
QuantiFERON[®]-CMV

Uputa o upotrebi 2 x 96

Interferon gama test pune krvi za mjerenje reakcije na peptidne antigene humanog citomegalovirusa

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australija

Telefon: (Australija) +613-9840-9800, (Europa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NJEMAČKA

1075110HR Rev. 01



Sadržaj

Namjena	5
Uvod	5
Načela testa	6
Vrijeme potrebno za testiranje	6
Reagensi i pohranjivanje	7
Potrebni materijali koji nisu isporučeni	8
Pohranjivanje i rukovanje	8
Upozorenja i mjere opreza	9
Uzorkovanje i rukovanje	10
Upute za upotrebu	11
Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme	11
Faza 2 – QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ	11
Izračunavanje i interpretacija rezultata	14
Interpretacija rezultata	15
Ograničenja	15
Očekivane vrijednosti	16
Značajke izvedbe	17
Prediktivno testiranje	17
Referentna vrijednost testa	18
Kliničke studije	18
Specifikacija	18
Osjetljivost	19
Ispitivanja koja upućuju na kliničku korist	19
Međunarodne smjernice o postupanju s citomegalovirusom pri transplantaciji čvrstih organa	22
Značajke testa	22
Tehnički podaci	24
Nejasni rezultati	24
Vodič za rješavanje problema	25
Bibliografija	26

Tehnička služba	27
Sažetak postupka testiranja	30
Faza 1 – inkubacija krvi	30
Faza 2 – IFN- γ ELISA	30

Namjena

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) jest in vitro test koji se izvodi pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine humanog citomegalovirusa (CMV) radi stimuliranja stanica heparinizirane pune krvi. Otkrivanje interferona gama (IFN- γ) enzimski vezanim imunosorbent testom (ELISA) upotrebljava se za mjerenje in vitro reakcija na te peptidne antigene koji su povezani s imunološkim nadzorom infekcije CMV-om. Gubitak te funkcije imunološkog sustava može se povezati s razvojem CMV bolesti. QF-CMV namijenjen je za nadziranje razine pacijentova imuniteta na anti-CMV.

QF-CMV ne služi za utvrđivanje infekcije CMV-om i ne treba se upotrebljavati za odbacivanje mogućnosti infekcije CMV-om.

Uvod

CMV je virus herpesa koji pogađa 50 do 85% odraslih. Riječ je o čestoj komplikaciji immunosupresijske terapije, osobito nakon transplantacije, koja može značajno utjecati na morbiditet i mortalitet primatelja transplantacije. Trenutačne immunosupresijske terapije koje se upotrebljavaju za sprječavanje odbacivanja transplantiranog organa imaju detrimentalne učinke na T-limfocite i stanicama posredovane imunološke (CMI) reakcije koje rezultiraju povećanom osjetljivošću na posttransplantacijske virusne infekcije. Važnost T-stanične funkcije u supresiji CMV replikacije također ističe činjenica da CD8⁺ CMV specifični citotoksični T-limfociti (CTL-ovi) mogu zaštititi od patogenih virusa. Broj CD8⁺ specifičnih CTL-ova kod pacijenata s immunosupresijom i proizvodnja IFN- γ mogu pomoći u predviđanju rizika od razvoja CMV bolesti. Proizvodnja IFN- γ može biti funkcionalni surogat za identifikaciju CMV specifičnih CTL-ova.

QF-CMV je test za CMI reakcije na peptidne antigene koji simuliraju CMV proteine. CMV peptidi namijenjeni su za CD8⁺ T-stanice, uključujući haplotipove A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 i Cw6 (A30, B13) HLA klase I koji obuhvaćaju > 98% ljudske populacije. Osobe zaražene CMV-om uobičajeno u krvi imaju CD8⁺ limfocite koji prepoznaju te antigene. Taj postupak prepoznavanja uključuje stvaranje i izlučivanje citokina, IFN- γ . Otkrivanje i utvrđivanje količine IFN- γ osnovna je svrha ovog testa.

Načela testa

QF-CMV test provodi se u 2 faze. Najprije se puna krv prikuplja u svaku QF-CMV epruvetu za uzimanje krvi, što uključuje epruvetu Nulta kontrola, epruvetu CMV Antigen i Mitogen epruvetu.

Mitogen epruveta upotrebljava se u QF-CMV testu kao pozitivna kontrola. To može biti od posebne važnosti ako je imunološki status bolesnika nejasan.

Epruvete treba što prije inkubirati na temperaturi od 37 °C i unutar 16 sati od prikupljanja. Nakon inkubacije u trajanju od 16 do 24 sata epruvete se centrifugiraju, plazma se odvaja te se mjeri količina IFN- γ (IU/ml) testom QF-CMV ELISA.

Količina IFN- γ u uzorcima plazme iz CMV Antigen i Mitogen epruveta može se često nalaziti iznad gornjih granica većine čitača ELISA, čak i kada su osobe umjereno imunosupresivne. Za **kvalitativne** rezultate upotrijebite vrijednosti izračunate za nultu kontrolnu plazmu. Za **kvantitativne** rezultate, gdje su potrebne stvarne IU/ml vrijednosti, uzorci plazme trebaju se razrijediti 1/10 u zelenom diluensu i testirati testom ELISA zajedno s nultom kontrolnom plazmom.

Napomena: Za uzorke koji se nalaze unutar raspona QF-CMV ELISA (tj., do 10 IU/ml) treba upotrijebiti rezultate dobivene pomoću uzorka nulte kontrolne plazme. Za takve koncentracije IFN- γ vrijednosti dobivene razrjeđivanjem uzorka plazme u omjeru 1/10 mogu biti netočne.

Test se smatra reaktivnim za IFN- γ reakciju kada CMV Antigen epruveta očitava vrijednosti koje se nalaze znatno iznad Nil IFN- γ IU/ml vrijednosti. Mitogenom stimuliran uzorak plazme služi kao IFN- γ pozitivna kontrola svakog testiranog uzorka. Neznatna reakcija na mitogen ukazuje na nejasan rezultat kada uzorak krvi također ima negativnu reakciju na CMV antigene. Takav rezultat može nastati u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita zbog nepravilnog postupanja s uzorkom, nepravilnog punjenja/miješanja Mitogen epruvete ili ako limfociti bolesnika nisu u stanju producirati IFN- γ , kao što je slučaj s pacijentima koji su nedavno bili podvrgnuti transplantaciji. Nulti uzorak prilagođava se pozadini ili nespecifičnom IFN- γ u uzorcima krvi. Razina IFN- γ nulte epruvete oduzima se od IFN- γ razine za CMV Antigen i Mitogen epruvete (za pregled načina interpretacije QF-CMV rezultata pogledajte "Interpretacija rezultata" na stranici 15 ove upute za upotrebu).

Vrijeme potrebno za testiranje

U nastavku se navodi procijenjeno vrijeme provođenja QF-CMC testa; naznačeno je i vrijeme testiranja većeg broja uzoraka metodom skupne obrade:

Inkubacija epruveta s uzorcima krvi pri 37 °C:	16 do 24 sata
ELISA:	Pribl. 3 sata za 1 ELISA ploču
	Manje od 1 sat rada
	Plus 10 do 15 minuta za svaku dodatnu ploču

Reagensi i pohranjivanje

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Epruvete za uzimanje krvi: CMV i antigen kontrola (pakiranje za jednog pacijenta))

Kataloški br. 0192-0301

Broj preparata 1

QuantiFERON Nil Control
(Nulta kontrola QuantiFERON) (sivi čep) 1 epruveta

CMV Antigen (CMV antigen) (plavi čep) 1 epruveta

QuantiFERON Mitogen Control
(Mitogen kontrola QuantiFERON) (ljubičasti čep) 1 epruveta

Uputa o lijeku 1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (Komponente QuantiFERON-CMV ELISA)

Kataloški br. 0350-0201

Mikrotitar trake 24 x 8 udubljenja

Human IFN- γ Standard (humani IFN- γ standard), liofiliziran 1 bočica

Zeleni diluens 1 x 30 ml

QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate
(konjugat QuantiFERON 100X koncentriran), liofiliziran 1 x 0,3 ml

QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate
(pufer za ispiranje QuantiFERON 20X koncentriran) 1 x 100 ml

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(otopina enzimskog supstrata QuantiFERON) 1 x 30 ml

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(enzimska otopina za zaustavljanje reakcije QuantiFERON) 1 x 15 ml

Potrebni materijali koji nisu isporučeni

- 37 °C inkubator; CO₂ nije potreban
- Kalibrirane pipete s varijabilnim volumenom (10 µl do 1000 µl) s jednokratnim vrhovima
- Kalibrirane višekanalne pipete za doziranje 50 µl i 100 µl s jednokratnim vrhovima
- Tresilica za mikrotitar ploče
- Deionizirana ili destilirana voda, 2 litra
- Uređaj za ispiranje mikrotitar ploča (po mogućnosti automatiziran)
- Čitač mikrotitar ploča s filtrom od 450-nm i referentnim filtrom od 620 do 650 nm

Pohranjivanje i rukovanje

Epruvete za uzimanje krvi

- Epruvete za uzimanje krvi čuvajte na temperaturama 4 °C do 25 °C.
- Vijek trajanja epruveta za uzimanje krvi QuantiFERON-CMV iznosi najviše 15 mjeseci od datuma proizvodnje, ako se pohranjuje na temperaturama od 4 °C do 25 °C.

Reagensi kompleta ELISA

- Komplet čuvajte na temperaturi od 2 °C do 8 °C.
- Otopinu enzimskog supstrata uvijek zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.

Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi

Za upute o rekonstituiranju reagensa pogledajte "Upute za upotrebu – faza 2" (koraci 3 i 5 na stranicama 11 i 12).

- Rekonstituirani komplet Standard može se držati do 3 mjeseca pohranjen na temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Zabilježite datum rekonstitucije kompleta Standard.

- Nakon rekonstitucije nepotrební konjugat QuantiFERON 100X (koncentrirani) mora se i dalje čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C i upotrijebiti unutar 3 mjeseca.

Zabilježite datum rekonstitucije konjugata.

- Rekonstituirani konjugat mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
- Pufer za ispiranje koji je pripremljen za uporabu održiv je na sobnoj temperaturi (17 °C do 27 °C) do 2 tjedna.

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku upotrebu.

Prilikom rada s kemikalijama uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku zaštitnu odjeću, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa sigurnosnim podacima. Njih možete pronaći na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na stranici www.qiagen.com/safety, gdje možete pronaći, pregledati i ispisati list sa sigurnosnim podacima za svaki komplet i komponentu kompleta QIAGEN.



OPREZ: S ljudskom krvlju postupajte kao s potencijalno infektivnom. Pridržavajte se odgovarajućih smjernica o postupanju s krvlju.

Sljedeće izjave o riziku i sigurnosti odnose se na komponente kompleta QF-CMV ELISA.

Enzimski otopina za zaustavljanje reakcije QuantiFERON



Sadrži sumpornu kiselinu: Nadražujuće. Izjave o riziku i sigurnosti:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zeleni diluens** sadrži normalni mišji serum i kazein koji mogu prouzrokovati alergijske reakcije. Stoga izbjegavajte kontakt s kožom.

U slučaju nužde

Prolijevanje, curenje, izlaganje ili nezgode

Nazovite CHEMTRECK u svako doba dana

Unutar SAD-a i Kanade: 1-800-424-9300

Izvan SAD-a i Kanade: +1-703-527-3887 (prihvaćaju se pozivi na račun primatelja)

Dodatne informacije

Listovi sa sigurnosnim podacima: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Nadražujuće za oči i kožu, S26: U slučaju kontakta s očima, odmah isperite oči s puno vode i potražite savjet liječnika; S36/37/39: Nosite odgovarajuću zaštitnu odjeću, rukavice i zaštitu za oči/lice.

Uzorkovanje i rukovanje

Važne napomene prije početka:

Nepridržavanje uputa za QF-CMV može dovesti do netočnih rezultata. Prije upotrebe pažljivo pročitajte upute.

- Komplet nemojte upotrebljavati ako bilo koja bočica reagensa pokazuje znakove oštećenja ili curenja prije upotrebe.
- Nemojte miješati ili upotrebljavati reagense ELISA iz drugih kompleta QF-CMV ELISA.
- Odložite neupotrijebljene reagense i biološke uzorke u skladu s lokalnim, državnim i saveznim propisima.
- Nemojte upotrebljavati epruvete za uzimanje krvi QF-CMV ili komplet QF-CMV ELISA nakon datuma isteka.

QF-CMV upotrebljava sljedeće epruvete za uzimanje krvi:

1. Nulta kontrola (sivi čep)
2. CMV Antigen (CMV antigen) (plavi čep)
3. Mitogen kontrola (ljubičasti čep)

Antigeni su osušeni na unutarnjoj stijenci epruvete za uzimanje krvi, stoga se uzorci u epruveti moraju dobro promiješati s krvlju. Epruvete zatim treba čim prije, ali najkasnije u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi, prenijeti u inkubator pri temperaturi od 37 °C.

Optimalni rezultati postižu se pridržavanjem sljedećih uputa:

1. Uzmite od svakog pacijenta 1 ml venske krvi u svaku QF-CMV epruvetu za uzimanje krvi.

- Budući da se epruvete od 1 ml relativno polako pune krvlju, ostavite epruvetu nakon postizanja razine punjenja još 2 do 3 sekunde na igli. Tako ćete osigurati uzimanje potrebne količine.

Crna oznaka s bočne strane epruveta označava razinu punjenja od 1 ml. QF-CMV epruvete za uzimanje krvi validirane su za razine punjenja od 0,8 to 1,2 ml. Ako razina krvi u bilo kojoj epruveti nije blizu oznake, preporučuje se uzimanje drugog uzorka.

- QF-CMV epruvete za uzimanje krvi validirane su za uzimanje od 0,8 ml i 1,2 ml na nadmorskim visinama do 810 metara (2650 stopa). Na većim nadmorskim visinama korisnici bi trebali osigurati da se krv puni u svaku epruvetu unutar ovih ograničenja. Ako je razina napunjenosti niska, krv se može uzeti injekcijom, nakon čega se 1 ml prenosi u svaku od 3 epruvete. Iz sigurnosnih razloga, najbolje je ukloniti iglu s injekcije, pridržavajući se odgovarajućih sigurnosnih mjera, ukloniti čepove s tri QF-CMV epruvete i dodati 1 ml krvi u svaku (do crne oznake s bočne strane naljepnice na epruveti). Sigurno uklonite čepove s epruveta i promiješajte prema uputama koje slijede u nastavku.
- Ako za uzimanje krvi upotrebljavate leptirastu iglu, najprije treba upotrijebiti praznu epruvetu kako bi se osiguralo da je napunjena krvlju prije upotrebe QF-CMV epruveta za uzimanje krvi.

2. Odmah nakon punjenja epruveta, protresite ih deset (10) puta dovoljno jako da osigurate da je cijela unutarnja površina epruvete prekrivena krvlju kako bi se rastvorili antigeni na stijenkama epruvete.

- Epruvete treba držati na temperaturama 17 °C do 25 °C za vrijeme punjenja.
- Prejako protresanje može poremetiti gel i dovesti do pogrešnih rezultata.

3. Označite epruvete na odgovarajući način.

4. Epruvete se moraju što prije prenijeti u inkubatore na temperaturama + 37°C ± 1°C, i to unutar 16 sati od uzimanja uzoraka. Uzorke krvi nemojte stavljati u hladnjak ili zamrzavati.

Upute za upotrebu

Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme

1. Ako se krv ne inkubira odmah nakon uzimanja, potrebno je opetovano miješati epruvete prije inkubacije, kao što je opisano u koraku 2 u prethodnom odjeljku.
2. Epruvete inkubirajte u **USPRAVNOM** položaju na temperaturi od 37 °C u trajanju od 16 do 24 sati. Za inkubator nije potreban CO₂ ili ovlaživanje.
3. Nakon inkubacije epruvete se trebaju držati na temperaturama od 2 °C do 27 °C najviše 3 dana prije izvođenja sljedećeg koraka. Nakon inkubacije epruveta na 37 °C centrifugirajte ih 15 minuta pri 2000 do 3000 RCF (g). Čep od gela odvojite od stanice od plazme. Ako se to ne dogodi, epruvete treba ponovno centrifugirati pri većoj brzini.
 - Plazma se može uzeti i bez centrifugiranja, ali treba pažljivo ukloniti plazmu bez poremećaja stanica.
4. Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati ili miješati plazmu prije uzimanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.
 - Uzorke plazme uzimajte samo pipetom.
 - Uzorci plazme mogu se prenijeti izravno iz centrifugiranih epruveta za uzimanje krvi u QF-CMV ELISA ploču, uključujući i situacije kada se upotrebljavaju automatske ELISA radne stanice.
 - Uzorci plazme mogu se pohranjivati do najviše 28 dana na temperaturama od 2 °C do 8 °C ili, ako se uzimaju na ispod -20 °C (po mogućnosti manje od -70 °C) na dulje vrijeme u epruvetama ili spremnicima za pohranjivanje plazme.

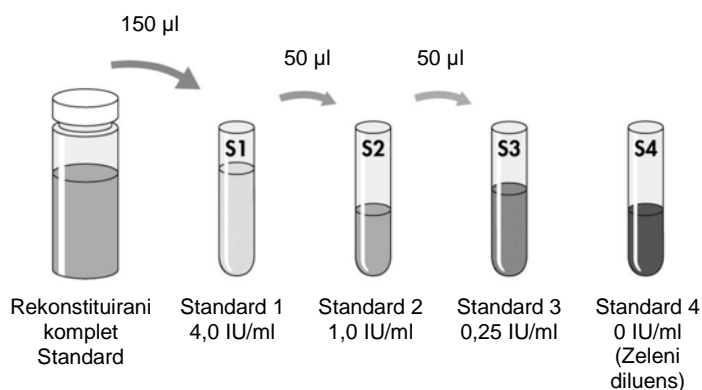
Faza 2 – QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim koncentriranog konjugata 100X, moraju prije upotrebe doći do sobne temperature (17 °C do 27 °C). Ostavite najmanje 60 minuta da se uravnoteži.
2. Uklonite nepotrebne trake s okvira, vratite ih u foliju i pohranite ih do upotrebe u hladnjaku. Pripremite najmanje jednu traku za QF-CMV ELISA standarde i dovoljan broj traka za testiranje pacijenata. Nakon upotrebe sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.
3. Rekonstituirajte liofilizirani komplet Standard s količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na etiketi bočice Standard. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice (minimizirajući stvaranje pjene) i uvjerite se da je sadržaj potpuno rastopljen. Rekonstitucijom standarda na naznačen volumen dobivamo otopinu s koncentracijom od 8,0 IU/ml.
4. Standardna krivulja priprema se pomoću 3 otopine kompleta Standarda i zelenog diluensa kao standarda 4 (0 IU/ml).

Upotrijebite rekonstituirani komplet Standard za proizvodnju serije otopina od 3 IFN- γ koncentrata. Razrjeđivanje u kompletu zelenog diluensa (GD) (pogledajte sliku 1 na sljedećoj stranici). Standardi se trebaju testirati najmanje dvostruko; sljedeći koraci čine dovoljnu količinu.

 - a. Označite 4 epruvete sa "S1", "S2", "S3", "S4".
 - b. Dodajte 150 μ l zelenog diluensa u 4 epruvete (S1–S4).
 - c. Dodajte 150 μ l kompleta Standard u S1 i dobro promiješajte.
 - d. Prenesite 50 μ l iz S1 u S2 i dobro promiješajte.

- e. Prenesite 50 µl iz S2 u S3 i dobro promiješajte.
 f. Zeleni diluens služi kao nulti standard (S4).



Slika 1. Pripremanje standardne krivulje. Pripremite svježe otopine kompleta Standard za svaku ELISA sesiju.

5. **Rekonstituirajte liofilizirani 100X koncentrirani konjugat sa 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice (minimizirajući stvaranje pjene) i uvjerite se da je sadržaj potpuno rastopljen.**
6. **Konjugat spreman za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100X koncentriranog konjugata razrijedi zelenim diluensom, kao što je prikazano u tablici br. 1 – Pripremanje konjugata.**
 - Dobro promiješajte, ali pazite da ne dođe do stvaranja pjene.
 - Neupotrijebljeni koncentrirani konjugat 100X odmah nakon upotrebe vratite na temperaturu od 2 °C do 8 °C.
 - Upotrebljavajte samo zeleni diluens.

Tabela 1. Pripremanje konjugata

Broj traka	Količina koncentriranog konjugata 100X	Količina zelenog diluensa
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. **Prije testiranja promiješajte plazmu kako biste osigurali da se IFN- γ ravnomjerno rasporedi u svakom uzorku. Također razrijedite CMV i Mitogen plazme 1/10 u zelenom diluensu (10 μ l plazme pomiješane s 90 μ l GD) ako su potrebni kvantitativni rezultati. Nultu plazmu ne treba razrijeđivati.**
Preporučuje se testiranje sljedećih uzoraka:
- Nulta, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)
- Međutim, softver za analizu QuantiFERON-CMV podržava i sljedeće opcije pacijentovih uzoraka:
- Nulta, CMV Antigen, Mitogen
 - Nulta, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)
 - Nulta, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10)
 - Nulta, CMV Antigen (1/10), Mitogen
8. **Dodajte 50 μ l svježe pripremljenog konjugata u potrebno ELISA udubljenje pomoću višekanalne pipete.**
9. **Dodajte 50 μ l testnih uzoraka plazme u odgovarajuća udubljenja pomoću višekanalne pipete. Na kraju dodajte 50 μ l svakog od standarda 1 do 4.**
10. **Dobro izmiješajte uzorke/standarde konjugata i plazme u tresilici za mikrotitar ploče u trajanju od 1 minute.**
11. **Svaku ploču prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi (17 °C do 27 °C) 120 \pm 5 minuta.**
- Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.
12. **Za vrijeme inkubacije razrijedite jedan dio 20x koncentriranog pufera za ispiranje s 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro promiješajte. U kompletu se nalazi dovoljno 20x koncentriranog pufera za ispiranje da bi se dobilo 2 litre gotovog pufera za ispiranje.**
Isperite udubljenja s **400 μ l** gotovog pufera za ispiranje najmanje 6 puta. Preporučujemo vam da upotrebljavate automatski uređaj za pranje mikrotitar ploča.
- Pažljivo ispiranje veoma je važno za učinak testa. Osigurajte da je svako udubljenje **potpuno napunjeno** puferom za ispiranje do vrha udubljenja pri svakom ispiranju. Preporučujemo da između ciklusa ispiranja ostavite najmanje 5 sekundi za namakanje.
 - U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati dezinfekcijsko sredstvo koje se upotrebljava u laboratorijima. Također se pridržavajte propisanih uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.
13. **Lupkanjem istresite ploče s udubljenjima prema dolje na papir kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100 μ l otopine enzimskog supstrata u svaku udubinu i promiješajte ploče pomoću tresilice.**
14. **Pokrijte svaku ploču poklopcem i inkubirajte ploče 30 minuta na sobnoj temperaturi (17 °C do 27 °C).**
- Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.
15. **Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta dodajte 50 μ l enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje i promiješajte.**
- Enzimsku otopinu za zaustavljanje reakcije dodajte u udubljenja po istom redoslijedu i približno istom brzinom kao što ste učinili s enzimskim supstratom pod korakom 13.
16. **Izmjerite optičku gustoću (OD) svakog udubljenja u roku od 5 minuta nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije pomoću čitača za mikrotitar ploče, primjenom 450 nm filtra i 620 do 650 nm referentnog filtra. Izračunavanje rezultata izvodi se pomoću očitane vrijednosti optičke gustoće.**

Izračunavanje i interpretacija rezultata

Softver za analizu QuantiFERON-CMV, koji služi za analizu podataka i izračun rezultata, možete nabaviti od tvrtke QIAGEN na stranici www.QuantiFERON.com.

Softver provodi kontrolu kvalitete testa, formira standardnu krivulju i pruža rezultat za svakog testiranog pacijenta, kao što je objašnjeno u odjeljku Interpretacija rezultata.

Kao alternativa QF-CMV softveru za analizu, rezultati se mogu utvrditi i na osnovu sljedeće metode.

Stvaranje standardne krivulje

Utvrđite srednju vrijednost optičke gustoće kompleta Standard replikata na svakoj ploči.

Napravite $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardnu krivulju prikazom $\log_{(e)}$ srednje vrijednosti optičke gustoće (y-os) prema $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IU/ml (x-os), izostavivši nulti standard. Izračunajte liniju najboljeg oblika standardne krivulje regresijskom analizom.

Upotrebljavajte standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- γ koncentracije (IU/ml) za svaki testirani uzorak plazme primjenom optičke gustoće.

Za te izračune mogu se upotrijebiti softverski paketi koje Cellestis nudi za čitače mikrotitar ploča, kao i standardne formule ili programi za statistiku (kao npr. Microsoft® Excel®). Preporučujemo primjenu tih softverskih paketa za izračunavanje regresijske analize, varijacijskog koeficijenta standarda (%CV) kao i koeficijenta korelacije (r) za standardnu krivulju.

Kontrola kvalitete testa

Točnost rezultata testa ovisi od pravilnog formiranja standardne krivulje. Stoga se rezultati izvedeni iz standarda moraju preispitati prije interpretacije rezultata testa.

ELISA je valjan ako su ispunjeni sljedeći kriteriji:

- Srednja vrijednost optičke gustoće Standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.
- %CV repliciranih vrijednosti optičke gustoće Standarda 1 i Standarda 2 mora biti $< 15\%$.
- Replicirane vrijednosti optičke gustoće Standarda 3 i Standarda 4 ne smiju u većoj mjeri odstupati od srednjih vrijednosti nego 0,040 OD jedinica.
- Koeficijent korelacije (r), dobiven iz srednjih vrijednosti apsorpcije standarda mora biti $\geq 0,98$.

Ako ovi kriteriji nisu ispunjeni, test nije valjan i mora se ponoviti.

Srednja vrijednost optičke gustoće Nultog standarda (zeleni diluens) trebao bi biti $\leq 0,150$. Ako je srednja vrijednost optičke gustoće $> 0,150$, preporučuje se kontrola postupka ispiranja ploča.

Interpretacija rezultata

Rezultate testa QuantiFERON-CMV treba interpretirati po sljedećim kriterijima:

CMV minus Nulta (IU/ml)*	Mitogen minus Nulta (IU/ml)	QF-CMV rezultat	Izvješće/interpretacija
< 0,2	≥ 0,5	Nereaktivno	Anti-CMV imunitet NIJE otkriven
≥ 0,2	Bilo koliko	Reaktivno	Anti-CMV imunitet otkriven
< 0,2	< 0,5	Nejasno [†]	Rezultati CMV reakcije nejasni

* IFN- γ reakcije na CMV Antigen i Mitogen pozitivnu kontrolu često je izvan mjernog opsega čitača mikrotirar ploča. To se ne odražava na rezultate testa.

[†] Moguće uzroke potražite u odjeljku Rješavanje problema.

Ograničenja

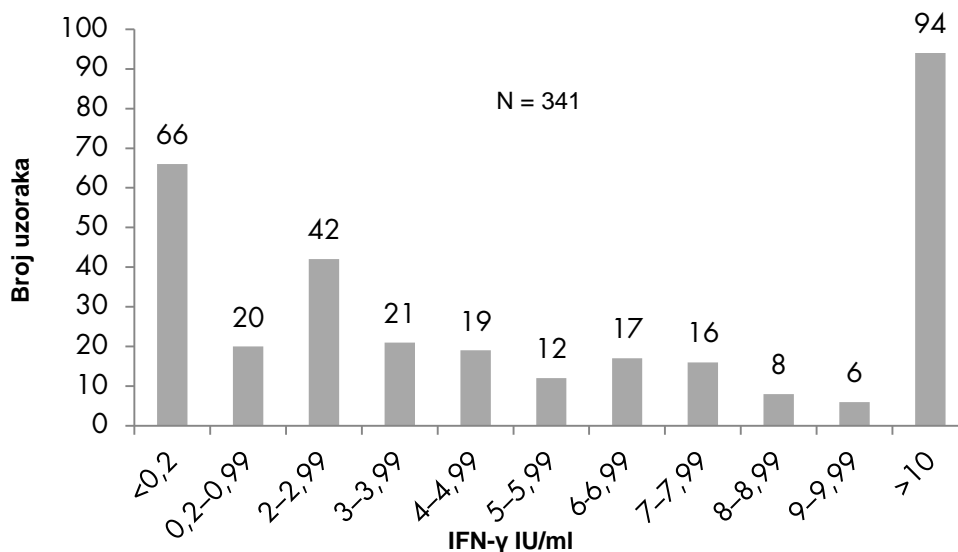
Rezultate testa QuantiFERON-CMV treba promatrati u kombinaciji s epidemiološkom anamnezom svakog pojedinačnog pacijenta, njegovog trenutnog zdravstvenog stanja i drugih dijagnostičkih pretraga.

Do nepouzdanih ili nejasnih rezultata može doći iz sljedećih razloga:

- Odstupanje od postupka opisanog u priloženoj uputi za uporabu.
- Previsoka koncentracija IFN- γ u Nultoj epruveti.
- Prekoračenje roka od 16 sati između uzimanja uzorka i inkubacije na temperaturi od 37 °C.

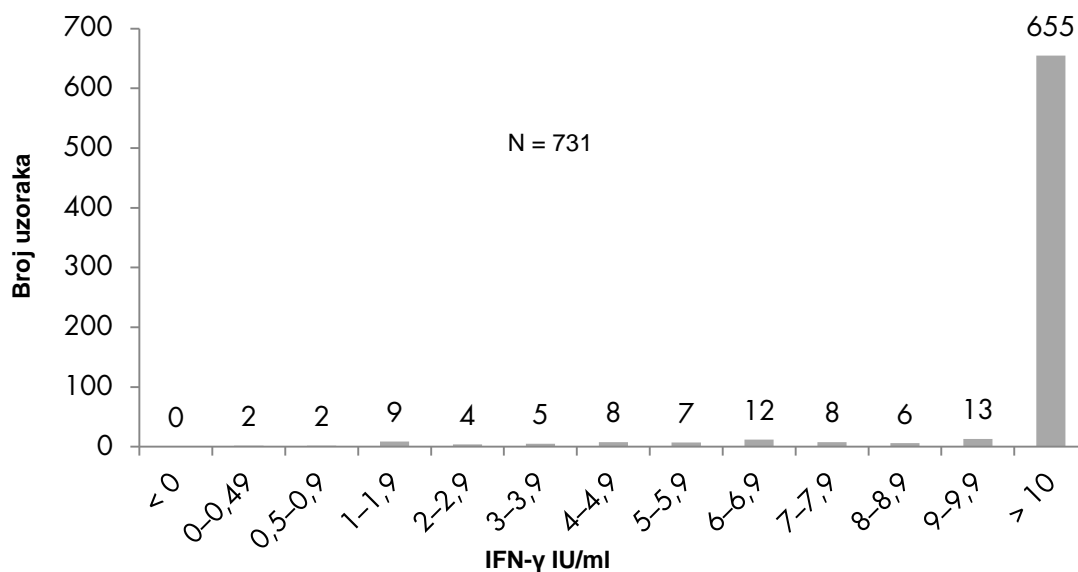
■ Očekivane vrijednosti

Očekivane IFN- γ vrijednosti za QuantiFERON-CMV dobivene su testiranjem 591 uzorka od zdravih odraslih osoba, od kojih je 341 CMV seropozitivno i 250 seronegativno. Za 250 zdravih odraslih osoba bez CMV infekcije, kao što je utvrđeno anti-CMV serologijom (CMV seronegativno), 100% testiranih osoba proizvelo je IFN- γ reakcije od $< 0,2$ IU/ml za CMV Antigen epruvetu (minus Nulta). Distribucija CMV Antigen epruvete (minus Nulta) za 341 zdrave osobe s CMV infekcijom, kao što je utvrđeno anti-CMV serologijom (CMV seropozitivno), prikazana je na slici 2.



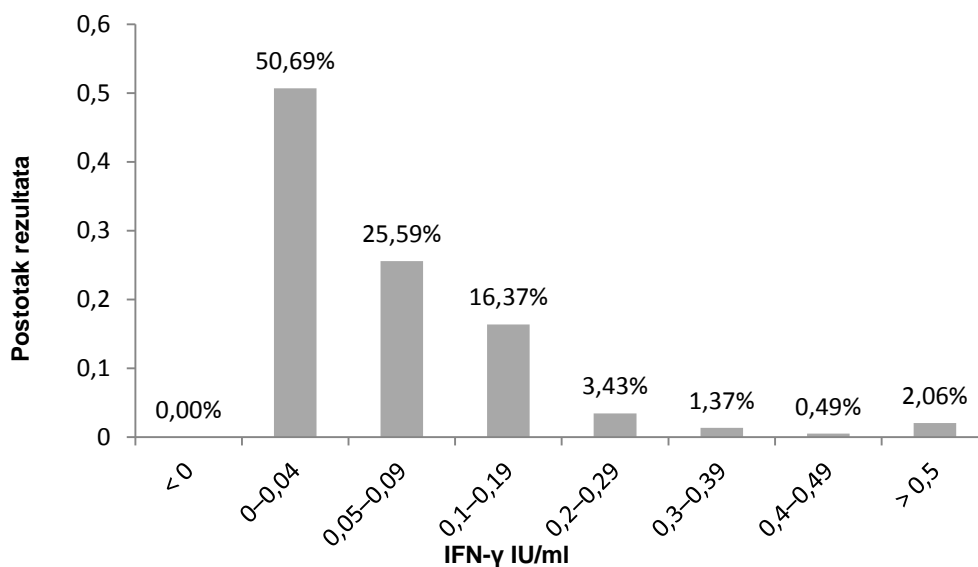
Slika 2. Distribucija CMV-Nultih IFN- γ reakcija u seropozitivnih zdravih subjekata (n=341).

Distribucija Mitogena (minus Nulta pozadina) rezultira sa 731 normalnim uzorkom krvi od zdravih odraslih subjekata, neovisno o poznatoj CMV infekciji, prikazana je na slici 3. Mitogen (minus Nulta) rezultat od manje od 0,5 IU/ml označava neispravnost testa ili da se osoba nalazi u imunokompromitiranom stanju. Kod zdrave populacije, samo 2/731 rezultata spada u tu kategoriju.



Slika 3. Distribucija Mitogen-Nultih IFN- γ reakcija kod zdravih odraslih subjekata (n = 731).

Očekivane vrijednosti za Nulte epruvete prikazane su na slici 4. Podaci su dobiveni od 1020 uzoraka plazme uzete od zdravih odraslih osoba koje su testirane metodom QuantiFERON-CMV ELISA.



Slika 4. Distribucija (izražena kao % populacije) za Nulte IFN-γ reakcije kod zdravih odraslih subjekata (n = 1020).

Značajke izvedbe

Prediktivno testiranje

Referentna vrijednost testa za utvrđivanje prijašnje CMV izloženosti metodom QF-CMV utvrđena je na temelju analize rezultata dobivenih od skupine zdravih subjekata (n = 223), pri čemu su QF-CMV rezultati uspoređeni s CMV serološkim rezultatima. ROC analizom utvrđeno je da je referentna vrijednost testa od 0,04 IU/ml (nakon nulte supstrakcije) dala optimalne pozitivne i negativne vrijednosti za QF-CMV (područje ispod krivulje = 0,9679 [95%CI = 0,9442 do 0,9915, $p < 0,0001$]) te predstavlja referentnu vrijednost pri kojoj je ovaj test najučinkovitiji u upotrebi za zdravu populaciju.

U prediktivnom testiranju, izvedba QF-CMV-a uspoređena je sa serološkim testom SeraQuest CMV IgG (Quest International). QF-CMV test pokazao 95% (294/310 osoba) slaganje s prediktivnim anti-HCMV serološkim testom kod zdravih osoba, pri čemu ni jedan od 149 seronegativnih davatelja nije pokazao reakciju s QF-CMV-om, a 145 od 161 seropozitivnih davatelja nije pokazao reaktivnu IFN-γ reakciju. Opće pozitivno slaganje bilo je 90% s vrijednošću negativnog slaganja od 100%. Razina slaganja između IFN-γ reakcija na CMV peptide, kako je izmjereno QF-CMV-om kod zdravih dobrovoljaca, i anti-CMV serološki status tih subjekata izmjereno serološkim testom SeraQuest CMV IgG prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Slaganje između QuantiFERON-CMV i CMV IgG serološkog testa kod zdravih subjekata.

		CMV serologija		Ukupno
		Pozitivno	Negativno	
QuantiFERON-CMV	Reaktivno	145	0	145 (46,8%)
	Nereaktivno	16	149	165 (53,2%)
	Ukupno	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Referentna vrijednost testa

Preporučena referentna vrijednost kliničkog testiranja za ovaj test iznosi 0,2 IU/ml u CMV Antigen epruveti (minus Nulta), premda se za različite kliničke postavke mogu utvrditi različite referentne vrijednosti. Razlog tome je u fundamentalnim imunološkim razlikama između normalne testne populacije i populacije kod koje se testiranje smatra klinički korisnim - osobito imunosupresivne osobe koje su zbog imunosupresije u opasnosti od razvoja simptomatske CMV infekcije i/ili bolesti. Kod takvih visokorizičnih slučajeva, klinička korist QF-CMV-a leži u točnom utvrđivanju razine anti-CMV imuniteta kod tih subjekata, budući da manjak imuniteta može biti povezan s razvojem CMV bolesti (1–5, 7, 8, 11–16).

Kliničke studije

Budući da nema utvrđenog standarda za potvrđivanje ili isključivanje dijagnoze citomegalovirusne infekcije, procjena osjetljivosti i specifikacija za QF-CMV ne može se praktično ocijeniti. Za QF-CMV približna specifična vrijednost je određena tako da je određena razina slaganja između IFN- γ reakcija na CMV peptide, kao što je izmjereno QF-CMV-om kod zdravih dobrovoljaca, i anti-CMV serološkog statusa tih subjekata CMV IgG serološkim testom.

Specifikacija QF-CMV-a približno je utvrđena procjenom lažno pozitivnih rezultata (QF-CMV reakcija) kod zdravih dobrovoljaca koji nisu bili izlagani CMV-u (CMV seronegativne osobe). Osjetljivost je približno utvrđena procjenom zdravih dobrovoljaca koji su ranije bili izloženi CMV-u (CMV seropozitivne osobe). Premda QF-CMV upotrebljava veliki broj CMV specifičnih epitopa od različitih CMV proteina, pružajući mogućnost široke kliničke primjene za širok raspon populacije s različitim HLA haplotipovima klase I, pokrivenost tih peptida nije 100%. Budući da su HLA haplotipovi subjekata testiranih na CMV serologiju bili nepoznati, očekivalo se da mali postotak seropozitivnih osoba neće reagirati na QF-CMV epruvete.

Specifikacija

U ispitivanju provedenom na zdravim osobama koje nisu prije bile izlagane CMV-u (CMV seronegativne osobe gdje je $n = 250$), razina slaganja između IFN- γ reakcija na CMV peptide, kao što je izmjereno QF-CMV-om, i anti-CMV serološki podaci bili su 100%.

U svim drugim procjenama specifikacije provedenim na primateljima čvrstih organa (1, 3, 4, 8, 12, 14 do 16), primateljima matičnih hematopoetskih stanica (7, 13) i pacijentima zaraženih virusom HIV-a (2), razina slaganja između IFN- γ reakcija na CMV peptide, kao što je izmjereno QF-CMV-om, i anti-CMV serologije bila je stalno na 100%.

Osjetljivost

U ispitivanju provedenom na zdravim osobama koje su prije bile izlagane CMV-u (CMV seropozitivne osobe gdje je $n = 341$), razina slaganja između IFN- γ reakcija na CMV peptide, kao što je izmjereno QF-CMV-om, i anti-CMV serološki podaci bili su 80,6% (275/341). Odstupanje se može temeljiti na upotrebi viših referentnih vrijednosti testa (0,2 IU/ml), lažno pozitivnoj CMV serologiji ili nereagiranju subjekata na CMV peptide koji su uključeni u test.

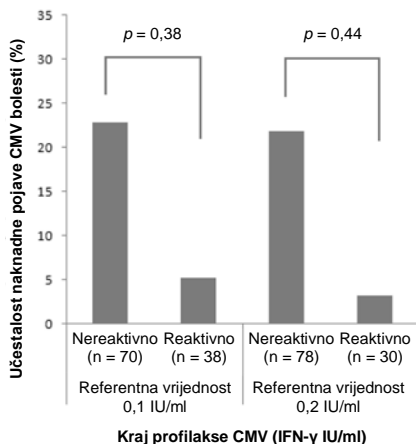
U procjenama osjetljivosti provedenim na primateljima čvrstih organa (1, 3, 4, 8, 12, 14 do 16), primateljima matičnih hematopoetskih stanica (7, 13) i pacijentima zaraženih virusom HIV-a (2), utvrđene su nešto niže razine slaganja između IFN- γ reakcija na CMV peptide, kao što je izmjereno QF-CMV-om, i CMV serologije. Niža razina slaganja može biti rezultat pogrešno pozitivne CMV serologije, nereagiranju pacijenata na CMV peptide koji su uključeni u test ili nedostatku reaktivnih T stanica kod ovih pacijenata uzrokovanom imunosupresijom.

Ispitivanja koja upućuju na kliničku korist

Serologija podjednako kao i QF-CMV opisuju namjenu koja omogućuje otkrivanje imunosti na CMV. Unutar postavke transplantacije, CMV serologija upotrebljava se u velikoj mjeri prije transplantacije da bi se utvrdio rizik od CMV komplikacija nakon transplantacije, ali ima ograničenu vrijednost nakon transplantacije. Alternativno, QF-CMV može se upotrebljavati za primatelje transplantacije da bi se procijenila razina CMV imuniteta kod pacijenata kod kojih postoji opasnost od razvoja simptomatske CMV infekcije i/ili bolesti zbog imunosupresije (6, 9 do 11).

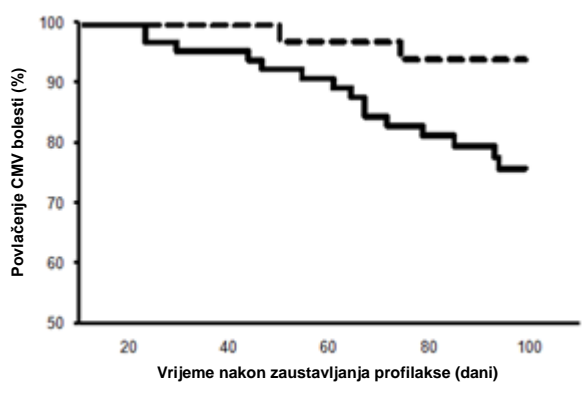
Brojna objavljena klinička ispitivanja različitih skupina podvrgnutih transplantaciji potvrdila su korisnost QuantiFERON-CMV-a (1 do 5, 7, 8, 11 do 16).

U velikom ispitivanju 108 primatelja čvrstih organa (4), pacijenti s QF-CMV reaktivnim rezultatom pri dovršetku anti-CMV profilakse imalo je značajno manji broj kasnijih pojava bolesti u usporedbi s pacijentima koji su imali QF-CMV nereaktivni rezultat (5,3% vs. 22,9%, $p=0,044$) (slika 5).



Slika 5. Broj kasnijih pojava CMV bolesti kod pacijenata s QuantiFERON-CMV reaktivnim rezultatom prema QuantiFERON-CMV nereaktivnom rezultatu na kraju profilakse. Podaci od Kumar et al.(4)

Nadalje, pacijenti s reaktivnim QF-CMV testom nakon završetka profilakse češće i duže nisu imali CMV bolest (slika 6), što znači da se QF-CMV može upotrebljavati za identificiranje rizika od kasnijeg razvoja CMV bolesti.

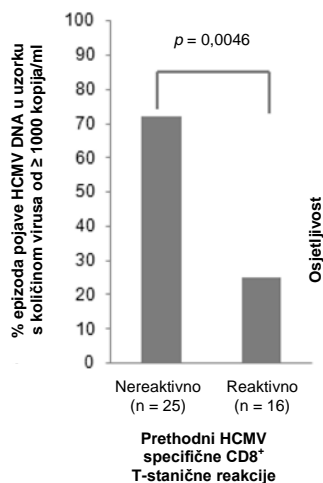


Slika 6. Vrijeme razvoja CMV bolesti kod pacijenata s QuantiFERON-CMV reaktivnim rezultatom (označeno isprekidanom crtom) u odnosu na QuantiFERON-CMV nereaktivni rezultat (označeno punom crtom) na kraju profilakse. Podaci od Kumar et al.(4)

Ovo je ispitivanje također ukazalo na to da je kod skupine primatelja transplantacije s najvećim rizikom od razvoja CMV bolesti (CMV seronegativni primatelji transplantacije koji su primili organ od CMV seropozitivnog davatelja, npr. D+/R-) QF-CMV reaktivni rezultat poslije profilakse bio povezan s 90-postotnom mogućnošću izostanka CMV bolesti.

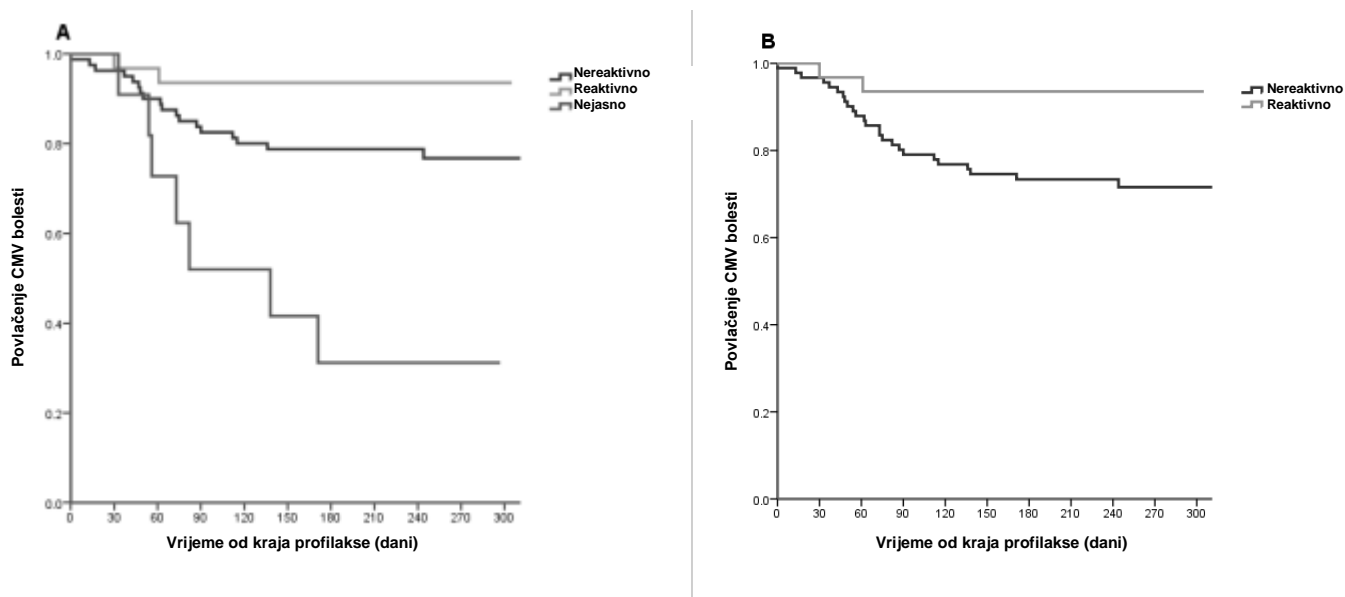
U ispitivanju 37 primatelja čvrstih organa (12), procjena CMV specifičnih CD8⁺ T-staničnih reakcija pomoću QF-CMV-a pomoglo u predviđanju spontanog nestanka virusa u usporedbi s napretkom CMV bolesti, uz povećanje CMV viremije. U ovom ispitivanju, 24/26 pacijenata (92,3%) s QF-CMV reaktivnim rezultatom, spontano se riješilo CMV virusa, dok je samo 5/11 (45,5%) pacijenata s QF-CMV nereaktivnim rezultatom imalo isti ishod.

Ispitivanje 67 pacijenata s transplantiranim plućima s procjenom epizoda CMV viremije nakon transplantacije (14), pokazalo je da je 18/25 (72%) epizoda CMV viremije bilo nakon nereaktivnog QF-CMV rezultata, dok je 4/16 (25%) epizoda bilo nakon reaktivnog QF-CMV rezultata (Fisherov test $p = 0,0046$, pogledajte sliku 7).



Slika 7. Statistička analiza CMV specifičnih CD8⁺ T-staničnih reakcija kao što je otkriveno QuantiFERON-CMV-om i razvojem CMV viremije (Fisherov test, $p = 0,0046$). Podaci od Weseslindtner et al (14).

U velikom ispitivanju više centara za 127 D+/R- primatelje čvrstih organa (15), od kojih su svi primili antivirusne profilakse, pacijenti s QF-CMV reaktivnim rezultatom (s referentnom vrijednošću 0,1 IU/ml) u bilo kojem trenutku nakon završetka anti-CMV profilakse imali su značajno manji broj kasnijih pojava bolesti 12 mjeseci nakon transplantacije, u usporedbi s onima koji su imali QF-CMV nereaktivni rezultat i nejasan rezultat (6,4% vs. 22,2% vs. 58,3%, odnosno, $p < 0,001$). Prilikom klasifikacije neodređenih rezultata koji su i “nereaktivni”, učestalost CMV bolesti bila je 6,4% vs. 26,8%, $p = 0,024$ (pogledajte sliku 8). Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti QF-CMV-a za zaštitu od CMV bolesti bile su 0,90 (95% CI 0,74-0,98) i 0,27 (95% CI 0,18-0,37), što ukazuje na to da je QuantiFERON-CMV reaktivni rezultat nakon profilakse bio povezan s 90-postotnom mogućnošću izostanka CMV bolesti. Ovo ispitivanje utvrdilo je da QF-CMV može biti koristan za predviđanje razine opasnosti kod pacijenta od razvoja CMV bolesti nakon profilakse.



Slika 8. Kaplan-Meierova krivulja učestalosti CMV bolesti na temelju rezultata dobivenih QF-CMV testom.

A Reaktivni vs. nereaktivni vs. nejasni QF-CMV rezultati (test log-rank, $p < 0,001$).

B Reaktivni vs. nereaktivni-, pri čemu su nejasni rezultati smatrani “nereaktivnima” (test log-rank, $p = 0,024$).

Pri ispitivanju 55 primatelja čvrstih organa (16), pri čemu se analizirao odnos između QF-CMV rezultata prije transplantacije i epizode CMV replikacije nakon transplantacije, utvrđena je veća učestalost CMV replikacije nakon transplantacije kod R(+) primatelja s QF-CMV nereaktivnim rezultatom prije transplantacije (7/14 ili 50%), u usporedbi s R(+) primateljima s QF-CMV reaktivnim rezultatom (4/30 ili 13,3%).

Ovo ispitivanje utvrdilo je da su QF-CMV nereaktivni primatelji prije transplantacije, koji su dobili organ od CMV-seropozitivnog davatelja, imali deseterostruko veći rizik od CMV replikacije u usporedbi s primateljima koji su prije transplantacije bili QF-CMV reaktivni (prilagođeni OR 10,49, 95% CI 1,88 do 58,46) i da QF-CMV test prije transplantacije može biti koristan u predviđanju rizika od CMV replikacije nakon transplantacije i omogućiti individualizaciju postupanja s CMV infekcijom nakon transplantacije čvrstih organa.

Broj drugih ispitivanja koja se bavila otkrivanjem CMV-specifičnih CD8⁺ T-staničnih reakcija QF-CMV-om kod skupine primatelja organa koja su dovršena (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) ili se trenutačno provode.

Međunarodne smjernice o postupanju s citomegalovirusom pri transplantaciji čvrstih organa

Značaj nadzora CMV specifične imunosti prepoznat je i objavljen u “International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation” (Međunarodnim smjernicama o postupanju s citomegalovirusom pri transplantaciji čvrstih organa) (6). Ove međunarodne smjernice, koje je razvio tim stručnjaka za CMV i transplantaciju čvrstih organa koji su okupljeni u udruženju The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society, predstavljaju dokaz i konsenzus temeljen na stručnom mišljenju o postupanju s CMV-om, što uključuje: dijagnostiku, imunologiju, prevenciju i terapiju.

Ove smjernice utvrđuju da “nadzor imuniteta na CMV specifične T-stanične reakcije može predvidjeti individualan rizik od razvoja CMV bolesti nakon transplantacije i može biti koristan za profilaksu i preemtivnu terapiju” (6).

Nadalje, smjernice pružaju i preporuke za atribute idealnog testa za nadzor imuniteta, što uključuje sljedeće:

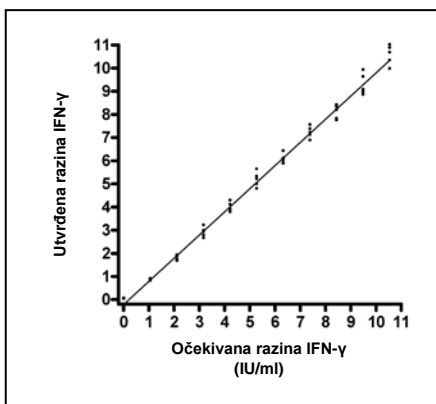
- Sposobnost za procjenu kvantiteta i funkcije CD4⁺ i CD8⁺ T stanica primatelja transplantacije
- Sposobnost za mjerenje IFN- γ
- Jednostavno provođenje, povoljno i reproduktivno
- Brzo vrijeme provođenja
- Jednostavno slanje uzoraka u specijalizirane laboratorije

QF-CMV ispunjava sve kriterije koji su navedeni u ovim smjernicama i predstavlja jedini standardizirani test za nadzor imuniteta koji može otkriti IFN- γ , specifično za CMV.

Značajke testa

Način mjerenja IFN- γ koncentracije testom QF-CMV ELISA pokazan je linearno od nule do 10 IU/ml (slika 9). Ispitivanje linearnosti provedeno je postavljanjem 5 replika od 11 spremnika plazme poznatih IFN- γ koncentracija nasumično na ELISA ploči.

QF-CMV ELISA ne ukazuje na postojanje učinka visoke razine izlaganja (prozon) s koncentracijama od IFN- γ do 100.000 IU/ml.



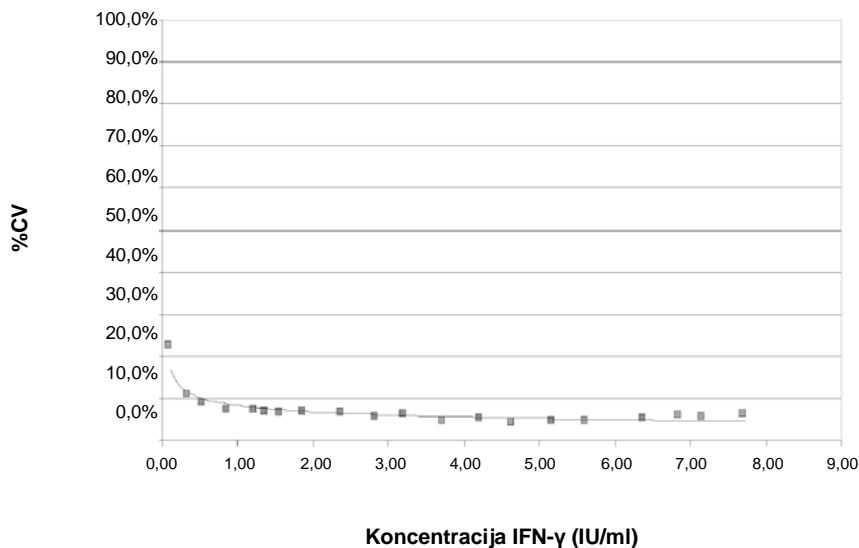
Slika 9. Profil linearnosti QF-CMV ELISA koji je utvrđen testiranjem 5 replika od 11 uzoraka plazme poznatih IFN- γ koncentracija. Crta linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99.

Intra i inter-testna nepreciznost (%CV) QF-CMV ELISA testa procijenjena je testiranjem 20 uzoraka plazme s različitim IFN- γ koncentracijama u replikama od 3, u 3 laboratorija, na 3 nasumična dana, od 3 operatora. Tako je svaki uzorak testiran 27 puta, u 9 neovisnih testiranja. Jedan je uzorak bio Nulta kontrola s izračunatom IFN- γ koncentracijom od 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. Od preostalih 19 uzoraka plazme, raspon koncentracija bio je 0,33 (0,31–0,34) do 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

Nepreciznost za vrijeme rada ili testa procijenjena je s prosječno %CV-a za svaku testnu plazmu koja sadrži IFN- γ sa svake ploče (n = 9) s rasponom od 4,1 do 9,1%CV. Prosjek tijekom rada %CV (\pm 95% CI) bio je 6,6% \pm 0,6%. Nulta IFN- γ plazma ima prosjek od 14,1%CV.

Ukupna nepreciznost ili nepreciznost za vrijeme testa utvrđena je usporedbom 27 izračunatih koncentracija IFN- γ za svaki uzorak plazme, i imala je raspon od 6,6 do 12,3%CV. Opći prosjek %CV (\pm 95% CI) bio je 8,7% \pm 0,7%. Nulta IFN- γ plazma iskazala je 26,1%CV. Ova se razina varijacije treba očekivati jer je izračunata koncentracija IFN- γ niska i varijacija oko niske procjene koncentracije bit će veća nego za više koncentracije.

Profil preciznosti za QF-CMV ELISA test prikazan je na slici 10 i ukazuje na to da se nepreciznost ne povećava s višim koncentracijama IFN- γ .



Slika 10. Profil preciznost QF-CMV ELISA testa utvrđen trostrukim testiranjem 20 uzoraka plazme, tijekom 3 nasumična dana, u 3 laboratorija i od 3 operatora. Crta trenda je izračun najmanjih kvadrata.

Ispitivanje je provedeno radi utvrđivanja reproduktivnosti QF-CMV testa pomoću uzoraka krvi dobivenih od 8 subjekata s nepoznatim CMV statusom. Krv od svakog subjekta uzimala se u tri kompleta QF-CMV epruveta (3 x Nulta, 3 x CMV, 3 x Mitogen). Tri kompleta epruveta zatim su inkubirana na tri različita mjesta (po jedan komplet Nulte, CMV i Mitogen po mjestu), kao što je naznačeno u uputama za upotrebu. Nakon 16–24 sata inkubacije epruvete su centrifugirane, a plazma prikupljena.

ELISA testovi zatim su triput provedeni na svakom od tri mjesta, stvarajući tri QF-CMV rezultata za svaki subjekt po mjestu (9 rezultata ukupno na svim mjestima). Svako je mjesto imalo drugog operatora. Ploče koje su upotrijebljene prilikom ispitivanja nisu nužno imale isti serijski broj, ali su bile unutar odgovarajućih datuma isteka.

Reproduktivnost, u pogledu dijagnostičkog statusa (reaktivno, nereaktivno, nejasno), i brojčana vrijednost utvrđeni su za svaki uzorak krvi. Reproductivnost brojčane vrijednosti procijenjena je samo u reaktivnim uzorcima (izraženo kao %CV), jer su IFN- γ razine u “nereaktivnim uzorcima” bile preniske da bi pružile smislenu procjenu.

Opća, dijagnostička reproduktivnost bila je 100% gdje je QF-CMV dijagnostički status svih 8 dobrovoljaca reproduciran na svim mjestima u svim prilikama, bez izvještavanja o nejasnim rezultatima. Reproductivnost reaktivnih uzoraka prihvatljiva je na jednom i između više mjesta. Srednja vrijednost %CV za svako testno mjesto bila je 4,5% (mjesto 1), 5,9% (mjesto 2) i 7,3% (mjesto 3). Općenito, %CV između različitih mjesta bio je 5,9% za svih 5 reaktivnih uzoraka. Koeficijent vrijednosti odstupanja ispod 10% smatra se odličnim.

Tehnički podaci

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati mogu biti povezani sa statusom imuniteta testiranog pojedinca, a mogu biti uzrokovani sljedećim tehničkim čimbenicima:

- Prekoračenje roka od 16 sati između uzimanja uzorka i inkubacije na temperaturi od 37 °C.
- Pohrana uzoraka krvi izvan preporučenog područja temperature (17 °C do 27 °C).
- Nedovoljno miješanje epruveta za uzimanje krvi.

Ako se sumnja na tehnički problem prilikom uzimanja krvi ili rukovanja s uzorcima, treba ponoviti cijeli QF-CMV test s novim uzorkom krvi. ELISA test sa stimuliranim uzorcima plazme može se ponoviti, ako se sumnja u odstupanja od propisane ELISA testne metode. Nejasni rezultati (iz niskih Mitogen vrijednosti) neće se mijenjati ponavljanjem testa, jedino ako je došlo do pogreške prilikom provođenja ELISA testa.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i tehničke podatke na stranici: www.QuantiFERON.com. Za podatke o kontaktu pogledajte stranicu 27 i stražnju stranicu.

ELISA rješavanje problema

Niska očitavanja optičke gustoće za standarde

Mogući uzrok	Rješenje
a) Greška prilikom razrjeđivanja Standarda	Razrjeđivanje kompleta Standard provodite točno prema priloženoj uputi.
b) Pogrešno pipetiranje	Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača.
c) Temperatura inkubacije preniska	Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi (17 °C do 27 °C).
d) Vrijeme inkubacije prekratko	Vrijeme inkubacije ploče s konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati 120 ± 5 minuta. Enzimaska otopina inkubira se na ploči 30 minuta.
e) Pogrešan filter za čitač ploče	Ploču treba čitati pri 450 nm referentnim filtrom od 620 i 650 nm.
f) Reagensi prehladni	Svi reagensi (osim 100x koncentrirani konjugat) moraju postići sobnu temperaturu prije početka testa. To traje oko 1 sat.
g) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao	Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Pobrinite se da Standard i 100x koncentrirani konjugat budu potrošeni u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.

Nespecifična boja/visoka pozadina

Mogući uzrok	Rješenje
a) Nedovoljno pranje ploča	Ploču operite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za pranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se pričekati najmanje 5 sekundi za namakanje.
b) Temperatura inkubacije previsoka	Inkubaciju za ELISA test treba izvoditi na sobnoj temperaturi (17 °C do 27 °C).
c) Istekao vijek trajanja kompleta/komponenti	Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Vodite računa o tome da se Standard i 100x koncentrirani konjugat potroše u roku od tri mjeseca nakon rekonstitucije.
d) Enzimaska otopina kontaminirana	Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.
e) Miješanje plazme u epruvetama za centrifugiranje prije prikupljanja	Osigurajte da se uzorci plazme pažljivo prikupljaju s gornjeg gela bez pipetiranja gore i dolje, pazeći na materijal na površini gela.

Bibliografija

1. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* **9**, 165.
2. Singh, K.P., Howard, J.L., Wild, S.P., Jones, S.L., Hoy, J., Lewin, S.R. (2007) Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of HCMV disease despite CD4+ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* **124**, 200.
3. Westall, G.P., Mifsud, N., Kotsimbos, T. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* **8**, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* **9**, 1214.
5. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**, 76.
6. Kotton, C.N., et al. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* **82**, 433.
8. Lachmanova, A.I., et al. (2010) Quantiferon-CMV Test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **42(9)**, 3574.
9. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 26 October 2010; doi:10.1038/nrneph.2010.
10. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **29(10)**, 735,11.
11. Giulieri, S, Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11(1)**, 17.
12. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E., Humar, A. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93(2)**, 195.
13. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detecting and estimating the magnitude and functionality of the CMV-specific IFN- γ CD8+ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* Online ahead of print 29 February 2012; doi: 10.1128/CVI.05633-111.
14. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8+ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **12(8)**, 2172.
15. Manuel, O., et al. (2012) Assessment of cytomegalovirus specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* (Manuscript accepted November 2012).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Manuscript accepted November 2012).

Tehnička služba

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

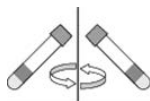
Ova je stranica namjerno ostavljena prazna.

Ova je stranica namjerno ostavljena prazna.

Sažetak postupka testiranja

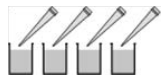
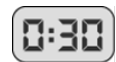
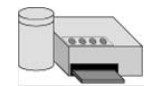
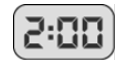
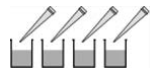
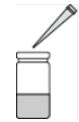
Faza 1 – inkubacija krvi

1. Uzmite krv od pacijenta u epruvete i dobro promiješajte uzorke deset (10) puta kako bi se cijela unutarnja površina epruveta prekrila krvlju i kako bi se rastopili antiagensi na stijenkama epruvete.
2. Epruvete inkubirajte u uspravnom položaju na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ u trajanju od 16 do 24 sati.
3. Poslije inkubacije centrifugirajte epruvete 15 minuta pri obrtaju od 2000 to 3000 RCF (g) da biste odvojili plazmu od crvenih krvnih stanica.
4. Nakon centrifugiranja izbjegavajte pipetiranje ili miješanje plazme prije prikupljanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.



Faza 2 – IFN- γ ELISA

1. ELISA komponente – osim 100x koncentriranog konjugata – ostavite da se stabiliziraju na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.
2. Rekonstituirajte komplet Standard destiliranom ili deioniziranom vodom na 8,0 IU/ ml. Pripremite četiri (4) standardne otopine.
3. Rekonstituirajte liofilizirani, 100X koncentrirani konjugat s destiliranom ili deioniziranom vodom.
4. Pripremite konjugat pomoću zelenog diluensa i dodajte 50 μ l u svako udubljenje.
5. Dodajte 50 μ l uzorka plazme i 50 μ l standarda u odgovarajuća udubljenja. Promiješajte tresilicom.
6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Isperite udubljenja najmanje 6 puta sa 400 μ l pufera za ispiranje po udubljenju.
8. Dodajte 100 μ l enzimske otopine u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.
10. Dodajte 50 μ l reagensa za zaustavljanje u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.
11. Očitajte rezultate na 450 nm s referentnim filtrom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



Zaštitni znak: QIAGEN[®], QuantiFERON[®] (QIAGEN Group); Microsoft[®], Excel[®] (Microsoft).

Ograničeni licencni ugovor za komplet QuantiFERON-CMV ELISA

Upotrebom ovog proizvoda, svaki kupac ili korisnik obvezuje se na pridržavanje uvjeta iz ovog ugovora:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu za svoje intelektualno vlasništvo za upotrebu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kao što je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnim na stranici www.qiagen.com. Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima. Tvrtka QIAGEN nije temeljito pregledala ili optimizirala te protokole. Tvrtka QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova upotreba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu upotrebu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati ili preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi. QIAGEN može ishodići zabranu ovog Ograničenog licencnog ugovora na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove za odvjetnika, za svako postupanje koje nije u skladu s ovim Ograničenim licencnim ugovorom ili intelektualnim pravima koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Za ažurirane uvjete licence pogledajte www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, all rights reserved.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

