
QuantiFERON[®]-CMV

lietošanas pamācība 2 x 96

Pilnasiņu gamma interferona tests atbildes reakcijas uz cilvēku citomegalovīrusu peptīdu antigēniem mērīšanai

IVD



REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia (Austrālija)

Tālrunis: (Austrālija) + 613 9840 9800, (Eiropa) + 49 2103 29 12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, Germany (Vācija)

1075110LV 01. izd.



Saturs

Paredzētais lietojums	4
Ievads	4
Testa principi	5
Testa veikšanai nepieciešamais laiks	5
Reaģenti un uzglabāšana	6
Nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti	7
Glabāšana un lietošana	7
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	8
Paraugu ņemšana un apstrāde	9
Lietošanas norādījumi	10
1. posms — asins parauga inkubācija un plazmas iegūšana	10
2. posms — cilvēka IFN- γ noteikšana ar QuantiFERON-CMV ELISA testu	10
Aprēķini un testa rezultātu interpretācija	13
Rezultātu interpretācija	14
Ierobežojumi	14
Sagaidāmās vērtības	15
Veiktspējas raksturojums	16
Salīdzinošā testēšana	16
Testa sliekšnis	17
Klīniskie pētījumi	17
Specifiskums	17
Jūtība	18
Pētījumi, kas izceļ klīnisko lietderību	18
Starptautiska konsensa pamatnostādnes par citomegalovīrusu izraisītu sasilšanu pārvaldību, transplantējot parenhimatozos orgānus	21
Testa veiktspējas raksturojums	21
Tehniskā informācija	23
Nenoteikti rezultāti	23
Problēmu novēršanas ieteikumi	24
Bibliogrāfija	25

Tehniskā dienesta pakalpojumi	26
Saīsināta testa procedūra	30
1. posms — asins parauga inkubācija	30
2. posms — IFN- γ ELISA tests	30

Paredzētais lietojums

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) ir in vitro tests, kurā tiek izmantots peptīdu maisījums, kas simulē cilvēka citomegalovīrusa (CMV) olbaltumvielas, lai ierosinātu ar heparīnu apstrādātas pilnasiņu šūnas. Gamma interferona (IFN- γ — interferon-gamma) noteikšanai tiek izmantots enzīmu imūnsorbcijas tests (ELISA — Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), lai kvantitatīvi noteiktu in vitro atbildes reakciju uz tiem peptīdu antigēniem, kas tiek saistīti ar CMV infekcijas imunoloģisko kontroli. Šādas imunoloģiskas reakcijas zudums var būt saistīts ar CMV slimības attīstību. QF-CMV testu ir paredzēts lietot, lai uzraudzītu pacientu imunitātes līmeni pret CMV.

QF-CMV tests nav paredzēts CMV infekcijas noteikšanai, un to nedrīkst lietot CMV infekcijas izslēgšanai.

Ievads

CMV ir herpes vīruss, ar ko inficējas aptuveni 50–85% no pieaugušo populācijas. Tā ir bieža komplikācija no vājinātas imunitātes gadījumā, jo īpaši pēc transplantācijas, kas var ievērojami palielināt saslimstību un mirstību pacientiem, kuriem transplantēts kāds orgāns. Pašreizējā imūnsupresijas terapija, ko lieto, lai pasargātu no transplantētā orgāna atgrūšanas, nelabvēlīgi ietekmē T limfocītu un šūnu imūno (CMI — cell-mediated immune) reakciju, tā izraisot paaugstinātu uzņēmību pret vīrusu izraisītām infekcijām pēc transplantācijas. T šūnu darbības nozīmi CMV replikācijas nomākšanā izceļ arī fakts, ka $CD8^+$ CMV specifiskie citotoksiskie T limfocīti (CTL) var aizsargāt no vīrusu ierosinātām slimībām. $CD8^+$ CMV specifisko CTL uzskaitē pacientiem ar imūnsupresiju un IFN- γ veidošanās ļauj prognozēt risku saslimt ar CMV slimību. IFN- γ veidošanos var izmantot kā funkcionālu aizstājēju, lai identificētu CMV specifiskos CTL.

QF-CMV ir tests, lai noteiktu CMI atbildes reakcijas uz peptīdu antigēniem, kas simulē CMV olbaltumvielas. CMV peptīdi ir paredzēti, lai iedarbotos uz $CD8^+$ T šūnām, tostarp uz HLA I klases haplotipiem A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 un Cw6 (A30, B13), kas ir > 98% no cilvēku populācijas. Individīdiem, kas inficēti ar CMV, parasti asinīs ir $CD8^+$ limfocīti, kas šos antigēnus atpazīst. Šis atpazīšanas process ietver citokīna IFN- γ veidošanu un sekrēciju. Šis tests pamatojas uz IFN- γ noteikšanu un secīgu kvantitatīvo aprēķināšanu.

Testa principi

QF-CMV tests tiek veikts 2 posmos. Vispirms tiek paņemts asins paraugs katrā QF-CMV asins analīžu stobriņā, t.i. nulles kontroles stobriņā, CMV antigēna stobriņā un mitogēna stobriņā.

Mitogēna stobriņš QF-CMV testā tiek izmantots kā pozitīvā kontrole. Tas var būt īpaši nepieciešams, ja pastāv šaubas par indivīda imunitātes statusu.

Stobriņi jāinkubē 37 °C pēc iespējas drīzāk, bet ne vēlāk kā 16 stundu laikā pēc parauga ņemšanas.

Pēc 16–24 stundu inkubācijas perioda stobriņi tiek centrifugēti, tiek atdalīta plazma un ar QF-CMV ELISA testu tiek izmērīts IFN- γ daudzums (SV/ml).

IFN- γ daudzums CMV antigēna un mitogēna stobriņu plazmas paraugos bieži vien var pārsniegt lielākās daļas ELISA testa rādījumu nolasišanas augstākās robežvērtības pat tādos gadījumos, ja indivīdiem ir mērena imūnsupresija. Lai iegūtu **kvalitatīvus** rezultātus, izmantojiet tīrai plazmai aprēķinātās vērtības. Ja **kvantitatīvajiem** rezultātiem nepieciešamas faktiskās SV/ml vērtības, plazmas paraugi jāatšķaida attiecībā 1/10 ar zaļo šķīdinātāju, un jāveic ELISA tests kopā ar tīru plazmu.

Piezīme. Ja paraugi ir QF-CMV ELISA testa diapazonā (t.i. līdz 10 SV/ml), jāizmanto ar tīru plazmas paraugu iegūtais rezultāts. Ja šādām IFN- γ koncentrācijām tiek izmantoti plazmas paraugi ar atšķaidījumu 1/10, iegūtās vērtības var būt neprecīzas.

Tiek uzskatīts, ka IFN- γ atbilde testā ir pozitīva, ja CMV antigēna stobriņa rādījums ievērojami pārsniedz nulles stobriņa IFN- γ SV/ml vērtību. Mitogēna stimulētais plazmas paraugs kalpo kā IFN- γ pozitīvā kontrole katram testētajam paraugam. Vāja atbildes reakcija uz mitogēnu norāda uz nenoteiktu rezultātu, ja arī asins parauga atbilde uz CMV antigēniem ir negatīva. Šāds modelis var īstenoties, ja ir nepietiekams limfocītu daudzums, samazināta limfocītu aktivitāte nepareizas parauga apstrādes dēļ, nepareiza mitogēna stobriņa uzpilde/maisīšana vai pacienta limfocīti nespēj veidot IFN- γ , piemēram, pacientiem, kuriem nesēn veikta transplantācija. Nulles paraugs tiek koriģēts ar fonu vai nespecifisku IFN- γ asins paraugos. Nulles stobriņa IFN- γ līmenis tiek atņemts no IFN- γ CMV antigēna stobriņa un mitogēna stobriņa līmeņa (izklāstu par QF-CMV testa rezultātu interpretēšanu skatiet šīs lietošanas pamācības sadaļā "Rezultātu interpretācija" 14. lappusē).

Testa veikšanai nepieciešamais laiks

Tālāk novērtēts QF-CMV testa veikšanai nepieciešamais laiks; ir norādīts arī laiks vairāku paraugu testēšanai, tos testējot kopā.

Asins stobriņu inkubācija 37 °C temperatūrā:	16–24 stundas.
ELISA tests:	aptuveni 3 stundas 1 ELISA testa platei; mazāk nekā 1 stunda darba. Pieskaitiet 10–15 minūtes katrai papildu platei.

Reāģenti un uzglabāšana

CMV un kontroles antigēna asins analīžu stobriņi (viena pacienta komplekts)	
Kataloga nr.	0192-0301
Sagatavju skaits	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON nulles kontrole) (pelēks vāciņš)	1 stobriņš
CMV Antigen (CMV antigēns) (zils vāciņš);	1 stobriņš
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogēna kontrole) (violets vāciņš)	1 stobriņš
Lietošanas pamācība	1

QuantiFERON-CMV ELISA testa sastāvdaļas	
Kataloga nr.	0350-0201
Mikroplates plātnītes	24 x 8 iedobītes
Human IFN- γ Standard (standarta cilvēka IFN- γ), liofilizēts	1 x flakons
Green Diluent (zaļš šķīdinātājs)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantiFERON konjugāta 100X koncentrāts), liofilizēts	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (QuantiFERON skalošanas buferšķīduma 20X koncentrāts)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON enzīmu substrāta šķīdums)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON enzīmu darbības pārtraukšanas šķīdums)	1 x 15 ml

Nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti

- 37 °C inkubators; CO₂ nav nepieciešams
- Kalibrētas pipetes ar maināmu tilpumu no 10 µl līdz 1000 µl šķīduma pārvešanai ar vienreizējas lietošanas uzgaļiem
- Kalibrētas daudzkanālu pipetes ar tilpumu 50 µl un 100 µl ar vienreizējas lietošanas uzgaļiem
- Mikroplašu kratītājs
- Dejonizēts vai destilēts ūdens, 2 litri
- Ierīce mikroplašu skalošanai (ieteicama automātiska skalošanas ierīce)
- Mikroplašu lasītājs ar 450 nm filtru un 620–650 nm references filtru

Glabāšana un lietošana

Asins analīžu stobriņi

- Uzglabājiet asins analīžu stobriņus 4–25 °C temperatūrā.
- QuantiFERON-CMV asins analīžu stobriņu maksimālais uzglabāšanas laiks ir 15 mēneši no ražošanas datuma, ja tie tiek glabāti 4–25 °C temperatūrā.

ELISA testa komplekta reaģenti

- Glabājiet komplektu 2–8 °C temperatūrā.
- Vienmēr aizsargājiet enzīmu substrāta šķīdumu no tiešas saules gaismas.

Pagatavotie un neizmantojie reaģenti

Reaģentu pagatavošanas norādījumus, lūdzu, skatiet sadaļā “Lietošanas norādījumi — 2. posms” (3. un 5. darbība 10. un 11. lappusē).

- Pagatavoto komplekta standarta šķīdumu var uzglabāt līdz 3 mēnešiem 2–8 °C temperatūrā.

Pierakstiet datumu, kurā komplekta standarta šķīdums tika pagatavots.

- Pēc pagatavošanas neizlietotais QuantiFERON konjugāta 100X koncentrāts atkal jāuzglabā 2–8 °C temperatūrā un jāizlieto 3 mēnešu laikā.

Pierakstiet datumu, kurā konjugāts tika pagatavots.

- Konjugāta darba šķīdums jāizlieto 6 stundu laikā pēc tā sagatavošanas.
- Skalošanas buferšķīduma darba šķīdumu var glabāt istabas temperatūrā (17–27 °C) līdz 2 nedēļām.

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai in vitro diagnostikā.

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimds un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildu informāciju, lūdzu, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (SDS — safety data sheets). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā pieejamas vietnē www.qiagen.com/safety, kur katram QIAGEN komplektam un tā sastāvdaļām var atrast, apskatīt un izdrukāt SDS.



UZMANĪBU! Rīkojoties ar cilvēku asinīm, ievērojiet, ka tās var būt infekciozas. Ievērojiet atbilstošās asins paraugu apstrādes vadlīnijas.

Tālāk norādītās riska un drošības frāzes attiecas uz QF-CMV ELISA testa komplekta sastāvdaļām.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON enzīmu darbības pārtraukšanas šķīdums)



Satur sērskābi: kairinošs. Riska un drošības frāzes:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zaļais šķīdinātājs** satur standarta peļu serumu un kazeīnu, kas var ierosināt alerģiskas reakcijas; izvairieties no saskares ar ādu.

Ķīmiskas ārkārtas situācijas gadījumā

Izšļakstīšanās, noplūde, iedarbība vai nelaimes gadījums

Jebkurā diennakts laikā zvaniet CHEMTREC

ASV un Kanādā: 1 800 424 9300

Ārpus ASV un Kanādas: + 1 703 527 3887 (tiek pieņemti zvani, kurus apmaksā to saņēmējs)

Papildinformācija

Drošības datu lapas: www.qiagen.com/safety

* R36/38: kairina acis un ādu; S26: ja nokļūst acīs, nekavējoties skalojiet ar lielu ūdens daudzumu un vērsieties pēc medicīniskas palīdzības; S36/37/39: valkājiet piemērotu aizsargapģērbu, cimds un acu/sejas aizsargus.

Paraugu ņemšana un apstrāde

Svarīga informācija pirms darba sākšanas.

Novirzes no QF-CMV lietošanas pamācībā sniegtajiem norādījumiem var izraisīt kļūdainus rezultātus. Pirms lietošanas rūpīgi izlasiet norādījumus.

- Nelietojiet komplektu, ja pirms lietošanas kāda reaģenta pudele izskatās bojāta vai tai ir noplūde.
- Nejauciet kopā un nelietojiet citu QF-CMV ELISA testa komplektu sēriju ELISA testu reaģentus.
- Neizlietotos reaģentus un neizlietotos paraugus izmetiet saskaņā ar vietējiem un valstī pastāvošajiem noteikumiem.
- Neizmantojiet QF-CMV testa asins analīžu stobriņus vai QF-CMV ELISA testa komplektus pēc derīguma termiņa beigām.

QF-CMV testā tiek lietoti šādi asins analīžu stobriņi:

1. Nil Control (nulle kontrole) (pelēks vāciņš);
2. CMV Antigen (CMV antigēns) (zils vāciņš);
3. Mitogen Control (mitogēna kontrole) (violets vāciņš).

Antigēni ir izzāvēti uz asins analīžu stobriņu iekšējās sienas, tāpēc ir svarīgi, lai stobriņu saturs tiktu rūpīgi samaisīts ar asinīm. Stobriņi jāievieto inkubatorā 37 °C temperatūrā pēc iespējas drīzāk, bet ne vēlāk kā 16 stundu laikā pēc parauga ņemšanas.

Lai iegūtu optimālus rezultātus, ievērojiet šīs procedūras:

1. **Veicot vēnas punkciju, no katra pacienta paņemiet 1 ml asiņu tieši katrā QF-CMV testa asins analīžu stobriņā.**
 - Tā kā, lietojot 1 ml stobriņus, asins ņemšana notiek salīdzinoši lēni, turiet stobriņu pie adatas 2–3 sekundes vēl pēc stobriņa uzpildes, lai nodrošinātu pareiza tilpuma paņemšanu.
Melnā atzīme uz stobriņa sāniem norāda 1 ml uzpildes tilpumu. QF-CMV testa asins analīžu stobriņi ir validēti tilpumam diapazonā no 0,8 līdz 1,2 ml. Ja asins līmenis stobriņā nav tuvu indikatora līnijai, ieteicams paņemt citu asins paraugu.
 - QF-CMV testa asins analīžu stobriņi ir validēti 0,8–1,2 ml asins tilpuma ņemšanai no jūras līmeņa augstuma līdz 810 metriem (2650 pēdām) virs jūras līmeņa. Virs šī augstuma lietotājiem jānodrošina, ka asinis tiek paņemtas katrā stobriņā šajās robežās. Ja asins parauga ņemšana ir lēna, asinis var ņemt ar šļirci un pa 1 ml pārliet katrā no 3 stobriņiem. Drošības apsvērumu dēļ šī procedūra jāveic noņemot šļirci adatu, nodrošinot attiecīgās drošības procedūras, noņemot vāciņus no trīs QF-CMV testa stobriņiem un pievienojot 1 ml asiņu katrā no tiem (līdz melnajai atzīmei uz stobriņa sāniem). Stingri uzlieciet atpakaļ stobriņu vāciņus un samaisiet, kā aprakstīts tālāk.
 - Ja asins ņemšanai izmanto tauriņadatu, tad ar tukša stobriņa palīdzību jānodrošina, lai būtu piepildīta tauriņadatai pievienotā caurulīte, pirms tiek lietoti QF-CMV testa asins analīzes stobriņi.
2. **Uzreiz pēc stobriņu uzpildīšanas sakratiet tos desmit (10) reizes tikai tik stipri, lai nodrošinātu, ka visa stobriņa iekšējā virsma ir pārklāta ar asinīm. Tādējādi tiek izšķīdināti antigēni uz stobriņa sienām.**
 - Uzpildīšanas laikā stobriņiem jāatrodas 17–25 °C temperatūrā.
 - Pārāk spēcīga kratīšana var izraisīt gela izšķīšanu, kas var būt par iemeslu neprecīziem rezultātiem.
3. **Atbilstoši marķējiet stobriņus.**
4. **Stobriņi jāievieto inkubatorā 37°C ± 1°C pēc iespējas drīzāk, bet ne vēlāk kā 16 stundu laikā pēc parauga ņemšanas. Asins paraugus nedrīkst uzglabāt ledusskapī vai saldētavā.**

Lietošanas norādījumi

1. posms — asins parauga inkubācija un plazmas iegūšana

1. Ja asins paraugi netiek inkubēti uzreiz pēc to paņemšanas, stobriņu saturs tieši pirms inkubācijas no jauna jāsakrata, kā tas aprakstīts iepriekšējās sadaļas 2. darbībā.
2. Inkubējiet stobriņus STĀVUS 16–24 stundas 37 °C temperatūrā. CO₂ vai mitrināšana inkubatoram nav nepieciešama.
3. Pēc inkubācijas un pirms nākamās darbības asins analīžu stobriņi var tikt uzglabāti līdz 3 dienām 2–27 °C temperatūrā. Pēc stobriņu inkubēšanas 37 °C centrifugējiet tos 15 minūtes ar ātrumu 2000–3000 RCF (g). Gela korķis šūnas atdalīs no plazmas. Ja tas nenotiek, stobriņi atkārtoti jācentrifugē ar lielāku ātrumu.
 - Plazmu var iegūt bez centrifugēšanas, tomēr jāpievērš papildu uzmanība tam, lai plazmu atdalītu, nesabojājot šūnas.
4. Pēc centrifugēšanas un pirms plazmas iegūšanas izvairieties no pipetēšanas augšup un lejup vai jebkāda veida plazmas maisīšanas. Vienmēr ievērojiet piesardzību, lai nesabojātu materiālu uz gela virsmas.
 - Plazmas paraugus drīkst iegūt tikai ar pipeti.
 - No centrifugētiem asins analīžu stobriņiem plazmas paraugus var pārliet tieši QF-CMV ELISA platē arī tad, ja tiek izmantotas automatizētas ELISA testa ierīces.
 - Plazmas paraugus var uzglabāt līdz 28 dienām 2–8 °C temperatūrā, bet, iegūstot tīru plazmu, ilgāku laika periodu temperatūrā, kas zemāka par –20 °C (vēlams zemākā par –70 °C) stobriņos vai plazmas uzglabāšanas konteineros.

2. posms — cilvēka IFN-γ noteikšana ar QuantiFERON-CMV ELISA testu

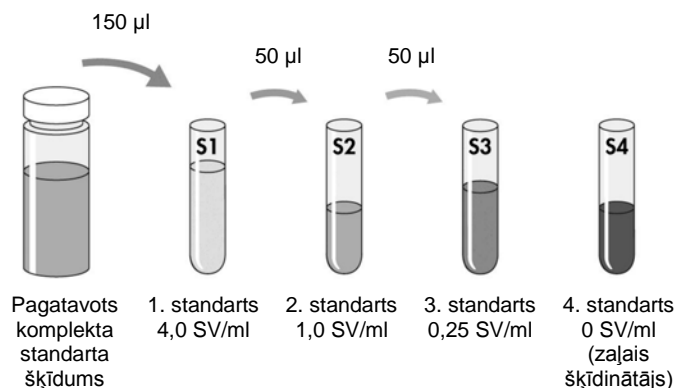
1. Visi plazmas paraugi un reaģenti, izņemot konjugāta 100x koncentrātu, pirms lietošanas jāsasilda līdz istabas temperatūrai (17–27 °C). Temperatūras izlīdzināšanai nepieciešamas vismaz 60 minūtes.
2. Izņemiet no rāmja plātnītes, kas netiek izmantotas, ielieciet tās atpakaļ folija iepakojumā un līdz lietošanai uzglabājiet ledusskapī.

Jāparedz vismaz viena plātnīte QF-CMV ELISA testa standartiem un pietiekams skaits plātnīšu testējamajiem pacientiem. Pēc izmantošanas rāmi un vāciņu saglabājiet lietošanai ar atlikušajām plātnītēm.
3. Izšķīdiniet ar saldēšanu izžāvēto komplekta standartu tādā dejonizētā vai destilētā ūdens daudzumā, kas norādīts uz standarta flakona etiķetes. Uzmanīgi samaisiet, lai samazinātu putu veidošanos un nodrošinātu pilnīgu izšķīšanu. Pagatavojot norādītā tilpuma standarta šķīdumu, iegūst šķīdumu ar koncentrāciju 8,0 SV/ml.
4. Standarta līkni iegūst, izmantojot 3 komplekta standartu atšķaidījumus un atsevišķi zaļo šķīdinātāju kā 4. standartu (0 SV/ml).

Izmantojiet pagatavoto komplekta standarta šķīdumu, lai iegūtu atšķaidījumu sēriju ar 3 IFN-γ koncentrācijām. Atšķaidiet komplekta zaļo šķīdinātāju (Green Diluent — GD) (skatiet 1. attēlu nākamajā lappusē). Standarta šķīdumi jātestē vismaz divas reizes. Tālāk norādītas darbības, kā tam sagatavot pietiekamu tilpumu.

 - a. Marķējiet 4 stobriņus kā “S1”, “S2”, “S3”, “S4”.
 - b. Pievienojiet 150 µl zaļā šķīdinātāja 4 stobriņos (S1–S4).
 - c. Pievienojiet 150 µl komplekta standarta šķīduma stobriņā S1 un rūpīgi samaisiet.
 - d. Pārnēsiet 50 µl no stobriņa S1 uz stobriņu S2 un rūpīgi samaisiet.

- d. Pārnesiet 50 µl no stobriņa S2 uz stobriņu S3 un rūpīgi samaisiet.
- f. Zaļais šķīdinātājs atsevišķi kalpo kā nulles standarts (S4).



1. attēls. Standarta līknes sagatavošana. Katrai ELISA testa sērijai sagatavojiet svaigus komplekta standarta šķīduma atšķaidījumus.

5. Izšķīdiniet ar saldēšanu izžāvēto QuantiFERON konjugāta 100X koncentrātu 0,3 ml dejonizēta vai destilēta ūdens. Uzmanīgi samaisiet, lai samazinātu putu veidošanos un nodrošinātu pilnīgu konjugāta izšķīšanu.
6. Konjugāta darba šķīdumu sagatavo, atšķaidot nepieciešamo pagatavotā konjugāta 100x koncentrāta daudzumu ar zaļo šķīdinātāju atbilstoši 1. tabulā “Konjugāta sagatavošana” sniegtajiem norādījumiem.
 - Rūpīgi, bet uzmanīgi samaisiet, lai izvairītos no putu veidošanās.
 - Neizlietoto konjugāta 100X koncentrātu uzreiz pēc lietošanas ievietojiet 2–8 °C temperatūrā.
 - Izmantojiet tikai zaļo šķīdinātāju.

1. tabula. Konjugāta sagatavošana

Plātnīšu skaits	Konjugāta 100X koncentrāta tilpums	Zaļā šķīdinātāja tilpums
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. **Pirms testēšanas plazmas paraugi jāsamaisa, lai nodrošinātu vienmērīgu IFN- γ sadalījumu katrā paraugā. Ja nepieciešami kvantitatīvi rezultāti, izšķīdiniet arī CMV un mitogēna plazmas paraugus zaļajā šķīdinātājā attiecībā 1/10 (10 μ l plazmas samaisa ar 90 μ l zaļā šķīdinātāja). Nulles plazmas paraugu nešķaida.**

Ieteicams testēt šādus paraugus:

- nulles, CMV antigēns, mitogēns, CMV antigēns (1/10), mitogēns (1/10).

Papildus QuantiFERON-CMV analīžu veikšanas programmatūra atbalsta vēl šādas pacientu paraugu iespējas:

- nulles, CMV antigēns, mitogēns;
- nulles, CMV antigēns (1/10), mitogēns (1/10);
- nulles, CMV antigēns, mitogēns, CMV antigēns (1/10);
- nulles, CMV antigēns (1/10), mitogēns.

8. **Ar daudzkanālu pipeti ievadiet 50 μ l svaigi pagatavota konjugāta darba šķīduma nepieciešamajās ELISA iedobītēs.**

9. **Ar daudzkanālu pipeti ievadiet 50 μ l testa plazmas paraugu atbilstošajās iedobītēs. Beigās pievienojiet 50 μ l no katra 1.–4. standarta šķīduma.**

10. **Rūpīgi 1 minūti maisiet konjugātu un plazmas paraugus/standarta šķīdumu mikroplašu kratītājā.**

11. **Katru plati pārklājiet ar vāku un 120 \pm 5 minūtes inkubējiet istabas temperatūrā (17–27 °C).**

- Inkubācijas laikā plates nedrīkst atrasties tiešā saules gaismā.

12. **Inkubācijas laikā atšķaidiet un rūpīgi samaisiet vienu daļu skalošanas buferšķīduma 20X koncentrāta ar 19 daļām dejonizēta vai destilēta ūdens. Tiek piegādāts pietiekami daudz skalošanas buferšķīduma 20X koncentrāta, lai varētu sagatavot 2 litrus skalošanas buferšķīduma darba šķīduma.**

Skalojiet iedobītes ar 400 μ l skalošanas buferšķīduma darba šķīdumu vismaz 6 ciklus. Ieteicams lietot automātisku plates skalošanas ierīci.

- Lai pareizi veiktu testu, ļoti svarīga ir rūpīga skalošana. Nodrošini, lai katrā skalošanas ciklā katra iedobīte **būtu pilnīgi uzpildīta** ar skalošanas buferšķīdumu līdz iedobītes augšējai malai. Starp katru ciklu ieteicams vismaz 5 sekunžu mērcēšanas periods.
- Notekūdeņu uzkrāšanas tvertnēs jāielej parastais laboratorijas dezinfekcijas līdzeklis, kā arī jāievēro spēkā esošie noteikumi par iespējami infekcioza materiāla dekontamināciju.

13. **Noteciniet otrādi apgrieztas plates uz uzsūcoša dvieļa, lai atbrīvotos no atlikušā skalošanas buferšķīduma. Pievienojiet 100 μ l enzīmu substrāta šķīduma katrā iedobītē un rūpīgi samaisiet ar mikroplašu kratītāju.**

14. **Katru plati pārklājiet ar vāku un 30 minūtes inkubējiet istabas temperatūrā (17–27 °C).**

- Inkubācijas laikā plates nedrīkst atrasties tiešā saules gaismā.

15. **Pēc 30 minūšu inkubācijas katrā iedobītē pievienojiet 50 μ l enzīmu darbības pārtraukšanas šķīduma un samaisiet.**

- Enzīmu darbības pārtraukšanas šķīdums iedobītēs jāpievieno tādā pašā rindas kārtībā un ar aptuveni tādu pašu ātrumu, kādā tika pievienots substrāts 13. darbībā.

16. **Ar mikroplašu lasītāju, kas aprīkots ar 450 nm filtru un 620–650 nm references filtru, izmēriet optisko blīvumu (OB) katrā iedobītē 5 minūšu laikā pēc reakcijas pārtraukšanas. Rezultātu aprēķināšanai tiek izmantotas OB vērtības.**

Aprēķini un testa rezultātu interpretācija

QuantiFERON-CMV analīžu veikšanas programmatūra iegūto datu analīzei un rezultātu aprēķinam ir pieejama QIAGEN tīmekļa vietnē www.QuantiFERON.com.

Programmatūra veic testa kvalitātes kontroles novērtējumu, izveido standarta līkni un nodrošina testa rezultātu katram pacientam. Sīkāks izklāsts pieejams sadaļā "Rezultātu interpretācija".

QF-CMV analīžu veikšanas programmatūras izmantošanas alternatīva ir rezultātu noteikšana, izmantojot tālāk aprakstīto metodi.

Standarta līknes izveidošana

Nosakiet komplekta standarta šķīduma atkārtojumu vidējās OB vērtības katrai platei.

Uzzīmējiet standarta līkni $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$, atzīmējot vidējo OB vērtību $\log_{(e)}$ (y ass) attiecībā pret standarta $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentrāciju SV/ml (x ass) un neņemot vērā šo aprēķinu nulles vērtību. Ar regresijas analīzi aprēķiniet līniju, kas vislabāk atbilst standarta līknei.

Izmantojiet standarta līkni, lai noteiktu IFN- γ koncentrāciju (SV/ml) katram testa plazmas paraugam, izmantojot katra parauga OB vērtību.

Šos aprēķinus var veikt, izmantojot mikroplašu lasītājiem pieejamās programmatūras paketes, kā arī standarta izklājlapu vai statistikas programmatūru (piemēram, Microsoft® Excel®). Šādas paketes ieteicams izmantot regresijas analīzes aprēķiniem, kā arī standartu variācijas koeficienta (%VK) un standarta līknes korelācijas koeficienta (r) noteikšanai.

Testa kvalitātes kontrole

Testa rezultātu precizitāte ir atkarīga no precīzas standarta līknes izveides. Tādēļ pirms testa paraugu rezultātu interpretācijas jāpārbauda no standartiem atvasinātie rezultāti.

Lai ELISA tests būtu derīgs:

- vidējai 1. standarta OB vērtībai jābūt $\geq 0,600$;
- 1. un 2. standarta atkārtojuma OB vērtību %VK jābūt $< 15\%$;
- 3. un 4. standarta atkārtojumu OB vērtību variācija nedrīkst būt lielāka par 0,040 optiskā blīvuma vienībām, salīdzinot ar to vidējo vērtību;
- no standartu vidējām absorbcijas vērtībām aprēķinātajam korelācijas koeficientam (r) jābūt $\geq 0,98$.

Ja iepriekš minētie kritēriji nav izpildīti, tests nav derīgs un ir jāatkārto.

Vidējai nulles standarta (zaļais šķīdinātājs) OB vērtībai jābūt $\leq 0,150$. Ja vidējā OB vērtība ir $> 0,150$, jāpārbauda plates skalošanas procedūra.

Rezultātu interpretācija

QuantiFERON-CMV testa rezultāti tiek interpretēti, izmantojot tālāk norādītos kritērijus.

CMV mīnus nulle (SV/ml)*	Mitogēns mīnus nulle (SV/ml)	QF-CMV testa rezultāts	Ziņojums/interpretācija
< 0,2	≥ 0,5	Negatīvs	NAV noteikta imunitāte pret CMV
≥ 0,2	Jebkāds	Pozitīvs	Ir noteikta imunitāte pret CMV
< 0,2	≥ 0,5	Nenoteikts [†]	Atbildes reakcijas uz CMV rezultāts ir nenoteikts

* IFN-γ atbildes reakcijas uz CMV antigēna un mitogēna pozitīvo kontroli bieži var būt ārpus mikroplātes lasītāja diapazona. Tas neietekmē kvalitatīvos rezultātus.

[†] Iespējamās iemeslus skatiet sadaļā "Problēmu novēršanas ieteikumi".

Ierobežojumi

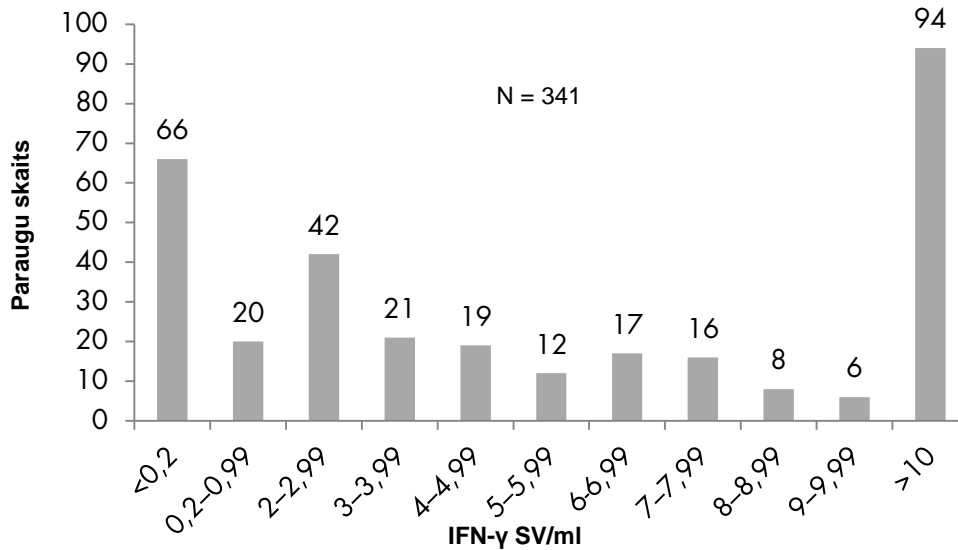
QuantiFERON-CMV testa rezultāti izvērtējami saistībā ar katra atsevišķā indivīda epidemioloģisko vēsturi, pašreizējo veselības stāvokli un citiem diagnostiskiem izmeklējumiem.

Neuzticamu un nenoteiktu rezultātu iemesli var būt šādi:

- lietošanas pamācībā aprakstīto procedūru neievērošana;
- pārāk augsta IFN-γ koncentrācija nulles stobriņā;
- no asins parauga paņemšanas līdz inkubēšanai 37 °C temperatūrā pagājušas vairāk nekā 16 stundas.

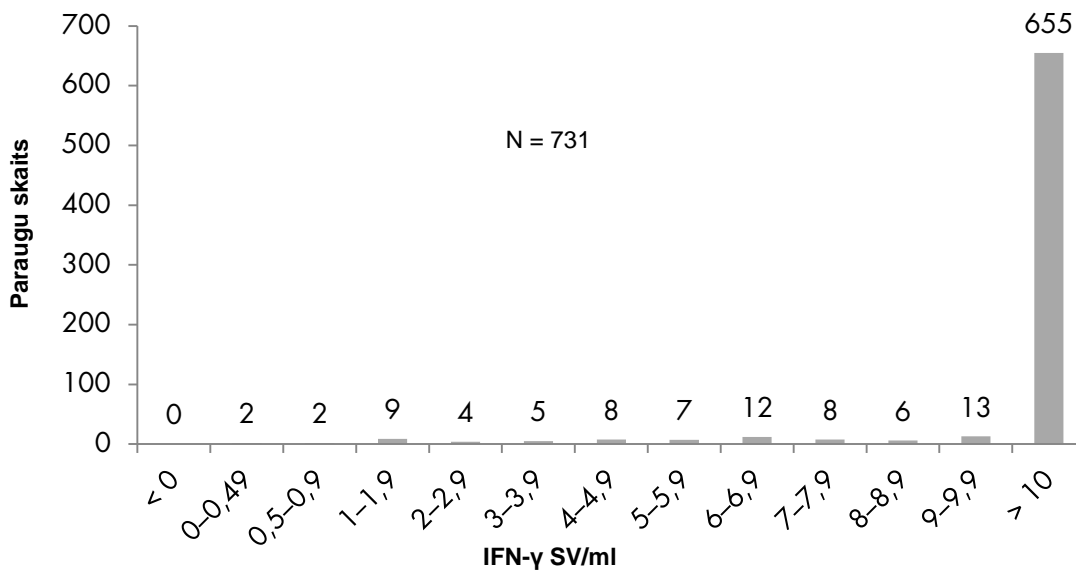
Sagaidāmās vērtības

Sagaidāmās IFN- γ vērtības, izmantojot QuantiFERON-CMV testu, tika iegūtas, testējot 591 vesela pieaugušā paraugu, no kuriem 341 bija CMV seropozitīvs un 250 bija seronegatīvi. No 250 veselajiem pieaugušajiem bez CMV infekcijas, kas tika noteikta ar CMV seroloģiskajiem rādītājiem (CMV seronegatīvi), 100% cilvēku IFN- γ rādītāji CMV antigēna stobriņam (mīnus nulle) bija < 0,2 SV/ml. CMV antigēna stobriņa rādītāju (mīnus nulle) sadalījums 341 veselajam cilvēkam ar CMV infekciju, kas tika noteikta ar CMV seroloģiskajiem rādītājiem (CMV seropozitīvi), ir parādīts 2. attēlā.



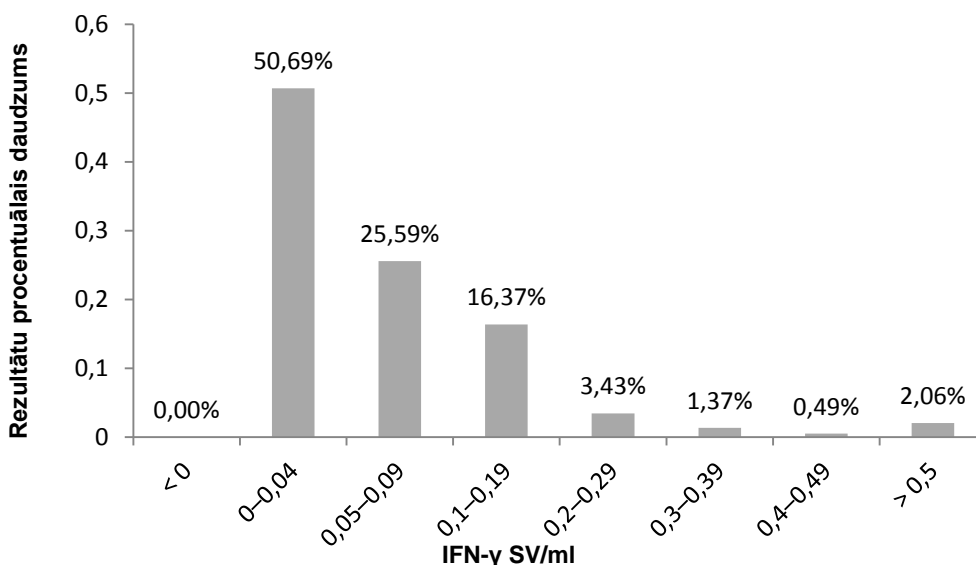
2. attēls. CMV–nulles stobriņa IFN- γ rādītāju sadalījums seropozitīviem veseliem cilvēkiem (n = 341).

3. attēlā ir parādīti mitogēna stobriņa (mīnus nulles fons) sadalījuma rezultāti 731 vesela pieaugušā normālam asins paraugam neatkarīgi no informācijas par CMV infekciju. Mitogēna stobriņa (mīnus nulle) rezultāts, kas mazāks par 0,5 SV/ml, norāda, ka tests nav izdevies vai personai ir novājinātas imunitātes stāvoklis. Veselo cilvēku populācijā tikai 2/731 rezultātu bija šajā kategorijā.



3. attēls. Mitogēna–nulles stobriņa IFN- γ rādītāju sadalījums veseliem pieaugušajiem (n = 731).

Nulles stobriņu sagaidāmās vērtības ir attēlotas 4. attēlā. Dati ir atvasināti no 1020 veselu pieaugušo plazmas paraugiem, kas tika testēti, izmantojot QuantiFERON-CMV ELISA testu.



4. attēls. Nulles stobriņa IFN-γ atbildes reakciju sadalījums veseliem pieaugušajiem (n = 1020) (izteikts kā populācijas procentuālā vērtība).

Veiktspējas raksturojums

Salīdzinošā testēšana

Izmantojot QF-CMV testu, tika izveidots testa sliekšnis iepriekšējas saskares ar CMV noteikšanai, pamatojoties uz veselu pieaugušo grupas (n = 223) rezultātu analīzi, kurā QF-CMV testa rezultāti tika salīdzināti ar CMV seroloģiskajiem rezultātiem. ROC analīzē tika noteikts, ka testa sliekšnis 0,04 SV/ml (pēc nulles atņemšanas) nodrošina optimālas prognozējamās pozitīvās un negatīvās QF-CMV testa vērtības (laukums zem līknes = 0,9679 [95% TI = no 0,9442 līdz 0,9915, $p < 0,0001$]), un tāpēc tas ir sliekšnis, pie kura šī testa paredzētais pielietojums veselu cilvēku populācijā ir visefektīvākais.

Salīdzinošajā testēšanā QF-CMV testa veiktspēja tika salīdzināta ar SeraQuest CMV IgG seroloģijas testu (Quest International). QF-CMV tests parādīja 95% (294 no 310 indivīdiem) sakrītību ar salīdzinošo seroloģijas testu pret HCMV veseliem cilvēkiem. QF-CMV testā nevienam no 149 seronegatīvajiem donoriem netika parādīts pozitīvs rezultāts, un 145 no 161 seropozitīvā donora tika parādīta pozitīva IFN-γ atbilde. Kopējā pozitīvā sakrītība bija 90%, bet negatīvās sakrītības vērtība bija 100%. Sakrītības līmenis starp IFN-γ atbildēm uz CMV peptīdiem veseliem brīvprātīgajiem, mērot ar QF-CMV testu, un šo cilvēku seroloģiskais CMV statuss, izmantojot SeraQuest CMV IgG seroloģijas testu, ir parādīts 2. tabulā.

2. tabula. QuantiFERON-CMV testa un CMV IgG seroloģijas testa rezultātu sakritība veseliem cilvēkiem.

		CMV seroloģija		Kopā
		Pozitīvs	Negatīvs	
QuantiFERON-CMV tests	Pozitīvs	145	0	145 (46,8%)
	Negatīvs	16	149	165 (53,2%)
	Kopā	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Testa sliekšnis

Šī testa ieteicamais klīniskais testa sliekšnis ir 0,2 SV/ml CMV antigēna stobriņā (mīnus nulle), lai gan dažādām klīniskajām vajadzībām var validēt dažādus sliekšņus. Tas tiek pamatots ar būtiskām imunoloģiskajām atšķirībām starp parasto testējamo populāciju un populācijām, kurām tests tiek uzskatīts par klīniski noderīgu — jo īpaši personām ar imunosupresiju, kam pastāv simptomātiskas CMV infekcijas un/vai slimības attīstības risks imunosupresijas dēļ. Individīdiem ar šādu augstu risku QF-CMV testa klīniskā lietderība ir iespējā precīzi noteikt imunitātes līmeni pret CMV, jo imunitātes trūkums var būt saistīts ar CMV slimības attīstību (1–5, 7, 8, 11–16).

Klīniskie pētījumi

Tā kā nav noteikta standarta citomegalovīrusa infekcijas apstiprināšanai vai izslēgšanai, QF-CMV testa jutīgumu un specifiskumu nevar praktiski izvērtēt. QF-CMV testa specifiskums un jutība tika aptuveni noteikta, novērtējot IFN- γ atbildes reakciju uz CMV peptīdiem sakritības līmeni, veseliem brīvprātīgajiem to mērot ar QF-CMV testu, kā arī nosakot šo cilvēku seroloģisko CMV statusu ar CMV IgG seroloģijas testu.

QF-CMV testa specifiskums tika aptuveni noteikts, novērtējot kļūdaini pozitīvus rādītājus (pozitīva atbilde ar QF-CMV testu) veseliem brīvprātīgajiem bez pierādījumiem par iepriekšēju saskari ar CMV (CMV seronegatīvi indivīdi). Jutīgums tika aptuveni noteikts, novērtējot veselus brīvprātīgos ar pierādījumiem par iepriekšēju saskari ar CMV (CMV seropozitīvi indivīdi). Lai gan QF-CMV testā tiek izmantots liels skaits specifisku CMV epitopu no dažādām CMV olbaltumvielām, tādējādi nodrošinot plašu klīnisko pielietojumu plašā populācijā ar dažādiem HLA I klases haplotipiem, šie peptīdi neaptver 100%. Tā kā cilvēkiem, kuriem veica CMV seroloģiskos izmeklējumus, nebija zināmi HLA haplotipi, tika sagaidīts, ka nelielai daļai seroloģiski pozitīvo indivīdu nebūs reakcijas uz QF-CMV testa stobriņiem.

Specifiskums

Pētījumā, kas tika veikts veseliem cilvēkiem, kuriem nebija pierādījumu par iepriekšēju saskari ar CMV (CMV seronegatīvi indivīdi, kur $n = 250$), tika konstatēts, ka sakritības līmenis starp IFN- γ atbildes reakcijām uz CMV peptīdiem, mērot ar QF-CMV testu, un CMV seroloģiskajām analīzēm ir 100%.

Visos citos specifiskuma novērtējumos, kas tika veikti cilvēkiem, kuriem ir transplantēti parenhimatozi orgāni (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), kuriem ir veikta asinsrades cilmes šūnu transplantācija (7, 13), kā arī ar HIV inficētiem pacientiem (2), tika pierādīts, ka sakritības līmenis starp IFN- γ atbildes reakcijām uz CMV peptīdiem, mērot ar QF-CMV testu, un CMV seroloģiskajām analīzēm ir 100%.

Jutība

Pētījumā, kas tika veikts veseliem cilvēkiem, kuriem bija pierādīta iepriekšēja saskare ar CMV (CMV seropozitīvi indivīdi, kur $n = 341$), tika konstatēts, ka sakritības līmenis starp IFN- γ atbildes reakcijām uz CMV peptīdiem, mērot ar QF-CMV testu, un CMV seroloģiskajām analīzēm ir 80,6% (275/341). Novērotās pretrunas var būt saistītas ar augstāka testa sliekšņa izmantošanu (0,2 SV/ml), kļūdaini pozitīvām CMV seroloģiskajām analīzēm vai cilvēka imunoloģiskās reakcijas trūkumu uz CMV peptīdiem, kas iekļauti testā.

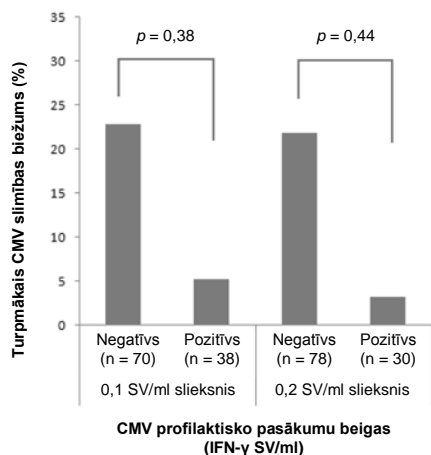
Jutības novērtējumos, kas tika veikti cilvēkiem, kuriem ir transplantēti parenhimatozi orgāni (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), kuriem ir veikta asinsrades cilmes šūnu transplantācija (7, 13), kā arī ar HIV inficētiem pacientiem (2), tika atklāts nedaudz zemāks sakritības līmenis starp IFN- γ atbildes reakcijām uz CMV peptīdiem, mērot ar QF-CMV testu, un šo pacientu CMV seropozitīvajām atbildēm. Zemāka sakritības līmeņa cēlonis var būt kļūdaini pozitīvi CMV seroloģiskie rezultāti, pacientu imunoloģiskās reakcijas trūkums uz CMV peptīdiem, kas iekļauti testā, kā arī reaģējošu T šūnu trūkums pacientiem, kuriem ir imūnsupresija.

Pētījumi, kas izceļ klīnisko lietderību

Gan seroloģisko analīžu, gan QF-CMV testa aprakstā ir norādīts, ka to paredzētais lietojums ļauj noteikt imunitāti pret CMV. Transplantācijas jomā CMV seroloģiskās analīzes tiek plaši izmantotas pirms transplantācijas, lai noteiktu CMV komplikāciju risku, kas pacientam varētu rasties pēc transplantācijas, tomēr šīm analīzēm ir ierobežota vērtība pēc transplantācijas. Toties QF-CMV testu var izmantot pacientiem, kuriem veikta transplantācija, lai novērtētu viņu CMV imunitātes līmeni, nosakot, vai nepastāv risks, ka attīstīsies simptomātiska CMV infekcija un/vai slimība imūnsupresijas dēļ (6, 9–11).

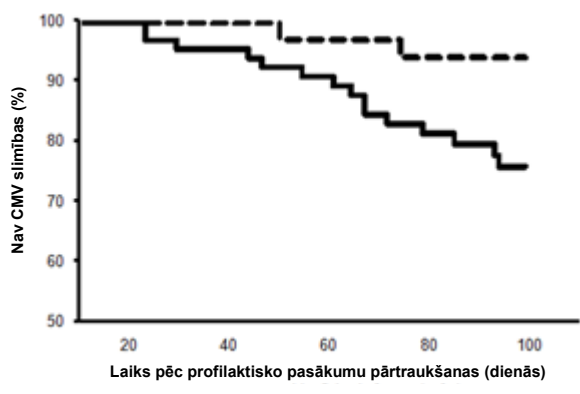
QuantIFERON-CMV testa lietderību tagad ir pierādījuši vairāki publicēti klīniskie pētījumi dažādās cilvēku grupās, kurās ir veikta transplantācija (1–5, 7, 8, 11–16).

Lielā pētījumā ar 108 pacientiem, kuriem veica parenhimatozo orgānu transplantāciju (4), tiem pacientiem, kuriem bija pozitīvs QF-CMV testa rezultāts, pabeidzot profilaktiskos pasākumus pret CMV, bija ievērojami zemāki vēlīnas saslimšanas rādītāji, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija negatīvi QF-CMV testa rezultāti (attiecīgi 5,3% un 22,9%; $p = 0,044$) (5. attēls).



5. attēls. Vēlīnas saslimšanas ar CMV infekciju rādītāji pacientiem ar pozitīvu QuantIFERON-CMV testa rezultātu un pacientiem ar negatīvu QuantIFERON-CMV testa rezultātu profilaktisko pasākumu beigās. Attēloti Kumar et al dati (4)

Turklāt pacienti ar pozitīviem QF-CMV testa rezultātiem profilaktisko pasākumu beigās biežāk un ilgāk nesa-
slima ar CMV infekciju (6. attēls), norādot, ka QF-CMV testu var izmantot, lai identificētu pacientus, kuriem ir
rīks vēlīnai saslimšanai ar CMV slimību.

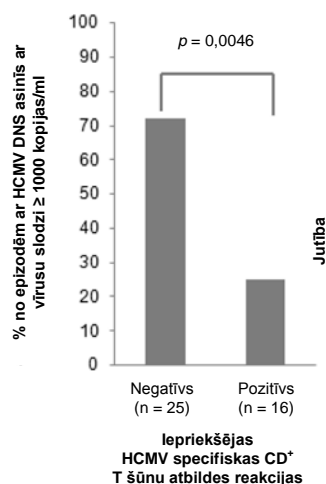


6. attēls. Laiks līdz CMV infekcijas attīstībai pacientiem ar pozitīviem QuantiFERON-CMV testa rezultātiem (norādīti ar pārtrauktu līniju) un negatīviem QuantiFERON-CMV testa rezultātiem (norādīti ar nepārtrauktu līniju) profilaktisko pasākumu beigās. Attēloti Kumar et al dati (4)

Šajā pētījumā arī uzsvērts, ka to pacientu grupā, kuriem veica transplantāciju un bija augstākais risks attīstīties CMV slimībai (CMV seronegatīvi pacienti, kas saņēma transplantējamo orgānu no CMV seropozitīva donora, t.i., D+/R-), pozitīvs QF-CMV testa rezultāts jebkurā laikā pēc profilaktiskajiem pasākumiem tika saistīts ar 90% varbūtību nesaistīties ar CMV infekciju.

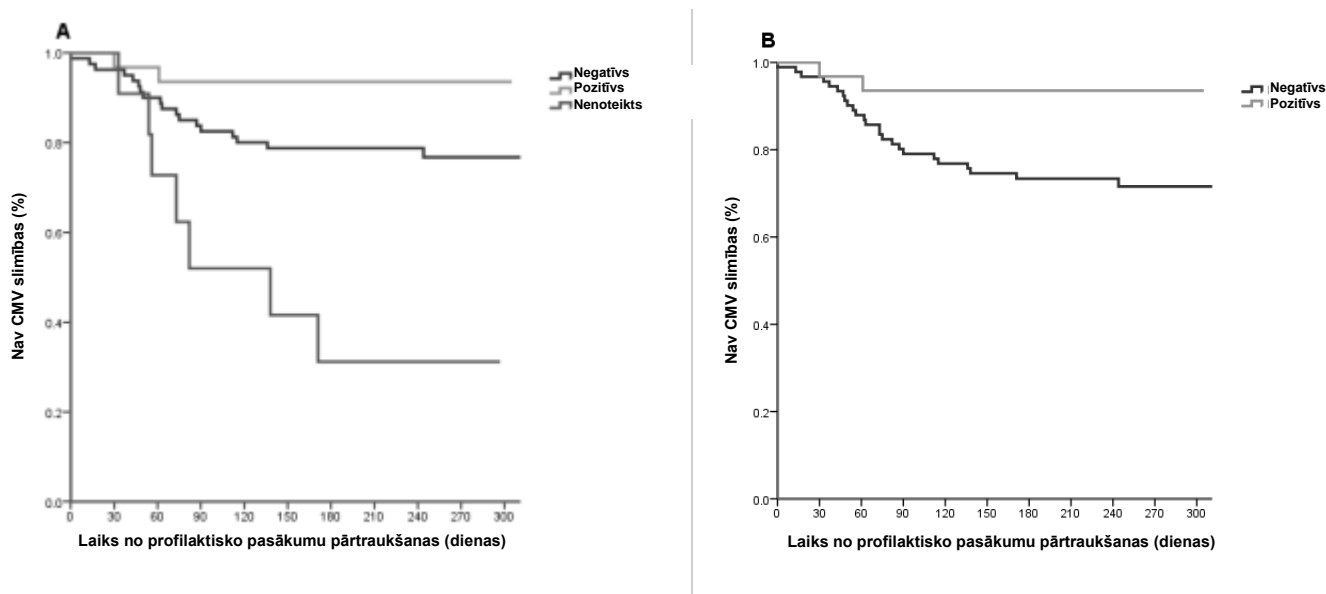
Pētījumā ar 37 pacientiem, kuriem tika transplantēti parenhimatozie orgāni (12), CMV specifisko CD8⁺ T šūnu atbildes reakcijas novērtēšana ar QF-CMV testu palīdzēja prognozēt spontānu atbrīvošanos no vīrusiem, salīdzinot ar CMV infekcijas progresēšanu pēc CMV virēmijas pastiprināšanās. Šajā pētījumā 24 no 26 pacientiem (92,3%) ar pozitīvu QF-CMV testa rezultātu spontāni atbrīvojās no CMV vīrusa, bet tikai 5 no 11 pacientiem (45,5%) ar negatīvu QF-CMV rezultātu bija līdzīgs iznākums.

Pētījumā ar 67 pacientiem, kuriem veica plaušu transplantāciju un novērtēja CMV virēmijas epizodes pēc transplantācijas (14), tika novērots, ka 18 no 25 (72%) CMV virēmijas epizodēm ievadīja negatīvs QF-CMV testa rezultāts, salīdzinot ar 4 no 16 (25%) epizodēm, kuras ievadīja pozitīva QF-CMV testa reakcija (Fišera kritērijs, $p = 0,0046$, skatiet 7. attēlu).



7. attēls. CMV specifiskās CD8⁺ T šūnu atbildes reakcijas, kas noteiktas ar QuantiFERON-CMV testu, un CMV virēmijas attīstības statistiskā analīze (Fišera kritērijs, $p = 0,0046$). Attēloti Weseslindtner et al dati (14).

Lielā daudzcentru perspektīvā pētījumā ar 127 D+/R- pacientiem, kuriem transplantēti parenhimatozie orgāni (15) un kuri visi saņēma pretvīrusu profilaktiskos līdzekļus, pacientiem ar pozitīviem QF-CMV testa rezultātiem (izmantojot 0,1 SV/ml testa sliekšni) jebkurā laikā pēc profilaktisko pasākumu pret CMV pabeigšanas 12 mēnešus pēc transplantācijas bija ievērojami zemāki vēlīnas saslimšanas rādītāji, salīdzinot ar tiem pacientiem, kuriem bija negatīvi un nenoteikti QF-CMV testa rezultāti (attiecīgi 6,4%, 22,2% un 58,3%; $p < 0,001$). Klasificējot arī nenoteiktos rezultātus kā “negatīvus”, turpmākais CMV infekcijas biežums bija 6,4%, salīdzinot ar 26,8%, $p = 0,024$ (skatiet 8. attēlu). Prognozējamās QF-CMV testa pozitīvās un negatīvās vērtības attiecībā uz aizsardzību pret CMV infekciju bija attiecīgi 0,90 (95% TI 0,74–0,98) un 0,27 (95% TI 0,18–0,37), norādot, ka pozitīvs QuantiFERON-CMV testa rezultāts jebkurā laikā pēc profilaktiskajiem pasākumiem tika saistīts ar 90% varbūtību nesaslimt ar CMV infekciju. Šajā pētījumā tika atklāts, ka QF-CMV tests var būt noderīgs, lai prognozētu, vai pacientiem pēc profilaktiskajiem pasākumiem ir zems, vidējs vai augsts turpmākas CMV infekcijas attīstības risks.



8. attēls. Kaplāna-Meijera līknes saslimstībai ar CMV slimību saskaņā ar QF-CMV testa rezultātiem.

A Pozitīvi, negatīvi un nenoteikti QF-CMV testa rezultāti (logaritmiski rangū kritēriji, $p < 0,001$).

B Pozitīvi un negatīvi rezultāti, kur nenoteikti rezultāti tiek uzskatīti par “negatīviem” (logaritmiski rangū kritēriji, $p = 0,024$).

Perspektīvā pētījumā ar 55 pacientiem, kuriem transplantēja parenhimatozos orgānus (16), tika analizēta QF-CMV testa rezultātu pirms transplantācijas saistība ar CMV replikācijas epizodēm pēc transplantācijas, konstatējot, ka biežāka CMV replikācija pēc transplantācijas tika novērota R(+) orgānu saņēmējiem, kam pirms transplantācijas bija negatīvs QF-CMV testa rezultāts (7 no 14 jeb 50%), salīdzinot ar tiem R(+) orgānu saņēmējiem, kam bija pozitīvs QF-CMV testa rezultāts (4 no 30 jeb 13,3%).

Šajā pētījumā tika atklāts, ka tiem orgānu saņēmējiem, kuriem pirms transplantācijas bija negatīvi QF-CMV testa rezultāti un kuri orgānu saņēma no CMV seropozitīva donora, bija desmitkārt lielāks CMV replikācijas risks, salīdzinot ar tiem orgānu saņēmējiem, kuriem pirms transplantācijas bija pozitīvi QF-CMV testa rezultāti (koriģētais relatīvais risks 10,49, 95% TI 1,88–58,46). Tādējādi QF-CMV tests pirms transplantācijas var būt noderīgs, lai prognozētu CMV replikācijas risku pēc transplantācijas un pieļautu individualizētu CMV infekcijas ārstēšanu pēc parenhimatozo orgānu transplantācijas.

Visā pasaulē ir pabeigti (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) vai pašlaik notiek vairāki citi pētījumi par CMV specifisko CD8⁺ T šūnu atbildes reakciju noteikšanu ar QF-CMV testu to pacientu grupā, kuriem tiek veikta transplantācija.

Starptautiska konsensa pamatnostādnes par citomegalovīrusu izraisītu saslimšanu pārvaldību, transplantējot parenhimatozos orgānus

Ir atzīta specifiska CMV imūnā monitoringa nozīme un publicēts izdevums “Starptautiska konsensa pamatnostādnes par citomegalovīrusu izraisītu saslimšanu pārvaldību, transplantējot parenhimatozos orgānus” (6). Šīs starptautiskās pamatnostādnes par CMV un parenhimatozo orgānu transplantāciju, ko izstrādājusi ekspertu grupa, kuru sasaukusi Transplantācijas biedrības infekcijas slimību nodaļa, pārstāv uz pierādījumiem un ekspertu atzinumiem pamatotas pamatnostādnes par CMV izraisītu saslimšanu pārvaldību, tostarp diagnostiku, imunoloģiju, profilaksi un ārstēšanu.

Šajās pamatnostādnēs secināts, ka “Ar CMV specifisko T šūnu atbildes reakciju imunoloģisko monitoringu var prognozēt indivīdu CMV slimības risku pēc transplantācijas, un tas var būt noderīgs profilaktisko pasākumu vadīšanā un preventīvajā terapijā” (6).

Turklāt pamatnostādnēs sniegti arī ieteikumi par ideāla imunoloģiskā monitoringa testa īpašībām, kuras ietver:

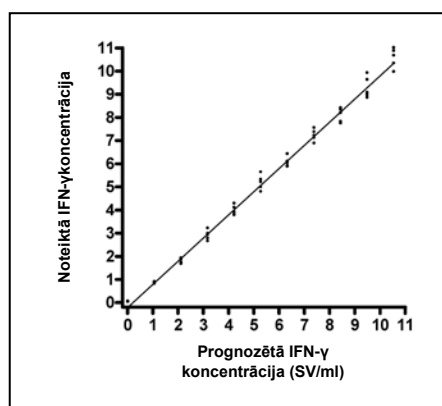
- spēju novērtēt pacienta, kuram transplantēts orgāns, CD4⁺ un CD8⁺ T šūnu daudzumu un funkciju;
- spēju izmērīt IFN- γ ;
- vienkāršību, izmaksu efektivitāti un atkārtojamību;
- ātru izpildes laiku;
- vienkāršu paraugu pārvadāšanu uz specializētajām laboratorijām, kurās tiek veiktas analīzes.

QF-CMV tests virtuāli atbilst visiem šajās pamatnostādnēs norādītajiem kritērijiem un pārstāv vienīgo standartizēto imunoloģiskā monitoringa testu, ar kuru var noteikt CMV specifisko IFN- γ .

Testa veikspējas raksturojums

Ir pierādīts, ka IFN- γ koncentrācijas mērīšanas metode ar QF-CMV ELISA testu ir lineāra no nulles līdz 10 SV/ml (9. attēls). Linearitātes pētījums tika veikts, uz ELISA plates nejauši novietojot 11 plazmas pūlu 5 atkārtojumus ar zināmām IFN- γ koncentrācijām.

QF-CMV ELISA tests nesniedz pierādījumus par augstas devas āķa (prozona) efektu ar IFN- γ koncentrācijām līdz 100 000 SV/ml.



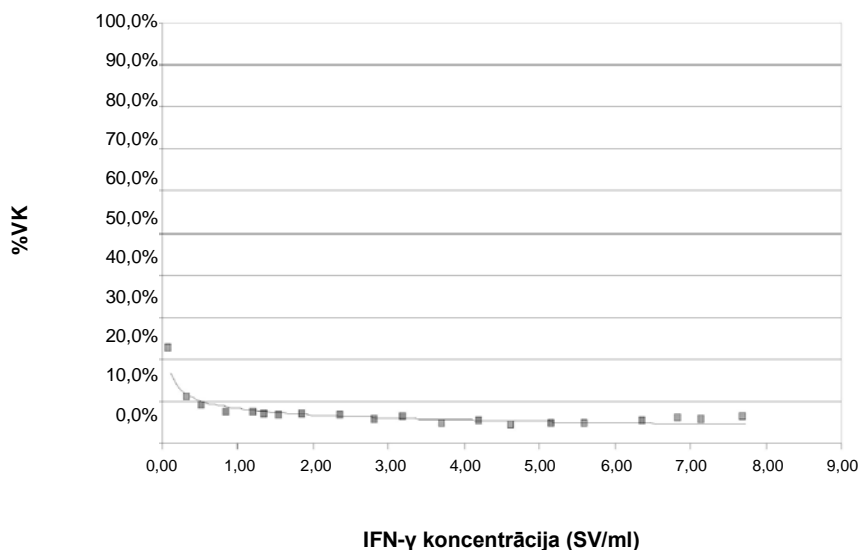
9. attēls. QF-CMV ELISA testa linearitātes profils, kuru nosaka, testējot 11 plazmas paraugu 5 atkārtojumus ar zināmām IFN- γ koncentrācijām. Lineārās regresijas līnijai ir $1,002 \pm 0,011$ slīpums un korelācijas koeficients 0,99.

Tika novērtēta QF-CMV ELISA testa iekšējā neprecizitāte un starptestu neprecizitāte (%VK), testējot 20 plazmas paraugus ar mainīgām IFN- γ koncentrācijām 3 atkārtojumos, ko veikuši 3 operatori 3 laboratorijās 3 dienās, kas nebija secīgas. Tādējādi katrs paraugs tika testēts 27 reizes 9 neatkarīgos testos. Viens paraugs bija nulles kontrole, un tam bija aprēķināta IFN- γ koncentrācija 0,08 (95% TI 0,07–0,09) SV/ml. Atlikušo 19 plazmas paraugu koncentrāciju diapazons bija no 0,33 (0,31–0,34) līdz 7,7 SV/ml (7,48–7,92).

Visa testa kopējā, kā arī starptestu neprecizitāte tika novērtēta, aprēķinot vidējo %VK katram testa plazmas paraugam, kas satur IFN- γ no katras plates testa ($n = 9$), un bija diapazonā no 4,1 līdz 9,1%VK. Vidējais testa %VK ($\pm 95\%$ TI) bija $6,6\% \pm 0,6\%$. Nulles IFN- γ plazmas parauga vidējais %VK bija 14,1%.

Kopējo vai starptestu neprecizitāti noteica, salīdzinot 27 aprēķinātās IFN- γ koncentrācijas katram plazmas paraugam, un tās %VK bija diapazonā no 6,6% līdz 12,3%. Kopējais vidējais %VK ($\pm 95\%$ TI) bija $8,7\% \pm 0,7\%$. Nulles IFN- γ plazmas parauga %VK bija 26,1%. Šāds variāciju līmenis ir prognozējams, jo aprēķinātā IFN- γ koncentrācija ir zema un zemām prognozētajām koncentrācijām variācijas ir lielākas nekā augstākām koncentrācijām.

QF-CMV ELISA testa precizitātes profils ir parādīts 10. attēlā, un tajā norādīts, ka neprecizitāte nepārsniedz augstākās IFN- γ koncentrācijas.



10. attēls. QF-CMV ELISA testa precizitātes profils, kas noteikts, 3 operatoriem trīs reizes testējot 20 plazmas paraugus 3 laboratorijās 3 dienās, kas nav secīgas. Tendenci līnija ir aprēķināta ar mazāko kvadrātu metodi.

Tika veikts pētījums, lai noteiktu QF-CMV testa atkārtojamību, izmantojot 8 cilvēku asins paraugus ar nezināmu CMV statusu. Katra cilvēka asinis tika paņemtas trīs QF-CMV stobriņu komplektos (3x nulles, 3x CMV un 3x mitogēna stobriņi). Pēc tam trīs stobriņu komplekti tika inkubēti trīs dažādās vietās (viens nulles, CMV un mitogēna stobriņu komplekts katrā vietā), kā tas norādīts lietošanas pamācībā. Pēc 16–24 stundu inkubācijas stobriņi tika centrifugēti un tika iegūta plazma.

Pēc tam katrā no trim vietām trīs reizes tika veikti ELISA testi, katrā vietā iegūstot katra cilvēka QF-CMV testa rezultātus (visās vietās kopā 9 rezultāti). Katrā vietā strādāja cits operators. Pētījumā izmantotajām platēm nebija jābūt ar vienu sērijas numuru, bet nevienai no tām netika pārsniegts derīguma termiņš.

Katram asins paraugam tika noteikta gan diagnostiskā statusa (pozitīvs, negatīvs vai nenoteikts), gan skaitliskās vērtības atkārtojamība. Skaitliskās vērtības atkārtojamība tika novērtēta tikai pozitīviem paraugiem (izteikta kā %VK), jo “negatīvu” paraugu IFN- γ līmeņi bija pārāk mazi, lai sniegtu nozīmīgu precizitātes novērtējumu.

Kopumā diagnostiskā atkārtamība bija 100%, kur visu 8 brīvprātīgo QF-CMV testa diagnostiskais statuss visos gadījumos tika atkārtots visās vietās. Par nenoteiktiem paraugu rezultātiem netika ziņots. Pozitīvo paraugu atkārtamība bija pieņemama gan katrā atsevišķā testēšanas vietā, gan visās testēšanas vietās kopumā. Testēšanas vietu vidējais %VK bija 4,5% (1. vietā), 5,9% (2. vietā) un 7,3% (3. vietā). Kopējais visu vietu %VK visiem 5 pozitīvajiem paraugiem bija 5,9%. Variācijas koeficienta procentuālā vērtība, kas ir zemāka par 10%, tiek uzskatīta par izcilu rezultātu.

Tehniskā informācija

Nenoteikti rezultāti

Nenoteikti rezultāti var būt saistīti ar testējamā indivīda imunoloģisko statusu, bet tie var būt saistīti arī ar vairākiem tehniskiem faktoriem:

- no asins parauga ņemšanas līdz inkubēšanai 37 °C temperatūrā pagājušas vairāk nekā 16 stundas;
- asins paraugi glabāti, neievērojot ieteicamo temperatūras diapazonu (17–27 °C);
- nepietiekami samaisīti asins analīžu stobriņi.

Ja pastāv aizdomas, ka asins paraugu ņemšanas vai to turpmākās apstrādes laikā radušās tehniska rakstura problēmas, viss QF-CMV tests jāatkārto ar jauniem asins paraugiem. Ja pastāv aizdomas, ka ELISA testa procedūrā ir bijušas novirzes, var atkārtot ELISA testēšanu ar stimulētiem plazmas paraugiem. Nenoteiktiem rezultātiem (zemu mitogēna vērtību dēļ), testu atkārtojot, nevajadzētu atšķirties, izņemot tos gadījumus, kad ELISA testēšanā pieļautas kļūdas.

Problēmu novēršanas ieteikumi

Šie problēmu novēršanas ieteikumi var būt noderīgi, risinot radušās problēmas. Papildu informāciju skatiet arī tehniskajā informācijā, kas sniegta tīmekļa vietnē www.QuantiFERON.com. Kontaktinformāciju skatiet 26. lapusē un uz aizmugurējā vāka.

ELISA problēmu novēršana

Zemas optiskā blīvuma vērtības standartiem

Iespējamie iemesli	Risinājums
a) Kļūda, izgatavojot standarta atšķaidījumu	Nodrošiniet, lai komplekta standarta atšķaidījumi tiktu sagatavoti, precīzi ievērojot lietošanas pamācībā sniegtos norādījumus.
b) Pipetēšanas kļūda	Nodrošiniet, lai pipetes būtu kalibrētas un tiktu lietotas atbilstoši ražotāja norādījumiem.
c) Pārāk zema inkubācijas temperatūra	ELISA testu inkubācija jāveic istabas temperatūrā (17–27 °C).
d) Pārāk īss inkubācijas laiks	Ja platei pievienots konjugāts, standarta šķīdumi un paraugi, tās inkubācijas periodam jābūt 120 ± 5 minūtes. Enzīmu substrāta šķīdumu uz plates inkubē 30 minūtes.
e) Tiek lietots nepareizs plates lasītāja filtrs	Plate jānolasa pie 450 nm ar 620–650 nm references filtru.
f) Pārāk auksti reaģenti	Visi reaģenti, izņemot konjugāta 100x koncentrātu, pirms testa sākšanas jāsasilda līdz istabas temperatūrai. Tam nepieciešama aptuveni 1 stunda.
g) Beidzies komplekta/sastāvdaļu derīguma termiņš	Nodrošiniet, lai komplekts tiktu izlietots pirms derīguma termiņa beigām. Nodrošiniet, lai pagatavotais standarta šķīdums un konjugāta 100x koncentrāts tiktu izlietots 3 mēnešu laikā pēc pagatavošanas datuma.

Nespecifiskas krāsas izveidošanās/spilgts fons

Iespējamie iemesli	Risinājums
a) Nepietiekama plates skalošana	Plate jāskalo vismaz 6 reizes ar 400 µl skalošanas buferšķīduma uz katru iedobīti. Atkarībā no izmantojamās skalošanas ierīces var būt nepieciešami vairāk nekā 6 skalošanas cikli. Starp katru ciklu jābūt vismaz 5 sekunžu mērcēšanas laikam.
b) Pārāk augsta inkubācijas temperatūra	ELISA testu inkubācija jāveic istabas temperatūrā (17–27 °C).
c) Beidzies komplekta/sastāvdaļu derīguma termiņš	Nodrošiniet, lai komplekts tiktu izlietots pirms derīguma termiņa beigām. Nodrošiniet, lai pagatavotais standarta šķīdums un konjugāta 100x koncentrāts tiktu izlietots trīs mēnešu laikā pēc pagatavošanas datuma.
d) Enzīmu substrāta šķīduma kontaminācija	Izmetiet substrātu, ja tam ir zilgana nokrāsa. Nodrošiniet, lai reaģentiem tiktu izmantotas tīras tvertnes.
e) Plazmas maisīšana centrifūgas stobriņos pirms tās iegūšanas	Nodrošiniet, lai plazmas paraugi tiktu uzmanīgi iegūti virs gela, neveicot pipetēšanu augšup un lejup un uzmanoties, lai nesabojātu materiālu uz gela virsmas.

Bibliogrāfija

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).

Tehniskā dienesta pakalpojumi

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

Šī lappuse atstāta tukša ar nodomu.

Šī lappuse atstāta tukša ar nodomu.

Šī lappuse atstāta tukša ar nodomu.

Saīsināta testa procedūra

1. posms — asins parauga inkubācija

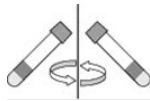
1. Paņemiet pacienta asinis asins analīžu stobriņos un samaisiet tos, sakratot desmit (10) reizes tikai tik stipri, lai nodrošinātu, ka visa stobriņa iekšējā virsma ir pārklāta ar asinīm, tādējādi izšķīdinot antigēnus uz stobriņa sienīņām.



2. Inkubējiet stobriņus stāvus 16–24 stundas 37°C ± 1°C temperatūrā.



3. Pēc inkubācijas centrifugējiet stobriņus 15 minūtes ar ātrumu 2000–3000 RCF (g), lai atdalītu plazmu un sarkanos asins ķermeņšus.



4. Pēc centrifugēšanas un pirms plazmas iegūšanas izvairieties no pipetēšanas augšup un lejup vai jebkāda veida plazmas maisīšanas. Vienmēr ievērojiet piesardzību, lai nesabojātu materiālu uz gela virsmas.

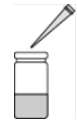


2. posms — IFN-γ ELISA tests

1. Izlīdziniet ELISA testa sastāvdaļu temperatūru, lai tās būtu istabas temperatūrā vismaz 60 minūtes, izņemot konjugāta 100X koncentrāta temperatūru.



2. Pagatavojiet komplekta standarta šķīdumu destilētā vai dejonizētā ūdenī, iegūstot koncentrāciju 8,0 SV/ml. Sagatavojiet četrus (4) standarta atšķaidījumus.

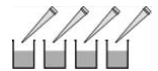


3. Izšķīdiniet ar saldēšanu izžāvēto konjugāta 100X koncentrātu destilētā vai dejonizētā ūdenī.

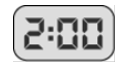
4. Sagatavojiet konjugāta darba šķīdumu zaļajā šķīdinātājā un ievadiet 50 µl visās iedobītēs.



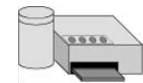
5. Atbilstošajās iedobītēs ievadiet 50 µl testa plazmas paraugu un 50 µl standarta šķīdumu. Samaisiet ar kratītāju.



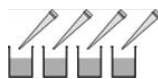
6. Inkubējiet 120 minūtes istabas temperatūrā.



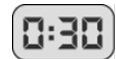
7. Izskalojiet iedobītes vismaz 6 reizes ar 400 µl skalošanas buferšķīduma.



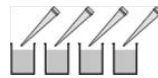
8. Ievadiet iedobītēs 100 µl enzīmu substrāta šķīduma. Samaisiet ar kratītāju.



9. Inkubējiet 30 minūtes istabas temperatūrā.



10. Ievadiet visās iedobītēs 50 µl enzīmu darbības pārtraukšanas šķīduma. Samaisiet ar kratītāju.



11. Nolasiet rezultātus pie 450 nm ar 620–650 nm references filtru.



12. Analizējiet rezultātus.



Preču zīmes: QIAGEN®, QuantiFERON® (QIAGEN grupa); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

Ierobežots licences līgums QuantiFERON-CMV ELISA komplektam

Šīs preces izmantošana liecina par katra preces pircēja un tās lietotāja piekrišanu šādiem nosacījumiem:

1. Šo precī drīkst lietot tikai saskaņā ar protokoliem, kas nodrošināti kopā ar precī, un šo rokasgrāmatu, un to drīkst lietot tikai kopā ar sastāvdaļām, kas ietvertas šajā komplektā. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tās intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā ietvertās sastāvdaļas izmantotu kopā ar jebkādam sastāvdaļām, kas nav ietvertas šajā komplektā, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti kopā ar precī piegādātajos protokolos un šajā rokasgrāmatā, kā arī papildu protokolos, kas pieejami tīmekļa vietnē www.qiagen.com. Dažus no šiem papildu protokoliem QIAGEN lietotāji nodrošina QIAGEN lietotājiem. Šie protokoli nav rūpīgi testēti vai optimizēti uzņēmumā QIAGEN. Uzņēmums QIAGEN nedz nodrošina, nedz garantē, ka tie nepārkāpj trešo personu tiesības.
2. Uzņēmums QIAGEN negarantē, ka šis komplekts, un/vai tā lietošana neaizskar trešo personu tiesības, izņemot attiecībā uz skaidri norādītām licencēm.
3. Šis komplekts un tā sastāvdaļas ir licencētas vienreizējai lietošanai un nevar tikt atkārtoti lietotas, atjaunotas vai pārdotas tālāk.
4. Uzņēmums QIAGEN īpaši atsakās no jebkādas citas tiešas vai netiešas licences, kas nav skaidri norādīta.
5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt jebkādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkādas iepriekš aizliegtās darbības. Uzņēmums QIAGEN var īstenot šī ierobežotā licences līguma aizliegumus jebkurā tiesā un atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, par jebkuru darbību, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no savām intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā sastāvdaļām.

Jaunākos licences noteikumus skatiet tīmekļa vietnē www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, visas tiesības aizsargātas.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

