

# QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV

## infoleht 2 x 96

Täisvere gamma-interferooni analüüsi mõõtmisnäidud  
inimese tsütomegaloviiruse peptiidantigeenidele  
reageerimise kohta

**IVD**

**CE**

**REF**

0350-0201



Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Austraalia

Telefon: (Austraalia) +613-9840-9800, (Euroopa) +49-2103-29-12000

**EC REP**

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, SAKSAMAA

1075110ET Vers. 01





# Sisukord

<b>Sihtotstarve</b>	<b>5</b>
<b>Sissejuhatus</b>	<b>5</b>
Analüüsi põhimõtted	6
Analüüsimiseks kuluv aeg	6
<b>Reaktiivid ja säilitamine</b>	<b>7</b>
Vajalikud materjalid, mida kaasas pole	8
Säilitamine ja käsitsemine	8
<b>Hoiatused ja ettevaatusabinõud</b>	<b>9</b>
<b>Proovide võtmine ja käsitsemine</b>	<b>10</b>
<b>Kasutusjuhised</b>	<b>11</b>
1. etapp – vere inkubeerimine ja plasma eraldamine	11
2. etapp – inimese IFN- $\gamma$ QuantiFERON-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüs	11
<b>Arvutused ja analüüsi tõlgendamine</b>	<b>14</b>
Tulemuste tõlgendamine	15
<b>Piirangud</b>	<b>16</b>
<b>Eeldatavad väärtused</b>	<b>16</b>
<b>Sooritusnäitajad</b>	<b>18</b>
Eelanalüüs	18
Analüüsi läviväärtus	18
<b>Kliinilised uuringud</b>	<b>19</b>
Spetsiifilisus	19
Tundlikkus	19
Kliinilist kasulikkust esiletõstvad uuringud	20
Rahvusvahelised kokkuleppelised juhised tsütomegaloviiruse ohjamiseks parenhümatoossete elundite siirdamisel	22
<b>Analüüsi sooritusnäitajad</b>	<b>23</b>

<b>Tehniline teave</b>	<b>25</b>
Määramatud tulemused	25
Tõrkeotsingujuhend	26
<b>Kirjandus</b>	<b>27</b>
<b>Tehniline tugi</b>	<b>28</b>
<b>Analüüsi lühikirjeldus</b>	<b>30</b>
1. etapp – vereproovi inkubeerimine	30
2. etapp – IFN- $\gamma$ ensüüm-immunosorptsiooni analüüs	30

## Sihtotstarve

QuantifERON-CMV (QF-CMV) on in vitro analüüs, milles kasutatakse peptiidisegu inimese tsütomegaloviiruse (CMV) proteiinide simuleerimiseks, et stimuleerida hepariniseeritud täisvere rakke. Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiga (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ) tuvastatakse gamma-interferoon (IFN- $\gamma$ ) ja selle abil mõõdetakse in vitro reaktsiooni sellistele peptiidantigeenidele, mis on seotud tsütomegaloviirusnakkuse immuunkontrolliga. Selle immuunfunktsiooni kadumist võib seostada tsütomegaloviirusnakkuse väljaarenemisega. QF-CMV on ette nähtud patsiendi tsütomegaloviiruse vastase immuunsustaseme jälgimiseks.

QF-CMV pole ette nähtud tsütomegaloviirusnakkuse diagnoosimiseks ja seda ei tohi kasutada selle nakkuse välistamiseks.

## Sissejuhatus

Tsütomegaloviirus on herpesviirus, millega on nakatunud 50–85% täiskasvanud elanikkonnast. See on sageli esinev immunosupressiooni tagajärjel tekkiv tüsistus, eriti pärast elundisiirdamist, ja võib märkimisväärselt mõjutada siiratud elundiga isikute haigestumust ja suremust. Tänapäeval kasutataval immuunsupressiivsel ravil, mille abil takistatakse siiratud organi äratõukereaktsiooni, on kahjustav mõju T-lümfotsüütidele ja rakuvahendatud immuunreaktsioonidele (CMI), mille tulemusena tõuseb siirdamisjärgne vastuvõtlikkus viirusnakkustele.

T-rakufunktsiooni tähtsust tsütomegaloviiruse paljunemise pärssimisel toetab ka fakt, et CD8<sup>+</sup> CMV-spetsiifilised tsütotoksilised T-lümfotsüüdid (CTL-id) võivad kaitsta viirusega seotud patogeneesi eest. Immuunsupressiivsete patsientide CD8<sup>+</sup> CMV-spetsiifiliste CTL-ide arvu ja IFN- $\gamma$  tootmise põhjal saab prognoosida tsütomegaloviiruse väljaarenemise riski. IFN- $\gamma$  tootmine võib olla funktsionaalne surrogaat CMV-spetsiifiliste CTL-ide tuvastamiseks.

QF-CMV on tsütomegaloviiruse proteiine simuleerivate peptiidantigeenide suhtes ilmnevate CMI-reaktsioonide analüüs. CMV peptiidid on loodud mõjutama CD8<sup>+</sup> T-rakke, sh A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 ja Cw6 (A30, B13) HLA klassi I haplotüüpe, mis hõlmavad >98% elanikkonnast. Tsütomegaloviirusega nakatunud isikutel on tavaliselt veres CD8<sup>+</sup> lümfotsüüte, mis need antigeenid ära tunnevad. Selle protsessi käigus toodetakse ja eritatakse tsütokiini IFN- $\gamma$ . Selle analüüsi aluseks on IFN- $\gamma$  tuvastamine ja edasine kvantifikatsioon.

## Analüüsi põhimõtted

QF-CMV analüüs viiakse läbi 2 etapis. Esmalt kogutakse igasse QF-CMV verekogumiskatsutisse (kontroll-lahus, CMV antigeen ja mitogeen) täisveri.

Mitogeeni katsutit kasutatakse QF-CMV analüüsis positiivse kontrollina. See võib olla eriti vajalik siis, kui on kahtlusi isiku immuunsüsteemi seisundi osas.

Katsutid tuleb inkubeerida võimalikult kiiresti temperatuuril 37 °C (kuni 16 tunni jooksul pärast verevõtmist). 16- kuni 24-tunnise inkubatsiooniperioodi järel katsutid tsentrifugeeritakse, plasma eemaldatakse ja QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiga mõõdetakse IFN- $\gamma$  hulk (RÜ/ml).

IFN- $\gamma$  hulk CMV antigeeni ja mitogeeni katsutite plasmaproovides võib sageli ületada enamiku ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi riiderite ülempiiri, isegi siis, kui isikute immunosuppression on mõõdukas.

**Kvalitatiivsete** tulemuste saamiseks kasutage töötlemata plasma kohta arvatud väärtusi. **Kvantitatiivsete** tulemuste jaoks, mille puhul on nõutavad tegelikud RÜ/ml väärtused, tuleb plasmaproovid lahjendada rohelise lahjendiga vahekorras 1/10 ja analüüsida ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi abil koos töötlemata plasmaga.

**Märkus.** Proovide puhul, mis jäävad QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi vahemikku (st kuni 10 RÜ/ml), tuleb kasutada töötlemata plasma prooviga saadud tulemust. Selliste IFN- $\gamma$  kontsentratsioonide puhul võivad lahjendusastmega 1/10 plasmaproovide abil saadud väärtused olla ebatäpsed.

Analüüs loetakse IFN- $\gamma$ -vastusele reaktiivseks siis, kui CMV antigeeni katsuti näit on tunduvalt kõrgem IFN- $\gamma$  kontrollväärtusest RÜ/ml. Mitogeenstimuleeritud plasmaprooviga kontrollitakse iga analüüsitava proovi IFN- $\gamma$ -positiivsust. Vähenenud reaktsioon mitogeenile näitab indeterminantset tulemust, kui vereproov ei reageeri ka CMV antigeenidele. Selline muster võib ilmuda ebapiisava arvu lümfotsüütide, nende pärssitud tegevuse, proovide vale käsitlemise, mitogeenikatsuti vale täitmise/segamise korral või patsiendi lümfotsüütide võimetuse korral toota IFN- $\gamma$ , nt patsientide puhul, kellele on asja tehtud elundisiirdamine. Kontrollproov kohandub tausta või mittespetsiifilise IFN- $\gamma$ -ga vereproovis. Kontrollkatsuti IFN- $\gamma$  tase lahutatakse CMV antigeenikatsuti ja mitogeenikatsuti IFN- $\gamma$  tasemest (selle infolehe teemast „Tulemuste tõlgendamine“, lk 15 leiate ülevaate QF-CMV tulemuste tõlgendamise kohta).

## Analüüsimiseks kuluv aeg

Allpool on prognoositav aeg, mis kulub QF-CMV analüüsi tegemisele; näidatud on ka mitmest proovist koosneva seeria analüüsimisele kuluv aeg.

Verekatsutite inkubeerimine temperatuuril 37 °C:	16 kuni 24 tundi
Ensüüm-immunosorptsiooni analüüs:	ligikaudu 3 tundi 1 ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi plaadile
	Alla 1 tunni tööd
	Lisage 10–15 minutit iga täiendava plaadi kohta

# Reaktiivid ja säilitamine

<b>CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)</b> (CMV ja kontrollantigeenide verekogumiskatsutid (ühe patsiendi pakend))	
<b>Katalooginr</b>	<b>0192-0301</b>
<b>Preparaatide arv</b>	<b>1</b>
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON kontroll-lahuse katsuti) (hall kork)	1 katsuti
CMV Antigen (CMV antigeeni katsuti) (sinine kork)	1 katsuti
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogeeni kontrollkatsuti) (lilla kork)	1 katsuti
Infoleht	1
<b>QuantiFERON-CMV ELISA Components</b> (QuantiFERON-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi komponendid)	
<b>Katalooginr</b>	<b>0350-0201</b>
Mikrolohukestega plaadi ribad	24 x 8 riba
Human IFN- $\gamma$ Standard (Inimese IFN- $\gamma$ , standardne), lüofiliseeritud	1 x viaal
Green Diluent (Roheline lahjendi)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (Konjugeeritud 100-kordne kontsentratsioon), lüofiliseeritud	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (QuantiFERON pesupuhver, 20-kordne kontsentratsioon)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON ensüüm-substraadi lahus)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON ensüümi deaktiveerimislahus)	1 x 15 ml

## Vajalikud materjalid, mida kaasas pole

- 37 °C inkubaator; CO<sub>2</sub> pole nõutav
- Kalibreeritud eri suurusega pipetid (10–1000 µl, ühekordse otsaga)
- Kalibreeritud, mitme kanaliga pipetid (50–100 µl, ühekordse otsaga)
- Mikroplaadi raputi
- Deioniseeritud või destilleeritud vesi, 2 liitrit
- Mikroplaatide pesuseade (soovitavalt automaatne)
- Mikroplaadilugeja 450 nm filtri ja 620–650 nm referentsfiltriga

## Säilitamine ja käsitlemine

### Verevõtukatsutid

- Säilitage verevõtukatsuteid temperatuuril 4–25 °C.
- QuantiFERON-CMV verevõtukatsutite kõlblikkusaeg on kuni 15 kuud alates tootmiskuupäevast, säilitustemperatuuril 4–25 °C.

### Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsikomplekti reaktiivid

- Säilitage komplekti temperatuuril 2–8 °C.
- Kaitske ensüüm-substraadi lahust alati otsese päikesevalguse eest.

### Rekonstitueeritud ja kasutamata reaktiivid

Reaktiivide rekonstitueerimise kohta leiate teavet teemast „Kasutusjuhised – 2. etapp“ (juhised 3 ja 5 lk 11 ja 12).

- Rekonstitueeritud reaktiivikomplekt säilib temperatuuril 2–8 °C 3 kuud.

Märkige üles reaktiivikomplekti rekonstitueerimise kuupäev.

- Ülejäänud kontsentraati QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate tuleb pärast rekonstitueerimist säilitada temperatuuril 2–8 °C ja see tuleb ära kasutada 3 kuu jooksul.

Märkige üles konjugaadi rekonstitueerimise kuupäev.

- Kasutusvalmis konjugaat tuleb ära tarvitada 6 tunni jooksul pärast valmistamist.
- Kasutusvalmis pesupuhver säilib toatemperatuuril kuni 2 nädalat (temperatuuril 17–27 °C).



# Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Kasutamiseks in vitro diagnostikas.

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge vastava ohutuskaardiga (SDS). Need on saadaval mugavas ja kompaktses PDF-vormingus veebiaadressil [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Seal saate vaadata kõiki QIAGEN-i komplekti ja selle osade ohutuskaarte ning need välja printida.



**ETTEVAATUST! Käsitsege inimverd kui potentsiaalselt nakkusohhtlikku.**

Järgige asjakohaseid vere käsitsemise juhiseid.

QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsikomplekti komponentidele kehtivad järgmised riski- ja ohutuslaused.

## QuantiFERON ensüümi deaktiveerimislahus



Sisaldab väävelhapet: ärritav. Riski- ja ohutuslaused: \* R36/38, S26-36/37/39

- **Roheline lahjendi** sisaldab tavalist hiireseerumit ja kaseiini, mis võivad esile kutsuda allergilisi reaktsioone; vältige nahakontakti.

## Keemiaõnnetus

### Reostus, leke, kokkupuude või õnnetus

Helistage (ööpäevaringselt) CHEMTREC-ile

Ameerika Ühendriigid ja Kanada: 1-800-424-9300

Väljaspool Ameerika Ühendriike ja Kanadat: +1-703-527-3887 (kõned vastuvõtja kulul on lubatud)

## Lisateave

Ohutuskaardid: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

\* R36/38: Ärritab silmi ja nahka; S26: Silma sattumisel loputada otsekohe rohke veega ja pöörduda arsti poole; S36/37/39: Kanda sobivat kaitseriietust, -kindaid ja silmade või näokaitset.

# Proovide võtmine ja käsitsemine

Enne alustamist pidage silmas järgmist.

QF-CMV infolehe juhiste eiramine võib põhjustada valesid tulemusi. Lugege juhised enne analüüsi kasutamist tähelepanelikult läbi.

- Ärge kasutage komplekti, kui mõni reaktiivipudel on enne kasutamist kahjustatud või lekib.
- Ärge segage omavahel ega kasutage ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi reaktiive muudest QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsikomplekti partiidest.
- Kõrvaldage ülejäänud reaktiivid ja bioloogilised proovid kohalike ja riiklike ettekirjutuste kohaselt.
- Ärge kasutage QF-CMV verevõtukatsuteid ega QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsikomplekte pärast aegumiskuupäeva.

QF-CMV sisaldab järgmisi verevõtukatsuteid:

1. Kontroll-lahuse katsuti (hall kork)
2. CMV antigeeni katsuti (sinine kork)
3. Mitogeeni kontrollkatsuti (lilla kork)

Antigeenid katavad kuivatatud kihina verevõtukatsutite siseseina, seetõttu tuleb vereproovid hoolikalt katsuti sisuga segada. Katsutid tuleb toimetada võimalikult kiiresti inkubaatorisse temperatuuril 37 °C (kuni 16 tunni jooksul pärast vere võtmist).

**Optimaalsete tulemuste saamiseks tuleb kinni pidada järgmistest juhistest.**

## 1. Võtke igalt patsiendilt otse igasse QF-CMV verevõtukatsutisse 1 ml veeniverd.

- Kuna veri voolab 1 ml katsutitesse suhteliselt aeglaselt, jätke katsuti pärast näilise täituvustaseme saavutamist veel 2–3 sekundiks nõela otsa. Sellega on tagatud vajaliku verekoguse saamine.

Katsuti küljel olev must märgistus tähistab 1 ml täituvustaset. QF-CMV verevõtukatsutid on nähtud ette 0,8–1,2 ml vere jaoks. Kui verevõtmisel ei õnnestu saada indikaatorjooneni ulatuvat kogust, on soovitatav teha uus vereproov.

- QF-CMV verevõtukatsutid on ette nähtud vere võtmiseks kogusevahemikus 0,8–1,2 ml (merepinnast kuni 810 m kõrgusel). Suuremal kõrgusel peavad kasutajad tagama verevõtu igasse katsutisse nende piirmäärade vahemikus. Kui veri voolab liiga aeglaselt, võib verevõtmiseks kasutada ka süstalt ning viia sellega kõigisse 3 katsutisse 1 ml verd. Et seda oleks turvaline ja mugav teha, tuleb süstlanõel nõuetekohaselt eemaldada, võtta kõigilt kolmelt QF-CMV katsutilt korgid ära ning viia süstlaga igasse katsutisse 1 ml verd (kuni musta märgistuseni katsuti küljel). Pange katsutikorgid kindlalt peale ja segage, nagu järgnevas osas kirjeldatud.
- Kui verevõtmisel kasutatakse libliknõela, tuleb tühja katsuti abil veenduda, et toru oleks enne QF-CMV verevõtukatsutite kasutamist verrega täidetud.

## 2. Loksutage katsuteid kohe pärast nende täitmist kümme (10) korda piisava tugevusega, et katsuti kogu sisepind oleks verega kaetud ja katsuti seintel olevad antigeenid lahustuksid.

- Katsutite temperatuur peab verevõtmise ajal olema vahemikus 17–25 °C.
- Liiga energiline loksutamine võib geeli lagundada ja põhjustada valesid tulemusi.

3. Sildistage katsutid vastavalt nõuetele.
4. Katsutid tuleb toimetada võimalikult kiiresti inkubaatorisse temperatuuril  $37 \pm 1$  °C (kuni 16 tunni jooksul pärast verevõtmist). Ärge säilitage vereproove külmikus ega jääkapis.

## Kasutusjuhised

### 1. etapp – vere inkubeerimine ja plasma eraldamine

1. Kui vereproove ei inkubeerita kohe pärast vere võtmist, tuleb katsuteid vahetult enne inkubeerimist uuesti loksutada, nagu on kirjeldatud eelmise osa 2. etapi juures.
2. Inkubeerige katsuteid PÜSTASENDIS temperatuuril 37 °C 16–24 tundi. Inkubaator ei vaja CO<sub>2</sub> ega niisutamist.
3. Inkubeerimise järgselt võib verevõtukatsuteid enne järgmist etappi säilitada temperatuuril 2–27 °C kuni 3 päeva. Pärast katsute inkubeerimist temperatuuril 37 °C tsentrifugeerige neid 15 minutit 2000–3000 g (RCF) juures. Moodustuv hüüvis eraldab rakud plasmast. Kui seda ei juhtu, tuleb katsuteid suurema kiirusega uuesti tsentrifugeerida.
  - Plasmast on võimalik eraldada ka tsentrifugeerimata, kuid seejuures peab toimima äärmise ettevaatusega, et plasma võtmisel rakke mitte kaasa haarata.
4. Plasmaproove ei tohi pärast tsentrifugeerimist ja enne plasma eraldamist mingil juhul üles või alla pipeteerida ega segada. Toimige suure ettevaatusega, et materjal hüüvise pinnaga ei seguneks.
  - Kasutage plasmaproovi võtmiseks alati pipetti.
  - Plasmaproovid võib tsentrifugeeritud verevõtukatsutitest kanda otse QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiplaadile; sama kehtib ka ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiautomaatide kasutamise korral.
  - Plasmaproove võib säilitada temperatuuril 2–8 °C kuni 28 päeva; pärast plasma eraldamist temperatuuril –20 °C (eelistatult alla –70 °C) ka pikema aja jooksul katsutites või plasma säilituskonteinerites.

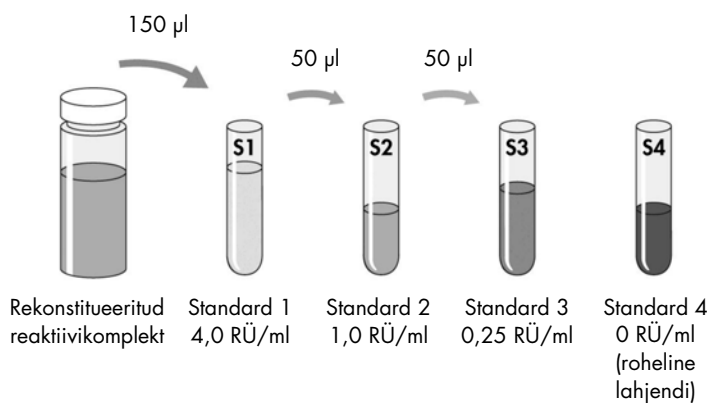
### 2. etapp – inimese IFN- $\gamma$ QuantiFERON-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüs

1. Kõik plasmaproovid ja reaktiivid, välja arvatud 100X konjugaadikontsentratsioon, peavad olema enne kasutamist saavutanud toatemperatuuri (17–27 °C). Kavandage selleks vähemalt 60 minutit.
2. Võtke kasutamata ribad raamist välja, pange kilepakendisse tagasi ja säilitage kuni kasutamiseni külmikus. Varuge QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi standarditele vähemalt üks riba ja analüüsivatele patsientidele piisav arv ribasid. Hoidke raam ja kaas pärast kasutamist ülejäänud ribad jaoks alles.
3. Rekonstitueerige lüofiliseeritud standardkomplekt standardviaali etiketile märgitud koguse deioniseeritud või destilleeritud veega. Segage pudeli sisu ettevaatlikult (et tekiks võimalikult vähe vahtu) ja veenduge, et sisu oleks täielikult lahustunud. Standardi rekonstitueerimine ettenähtud mahuni annab tulemuseks 8,0 RÜ/ml kontsentratsiooniga lahuse.

**4. Standardkõver moodustatakse standardkomplekti 3 lahjenduse ja roheline lahjendi abil standardina 4 (0 RÜ/ml).**

Kasutage rekonstitueeritud standardkomplekti 3 IFN- $\gamma$  kontsentratsiooni lahjendusseeria loomiseks. Lahjendage komplekti roheline lahjendiga (GD) (vt joonis 1). Standardeid tuleb analüüsida vähemalt kahekordselt; järgmiste etappide ajal toodetakse selleks piisav kogus.

- Pange 4 katsutile sildid „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- Lisage 4 katsutisse (S1–S4). 150  $\mu$ l rohelist lahjendit.
- Lisage 150  $\mu$ l standardkomplektist katsutisse S1 ja segage korralikult.
- Valage 50  $\mu$ l katsutist S1 katsutisse S2 ja segage korralikult.
- Valage 50  $\mu$ l katsutist S2 katsutisse S3 ja segage korralikult.
- Roheline lahjendi üksi on nullstandard (S4).



**Joonis 1. Standardkõvera moodustamine.** Valmistage igaks ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi seansiks ette standardkomplekti värsked lahused.

- Rekonstitueerige lüofiliseeritud QuantiFERON-i 100X konjugaadikontsentratsioon 0,3 ml deioniseeritud või destilleeritud veega. Segage pudeli sisu ettevaatlikult (et tekiks võimalikult vähe vahu) ja veenduge, et konjugaat oleks täielikult lahustunud.**
- Kasutusvalmis konjugaadi valmistamiseks lahjendatakse vajalik kogus rekonstitueeritud 100X konjugaadikontsentrati rohelises lahjendis, nagu näidatud tabelis 1 (Konjugaadi ettevalmistamine).**
  - Segage korralikult, kuid ettevaatlikult, et vältida vahu teket.
  - Paigutage ülejäänud 100X konjugaadikontsentratsioon kohe pärast kasutust uuesti temperatuurile 2–8 °C.
  - Kasutage ainult rohelist lahjendit.

**Tabel 1. Konjugaadi ettevalmistamine**

Ribade arv	100X konjugaadikontsentraadi kogus	Rohelise lahjendi kogus
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

7. Enne analüüsimist tuleb plasmaproove segada, et IFN-γ oleks igas proovis ühtlaselt jaotunud. Kui on vaja kvantitatiivseid tulemusi, lahjendage ka CMV ja mitogeeni plasmaproovid rohelise lahjendiga vahekorras 1/10 (10 µl plasmata segatud 90 µl GD-ga). Kontroll-plasmaproovi ei tohi lahjendada.

Soovitav on analüüsida järgmisi proove:

- kontroll, CMV antigeen, antigeen, CMV antigeen (1/10), mitogeen (1/10)

Analüüsitarvara QuantiFERON-CMV Analysis Software toetab ka järgmisi patsiendi proovikombinatsioone:

- kontroll, CMV antigeen, mitogeen
- kontroll, CMV antigeen(1/10), mitogeen(1/10)
- kontroll, CMV antigeen, mitogeen, CMV antigeen(1/10)
- kontroll, CMV antigeen(1/10), mitogeen

8. Tilgutage mitmekanalilise pipetiga nõutavasse ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiplaadi mikrolohukestesse 50 µl värskelt ettevalmistatud valmis konjugaati.
9. Tilgutage mitmekanalilise pipetiga vastavatesse mikrolohukestesse 50 µl analüüsitavaid plasmaproovi. Lõpuks lisage igasse mikrolohukestesse 50 µl standardeid 1–4.
10. Segage konjugaati ja plasmaproove/standardeid korralikult 1 minuti vältel mikroplaatide raputis.
11. Katke kõik plaadid kaanega ja inkubeerige neid  $120 \pm 5$  minutit toatemperatuuril (17–27 °C).
- Inkubeerimise ajal tuleb plaate kaitsta otsese päikesekiirguse eest.

12. Lahjendage inkubeerimise ajal üks osa 20X pesupuhvrikontsentrati 19 osa deioniseeritud või destilleeritud veega ja segage korralikult läbi. Analüüsiga on kaasas piisav kogus 20X pesupuhvrikontsentrati, millest piisab 2 liitri kasutusvalmis pesupuhvri valmistamiseks.

Peske mikrolohuksi vähemalt 6 korda 400 µl kasutusvalmis pesupuhvriga. Soovitav on kasutada automaatset pesemisseadet.

- Korralik pesemine on analüüsi tulemuste seisukohast väga tähtis. Kontrollige iga pesutsükli juures, et kõik mikrolohuksed oleksid **täielikult kuni ülemise servani pesupuhvriga täidetud**. Soovitav on jätta iga pesutsükli vahele vähemalt 5 sekundi pikkuse leotusaja.
  - Kasutatud pesuvee kogumisnõusse tuleb lisada laborites kasutatavat desinfitseerimisvahendit. Lisaks sellele pidage kinni teie laboris kehtivatest potentsiaalselt nakkava materjali dekontamineerimise eeskirjadest.
13. Koputage plaate, mikrolohuksed allpool, paberrätiku peal, et eemaldada nendesse jäänud pesupuhvri jäägid. Tilgutage igasse mikrolohuksesse 100 µl ensüümsubstraadi lahust ja segage plaadid raputis.
14. Katke kõik plaadid kaanega ja inkubeerige neid 30 minutit toatemperatuuril (17–27 °C).
- Inkubeerimise ajal tuleb plaate kaitsta otsese päikesekiirguse eest.
15. Pärast 30 minutit kestnud inkubeerimist tilgutage igasse mikrolohuksesse 50 µl ensüümi deaktiveerimislahust ja segage läbi.
- Ensüümi deaktiveerimislahust tuleb viia mikrolohuksesse samas järjekorras ja umbes samas tempos kui substraat (vt etapp 13).
16. Mõõtke iga mikrolohuksese optilist tihedust (OT) 5 minuti jooksul pärast deaktivaatori lisamist mikroplaatide lugejaga ja kasutage selleks 450 nm filtrit ning 620–650 nm referentsfiltrit. OT väärtusi on hiljem vaja tulemuste arvutamiseks.

## Arvutused ja analüüsi tõlgendamine

Tarkvara QuantiFERON-CMV Analysis Software lähteandmete analüüsimiseks ja tulemuste arvutamiseks on saadaval QIAGEN-i veebisaidil [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).

Tarkvara teeb analüüsi kvaliteedikontrolli, koostab standardkõvera ja väljastab iga analüüsitud patsiendi kohta tulemuse, mida kirjeldatakse üksikasjalikumalt teemas Tulemuste tõlgendamine.

QF-CMV analüüsimise tarkvara kasutamise alternatiivina on võimalik tulemusi kindlaks teha ka järgmise meetodi abil.

### Standardkõvera moodustamine

Leidke igal plaadil standardkomplekti korduste keskmised OT-väärtused.

Moodustage  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  standardkõver, kandes y-teljele keskmise OT-väärtuse  $\log_{(e)}$  ja x-teljele standardite  $\log_{(e)}$  (IFN- $\gamma$ -kontsentratsiooni RÜ/ml), jättes neist arvutustest välja nullstandardi. Arvutage regressioonanalüüsi kaudu standardkõvera parim kontuur.

Kasutage standardkõverat, et leida kõikide analüüsitud plasmaproovide IFN- $\gamma$ -kontsentratsioon (RÜ/ml), kasutades iga proovi OT-väärtust.

Nendeks arvutusteks võib kasutada mikroplaatide lugemisseadmetele pakutavaid tarkvarapakette ja standardseid arvutustabeleid või statistikaprogramme (nt Microsoft® Excel®). Soovitatav on selliseid tarkvarapakette kasutada regressioonianalüüsi tegemiseks, standardite variatsioonikoefitsiendi (%VK) ja standardkõvera korrelatsioonikoefitsiendi (r) leidmiseks.

## Analüüsi kvaliteedikontroll

Analüüsi tulemuste täpsus sõltub korrektse standardkõvera moodustamisest. Seetõttu tuleb enne proovide analüüsitulemuste tõlgendamist kontrollida standarditest tuletatud tulemusi.

Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi tulemused on valiidsed, kui on täidetud järgmised tingimused.

- Standardi 1 keskmine OT-väärtus peab olema  $\geq 0,600$ .
- Standardi 1 ja standardi 2 korduvate OT-väärtuste protsendis peab %VK olema  $< 15\%$ .
- Standardi 3 ja standardi 4 korduvad OT-väärtused ei tohi hälbida konkreetsest keskmisest väärtusest rohkem kui 0,040 OT-ühikut.
- Standardite keskmiste ekstinktsiooniväärtuste põhjal arvutatud korrelatsioonikoefitsient (r) peab olema  $\geq 0,98$ .

Kui nimetatud kriteeriumid pole täidetud, on analüüsipartii kehtetu ja seda tuleb korrata.

Nullstandardi (roheline lahjendi) keskmine OT-väärtus peab olema  $\leq 0,150$ . Kui keskmine OT-väärtus on  $> 0,150$ , tuleks kontrollida, kuidas toimub plaatide pesemine.

## Tulemuste tõlgendamine

QuantiFERON-CMV tulemusi saab tõlgendada järgmiste kriteeriumide alusel:

CMV miinus kontroll (RÜ/ml)*	Mitogeen miinus kontroll (RÜ/ml)	QF-CMV tulemus	Aruanne/tõlgendus
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Mittereaktiivne	CMV vastast immuunsust EI tuvastatud
$\geq 0,2$	Suvaline	Reaktiivne	CMV vastane immuunsus on tuvastatud
$< 0,2$	$< 0,5$	Määratlemata <sup>†</sup>	CMV reaktiivsuse tulemused on määratlematud

\* IFN- $\gamma$  reaktsioon CMV antigeenile ja mitogeeni positiivsele kontrollile võib sageli olla väljaspool mikroplaadi lugeja vahemikku. See ei mõjuta kvalitatiiivseid tulemusi.

<sup>†</sup> Võimalike põhjuste kohta leiate teavet teemast Tõrkeotsing.

## Piirangud

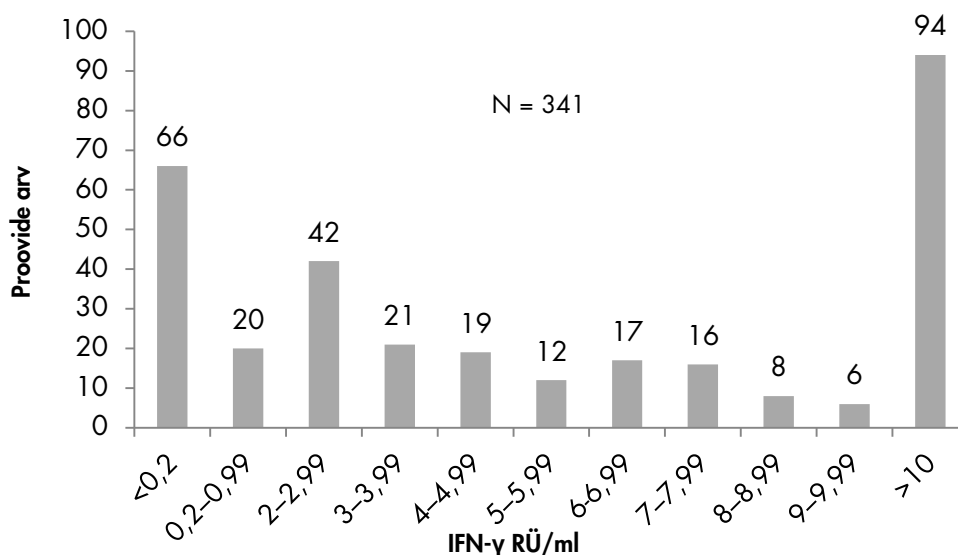
QuantiFERON-CMV analüüsi tulemusi tuleb vaadelda koos iga patsiendi epidemioloogilise ajaloo, tema tegeliku tervisliku seisundi ja muude diagnostiliste uuringutega.

Ebausaldusväärsed või määratlematud tulemused võidakse saada järgmistel põhjustel.

- Kõrvalekaldumine infolehel kirjeldatud protseduurist.
- IFN- $\gamma$  ülemäärane tase kontrollkatsutis.
- Vereproovi võtmise ja inkubeerimise vahe on pikem kui 16 tundi (37 °C).

## Eeldatavad väärtused

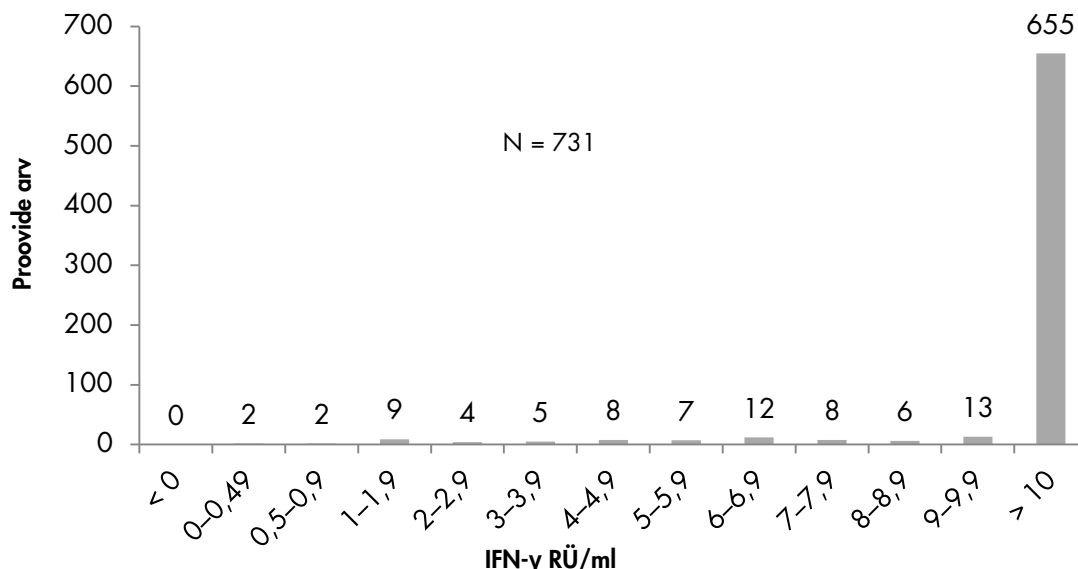
Eeldatavad IFN- $\gamma$  väärtused, mis saadi analüüsi QuantiFERON-CMV abil, saadi 591 terve täiskasvanu vereproovi analüüsimise teel, kellest 341 olid seroposiitvused ja 250 seronegatiivsed. 250 tervest täiskasvanud analüüsitava, kellel polnud CMV nakkust (määratleti CMV vastase seroloogia teel, CMV seronegatiivsed) 100%-l ilmsid IFN- $\gamma$  reaktsioonid < 0,2 RÜ/ml CMV-antigeeni katsuti puhul (miinus kontroll). CMV-antigeeni katsuti (miinus kontroll) jaotuvus CMV-nakkusega 341 terve täiskasvanud analüüsitava vahel (määratletud CMV vastase seroloogiaga, CMV seroposiitvused) on näidatud joonisel 2.



Joonis 2. CMV-kontroll IFN- $\gamma$  reaktsioonide jaotuvus seroposiitvsete tervete analüüsitava vahel (n = 341)

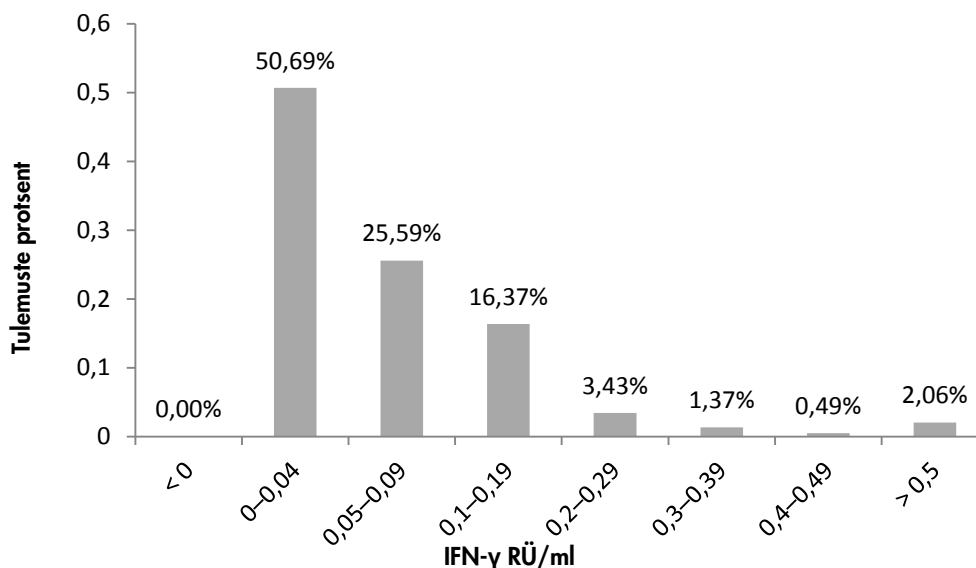


Joonisel 3 on näidatud mitogeeni (miinus kontrolltaust) tulemuste jaotuvus 731 terve täiskasvanud analüüsitava normaalsete vereproovide vahel, olenemata teadaolevast CMV-nakkusest. Mitogeeni (miinus kontroll) tulemus alla 0,5 RÜ/ml näitab analüüsi nurjumist või seda, et isiku immuunsüsteem on ohustatud seisundis. Tervetest analüüsitavatest sattus sellesse kategooriasse ainult 2/731-st tulemusest.



**Joonis 3. Kontrollmitogeeni IFN-γ reaktsioonide jaotuvus tervete täiskasvanud analüüsitavate vahel (n = 731)**

Joonisel 4 on näidatud kontrollkatsutite eeldatavad väärtused. Andmed on tuletatud 1020 plasmaproovist, mis on võetud QuantiFERON-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiga kontrollitud tervetelt täiskasvanutelt.



**Joonis 4. Kontroll-IFN-γ reaktsioonide jaotuvus tervete täiskasvanud testitavate vahel (n = 1020) (väljendatud %-na populatsioonist)**

# Sooritusnäitajad

## Eelanalüüs

Analüüsi läviväärtus varasema CMV-ga kokkupuute tuvastamiseks QF-CMV abil saadi grupi tervete täiskasvanute (n = 223) testimise tulemuste analüüsi põhjal, mille käigus QF-CMV tulemusi võrreldi CMV seroloogiliste tulemustega. ROC-analüüsiga määratleti, et analüüsi läviväärtus 0,04 RÜ/ml (pärast kontrollväärtuse lahutamist) tagas QF-CMV jaoks optimaalsed positiivsed ja negatiivsed prognoositavad väärtused (kõvera ala = 0,9679 [95%CI = 0,9442–0,9915,  $p < 0,0001$ ]) ja seega sobis läviväärtuseks, mille juures analüüs toimis ettenähtud kasutuse juures tervetest isikutest koosneva populatsiooni uurimisel kõige tõhusamalt.

Eelanalüüsimisel võrreldi QF-CMV tulemusi SeraQuest CMV IgG seroloogiaanalüüsiga (Quest International). QF-CMV analüüs kattus tervete täiskasvanute puhul 95% (294/310 isikut) ulatuses HCMV-vastase seroloogiaanalüüsi tulemustega, kusjuures ükski 149-st seronegatiivsest doonorist ei olnud reaktiivne QF-CMV-le, ja 145 161-st seropositiivsest doonorist oli reaktiivne IFN- $\gamma$ -le. Üldine positiivne ühildumine oli 90%, negatiivse ühildumise väärtus aga 100%. Tabelis 2 on näidatud IFN- $\gamma$  CMV peptiididele reageerimise (möödetuna QF-CMV-ga tervetel vabatahtlikel analüüsitavatel) ja nende analüüsitavate CMV-vastase seroloogilise seisundi (möödetuna SeraQuest CMV IgG seroloogiaanalüüsiga) vaheline ühilduvustase.

**Tabel 2. QuantiFERON-CMV ja CMV IgG seroloogiaanalüüsi tulemuste kattumine tervete analüüsitavate puhul**

		CMV seroloogia		Kokku
		Positiivsed	Negatiivsed	
QuantiFERON-CMV	Reaktiivne	145	0	145 (46,8%)
	Mittereaktiivne	16	149	165 (53,2%)
	Kokku	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

## Analüüsi läviväärtus

Selle analüüsi soovitatav kliiniline läviväärtus CMV antigeeni katsuti puhul on 0,2 RÜ/ml (miinus kontroll), kuigi erinevate kliiniliste tingimuste korral võivad valiidseks osutada erinevad läviväärtused. Põhjused seisnevad fundamentaalsetes immunoloogilistes erinevustes normaalse analüüsitava populatsiooni ja sellise populatsiooni vahel, kelle puhul analüüsi peetakse kliiniliselt kasulikuks – eriti immuunpuudulikkusega inimestel, kellel immuunpuudulikkuse tõttu on risk sümptomaatilise CMV-infektsiooni ja/või haiguse tekkeks. Selliste kõrge riskiga isikute puhul tuleb QF-CMV-ga täpselt tuvastada CMV vastase immuunsuse tase, kuna immuunpuudulikkus võib olla seotud CMV väljakujunemisega (1–5, 7, 8, 11–16).

## Kliinilised uuringud

Kuna üldtunnustatud standard tsütomegaloviirusnakkuse diagnoosi kinnitamiseks või välistamiseks puudub, ei saa QF-CMV tundlikkuse ja spetsiifilisuse analüüsi praktiliselt hinnata. QF-CMV ligikaudne spetsiifilisus ja tundlikkus leiti ühilduvustaseme määramise teel IFN- $\gamma$  CMV peptiididele reageerimise (möödetud QF-CMV-ga tervetel vabatahtlikel analüüsitavatel) ja nende isikute CMV vastase seroloogilise seisundi vahel (möödetud CMV IgG seroloogiaanalüüsiga).

QF-CMV ligikaudne spetsiifilisus leiti tervete uuritavate valepositiivsete tulemuste määra hindamise teel (QF-CMV reaktiivne vastus), kellel puudus varasem kokkupuude CMV-ga (CMV-seronegatiivsed isikud). Ligikaudne tundlikkus määrati tervete uuritavate hindamise teel, kellel oli varasemaid kokkupuuteid CMV-ga (CMV-seropositiivsed isikud). Kuigi QF-CMV kasutab suurt arvu erinevate CMV proteiinide CMV-spetsiifilisi epitoope, võimaldades ulatuslikku kliinilist rakendust suurele hulgale erineva HLA-klass I haplotüüpidega populatsioonile, pole nende peptiidide katvus siiski 100%. Kuna CMV seroloogiaga analüüsitud isikute HLA haplotüübid polnud teada, eeldati, et väike protsent seropositiivsete isikute proovidest ei reageeri QF-CMV katsutitele.

## Spetsiifilisus

Uuringus, mis viidi läbi tervete isikutega, kes polnud eelnevalt CMV-ga kokku puutunud (CMV-seronegatiivsed isikud,  $n = 250$ ), oli IFN- $\gamma$  CMV peptiididele reageerimise tase (möödetud QF-CMV-ga) ja CMV vastase seroloogiateabe ühilduvuse tase 100%.

Kõigis muudes spetsiifilisuse analüüsides, mis viidi läbi parenhümatoossete elundite siirdamise (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), hematopoeetilise tüvirakusiirdamise (7, 13) läbi teinud ja HI-viirusega (2) patsientide seas, oli IFN- $\gamma$  CMV peptiididele reageerimise (möödetud QF-CMV-ga) ja CMV vastase seroloogia ühilduvuse tase olnud järjepidevalt 100%.

## Tundlikkus

Uuringus, mis viidi läbi tervete isikutega, kes olid eelnevalt CMV-ga kokku puutunud (CMV-seropositiivsed isikud,  $n = 341$ ), oli IFN- $\gamma$  CMV peptiididele reageerimise tase (möödetud QF-CMV-ga) ja CMV vastase seroloogia ühilduvuse tase 80,6% (275/341). Ebakõla võib olla tingitud kõrgema analüüsi läviväärtuse (0,2 RÜ/ml) kasutamisest, valepositiivsest CMV-seroloogiast või analüüsitavate mittereaktiivsusest CMV peptiidide suhtes.

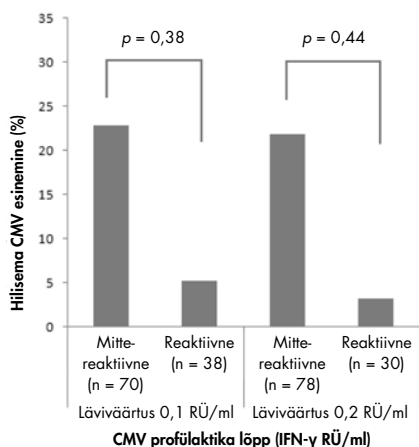
Tundlikkuse hindamisel parenhümatoossete elundite siirdamise läbi teinud patsientidel (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), hematopoeetilise tüvirakusiirdamise patsientidel (7, 13) ja HI-viirusega nakatunud patsientidel (2) leiti IFN- $\gamma$  CMV peptiididele reageerimise (möödetud QF-CMV) ja CMV seropositiivsete vastuste puhul pisut madalamat ühilduvuse taset. Madalam ühilduvuse tase võib olla tingitud valepositiivsest CMV-seroloogiast, patsiendi mittereaktiivsusest analüüsi CMV-peptiidide suhtes või reaktiivsete T-rakkude puudumisest neis patsientides nende immuunreaktsiooni pärsituse tõttu.

## Kliinilist kasulikkust esiletõstvad uuringud

Nii seroloogia kui ka QF-CMV sihtotstarve on CMV suhtes immuunsuse tuvastamise võimaldamine. Elundite siirdamisel kasutatakse CMV seroloogiat laialdaselt enne siirdamist, et kindlaks teha CMV-ga seotud komplikatsioonide riski pärast patsiendile elundi siirdamist, kuid siirdamisjärgselt on sel vaid piiratud väärtus. QF-CMV-d võib kasutada ka elundisiirdamispatsientide puhul, et hinnata nende CMV vastase immuunsuse taset ja riski sümptomaatilise CMV-nakkuse ja/või -haiguse väljakujunemiseks immuunreaktsiooni pärsituse tõttu (6, 9–11).

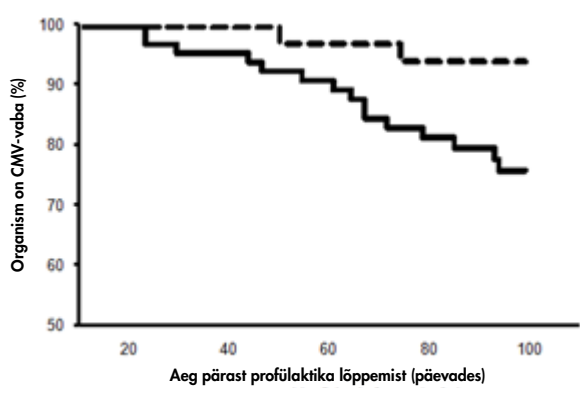
Mitmed avaldatud kliinilised uuringud erinevate siirdamispatsiendirühmade seas on nüüdseks tõestanud QuantiFERON-CMV kasulikkust (1–5, 7, 8, 11–16).

Ulatuslikus uuringus 108 parenhümatoomsete elundite siirdamise läbi teinud patsiendi (4) seas oli QF-CMV reaktiivse tulemusega patsientidel pärast CMV vastase profülaktika läbimist märkimisväärselt madalam hiljem avaldunud haigestumuse tase võrreldes nendega, kellel oli QF-CMV analüüsis mittereaktiivne tulemus (vastavalt 5,3% ja 22,9%,  $p = 0,044$ ) (joonis 5).



**Joonis 5. Hiljem avaldunud haiguse CMV reaktiivsete ja mittereaktiivsete QuantiFERON-CMV tulemustega patsientide puhul pärast profülaktika lõppu. Kumari jt andmed (4)**

Veelgi enam – QF-CMV reaktiivse tulemusega patsiendid ei nakatunud pärast profülaktika lõppu sagedamini ja pikema aja vältel CMV haigusse (joonis 6), mis näitab, et QF-CMV abil saab tuvastada isikuid, kelle puhul on risk hiljem avalduva CMV väljakujunemiseks.

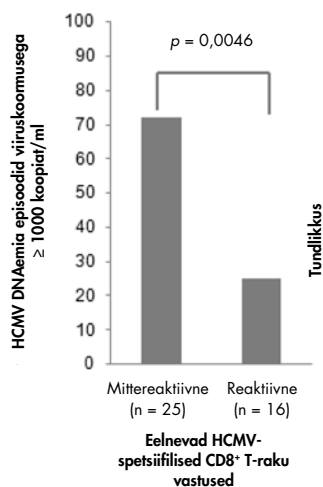


**Joonis 6. Aeg CMV väljakujunemiseni QuantiFERON-CMV reaktiivsete tulemustega (tähistatud punktiirjoonega) ja mittereaktiivsete tulemustega (tähistatud pidevjoonega) patsientidel pärast profülaktika lõppu. Kumari jt andmed (4)**

Selle uuringuga tõsteti ka esile, et kõrgeima CMV riskiga siirdamispatientide Rühma (CMV-seronegatiivsed patsiendid, kes said elundi CMV-seropositiivselt doonorilt, s.o D+/R-) puhul oli QF-CMV reaktiivne tulemus pärast profülaktikat seotud 90% tõenäosusega mitte nakatuda CMV-sse.

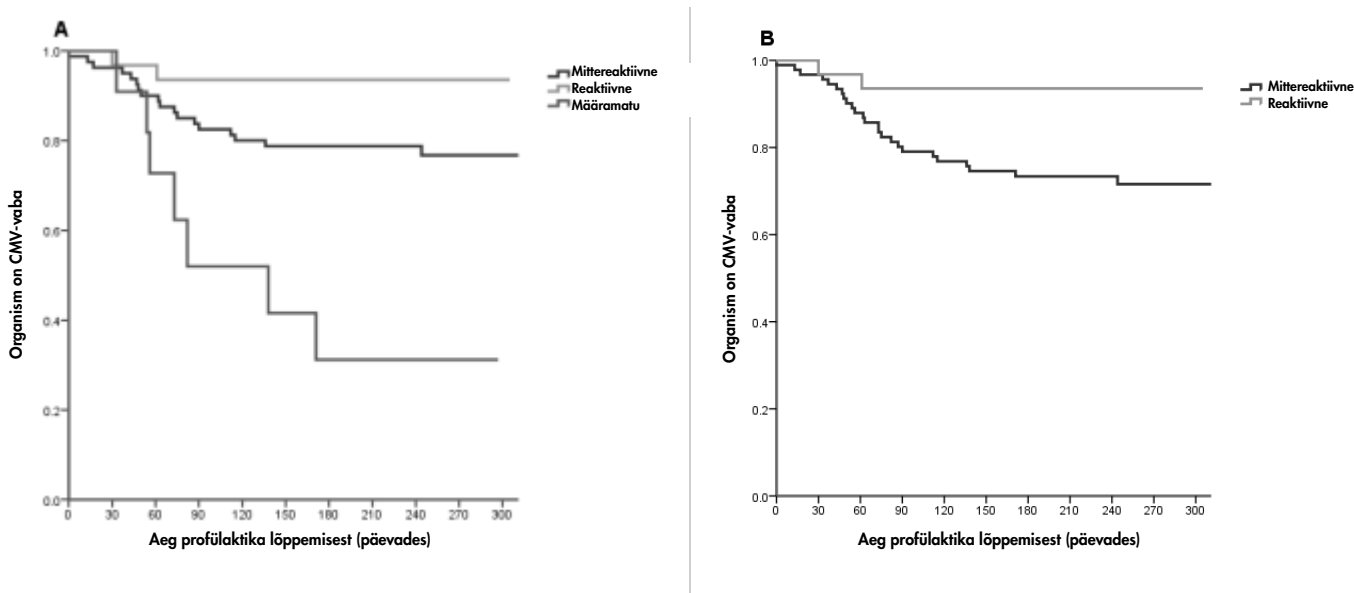
37 parenhümatosse elundi siirdamise läbi teinud patsiendi (12) seas tehtud uuringus aitas QF-CMV analüüsi CMV-spetsiifiliste CD8<sup>+</sup> T-raku vastuste analüüs prognoosida CMV vireemia suurenemise järgset spontaanset viiruse kadumist organismist või CMV väljakujunemist. Selles uuringus kadus 24-l 26-st QF-CMV reaktiivse tulemusega patsiendist (92,3%) CMV-viirus organismist spontaanselt ja ainult 5-l 11-st CMV mittereaktiivse tulemusega patsiendist (45,5%) kadus viirus spontaanselt.

Uuringus, kus osales 67 kopsusiirdamispatient ja kus analüüsiti siirdamisjärgseid CMV vireemia episoode (14), leiti, et 18/25-st (72%) CMV vireemia episoodist eelnes mittereaktiivne QF-CMV tulemus ja 4/16-st (25%) episoodist eelnes reaktiivne QF-CMV tulemus (Fisher'i täppisanalüüs,  $p = 0,0046$ , vt joonis 7).



**Joonis 7. QuantiFERON-CMV-ga tuvastatud CMV-spetsiifiliste CD8<sup>+</sup> T-raku vastuste ja CMV vireemia väljakujunemise statistiline analüüs (Fisher'i täppisanalüüs,  $p = 0,0046$ ).** Andmed võetud Weseslindtner et al (14)

Ulatuslikus laboratooriumidevahelises perspektiivses uuringus, milles osales 127 D+/R- parenhümatossete elundite siirdamise patienti (15), kes läbisid kõik viirusevastase profülaktika, oli QF-CMV reaktiivse tulemusega patientide seas (analüüsi läviväärtus 0,1 RÜ/ml) 12 kuu jooksul pärast siirdamist ja CMV vastase profülaktika läbimist märkimisväärselt väiksem hiljem avaldunud haiguse avaldumise protsent võrreldes nendega, kelle QF-CMV tulemus oli mittereaktiivne ja määramatu (vastavalt 6,4% ja 22,2% ja 58,3%,  $p < 0,001$ ). Kui liigitada määramatud tulemused samuti mittereaktiivsete hulka, oli hilisema CMV avaldumise protsent 6,4% ja 26,8%,  $p = 0,024$  (vt joonis 8). QF-CMV positiivsed ja negatiivsed väärtused, mille põhjal sai prognoosida kaitset CMV viiruse vastu, olid vastavalt 0,90 (95% CI 0,74–0,98) ja 0,27 (95% CI 0,18–0,37), mis näitas, et QuantiFERON-CMV reaktiivset tulemust mis tahes ajahetkel pärast profülaktika läbimist on võimalik seostada 90% tõenäosusega mitte nakatuda CMV-sse. Selles uuringus leiti, et QF-CMV abil võib olla võimalik prognoosida, kas patientidel on profülaktikajärgselt väike, keskmine või suur CMV väljakujunemise risk.



**Joonis 8. Kaplan-Meieri kõverad CMV esinemise kohta vastavalt QF-CMV analüüsi tulemusele.**

**A** Võrdlus: reaktiivsed, mittereaktiivsed ja määramatud QF-CMV tulemused (logrank-test,  $p < 0,001$ ).

**B** Võrdlus: reaktiivsed ja mittereaktiivsed, milles määramatud tulemused arvestati mittereaktiivsete hulka (logrank-test,  $p = 0,024$ ).

55 parenhümatoosete elundite siirdamise läbi teinud patsiendi perspektiivses uuringus (16), milles analüüsiti siirdamiseelsete QF-CMV tulemuste ja siirdamisjärgsete CMV replikatsiooniepisoodide vahelist seost, leiti, et siirdamisjärgselt esines CMV replikatsiooni rohkem R(+)-patsientidel, kellel oli siirdamiseelsetes QF-CMV analüüsis mittereaktiivne tulemus (7/14 või 50%), võrreldes nende R(+)-patsientidega, kelle QF-CMV tulemus oli reaktiivne (4/30 või 13,3%).

Selles uuringus leiti, et siirdamiseelsete QF-CMV analüüsi mittereaktiivse tulemusega patsientidel, kes said elundi CMV-seropositiivselt doonorilt, oli kümme korda suurem CMV replikatsiooni risk võrreldes siirdamiseelsete QF-CMV analüüsi reaktiivse tulemusega patsientidega (korrigeeritud OR 10,49, 95% CI 1,88–58,46). Samuti leiti, et siirdamiseelne QF-CMV analüüs võib olla kasulik siirdamisjärgse CMV replikatsiooni riski prognoosimisel ja seega võimaldab parenhümatoosete elundite siirdamise järgse CMV-nakkuse ohu individuaalset käsitlemist.

Üle maailma on läbi viidud või parajasti viiakse läbi teisigi uuringuid (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) QF-CMV analüüsiga CMV-spetsiifiliste CD8<sup>+</sup> T-raku vastuste tuvastamiseks siirdamispatsientide rühmades.

## Rahvusvahelised kokkuleppelised juhised tsütomegaloviiruse ohjamiseks parenhümatoosete elundite siirdamisel

Publikatsioonis „International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation“ (6) on rõhutatud CMV-spetsiifilise immuunsuse jälgimise tähtsust. Need rahvusvahelised juhised on välja töötanud CMV ja parenhümatoosete elundite siirdamise ekspertide komisjon, heaks kiitnud siirdamisühenduse Transplantation Society nakkushaiguste haru, ja need hõlmavad tõendusmaterjali ja ekspertide arvamusel põhinevaid konsensuslikke juhiseid CMV ohjamiseks, sh järgmist:

Neis juhistes leiti, et CMV-spetsiifiliste T-raku vastuste immuunreaktsiooni jälgimine võib aidata prognoosida individuaalselt siirdamisjärgse CMV-sse nakatumise riski ning olla kasulik profülaktika ja ennetava ravi suunamisel (6).

Juhistes kirjeldatakse ka ideaalse immuunsuse jälgimise analüüsi omadusi, mis hõlmavad järgmist:

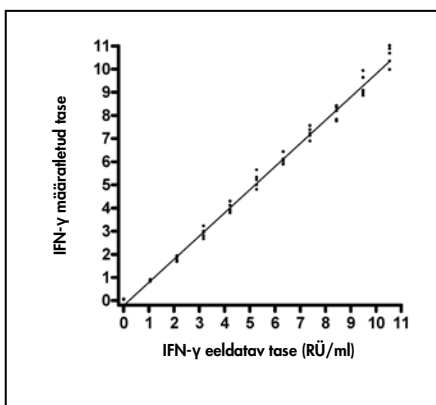
- võimaldab hinnata siirdamispatsiendi CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> T-rakkude kogust ja funktsiooni;
- võimaldab mõõta IFN- $\gamma$ ;
- lihtne läbi viia, kulusäästlik ja korratav;
- kiire läbiviimistsükkel;
- lihtne lähetada proove spetsiaalsetesse laboratooriumidesse.

QF-CMV vastab peaaegu kõigile neis juhistes seatud kriteeriumidele ja on ainus standarditud immuunsuse jälgimise analüüs, mis suudab tuvastada CMV-spetsiifilist IFN- $\gamma$ .

## Analüüsi sooritusnäitajad

QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiga IFN- $\gamma$  kontsentratsiooni mõõtmise meetod on lineaarne: 0–10 RÜ/ml-ni (joonis 9). Lineaarsusuring viidi läbi järgmiselt: teadaoleva IFN- $\gamma$  kontsentratsiooniga 11 plasmaproovi 5 paralleelproovi paigutati juhuslikus järjestuses ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiplaadile.

QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüs ei näita IFN- $\gamma$  kuni 100 000 RÜ/ml kontsentratsiooni juures mingeid ülisuure kontsentratsiooniga seotud negatiivseid tulemusi.



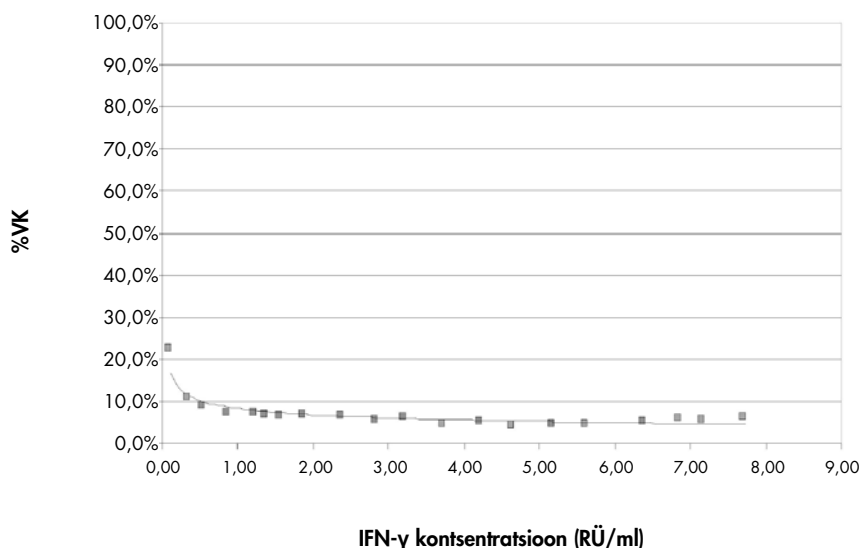
**Joonis 9. QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi lineaarsusprofiil, mis määratleti teadaoleva IFN- $\gamma$  kontsentratsiooniga 11 plasmaproovi 5 paralleelproovi analüüsimise teel.** Lineaarsel regressioonisirgel on kalle  $1,002 \pm 0,011$  ja korrelatsioonikordaja 0,99.

QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsisest ja analüüsivahelist ebatäpsust (%VK) hinnati 20 plasmaproovi analüüsimise teel, millel olid erinevad IFN- $\gamma$  kontsentratsioonid, 3 paralleelproovi põhjal, 3 laboratooriumis, 3 mittejärjestikusel päeval ja 3 töötaja poolt. Seega analüüsiti igat proovi 27 korda 9 eraldi analüüsipartii. Üks proov oli kontroll-lahus ja selle arvatud IFN- $\gamma$  kontsentratsioon oli 0,08 (95% CI 0,07–0,09) RÜ/ml. Ülejäänud 19 plasmaproovi kontsentratsioonide vahemik oli 0,33 (0,31–0,34) kuni 7,7 RÜ/ml (7,48–7,92).

Analüüsipartii või analüüsisest ebatäpsust hinnati iga plaadipartii IFN- $\gamma$  sisaldava analüüsitava plasmaproovi keskmise %VK leidmise teel ( $n = 9$ ) ja selle vahemik oli %VK 4,1–9,1. Analüüsipartii keskmine %VK ( $\pm 95\%$  CI) oli  $6,6\% \pm 0,6\%$ . IFN- $\gamma$  nullplasmaproovi keskmine %VK oli 14,1.

Kogu- või analüüsivaheline ebatäpsus määratleti iga plasmaproovi 27 arvatud IFN- $\gamma$  kontsentratsiooni võrdlemise teel ja selle %VK vahemik oli 6,6–12,3. Üldine keskmine %VK ( $\pm 95\%$  CI) oli  $8,7\% \pm 0,7\%$ . IFN- $\gamma$  nullplasmaproovi %VK oli 26,1. Selline varieerumistase oli eeldatav, kuna IFN- $\gamma$  arvatud kontsentratsioon on madal ja madala kontsentratsiooni varieeruvus on suurem kui kõrgemate kontsentratsioonide puhul.

QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi täpsusprofiil on toodud joonisel 10 ja see näitab, et kõrgemate IFN- $\gamma$  kontsentratsioonide juures ebatäpsus ei suurene.



**Joonis 10. QF-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi täpsusprofiil, mis määratleti 20 plasmaproovi analüüsimise teel kolmes eksemplaris, 3 mittejärjestikusel päeval, 3 laboratooriumis ja 3 töötaja poolt.** Trendijoon on arvatud vähimruutude meetodiga.

Viidi läbi uuring QF-CMV analüüsi korratavuse kontrollimiseks, milles kasutati 8 isiku vereproove, kelle CMV seisund polnud teada. Iga isiku veri koguti kolme QF-CMV katsutiseeriasse (3 kontroll-lahuse, 3 CMV- ja 3 mitogeenikatsutit). Seejärel inkubeeriti 3 katsutiseeriat kolmes erinevas kohas (üks kontroll-lahuse, CMV- ja mitogeeniseeria koha kohta), nagu on juhendatud infolehel. Pärast 16–24 tunnist inkubatsiooni katsutid tsentrifuugiti ja eraldati plasma.

Kõigis kolmes kohas tehti kolm korda ensüüm-immunosorptsiooni analüüs ja saadi kolm QF-CMV tulemust iga isiku ja iga koha kohta (kõigis kohtades kokku 9 tulemust). Igas kohas töötas erinev töötaja. Uuringus kasutatud plaadid polnud tingimata sama partinumbriga, kuid nende kõlblikkusaeg polnud ületatud.

Iga vereproovi kohta määratleti nii diagnostilise staatuse (reaktiivne, mittereaktiivne või määramatu) kui ka arväärtuse korratavus. Arväärtuse korratavust hinnati ainult reaktiivsete proovide (väljendatuna %VKna) puhul, kuna mittereaktiivsete proovide IFN- $\gamma$  tasemed olid liiga madalad, et võimaldada tähendusliku täpsushinnangu andmist.

Üldine diagnostiline korratavus oli 100%; kõigi 8 vabatahtliku QF-CMV diagnostilist staatust korrati kõigil juhtudel kõigis kohtades – ühtegi määramatut proovi ei olnud. Reaktiivsete proovide korratavus oli aktsepteeritav nii kohasiseselt kui ka kohtadevaheliselt. Iga analüüsimiskoha keskmine %VK oli 4,5% (koht 1), 5,9% (koht 2) ja 7,3% (koht 3). Kõigi 5 reaktiivse proovi üldine kohtadevaheline %VK oli 5,9%. Varieeruvusväärtuste koefitsient alla 10% on suurepärase tulemus.



# Tehniline teave

## Määramatud tulemused

Määramatud tulemused võivad olla seotud analüüsitava isiku immuunsüsteemi seisundiga, kuid ka mitmesuguste tehniliste teguritega:

- verevõtu ja temperatuuril 37 °C inkubeerimise vahe on pikem kui 16 tundi;
- vere säilitamistemperatuur on väljaspool soovitatavat vahemikku (17–27 °C);
- verevõtukatsutite ebapiisav segamine.

Kui teil on kahtlusi, et vereproovide võtmisel või käsitlemisel võib olla esinenud tehnilisi probleeme, korrake kogu QF-CMV analüüsi uute vereproovidega. Kui ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi puhul kahtlustatakse protseduurilisi kõrvalekaldeid, võib stimuleeritud plasmaproovide analüüsi ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiga korrata. Kui ensüüm-immunosorptsiooni analüüsimisel pole vigu tehtud, siis määramatud tulemused (madalate mitogeeniväärtuste põhjal) analüüsi kordamisel tõenäoliselt ei muutu.

# Tõrkeotsingujuhend

See tõrkeotsingujuhend võib aidata tekkivaid probleeme lahendada. Lisateavet leiate ka tehnilisest teabest veebisaidil: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Kontaktteabe leiate lk 28 ja tagakaanelt.

## Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi tõrkeotsing

---

### *Standardite halvad optilise tiheduse näidud*

<b>Võimalik põhjus</b>	<b>Lahendus</b>
a) Viga standardi lahjendamisel	Veenduge, et standardkomplekti lahused valmistataks õigesti vastavalt infolehe juhistelet.
b) Pipeteerimisviga	Veenduge, et pipetid oleks kalibreeritud ja neid kasutataks vastavalt tootja juhistele.
c) Inkubeerimistemperatuur on liiga madal	Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi inkubeerimine tuleb teha toatemperatuuril (17–27 °C).
d) Inkubeerimisaeg on liiga lühike	Konjugaadi, standardite ja proovidega plaadi inkubeerimine peab kestma $120 \pm 5$ minutit. Ensüüm-substraadi lahust inkubeeritakse plaadil 30 minutit.
e) Kasutati valet plaadilugemisfiltrit	Mikroplaati tuleb lugeda 450 nm filtri ja 620–650 nm referentsfiltri abil.
f) Reaktiivid on liiga külmad	Kõik reaktiivid (välja arvatud 100-kordne konjugaadikontsentraat) peavad enne analüüsi tegemist olema saavutanud toatemperatuuri. See võtab aega umbes 1 tund.
g) Komplekt/komponendid on aegunud	Kontrollige, et komplekti säilivusaeg poleks möödas. Arvestage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentraat tuleb ära kasutada 3 kuu jooksul pärast rekonstitueerimist.

### *Mittespetsiifiline värvireaktsioon / tausta tugev värvumus*

<b>Võimalik põhjus</b>	<b>Lahendus</b>
a) Plaadid pole piisavalt puhtad	Peske plaati vähemalt 6 korda, kasutades iga mikrolohukese kohta 400 µl pesupuhvrit. Sõltuvalt kasutatavast pesuseadmest võib osutada vajalikuks üle 6 pesutsükli. Iga pesutsükli vahele tuleb jätta vähemalt 5 sekundi pikkune leotusaeg.
b) Inkubeerimistemperatuur on liiga kõrge	Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi inkubeerimine tuleb teha toatemperatuuril (17–27 °C).
c) Komplekt/komponendid on aegunud	Kontrollige, et komplekti säilivusaeg poleks möödas. Arvestage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentraat tuleb ära kasutada kolme kuu jooksul pärast rekonstitueerimist.
d) Ensüüm-substraadi lahus on saastunud	Kui substraat muutub sinakaks, tuleb see kõrvaldada. Kontrollige, et kasutatavad reaktiivimahutid oleksid puhtad.
e) Plasmat on enne eraldamist tsentrifuugikatsutites loksutatud	Plasma tuleb eraldada ettevaatlikult hüüvise pealt hüüvist alt või pealt pipeteerimata, hoolitsedes selle eest, et plasma ja hüüvis ei seguneks.

# Kirjandus

1. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* **9**, 165.
2. Singh, K.P., Howard, J.L., Wild, S.P., Jones, S.L., Hoy, J., Lewin, S.R. (2007) Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of HCMV disease despite CD4+ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* **124**, 200.
3. Westall, G.P., Mifsud, N., Kotsimbos, T. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* **8**, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* **9**, 1214.
5. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**, 76.
6. Kotton, C.N., et al. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* **82**, 433.
8. Lachmanova, A.I., et al. (2010) Quantiferon-CMV Test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **42(9)**, 3574.
9. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 26 October 2010; doi:10.1038/nrneph.2010.
10. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **29(10)**, 735.11.
11. Giulieri, S, Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11(1)**, 17.
12. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E., Humar, A. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93(2)**, 195.
13. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detecting and estimating the magnitude and functionality of the CMV-specific IFN- $\gamma$  CD8+ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* Online ahead of print 29 February 2012; doi: 10.1128/CVI.05633-111.
14. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8+ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **12(8)**, 2172.
15. Manuel, O., et al. (2012) Assessment of cytomegalovirus specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* (käsikiri aktsepteeritud 2012. aasta novembris).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (käsikiri aktsepteeritud 2012. aasta novembris).

# Tehniline tugi

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

**Asia-Pacific** ■ techservice-ap@qiagen.com

**Europe** ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

**Middle East/Africa** ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

**USA/Canada** ■ techservice-na@qiagen.com

**Latin America (not including Brazil or Mexico)** ■ techservice-latam@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-MX@qiagen.com

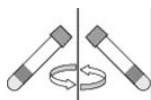
**Brazil** ■ techsebr@qiagen.com

See leht on teadlikult tühjaks jäetud.

# Analüüsi lühikirjeldus

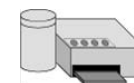
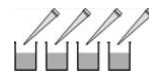
## 1. etapp – vereproovi inkubeerimine

1. Võtke patsiendi veri verevõtukatsutitesse ja raputage neid kohe pärast nende täitmist kümme (10) korda piisava tugevusega, et katsuti kogu sisepind oleks verrega kaetud ja katsuti seintel olevad antigeenid lahustuksid.
2. Inkubeerige katsuteid püstasendis temperatuuril  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  16–24 tundi.
3. Tsentrifugeerige katsuteid pärast inkubeerimist 15 minutit 2000–3000 RCF (g) juures, et plasma ja punalibled eraldada.
4. Pärast tsentrifugimist ja enne plasma eraldamist ei tohi seda mingil juhul üles või alla pipeteerida ega segada. Olge hoolikas, et plasma ei seguneks hüüvise pinnaga.



## 2. etapp – IFN- $\gamma$ ensüüm-immunosorptsiooni analüüs

1. Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi komponentidel (välja arvatud 100-kordne konjugaadikontsentraat) tuleb lasta vähemalt 60 minutit toatemperatuuril stabiliseeruda.
2. Rekonstitueerige standardkomplekt destilleeritud või deioniseeritud veega 8,0 RÜ/ml-ni. Valmistage neli (4) standardlahust.
3. Rekonstitueerige lüofiliseeritud 100-kordne konjugaadikontsentraat destilleeritud või deioniseeritud veega.
4. Valmistage rohelise lahjendiga konjugaat ja valage igasse mikrolohukesse 50  $\mu\text{l}$ .
5. Lisage igasse mikrolohukesse 50  $\mu\text{l}$  plasmaproovi ja 50  $\mu\text{l}$  standardeid. Segage raputis.
6. Inkubeerige 120 minutit toatemperatuuril.
7. Peske mikrolohukesi vähemalt 6 korda, kasutades iga mikrolohukese kohta 400  $\mu\text{l}$  pesupuhvrit.
8. Tilgutage igasse mikrolohukesse 100  $\mu\text{l}$  ensüüm-substraadi lahust. Segage raputis.
9. Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril.
10. Tilgutage igasse mikrolohukesse 50  $\mu\text{l}$  deaktivaatorit. Segage raputis.
11. Mõõtkte tulemusi 450 nm filtri ja 620–650 nm referentsfiltriga.
12. Analüüsige tulemusi.



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

#### **QuantiFERON-CMV ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi komplekti piiratud litsentsileping**

Selle toote kasutamine tähendab, et toote ostja või kasutaja nõustub järgmiste tingimustega.

1. Toodet tohib kasutada ainult vastavalt tootega kaasas olevatele protokollidele ja sellele käsiraamatule ning ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna oma intellektuaalse omandi all litsentse komplekti komponentide kasutamiseks või ühendamiseks sellesse komplekti mittekuuluvate komponentidega, välja arvatud toote protokollides, selles käsiraamatus ja veebisaidil [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Mõne neist lisaprotokollidest on lisanud QIAGEN-i kasutajate jaoks teised QIAGEN-i kasutajad. QIAGEN pole neid protokolle põhjalikult testinud ega optimeerinud. QIAGEN ei garanteeri, et need ei riku kolmandate osapoolte õigusi.
2. QIAGEN ei anna garantiid, et komplekt ja/või selle kasutus ei riku kolmandate osapoolte õigusi, v.a selgesõnalised litsentsid.
3. Komplekt ja selle osad on litsensitud ühekordseks kasutuseks ning neid ei tohi taaskasutada, parandada ega edasi müüa.
4. QIAGEN ütleb lahti muudest väljendatud või kaudsetest litsentsidest, v.a selgesõnalistest litsentsidest.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustuvad, et ei tee ise ega luba kellelgi teisel teha midagi, mis võiks kaasa aidata või viia ülaltoodud keelatud toiminguteni. QIAGEN võib selle piiratud litsentsilepingu keelde jõustada mis tahes kohtus ning taotleda tagasi kõik piiratud litsentsilepingu või komplekti ja/või selle komponentidega seotud mis tahes intellektuaalse omandi õiguste jõustamiseks kulunud juurdlus- ja kohtukulud, sh advokaaditasud.

Uuendatud litsentsitingimused leiate veebilehelt [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2012, Cellestis, QIAGEN Company. Kõik õigused kaitstud.

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

E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)

