).

Масштабное многоцентровое проспективное исследование 127 случаев трансплантации паренхиматозных органов от ЦМВ-серопозитивного донора к ЦМВ-серонегативному реципиенту (8), каждый из которых проходил антивирусную профилактику, показало, что у пациентов с реактивным результатом QF-CMV (с использованием порога теста 0,1 МЕ/мл) в любой момент после завершения анти-ЦМВ-профилактики наблюдалась значительно более низкая частота развития заболевания с поздним началом через 12 месяцев после трансплантации (6,4 %) по сравнению с пациентами с нереактивным результатом QF-CMV (22,2 %) и неопределенным результатом (58,3 %, p < 0,001). При классификации неопределенных результатов как являющихся также «нереактивными» частота последующего развития ЦМВИ составила 6,4 % против 26,8 %, p = 0,024. Прогностичность положительного и отрицательного результатов QF-CMV в отношении защиты от ЦМВИ составляла 0,90 (95 % ДИ 0,74–0,98) и 0,27 (95 % ДИ

0,18–0,37) соответственно. Данное исследование показало, что метод QF-CMV может быть полезен для прогнозирования того, находится ли пациенты в группе низкого, среднего или высокого риска развития ЦМВИ после профилактики.

В перспективном исследовании 55 случаев трансплантации паренхиматозных органов (8) анализировалась взаимосвязь между предтрансплантационными результатами QF-CMV и эпизодами репликации ЦМВ после трансплантации. В ходе исследования было установлено, что у ЦМВ-серопозитивных реципиентов с нереактивным предтрансплантационным результатом QF-CMV (при пороге теста 0,2 МЕ/мл) наблюдалась более высокая частота репликации ЦМВ после трансплантации (7 из 14, или 50 %) по сравнению с ЦМВ-серопозитивными реципиентами с реактивным результатом QF-CMV (4 из 30, или 13,3 %, $p = 0,021$).

Это исследование показало, что у реципиентов с нереактивным предтрансплантационным ответом по результатам QF-CMV, получивших орган от ЦМВ-серопозитивного донора, десятикратно возрастал риск репликации ЦМВ по сравнению с реципиентами с реактивным предтрансплантационным ответом по результатам QF-CMV (скорректированное ОШ 10,49, 95 % ДИ 1,88–58,46). Таким образом, предтрансплантационный анализ методом QF-CMV может быть полезен в прогнозировании риска репликации ЦМВ после трансплантации и, следовательно, позволяет персонализировать лечение ЦМВИ после трансплантации паренхиматозных органов.

В настоящее время по всему миру завершены (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) либо продолжаются другие исследования, касающиеся определения ответа ЦМВ-специфических Т-клеток CD8⁺ методом QF-CMV в когортах реципиентов трансплантатов.

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

Важность мониторинга специфического иммунитета к ЦМВ признана и отмечается в публикации *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (12). Эти международные основополагающие принципы, разработанные группой экспертов по ЦМВ и трансплантации паренхиматозных органов, созданной Отделением инфекционных заболеваний Общества трансплантации (Transplantation Society), представляют собой доказательную базу и основанные на консенсусном мнении экспертов руководящие принципы лечения ЦМВ, в частности в отношении диагностики, иммунологии, профилактики и лечения.

В этой публикации делается следующее заключение: «Путем иммунологического мониторинга ответа ЦМВ-специфических Т-клеток можно прогнозировать риск развития ЦМВИ после трансплантации. Такой мониторинг может быть полезен в планировании профилактики и упреждающей терапии» (12).

Эти основополагающие принципы также содержат рекомендации касательно характеристик идеального метода анализа для иммунологического мониторинга, а именно:

- возможность оценить количество и функцию Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ у реципиента трансплантата;
- возможность измерить уровень IFN- γ ;
- простоту выполнения, экономичность и воспроизводимость;
- малую продолжительность цикла обработки;
- простоту доставки образцов в специализированные лаборатории.

Тест QF-CMV отвечает практически всем критериям, указанным в этих рекомендациях, и является единственным стандартизированным методом анализа для иммунологического мониторинга, позволяющим обнаруживать IFN- γ , специфичный к ЦМВ.

Аналитические характеристики

В тест-системе QF-CMV ELISA используется рекомбинантный стандарт IFN- γ человека, проверенный по эталонному препарату IFN- γ (рег. № NIH: Gxg01-902-535). Результаты для исследованных образцов выражаются в международных единицах (МЕ) относительно стандартной кривой, полученной путем анализа разведений вспомогательного стандарта, входящего в комплект поставки системы.

Известно, что гетерофильные антитела (например, человеческие антимышинные антитела) в сыворотке или плазме крови определенных индивидов могут мешать иммунологическому анализу. В тест-системе QF-CMV ELISA этот эффект гетерофильных антител сведен к минимуму. Для этого в зеленый разбавитель добавлена нормальная мышиная сыворотка, а также используются F(ab')₂-фрагменты моноклональных антител для захвата IFN- γ (нанесены на лунки микропланшетов).

Предел обнаружения метода QF-CMV ELISA составляет 0,065 МЕ/мл. Признаков хук-эффекта для высоких концентраций (эффекта прозоны) при концентрации IFN- γ до 10 000 МЕ/мл не обнаружено. Перекрестная реактивность антител тест-системы QF-CMV ELISA к испытанным цитокинам (включая ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12) не обнаружена.

Линейность QF-CMV ELISA подтверждена путем параллельного анализа пяти проб 11 пулов плазмы с известной концентрацией IFN- γ при случайном размещении этих проб на планшете для ELISA. Линия линейной регрессии имеет наклон $1,002 \pm 0,011$ и коэффициент корреляции 0,99 (рис. 7).

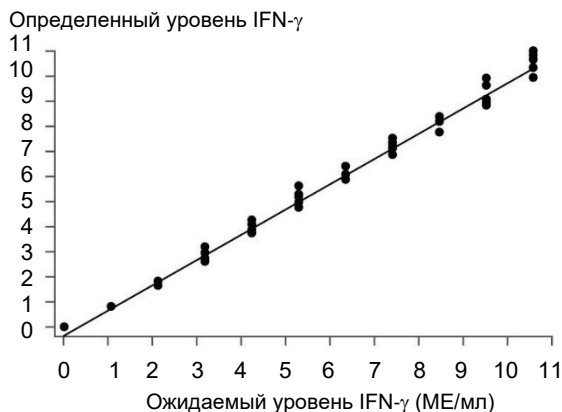


Рис. 7. Профиль линейности QF-CMV ELISA, определенный по результатам параллельного анализа пяти проб 11 пулов плазмы с известной концентрацией IFN-γ

Воспроизводимость результатов теста QF-CMV ELISA оценивалась путем исследования 20 образцов плазмы с разной концентрацией IFN-γ в трех повторностях в трех лабораториях в течение трех не идущих подряд дней тремя разными операторами. Таким образом, каждый образец подвергался анализу 27 раз в девяти независимых сериях испытаний. Один образец выступал в качестве «ноль-контроля» с рассчитанной концентрацией IFN-γ, равной 0,08 (95 % ДИ 0,07–0,09) МЕ/мл. В остальных 19 образцах плазмы концентрация аналита находилась в диапазоне от 0,33 (95 % ДИ 0,31–0,34) до 7,7 МЕ/мл (95 % ДИ 7,48–7,92).

Погрешность результатов внутри одного анализа оценивалась путем усреднения значений %CV для каждой исследуемой плазмы, содержащей IFN-γ, по результатам анализа для каждого планшета (n = 9) и колебалась в диапазоне от 4,1 до 9,1 % (значение %CV). Среднее для серии значение CV (%) (\pm 95 % ДИ) составило $6,6 \pm 0,6$ %. Для плазмы с нулевым содержанием IFN-γ среднее значение %CV равнялось 14,1 %.

Общая, или межаналитическая, погрешность определялась путем сравнения 27 результатов расчета концентрации IFN- γ для каждого образца плазмы и колебалась в диапазоне от 6,6 до 12,3 % (значение %CV). Общее среднее значение %CV (± 95 % ДИ) составило $8,7 \pm 0,7$ %. Для плазмы с нулевым содержанием IFN- γ это значение (%CV) составило 26,1 %. Такой уровень вариации является ожидаемым, поскольку рассчитанная концентрация IFN- γ низка, а вариация при низкой расчетной концентрации больше, чем при высоких концентрациях.

Техническая информация

Неопределенные результаты

Неопределенные результаты могут быть обусловлены иммунным статусом проходящего исследование индивида, но также могут быть связаны с рядом технических факторов, а именно:

- инкубирование отобранной крови при температуре 37 °C спустя более чем 16 часов после забора;
- хранение крови вне рекомендуемого температурного диапазона (22 ± 5 °C);
- недостаточное перемешивание содержимого пробирок для забора крови;
- недостаточное промывание планшета для ELISA.

При наличии подозрений на технические проблемы при заборе или обработке образцов крови повторите весь тест QF-CMV с новыми образцами крови. При наличии подозрений на процедурные отклонения в ходе выполнения теста ELISA можно провести тест ELISA повторно с использованием стимулированной антигеном плазмы. Если при выполнении теста ELISA не было ошибок, то неопределенные результаты (из-за низких значений для пробирки «митоген») не должны измениться при повторе теста.

Образование сгустков в плазме крови

В случае образования в образцах плазмы, хранившихся длительное время, фибриновых сгустков необходимо центрифугировать образцы. При этом сгустки выпадут в осадок, что облегчит пипетирование плазмы.

Руководство по поиску и устранению неполадок

Данное руководство по устранению неполадок может быть полезным в решении любых проблем, которые могут возникнуть. См также дополнительную техническую информацию по адресу: www.QuantiFERON.com. Контактную информацию см. на последней странице обложки.

Комментарии и рекомендации

Низкие показатели оптической плотности у стандартов

- | | |
|---|--|
| а) Ошибка при разведении стандарта | Обеспечьте правильное разведение входящего в набор стандарта согласно инструкции-вкладышу для QF-CMV ELISA. |
| б) Ошибка при пипетировании | Убедитесь, что пипетки откалиброваны и используются в соответствии с инструкциями производителя. |
| в) Слишком низкая температура инкубации | Инкубация при проведении ELISA должна осуществляться при комнатной температуре (22 ± 5 °C). |
| г) Слишком малое время инкубации | Инкубация планшета с конъюгатом, стандартами и образцами должна проводиться в течение 120 ± 5 мин. Инкубация планшета с раствором ферментного субстрата проводится в течение 30 мин. |
| д) Использование неподходящего фильтра считывающего устройства для планшета | Считывание результатов для планшета должно осуществляться при 450 нм с использованием референсного фильтра, рассчитанного на длину волны от 620 до 650 нм. |
| е) Реактивы слишком холодные | Перед проведением анализа все реактивы, за исключением 100-кратного концентрата конъюгата, необходимо довести до комнатной температуры. Это занимает около 1 часа. |
| ж) Истек срок годности набора/компонентов | Используйте набор до истечения срока годности. Стандартный раствор и 100-кратный концентрат конъюгата необходимо использовать в течение 3 месяцев с момента разведения. |

Неспецифическое окрашивание

- | | |
|---------------------------------|---|
| а) Неполное промывание планшета | Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться больше шести промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее 5 секунд. |
|---------------------------------|---|

Комментарии и рекомендации

- | | |
|---|---|
| б) Перекрестное загрязнение лунок при проведении ELISA | Соблюдайте осторожность при пипетировании и перемешивании образцов, чтобы свести риск загрязнения к минимуму. |
| в) Истечение срока годности набора либо его компонентов | Используйте набор до истечения срока годности. Стандартный раствор и 100-кратный концентрат конъюгата необходимо использовать в течение 3 месяцев с момента разведения. |
| г) Загрязнение раствора ферментного субстрата | Утилизируйте субстрат при окрашивании в синий цвет. Используйте чистые емкости для реактивов. |
| д) Смешивание плазмы в центрифужных пробирках до сбора | Убедитесь, что образцы плазмы осторожно собраны выше уровня геля без набора и выпуска пипеткой. Старайтесь не взбалтывать материал на поверхности геля. |

Высокий фон

- | | |
|---|---|
| а) Неполное промывание планшета | Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться больше шести промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее 5 секунд. |
| б) Температура инкубации слишком высокая | Инкубация при проведении ELISA должна осуществляться при комнатной температуре (22 ± 5 °C). |
| в) Истечение срока годности набора либо его компонентов | Используйте набор до истечения срока годности. Стандартный раствор и 100-кратный концентрат конъюгата необходимо использовать в течение 3 месяцев с момента разведения. |
| г) Загрязнение раствора ферментного субстрата | Утилизируйте субстрат при окрашивании в синий цвет. Используйте чистые емкости для реактивов. |

Нелинейность стандартной кривой, вариабельность результатов параллельного анализа

- | | |
|--|---|
| а) Неполное промывание планшета | Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться больше шести промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее 5 секунд. |
| б) Ошибка при разведении стандарта | Обеспечьте правильное разведение входящего в набор стандарта согласно настоящей инструкции-вкладышу. |
| в) Плохое смешивание | Тщательно перемешивайте реактивы путем перевертывания или вихревым способом перед внесением на планшет. |
| г) Непоследовательная техника пипетирования или приостановка рабочего процесса на этапе постановки теста | Внесение образцов и стандартов должно осуществляться непрерывно. Все реактивы должны быть подготовлены до проведения теста. |

Информация о продукте и технические руководства предоставляются компанией QIAGEN бесплатно. Их можно также заказать через регионального дистрибьютора или получить по адресу www.QuantiFERON.com.














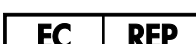
Литература

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. Infec. 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.

Условные обозначения

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие символы.

Символ	Значение символа
	Содержит реактивы для <N> реакций
	Срок годности
	Маркировка CE
	Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro
	Номер по каталогу
	Номер партии
	Номер материала
	Глобальный торговый номер единицы
	Ограничение по температуре
	Не использовать повторно
	Защищать от прямого солнечного света
	См. инструкцию по применению
	Изготовитель
	Полномочный представитель в ЕС

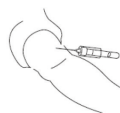
Контактная информация

По вопросам технической поддержки и для получения дополнительной информации обращайтесь в Центр технической поддержки по адресу **www.qiagen.com/Support**, по тел. 00800-22-44-6000 или через отделы технической поддержки QIAGEN либо региональных дистрибьюторов (см. последнюю страницу обложки или веб-сайт **www.qiagen.com**).

Краткое описание порядка выполнения теста ELISA

Этап 1. Инкубация крови

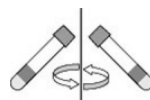
1. Возьмите у пациента кровь в пробирки для забора крови и тщательно перемешайте ее, встряхивая пробирки по 10 (десять) раз так, чтобы вся внутренняя поверхность пробирки покрылась кровью, что необходимо для растворения антигенов на стенках пробирки.



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



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



4. После центрифугирования перед отбором плазмы не допускайте набора и выпуска плазмы пипеткой или смешивания плазмы до ее отбора. Всегда соблюдайте осторожность во избежание взбаламучивания материала на поверхности геля.



Этап 2. ELISA для определения уровня IFN-γ

1. Выдержите все компоненты тест-системы для ELISA (кроме 100-кратного концентрата конъюгата) при комнатной температуре не менее 60 минут.



2. Разведите стандарт, входящий в комплект поставки, деионизированной или дистиллированной водой до концентрации 8,0 МЕ/мл. Приготовьте 4 (четыре) разведения стандарта.



3. Разведите лиофилизированный 100-кратный концентрат конъюгата деионизированной или дистиллированной водой.

4. Разбавьте конъюгат зеленым разбавителем до рабочей концентрации и внесите по 50 мкл во все лунки.



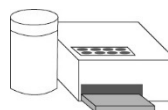
5. Внесите 50 мкл каждого образца плазмы и 50 мкл стандарта в соответствующие лунки. Перемешайте содержимое с помощью шейкера.



6. Инкубируйте в течение 120 минут при комнатной температуре.



7. Не менее 6 раз промойте лунки промывочным буфером (400 мкл на каждую лунку).



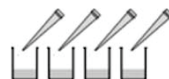
8. Внесите по 100 мкл раствора ферментного субстрата в каждую лунку. Перемешайте содержимое с помощью шейкера.



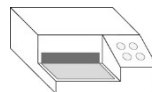
9. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре.



10. Внесите в каждую лунку по 50 мкл стоп-реактива для ферментативной реакции. Перемешайте содержимое с помощью шейкера.



11. Считайте результаты при 450 нм, используя референсный фильтр 620–650 нм.



12. Проанализируйте результаты.



История изменения руководства

Документ	Изменения	Дата
L1075110-R5	Добавление информации о технике безопасности, касающейся разбитых флаконов. Обновления таблицы 2, «Интерпретация результатов теста QF-CMV», стр. 26.	Февраль 2018 г.
L1075110-R5	Обновление информации о СГС, стр. 11.	Февраль 2018 г.

Эта страница оставлена пустой намеренно.

Эта страница оставлена пустой намеренно.

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

Ограниченное лицензионное соглашение для набора ELISA QuantiFERON-CMV

Использование настоящего изделия означает согласие покупателя или пользователя изделия со следующими условиями.

1. Изделие подлежит использованию исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к изделию, и настоящим руководством и только с компонентами, которые входят в состав набора. Компания QIAGEN не дает разрешения в рамках своей интеллектуальной собственности на использование или объединение компонентов, входящих в состав настоящего набора, с любыми компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, прилагаемых к изделию, настоящем руководстве и дополнительных протоколах, опубликованных по адресу www.qiagen.com. Некоторые из таких дополнительных протоколов предоставлены пользователями продукции компании QIAGEN для пользователей продукции компании QIAGEN. Такие протоколы не были всесторонне проверены или оптимизированы компанией QIAGEN. Компания QIAGEN не гарантирует их правильности, а также не гарантирует того, что они не нарушают прав третьих лиц.
2. Кроме официально заявленных лицензий, компания QIAGEN не предоставляет никаких гарантий того, что данный набор и/или его использование не нарушают прав третьих лиц.
3. Данный набор и его компоненты лицензированы для одноразового использования и не подлежат повторному использованию, восстановлению или перепродаже.
4. Компания QIAGEN прямо отказывается от всех прочих лицензий, заявленных или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено официально.
5. Покупатель и пользователь данного набора соглашаются не совершать и не допускать совершения другими лицами каких-либо действий, которые могут привести к любым действиям, запрещенным выше, или способствовать им. Компания QIAGEN может требовать исполнения запретов, предусмотренных настоящим ограниченным лицензионным соглашением, в судебном порядке в любом суде и получать возмещение всех понесенных ею следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, по любому иску, направленному на исполнение настоящего ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с набором и/или его компонентами.

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

Февр. 18 © QIAGEN, 2018. Все права защищены.

Контактная информация для заказа: www.qiagen.com/shop | Техническая поддержка: support.qiagen.com |
Веб-сайт: www.qiagen.com