
QuantiFERON[®]-CMV

Navodilo za uporabo 2 x 96

Test INF-gama za merjenje reakcij polne krvi na peptidne antigene humanega citomegalovirusa

IVD



REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Avstralija

Telefon: (Avstralija) +613-9840-9800, (Evropa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NEMČIJA

1075110SL Razi. 01



Vsebina	
Namen uporabe	5
Uvod	5
Princip testa	6
Trajanje testa	6
Reagenti in shranjevanje	7
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo	8
Skladiščenje	8
Previdnosti ukrepi in opozorila	9
Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi	10
Navodilo za uporabo	11
1. faza – Inkubacija vzorca krvi in odvzem plazme	11
2. faza – QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ	11
Izračunavanje in interpretacija rezultatov	14
Interpretacija rezultatov	15
Omejitve postopka	15
Pričakovane vrednosti	16
Značilnosti	17
Primerjalno testiranje	17
Prag testa	18
Klinične študije	18
Specifičnost	18
Občutljivost	19
Študije kažejo na klinično uporabnost	19
Skupne mednarodne smernice o ravnanju s citomegalovirusom pri presajanju solidnih organov	22
Značilnosti izvedbe testa	22
Tehnične informacije	24
Nejasni rezultati	24
Navodila za odpravljanje težav	25
Bibliografija	26
TEHNIČNA SLUŽBA	27

Testni postopek (skrajšana oblika)	30
1. faza – inkubacija krvi	30
2. faza – IFN- γ ELISA	30

Namen uporabe

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) je test za in vitro diagnostiko in vsebuje koktajl peptidov, ki simulira človeške citomegalovirusne (CMV) proteine in stimulira celice v heparinizirani polni krvi. Dokazovanje interferona gama (IFN- γ) s pomočjo metode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se uporablja za prepoznavanje in vitro reakcij na peptidne antigene, ki so povezani z imunskim obvladovanjem okužbe s CMV. Izguba imunske funkcije je lahko povezana z razvojem bolezni CMV. Test QF-CMV se uporablja za spremljanje pacientove stopnje anti-CMV imunosti.

QF-CMV ni test za ugotavljanje okužbe s CMV in se ne sme uporabljati za izključitev okužbe s CMV.

Uvod

CMV je virus herpesa, ki okuži 50–85 % odrasle populacije. Pogosto nastane kot zaplet pri imunosupresiji, še posebno po presaditvi, ter lahko bistveno prispeva k obolevnosti in smrtnosti pri presaditvah. Trenutne imunosupresivne terapije, ki se uporabljajo za preprečevanje zavrnitve presajenega organa, imajo škodljive vplive na limfocite T in celično posredovane imunske odzive (CMI), kar poveča občutljivost za virusne okužbe po presaditvi. Pomen delovanja celic T pri zaviranju replikacije CMV je pomemben tudi zato, ker lahko CD8⁺ CMV-specifični citotoksični limfociti T (CTL) ščitijo pred nastankom bolezni zaradi virusa. Štetje CD8⁺ CMV-specifičnih CTL-jev pri pacientih z oslabiljenim imunskim sistemom in produkcija IFN- γ lahko napove tveganje za razvoj bolezni CMV. Produkcija IFN- γ je lahko funkcionalni nadomestek za identifikacijo CMV-specifičnih CTL-jev.

QF-CMV je test za merjenje imunskih celičnih reakcij (CMI) na peptidne antigene, ki simulirajo CMV beljakovine. CMV-peptidi so usmerjeni proti celicam CD8⁺ T, vključno z naslednjimi HLA haplotipi razreda I: A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 in Cw6 (A30, B13), ki zajemajo >98 % človeške populacije. Posamezniki, okuženi s CMV, imajo običajno v krvi limfocite CD8⁺, ki prepoznajo te antigene. Pri tem procesu prepoznavanja nastaja in se sprošča citokin IFN- γ . Ugotavljanje le-tega, kateremu sledi kvantificiranje IFN- γ , je podlaga za ta test.

Princip testa

Test QF-CMV se izvaja v 2 fazah. Najprej se odvzame polna kri v posebne epruvete QF-CMV, ki vključujejo epruveto nične kontrole, epruveto antigena CMV in epruveto mitogena.

Epruveta mitogena se v testu QF-CMV uporablja kot pozitivna kontrola. Prikaz le-te je še zlasti upravičen, kadar je pacientovo imunsko stanje vprašljivo.

Epruvete je treba čim prej, obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi, inkubirati pri temperaturi 37 °C.

Po 16- oziroma 24-urnem inkubacijskem času se epruvete centrifugirajo, nato se odvzame plazma in s pomočjo metode QF-CMV ELISA ugotovi količina IFN- γ (v IE/ml).

Količina IFN- γ v vzorcih plazme iz epruvet antigena CMV in mitogena je lahko pogosto nad zgornjo mejo večine metod ELISA, tudi če imajo posamezniki zmerno oslabilen imunski sistem. Za **kvalitativne** rezultate uporabljajte vrednosti, izračunane za nerazredčeno plazmo. Za **kvantitativne** rezultate, kjer so potrebne dejanske vrednosti v IE/ml, je treba vzorce plazme razredčiti v razmerju 1/10 z zeleno raztopino in testirati po metodi ELISA skupaj s čisto plazmo.

Opomba: Za vzorce v obsegu metode QF-CMV ELISA (do 10 IE/ml) je treba uporabiti rezultat, pridobljen z vzorcem čiste plazme. Za take primere koncentracije IFN- γ so lahko vrednosti vzorcev plazme, pridobljene z raztopino 1/10, netočne.

Test se šteje za pozitivnega pri reakciji IFN- γ na epruveto antigena CMV takrat, ko je ta vrednost znatno nad vrednostjo nične kontrole IFN- γ IE/ml. Mitogensko simulirani vzorec plazme služi kot pozitivna kontrola IFN- γ za vsak testirani vzorec. Majhna reakcija na mitogen velja kot nejasni rezultat, če vzorec krvi izkazuje tudi negativno reakcijo na antigene CMV. Takšen vzorec lahko nastane pri nezadostnem številu limfocitov, zmanjšani aktivnosti limfocitov zaradi nestrokovnega ravnanja z vzorcem, nestrokovnega polnjenja ali mešanja epruvete mitogena ali pa takrat, ko pacientovi limfociti niso sposobni proizvajati IFN- γ , npr. pri pacientih z nedavno presaditvijo. Nični vzorec se uporablja za korekcijo ozadja ali za korekcijo nespecifičnih IFN- γ v vzorcih krvi. Vrednost IFN- γ v nični epruveti se odšteje od vrednosti IFN- γ v epruveti antigena CMV in epruvete mitogena (za pojasnila glede interpretacije rezultatov metode QF-CMV glejte razdelek »Interpretacija rezultatov« na 15. strani tega navodila za uporabo).

Trajanje testa

V nadaljevanju besedila so navedeni podatki o ocenjenem trajanju testa QF-CMV in o času, ki je potreben pri testiranju več vzorcev v modusu Batch:

Inkubacija epruvet z vzorci pri 37 °C:	16 do 24 ur
ELISA:	pribl. 3 ure za 1 ploščo ELISA
	manj kot 1 ura dela
	plus 10 do 15 minut za vsako dodatno ploščo

Reagenti in shranjevanje

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (CMV in epruvete za določanje kontrolnega antigena v krvi (paket za enega pacienta))	
Kataloška številka	0192-0301
Število pripravkov	1
QuantIFERON Nil Control (QuantIFERON za nično kontrolo) (siv pokrovček)	1 epruveta
CMV Antigen (Antigen CMV) (moder pokrovček)	1 epruveta
QuantIFERON Mitogen Control (QuantIFERON za kontrolo mitogena) (vijoličast pokrovček)	1 epruveta
Navodilo za uporabo	1
QuantIFERON-CMV ELISA Components (Sestavni deli kompleta QuantIFERON-CMV ELISA)	
Kataloška številka	0350-0201
Mikro trakovi	24 x 8 trakov z vdolbinami
Human IFN- γ Standard (Standardni humani IFN- γ), liofiliziran	1 x steklenička
Green Diluent (Zelena raztopina)	1 x 30 ml
QuantIFERON Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (Koncentrat konjugata (stokrat koncentriran), liofiliziran)	1 x 0,3 ml
QuantIFERON Wash Buffer 20X Concentrate (Pralni pufer (dvajsetkrat koncentriran))	1 x 100 ml
QuantIFERON Enzyme Substrate Solution (Raztopina encimskega substrata)	1 x 30 ml
QuantIFERON Enzyme Stopping Solution (Raztopina za blokiranje encimov)	1 x 15 ml

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Inkubator 37 °C; CO₂ ni potreben
- Kalibrirane pipete z variabilnim volumnom od 10 do 1000 µl s konicami za enkratno uporabo
- Kalibrirane večkanalne pipete za oddajanje od 50 do 100 µl s konicami za enkratno uporabo
- Vibrator za mikro plošče
- Deionizirana ali destilirana voda, 2 litra
- Pralni aparat za mikro plošče (priporočen je avtomatski)
- Čitalnik za mikro plošče s filtrom 450 nm in referenčnim filtrom od 620 do 650 nm

Skladiščenje

Epruvete za odvzem vzorcev krvi

- Epruvete za odvzem krvi skladiščite pri temperaturi od 4 do 25 °C.
- Rok trajanja epruвет za odvzem krvi QuantiFERON-CMV je največ 15 mesecev od dneva proizvodnje, če so skladiščene pri temperaturi od 4 do 25 °C.

Reagenti kompleta ELISA

- Komplet skladiščite pri temperaturi od 2 do 8 °C.
- Raztopina encimskega substrata naj bo vedno zavarovana pred neposrednimi sončnimi žarki.

Rekonstruirani in odvečni reagenti

Navodila za rekonstruiranje kompleta reagentov so navedena v poglavju »Navodilo za uporabo – 2. faza« (3. in 5. korak na 11. in 12. strani).

- Rok trajanja rekonstruiranega standardnega kompleta znaša 3 mesece pri temperaturi skladiščenja med 2 in 8 °C.

Zabeležite si datum rekonstruiranja kompleta reagentov.

- Po rekonstruiranju je treba odvečni koncentrat konjugata QuantiFERON (100X) spet skladiščiti pri temperaturi od 2 do 8 °C in ga porabiti v 3 mesecih.

Zabeležite si datum rekonstruiranja konjugata.

- Konjugat, pripravljen za uporabo, je treba porabiti v 6 urah po pripravi.
- Rok uporabe pralnih pufrov, pripravljenih za uporabo in shranjenih pri sobni temperaturi (od 17 do 27 °C), je največ 2 tedna.

Previdnosti ukrepi in opozorila

Samo za diagnostično uporabo in vitro.

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih. Ti so na voljo v spletu v priročni in uporabni obliki PDF na naslovu www.qiagen.com/safety. V njih lahko najdete, preberete ter natisnete varnostne liste za vse komplete QIAGEN in njihove sestavne dele.



POZOR: S človeško krvjo ravnajte, kot če bi bila kužna.
Upoštevajte ustrezna navodila za ravnanje v s krvjo.

Za sestavne dele kompleta QF-CMV ELISA veljajo naslednji opozorilni in obvestilni stavki.

QuantiFERON raztopina za blokiranje encimov



Vsebuje žveplovo kislino: Draži. Opozorilni in obvestilni stavki:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zelena raztopina** vsebuje normalni mišji serum in kazein. Ti dve substanci lahko izzoveta alergične reakcije. Izogibajte se stiku s kožo.

Za nujne kemične primere

Razlitje, puščanje, izpostavljenost ali nesreča

Podnevi ali ponoči pokličite CHEMTREC

V ZDA in Kanadi: 1-800-424-9300

Drugod po svetu: +1-703-527-3887 (tudi klici na stroške klicanega)

Dodatne informacije

Varnostni listi: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Draži oči in kožo; S26: Če pride v oči, takoj izprati z obilo vode in poiskati zdravniško pomoč; S36/37/39: Nositi primerno zaščitno obleko, zaščitne rokavice in zaščito za oči/obraz.

Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi

Pomembno pred začetkom:

Odstopanja od postopka in navodil QF-CMV lahko privedejo do napačnih rezultatov. Pred uporabo pozorno preberite navodila.

- Kompleta ne uporabljajte, če steklenica reagenta pred uporabo kaže znake poškodb ali puščanja.
- Ne mešajte ali uporabljajte reagentov ELISA z drugimi serijami kompletov QF-CMV ELISA.
- Reagente in biološke vzorce, ki jih ne potrebujete več, odložite v skladu z lokalnimi in nacionalnimi predpisi.
- Po preteku roka uporabnosti se epruвет za odvzem krvi QF-CMV in sestavnih delov kompleta QF-CMV ELISA ne sme več uporabljati.

QF-CMV obsega naslednje epruvete za vzorce krvi:

1. Nična kontrola (sivi pokrovček)
2. Antigen CMV (moder pokrovček)
3. Kontrola mitogena (vijolični pokrovček)

Antigeni se v posušeni obliki nahajajo v oblogi notranje stene epruvete za odvzem krvi. Vzorce krvi je zaradi tega treba dobro premešati z vsebino epruvete. Epruvete je treba čim prej, obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi, prenesti v inkubator (37 °C).

Optimalni rezultati bodo doseženi ob upoštevanju naslednjih navodil:

1. Vsakemu pacientu odvzemite po 1 ml venozne krvi v vsako epruveto QF-CMV.

- Glede na dejstvo, da se epruvete za odvzem 1 ml relativno počasi polnijo s krvjo, pustite epruveto po navideznem doseganju nivoja še 2–3 sekunde na igli. To bo zagotovilo odvzem potrebne količine krvi.

Črna oznaka ob strani epruvete je črta polnjenja 1 ml. Epruvete za odvzem krvi QF-CMV so testirane za volumen od 0,8 do 1,2 ml. Če pri odvzemu krvi ta indikatorska črta ni dosežena, priporočamo nov odvzem krvi.

- Epruvete za odvzem krvi QF-CMV so testirane za odvzem od 0,8 do 1,2 ml krvi na nadmorski višini do 810 metrov. Nad to nadmorsko višino je treba zagotoviti, da se kri odvzame v vsako epruveto znotraj teh omejitev. Pri majhnem volumnu vzorca lahko kri odvzamete tudi z brizgalko in vsako od 3 epruвет napolnite z 1 ml krvi. Iz varnostnih razlogov je najbolje, če pri tem odstranite injekcijsko iglo in upoštevate običajne previdnostne ukrepe. Odstranite pokrovčke z vseh treh epruвет QF-CMV in napolnite vsako z 1 ml krvi (do črne oznake na stranskem robu etikete). Nato ponovno namestite pokrovčke in premešajte, kot je opisano spodaj.
- Pri uporabi metuljčkov za odvzem krvi je treba s pomočjo prazne epruvete poskrbeti za to, da bo pred namestitvijo epruвет QF-CMV zagotovljena napolnjenost cevnega spoja.

2. Takoj po polnjenju epruвет jih morate deset (10) krat stresti dovolj močno, da je celotna notranja površina epruvete prekrita s krvjo in da se raztopijo antigeni na stenah epruvete.

- V času polnjenja naj imajo epruvete temperaturo od 17 do 25 °C.
- Premočno stresanje lahko povzroči motnje gela in privede do napačnih rezultatov.

3. Epruvete opremite z napisi.

4. Epruvete je treba čim prej, obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi, prenesti v inkubator (37 °C ± 1 °C). Vzorcev krvi ne shranjujte v hladilniku ali zamrzovalniku.

Navodilo za uporabo

1. faza – Inkubacija vzorca krvi in odvzem plazme

1. Če vzorci krvi ne bodo takoj po odvzemu inkubirani, je treba epruvete neposredno pred inkubiranjem ponovno premešati oziroma pretresti, tako kot je opisano v 2. koraku prejšnjega poglavja.
2. Epruvete inkubirajte v **STOJEČEM POLOŽAJU** od 16 do 24 ur pri 37 °C. CO₂ ali vlaženje pri tem nista potrebna.
3. Po inkubiranju in pred naslednjim korakom se epruvete za odvzem krvi lahko hranijo do 3 dni pri temperaturi od 2 do 27 °C. Po inkubiranju epruвет pri 37 °C se opravi centrifugiranje, ki traja do 15 minut pri od 2000 do 3000 RCF (g). Celice se ločijo od plazme. Če se to ne zgodi, centrifugiranje ponovite pri višji hitrosti.
 - Odvzem plazme je mogoč tudi brez centrifugiranja, vendar je treba pri tem postopati zelo previdno, ker se lahko pri odvzemu celice vzvrtinčijo.
4. Po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvzemanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.
 - Vzorce plazme odvezemajte le s pomočjo pipete.
 - Vzorci plazme se lahko iz epruвет za odvzem krvi prenesejo neposredno v ploščo QF-CMV ELISA, tudi pri uporabi avtomata ELISA.
 - Vzorci plazme se lahko shranjujejo do 28 dni pri temperaturi od 2 do 8 °C, če je plazma odvzeta, pa pri temperaturi, nižji od -20 °C (raje nižji od -70 °C) in v epruветah ali posodicah za shranjevanje plazme, še daljše obdobje.

2. faza – QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ

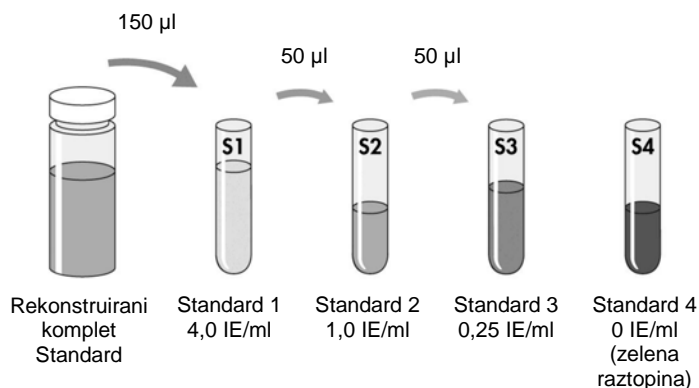
1. Vsi vzorci plazme in reagentov z izjemo 100x koncentrata konjugata morajo pred uporabo doseči sobno temperaturo (od 17 do 27 °C). Za ta proces načrtujte najmanj 60 minut.
2. Iz okvira odstranite nepotrebne trakove, jih spravite nazaj v folijsko embalažo in jih do uporabe shranjujte v hladilniku.

Za QF-CMV ELISA Standard morate predvideti najmanj en trak in zadostno število trakov za paciente, ki jih boste testirali. Po uporabi okvir in pokrov shranite za uporabo z ostalimi trakovi.
3. Rekonstruirajte standardni komplet s količino deionizirane ali destilirane vode, ki je navedena na etiketi standardne stekleničke. Previdno premešajte stekleničko (minimirajte penjenje) in preverite, ali se je vsebina popolnoma razpustila. Rekonstruiranje standarda na navedeni volumen izkazuje raztopino s koncentracijo 8,0 IE/ml.
4. Standardna krivulja se pripravi s 3 redčeni standardnega kompleta in zelene raztopine same kot standarda 4 (0 IE/ml).

Rekonstruiran standardni komplet uporabite za izdelavo serije razredčila 3 IFN- γ koncentracij. Redčite v kompletu zelene raztopine (GD) (glejte sliko 1 na naslednji strani). Standarde je treba testirati vsaj dvakrat; z naslednjimi koraki ustvarite zadostno količino za to.

 - a. 4 epruvete opremite z napisi »S1«, »S2«, »S3«, »S4«.
 - b. Dodajte 150 μ l zelene raztopine v 4 epruvete (S1–S4).
 - c. Dodajte 150 μ l standardnega kompleta v S1 in skrbno premešajte.
 - d. Prenesite 50 μ l iz S1 v S2 in skrbno premešajte.

- e. Prenesite 50 μ l iz S2 v S3 in skrbno premešajte.
 f. Zelena raztopina velja kot nični standard (S4).



Slika 1. Izdelava standardne krivulje. Za vsak postopek ELISA izdelajte novo razredčilo standardnega kompleta.

5. **Rekonstruirajte suho zamrznjen 100x koncentrat konjugata QuantiFERON z 0,3 ml deionizirane ali destilirane vode. Previdno premešajte stekleničko, da je čim manj penjenja, in preverite, ali se je konjugat popolnoma razpusil.**
6. **Konjugat je pripravljen za uporabo, ko potrebno količino rekonstruiranega 100x koncentrata razredčite v zeleni raztopini za redčenje, kot je prikazano v tabeli 1 – Priprava konjugata.**
 - Temeljito, vendar previdno premešajte; pri tem se izogibajte penjenju.
 - 100x koncentrat konjugata, ki ga ne potrebujete, takoj po uporabi shranite pri temperaturi od 2 do 8 °C.
 - Kot razredčilo uporabljajte samo zeleno raztopino za redčenje.

Tabela 1. Priprava konjugata

Število trakov	Količina 100x koncentrata konjugata	Količina zelene raztopine za redčenje
2	10 μ l	1,0 ml
3	15 μ l	1,5 ml
4	20 μ l	2,0 ml
5	25 μ l	2,5 ml
6	30 μ l	3,0 ml
7	35 μ l	3,5 ml
8	40 μ l	4,0 ml
9	45 μ l	4,5 ml
10	50 μ l	5,0 ml
11	55 μ l	5,5 ml
12	60 μ l	6,0 ml

7. **Pred testom je treba plazmo premešati, tako da se IFN- γ enakomerno porazdeli v vzorcu. V zeleni raztopini razredčite tudi plazmo CMV in mitogena v razmerju 1/10 (10 μ l plazme zmešane z 90 μ l GD), če potrebujete kvantitativne rezultate. Nične plazme se ne sme redčiti.**

Priporoča se testiranje naslednjih vzorcev:

- nični, antigen CMV, mitogen, antigen CMV (1/10), mitogen (1/10)

Vendar pa programska oprema za analizo QuantiFERON-CMV podpira tudi naslednje možnosti vzorcev pacientov:

- nični, antigen CMV, mitogen
- nični, antigen CMV (1/10), mitogen (1/10)
- nični, antigen CMV, mitogen, antigen CMV (1/10)
- nični, antigen CMV (1/10), mitogen

8. **Z večkanalno pipeto dajte v vdolbine ELISA po 50 μ l sveže pripravljenega konjugata.**
9. **Po 50 μ l testnih vzorcev plazme dajte z večkanalno pipeto v ustrezne vdolbine. Nazadnje dodajte še po 50 μ l standardov od 1 do 4.**
10. **Konjugat in vzorce plazme/standarde 1 minuto skrbno mešajte v vibratorju za mikro plošče.**
11. **Vsako ploščo pokrijte s pokrovom in plošče 120 \pm 5 minut inkubirajte pri sobni temperaturi (17–27 °C).**
- Med inkubacijo morajo biti plošče zaščitene pred neposrednimi sončnimi žarki.
12. **Med inkubacijo razredčite en del 20x koncentriranega koncentrata pralnega pufra z 19 deli deionizirane ali destilirane vode in skrbno premešajte. Dobavi je priloženega dovolj 20x koncentriranega koncentrata pralnega pufra za izdelavo 2 litrov pralnega pufra, pripravljenega za uporabo.**
- Vdolbine najmanj 6-krat operite s 400 μ l pralnega pufra, pripravljenega za uporabo. Priporočamo uporabo pralnega avtomata za mikro plošče.
- Temeljito pranje je zelo pomembno za učinkovitost testiranja. Pri vsakem pralnem ciklusu preverite, **ali so vdolbine popolnoma**, torej do zgornjega roba napolnjene s pralnim pufrom. Med posameznimi pralnimi cikli priporočamo fazo namakanja, ki naj traja vsaj 5 sekund.
 - V lovilno posodo za odpadno tekočino dajte standardno razkužilo, ki se uporablja v laboratorijih. Poleg tega upoštevajte navodila za dekontaminacijo potencialno kužnega materiala, ki veljajo v vašem laboratoriju.
13. **Plošče z vdolbinami obrnjenimi navzdol iztrkajte na papirnato brisačo in tako odstranite ostanke pralnega pufra. V vsako vdolbino nato nalijte 100 μ l raztopine za blokiranje encimov in premešajte ploščo v vibratorju.**
14. **Vsako ploščo pokrijte s pokrovom in jo 30 minut inkubirajte pri sobni temperaturi (17–27 °C).**
- Med inkubacijo morajo biti plošče zaščitene pred neposrednimi sončnimi žarki.
15. **Po 30-minutni inkubaciji nalijte v vsako vdolbino 50 μ l raztopine za blokiranje encimov in premešajte.**
- Raztopino za blokiranje encimov nalivajte v vdolbine v enakem zaporedju in približno enako hitro kot substrat v 13. koraku.
16. **S čitalnikom za mikro plošče izmerite optično gostoto (OD) vsake vdolbine v 5 minutah po dodajanju raztopine za blokiranje – pri tem uporabljajte filter s 450 nm in referenčni filter z med 620 in 650 nm. Vrednosti OD boste potrebovali pri izračunavanju rezultatov.**

Izračunavanje in interpretacija rezultatov

Programsko opremo za analizo QuantiFERON-CMV, s katero se analizira neobdelane podatke in izračuna rezultate, zagotavlja QIAGEN na spletnem naslovu www.QuantiFERON.com.

Programska oprema izvaja kontrolno oceno kakovosti testiranja, izdelava standardno krivuljo in za vsakega testiranega pacienta posreduje rezultat, kot je opisano v poglavju »Interpretacija rezultatov«.

Alternativno uporabi programske opreme QF-CMV za analizo podatkov se lahko rezultati izračunavajo tudi po spodaj opisani metodi.

Izdelava standardne krivulje

Ugotovite srednje vrednosti OD pri ponovitvah standardnega kompleta na vsaki plošči.

Izdelajte standardno krivuljo $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ z grafičnim prikazom srednje vrednosti OD $\log_{(e)}$ (os y) proti $\log_{(e)}$ koncentracije standarda IFN- γ v IE/ml (os x), nični standard pri tem izpustite. S pomočjo regresivne analize izračunajte linijo, ki se oblikovno najbolj prilagaja standardni krivulji.

Standardno krivuljo uporabite za izračun koncentracije IFN- γ (IE/ml) za vsak testirani vzorec plazme, pri čemer uporabite vrednost OD vsakega vzorca.

Za te izračune lahko uporabljate pakete programske opreme, ki so v ponudbi za čitalnike mikro plošč, pa tudi standardni programe z razpredelnicami oziroma statistične programe (na primer Microsoft® Excel®). Uporabo teh paketov programske opreme priporočamo za izračunavanje regresijske analize in variacijskih koeficientov (%CV) za standard ter korelacijskih koeficientov (r) za standardno krivuljo.

Kontrola kakovosti

Pravilnost testnih rezultatov je odvisna od izdelave pravilne standardne krivulje. Zato je treba rezultate, ki so pridobljeni s standardi, preveriti pred interpretiranjem testnih rezultatov.

ELISA velja, če so izpolnjeni vsi naslednji kriteriji:

- Srednja vrednost OD standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.
- %CV repliciranih vrednostih OD standarda 1 in standarda 2 mora znašati $< 15\%$.
- Replicirane vrednosti OD standarda 3 in standarda 4 ne smejo za več kot 0,040 enote OD odstopati od srednje vrednosti vsakega od njiju.
- Korelacijski koeficient (r), izračunan iz srednjih ekstinkcijskih vrednosti, mora znašati $\geq 0,98$.

Če ti kriteriji niso izpolnjeni, je test neveljaven in ga je treba ponoviti.

Srednja vrednost OD ničnega standarda (zelena raztopina) naj znaša $\leq 0,150$. Če je srednja vrednost OD $> 0,150$, priporočamo, da preverite postopek za pranje plošč.

Interpretacija rezultatov

Rezultati QuantiFERON-CMV se interpretirajo po naslednjih kriterijih:

CMV minus ničla (IE/ml)*	Mitogen minus ničla (IE/ml)	Rezultat QF-CMV	Poročilo/interpretacija
< 0,2	≥ 0,5	Nereaktiven	Anti-CMV imunost NI zaznana
≥ 0,2	Poljuben	Reaktiven	Anti-CMV imunost zaznana
< 0,2	< 0,5	Nejasen [†]	Nejasni rezultati za odzivnost na CMV

* IFN- γ reakcije na pozitivno kontrolo antigena CMV in mitogena so lahko pogosto zunaj obsega čitalnika za mikro plošče. To ne vpliva na kakovost rezultatov.

[†] Možne vzroke poiščite v poglavju »Odpravljanje težav«.

Omejitve postopka

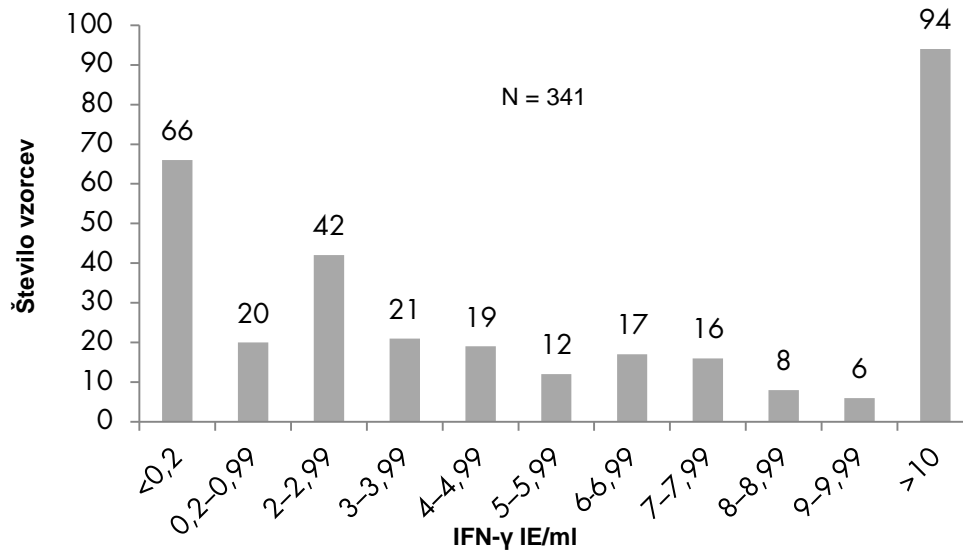
Rezultate testa QuantiFERON-CMV je treba obravnavati v kombinaciji z epidemiološko anamnezo posameznega pacienta, njegovim trenutnim zdravstvenim stanjem in drugimi diagnostičnimi preiskavami.

Vzroki za nezanesljive ali nejasne rezultate so lahko naslednji:

- Odstopanja od postopka, ki je opisan v navodilu za uporabo.
- Prekoračene stopnje IFN- γ v nični epruveti.
- Prekoračenje 16-urnega roka med odvzemom krvi in inkubacijo pri 37 °C.

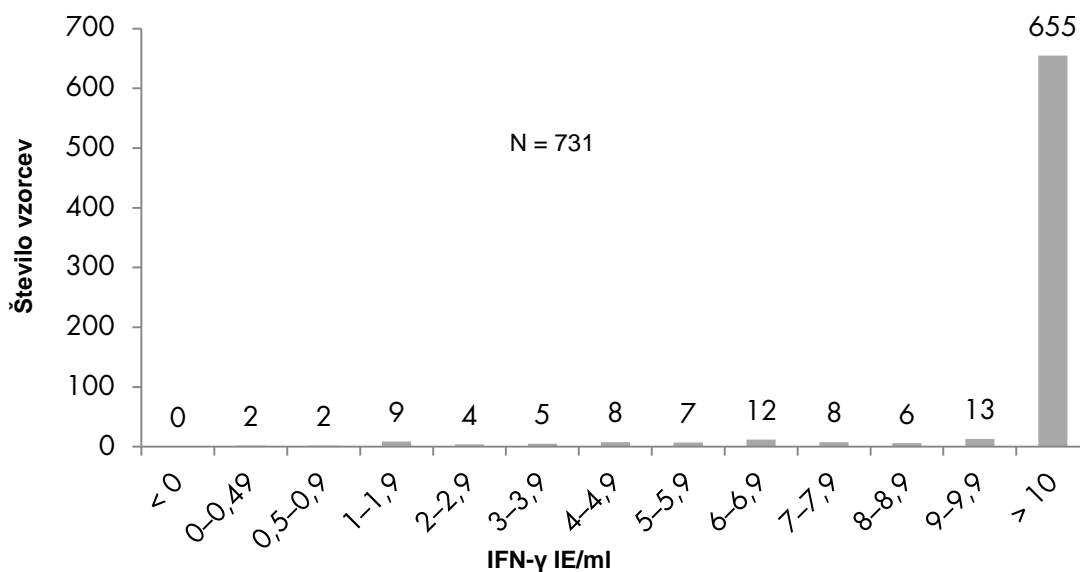
■ Pričakovane vrednosti

Pričakovane vrednosti IFN- γ z uporabo testa QuantiFERON-CMV so bile pridobljene s testiranjem 591 vzorcev zdravih odraslih oseb, od katerih jih je bilo 341 seropozitivnih na CMV in 250 seronegativnih. Pri 250 zdravih odraslih osebah brez okužbe s CMV, kot je bilo ugotovljeno z anti-CMV serologijo (seronegativni na CMV), jih je 100 % imelo IFN- γ reakcijo v vrednosti < 0,2 IE/ml na epruveto antigena CMV (minus ničla). Porazdelitev reakcij v epruveti antigena CMV (minus ničla) za 341 zdravih oseb z okužbo CMV, kot je bilo ugotovljeno z anti-CMV serologijo (CMV-seropozitivni), je prikazana na sliki 2.



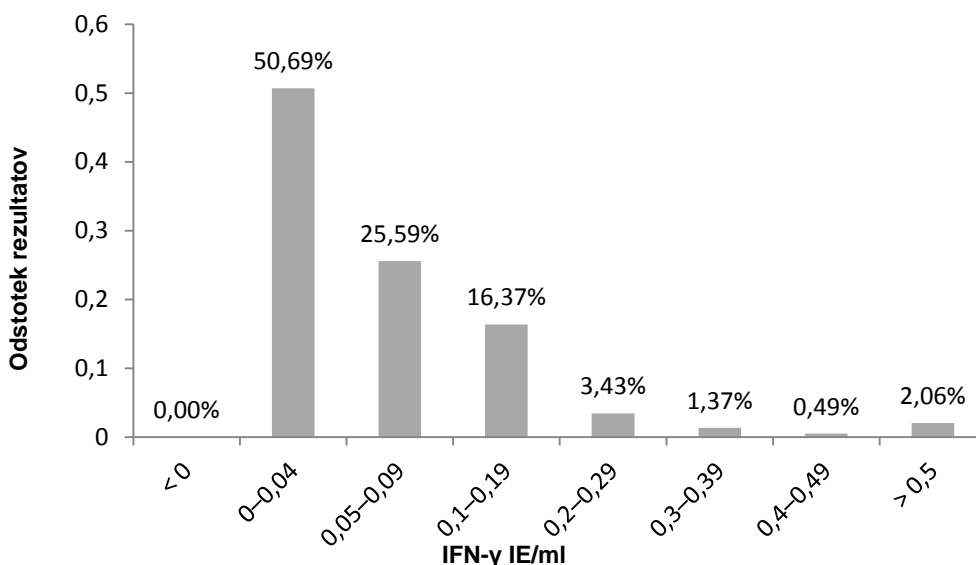
Slika 2. Porazdelitev reakcij nične kontrole CMV IFN- γ pri seropozitivnih zdravih osebah (n = 341).

Porazdelitev rezultatov mitogena (minus nični zakulisni) pri 731 normalnih vzorcih krvi odraslih oseb, ne glede na znano okužbo s CMV, je prikazana na sliki 3. Koncentracija mitogena (minus ničla), ki je manjša od 0,5 IE/ml, pomeni bodisi da test ni uspel bodisi da ima oseba oslabiljen imunski sistem. V zdravi populaciji sta v to kategorijo padla le 2 rezultata od 731.



Slika 3. Porazdelitev reakcij nične kontrole mitogena IFN- γ pri zdravih odraslih osebah (n = 731).

Pričakovane vrednosti za nične epruvete so prikazane na sliki 4. Podatki so pridobljeni iz 1020 vzorcev plazme zdravih odraslih oseb, testiranih s testom QuantiFERON-CMV ELISA.



Slika 4. Porazdelitev (izražena v % populacije) reakcij nične kontrole IFN- γ pri zdravih odraslih osebah (n = 1020).

Značilnosti

Primerjalno testiranje

Testni prag za odkrivanje izpostavljenosti CMV s testom QF-CMV je bil določen na podlagi analize rezultatov v skupini zdravih oseb (n = 223), pri čemer so rezultate QF-CMV primerjali s serološkimi rezultati CMV. Z analizo ROC so ugotovili, da je dal testni prag 0,04 IE/ml (po odštevanju ničle) optimalne pozitivne in negativne predvidene vrednosti za QF-CMV (področje pod krivuljo = 0,9679 [95 % CI = 0,9442 do 0,9915, $p < 0,0001$]). Tako je ta prag tisti, pri katerem se je test izkazal za najbolj učinkovitega pri uporabi v zdravi populaciji.

V predhodnem testiranju so primerjali rezultate testa QF-CMV s serološkim testom SeraQuest CMV IgG (Quest International). Test QF-CMV se je v 95 % (294 oseb od 310) ujema s predhodnim anti-HCMV serološkim testom pri zdravih osebah, pri čemer ni nihče od 149 seronegativnih darovalcev kazal reaktivnosti s testom QF-CMV in 145 od 161 seropozitivnih darovalcev je izkazalo reaktiven odziv IFN- γ . Splošno pozitivno ujemanje je bilo 90-% in negativno 100-%. Stopnja ujemanja reakcij IFN- γ na peptide CMV, merjena s testom QF-CMV pri zdravih prostovoljcih, in status anti-CMV serologije teh oseb, določen s serološkim testom SeraQuest CMV IgG, sta prikazana v tabeli 2.

Tabela 2. Stopnja ujemanja testa QuantiFERON-CMV in serološkega testa CMV IgG pri zdravih osebah.

		Serologija CMV		Skupaj
		Pozitivno	Negativno	
QuantiFERON-CMV	Reaktiven	145	0	145 (46,8 %)
	Nereaktiven	16	149	165 (53,2 %)
	Skupaj	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Prag testa

Priporočeni klinični preizkusni prag pri tem testu je 0,2 IE/ml v epruveti antigena CMV (minus ničla), čeprav se lahko v različnih kliničnih okoljih določi tudi druge prage. Razlog je v temeljnih imunoloških razlikah med normalno testno populacijo in populacijo, v kateri test šteje za koristnega – predvsem pri osebah, pri katerih zaradi oslabiljenega imunskega sistema obstaja tveganje za razvoj simptomatske okužbe s CMV in/ali razvoj bolezni. Pri posameznikih z visokim tveganjem je klinična uporabnost testa Qf-CMV v natančnem odkrivanju stopnje anti-CMV imunitete pri teh osebah, saj je zmanjšana imunost lahko povezana z razvojem bolezni CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

Klinične študije

Ker za diagnozo citomegalovirusne okužbe ne obstaja noben dokončen standard, analiza občutljivosti in specifičnosti testa QF-CMV praktično ni mogoča. Specifičnost in občutljivost QF-CMV je bila približno izračunana z oceno stopnje ujemanja reakcij IFN- γ na CMV-peptide, izmerjene s testom QF-CMV pri zdravih prostovoljcih, in statusa anti-CMV serologije teh oseb s testom serologije CMV IgG.

Specifičnost QF-CMV je bila približno izračunana z oceno stopnje napačno pozitivnih rezultatov (pozitivna reakcija QF-CMV) pri zdravih prostovoljcih brez dokazov o predhodni izpostavljenosti CMV (osebe seronegativne na CMV). Občutljivost je bila približno izračunana z oceno zdravih prostovoljcev z dokazom o predhodni izpostavljenosti CMV (osebe seropozitivne na CMV). Čeprav QF-CMV uporablja veliko število CMV-specifičnih epitopov iz različnih proteinov CMV, kar omogoča široko klinično rabo za vse tipe populacije z različnimi HLA haplotipi razreda I, pokritost teh peptidov ni 100%. Ker so bili HLA haplotipi oseb, testiranih za serologijo CMV, neznan, je bilo za pričakovati, da bo majhen odstotek seropozitivnih posameznikov neodziven na epruvete QF-CMV.

Specifičnost

V študiji na zdravih osebah, ki pred tem niso bili dokazano izpostavljeni CMV (CMV seronegativni posamezniki, kjer je $n = 250$), je bila stopnja ujemanja med IFN- γ reakcijami na CMV peptide, izmerjene s QF-CMV, in podatki o anti-CMV serologiji kar 100%.

Pri vseh drugih preiskavah, opravljenih na prejemnikih presajenih solidnih organov (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), prejemnikih presaditev hematopoetskih matičnih celic (7, 13) in pacientih, okuženih s HIV (2), stopnja ujemanja med IFN- γ reakcijami na CMV peptide, izmerjene s QF-CMV, in anti-CMV serologijo, stalno dosega 100 %.

Občutljivost

V študiji na zdravih osebah, ki so bile pred tem dokazano izpostavljene CMV (CMV seropozitivni posamezniki, kjer je $n = 341$), je bila stopnja ujemanja med IFN- γ reakcijami na CMV peptide, izmerjene s QF-CMV, in podatki o anti-CMV serologiji 80,6 % (275/341). Opažena neskladnost je lahko posledica uporabljenega višjega testnega praga (0,2 IE/ml), napačno pozitivne serologije, ali neodzivnosti oseb na CMV peptide, vključene v ta test.

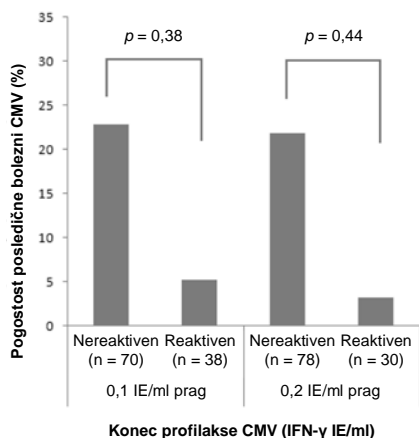
Pri ocenah občutljivosti, opravljenih na prejemnikih presajenih solidnih organov (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), prejemnikih presajenih hematopoetskih matičnih celic (7, 13) in pacientih, okuženih s HIV (2), so bile pri teh pacientih odkrite nekoliko nižje stopnje ujemanja med IFN- γ reakcijami na CMV peptide, izmerjene s QF-CMV, in CMV seropozitivnimi reakcijami. Nižja stopnja ujemanja je lahko posledica napačno pozitivne CMV serologije, pacientove neodzivnosti na CMV peptide v testu ali odsotnosti reaktivnih T-celic v pacientih zaradi njihovega oslabiljenega imunskega sistema.

Študije kažejo na klinično uporabnost

Tako serologija kot QF-CMV opisujeta svoj namen uporabe pri zaznavanju imunosti na CMV. Pri presajanju je serologija CMV pogosto uporabljena pred presaditvijo z namenom ocene tveganja za zaplete v povezavi s CMV v pacientu v fazi po presaditvi, njena uporabnost v fazi po presaditvi pa je omejena. Alternativno se QF-CMV lahko uporablja pri prejemnikih presaditve za oceno stopnje imunosti na CMV pri pacientih, pri katerih obstaja tveganje za razvoj simptomatične CMV okužbe in/ali bolezni zaradi oslabiljenega imunskega sistema (6, 9–11).

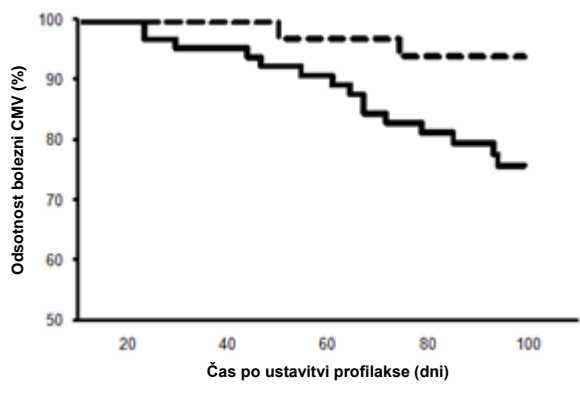
Številne objavljene klinične študije v različnih združenjih za presaditve so dokazale uporabnost QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

V veliki študiji 108 prejemnikov presajenih solidnih organov (4), so imeli pacienti reaktiven rezultat QF-CMV po zaključku anti-CMV profilakse občutno nižji odstotek poznega nastopa bolezni v primerjavi s tistimi, ki so imeli negativen rezultat QF-CMV (5,3 % v primerjavi z 22,9 %, $p = 0,044$) (slika 5).



Slika 5. Odstotki poznega nastopa CMV bolezni pri pacientih z reaktivnim rezultatom QuantiFERON-CMV v primerjavi z nereaktivnim rezultatom QuantiFERON-CMV ob zaključku profilakse. Podatki vzeti iz Kumar et al.(4)

Poleg tega so pacienti z reakcijo na test QF-CMV po zaključku profilakse redkeje obolevali za CMV in ostali dlje časa zdravi (slika 6), kar pomeni, da se test QF-CMV lahko uporablja za identifikacijo oseb, pri katerih obstaja tveganje za kasnejši razvoj bolezni CMV.

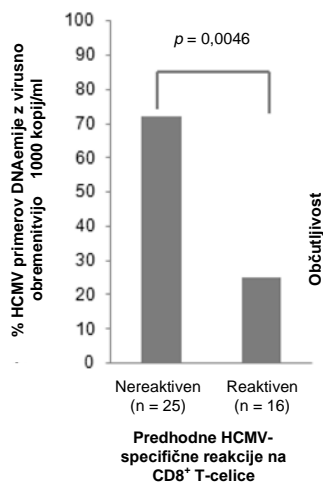


Slika 6. Čas razvoja bolezni CMV pri bolnikih z reaktivnim rezultatom QuantiFERON-CMV (označeno s prekinjeno črto) v primerjavi s tistimi z nereaktivnim rezultatom QuantiFERON-CMV (označeno s polno črto) po zaključku profilakse. Podatki vzeti iz Kumar et al.(4)

Študija navaja tudi, da je bil v skupini pacientov s presaditvijo z najvišjo stopnjo tveganja za razvoj bolezni CMV (prejemniki CMV seronegativne presaditve, ki organ prejmejo od CMV seropozitivnega darovalca, torej D+/R-), reaktiven rezultat QF-CMV kadar koli po profilaksi povezan z 90-% možnostjo neobolenja za CMV boleznijo.

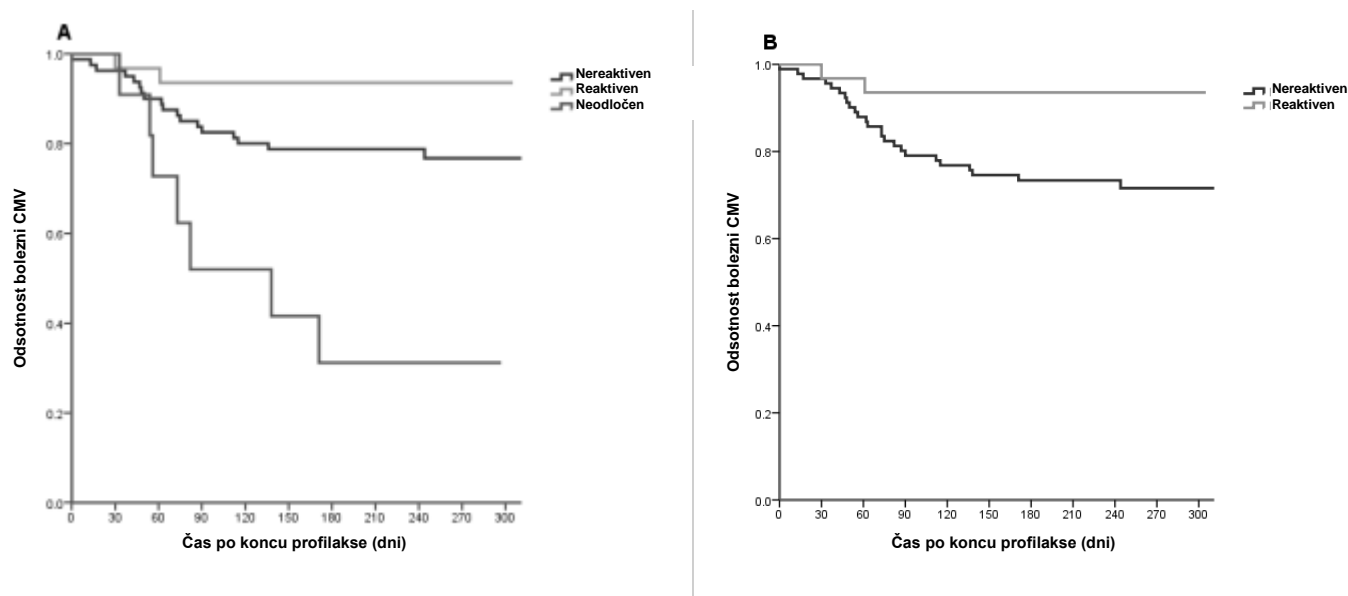
V študiji s pacienti (12) s presaditvijo 37 solidnih organov, je ocena CMV-specifičnih reakcij na CD8⁺ T-celice s testom QF-CMV pomagala pri napovedovanju spontanega izginotja virusa v primerjavi z napredovanjem bolezni CMV po dvigu viremije CMV. V tej študiji se je 24/26 pacientov (92,3 %) z reaktivnim rezultatom QF-CMV, spontano znebilo virusa CMV, pri čemer je isti rezultat doseglo samo 5/11 (45,5 %) pacientov z nereaktivnim rezultatom QF-CMV.

V študiji 67 prejemnikov presajenih pljuč z oceno primerov CMV viremije po presaditvi (14) je bilo ugotovljeno, da je bilo v 18/25 (72 %) primerih CMV viremije predhodno ugotovljen nereaktiven rezultat na QF-CMV v primerjavi s 4/16 (25 %) primeri, ko je bil predhodno ugotovljen reaktiven rezultat QF-CMV (natančen Fisherjev test, $p = 0,0046$, glejte sliko 7).



Slika 7. Statistična analiza CMV-specifičnih CMV CD8⁺ reakcij na T-celice, zaznana s testom QuantiFERON-CMV in razvoj CMV viremije (natančen Fisherjev test, $p = 0,0046$). Podatki vzeti iz Weseslindtner et al (14).

V veliki perspektivni študiji več centrov, ki je vključevala 127 D+/R- presajenih solidnih organov in 15 prejemnikov, od katerih so vsi prejeli antivirusno profilakso, so imeli pacienti z reaktivnim rezultatom QF-CMV (s testnim pragom 0,1 IE/ml) kadar koli po zaključku anti-CMV profilakse občutno nižjo stopnjo poznega nastopa bolezni v 12 mesecih po presaditvi v primerjavi s tistimi, ki so imeli nereaktiven rezultat QF-CMV in nedoločen rezultat (6,4 % v primerjavi z 22,2 % oz. v primerjavi z 58,3 %, $p < 0,001$). V primeru uvrstitve nejasnih rezultatov med nereaktivne rezultate je bil odstotek posledične CMV bolezni 6,4 % v primerjavi s 26,8 %, $p = 0,024$ (glejte sliko 7). Pozitivne in negativne predvidene vrednosti QF-CMV za zaščito pred CMV boleznijo so bile 0,90 (95 % CI 0,74–0,98) in 0,27 (95 % CI 0,18–0,37), kar pomeni, da je bil reaktiven rezultat QuantiFERON-CMV kadar koli po profilaksi povezan z 90-% možnostjo neobolenja za CMV boleznijo. Ta študija ugotavlja, da je test QF-CMV uporaben za ugotavljanje, ali imajo pacienti nizko, srednje ali visoko tveganje za razvoj posledične CMV bolezni po profilaksi.



Slika 7. Kaplan-Meierjeve krivulje pogostnosti CMV bolezni glede na rezultate testa QF-CMV.

- A** Reaktivni v primerjavi z nereaktivnimi v primerjavi z nejasnimi rezultati QF-CMV (log rank test, $p < 0,001$).
B Reaktivni v primerjavi z nereaktivnimi, kjer nejasni rezultati štejejo za nereaktivne (log rank test, $p = 0,024$).

V perspektivni študiji 16 prejemnikov 55 presajenih solidnih organov, kjer je bilo analizirano razmerje med rezultati QF-CMV pred presaditvijo in primeri replikacije CMV po presaditvi, je bilo ugotovljeno, da je bil višji odstotek replikacije CMV po presaditvi opaziti pri prejemnikih R(+) z nereaktivnim rezultatom QF-CMV -pred presaditvijo (7/14 ali 50 %) v primerjavi s prejemniki R(+) z reaktivnim rezultatom QF-CMV (4/30 ali 13,3 %).

V tej študiji je bilo ugotovljeno, da so imeli prejemniki, ki so bili pred presaditvijo nereaktivni na QF-CMV in so prejeli organ od CMV-seropozitivnega darovalca, desetkrat višje tveganje za CMV replikacijo v primerjavi s prejemniki, ki so bili pred presaditvijo reaktivni na QF-CMV (prilagojeno razmerje obetov 10,49, 95 % CI 1,88–58,46), ter da je test QF-CMV pred presaditvijo lahko uporaben pri napovedovanju tveganja za CMV replikacijo po presaditvi in tako omogoča individualizacijo upravljanja CMV okužbe po presaditvi solidnega organa.

Po svetu so bile izvedene ali trenutno potekajo številne druge študije, ki preiskujejo zaznavanje CMV-specifičnih CD8⁺ reakcij T-celic prek QF-CMV v skupini prejemnikov presaditve (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13).

Skupne mednarodne smernice o ravnanju s citomegalovirusom pri presajanju solidnih organov

Pomembnost CMV-specifičnega nadziranja imunosti je bila potrjena in objavljena v dokumentu »Skupne mednarodne smernice o ravnanju s citomegalovirusi pri presajanju solidnih organov« (6). Te mednarodne smernice, ki jih je razvila skupina strokovnjakov za CMV in presajanje solidnih organov, zbrana s strani Oddelka za nalezljive bolezni združenja za presaditve služijo kot dokaz in skupne, na izvedenskem mnenju osnovane, smernice o ravnanju s CMV, vključno z diagnostiko, imunologijo, preprečevanje in zdravljenjem.

Te smernice zaključujejo, da »imunsko spremljanje CMV-specifičnih reakcij T-celic lahko napove, pri katerih posameznikih obstaja tveganje za razvoj CMV bolezni po presaditvi in je lahko uporabno pri izvajanju profilaktičnih in predbolezenskih terapij« (6).

Poleg tega smernice vključujejo tudi priporočila glede lastnosti idealnega imunskega testiranja, med njimi:

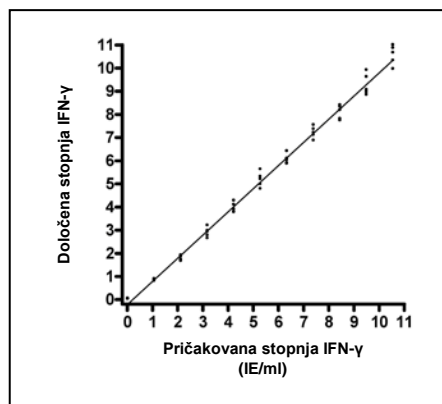
- Sposobnost oceniti količino in funkcijo CD4⁺ in CD8⁺ T-celic prejemnika presaditve
- Sposobnost merjenja IFN- γ
- Preprosta izvedba, stroškovna učinkovitost in možnost ponovitve
- Kratko zadrževanje
- Preprosto pošiljanje vzorcev v specializirane priporočene laboratorije

QF-CMV izpolnjuje praktično vse kriterije, specificirane v teh smernicah, in predstavlja edini standardizirani test za spremljanje imunosti z zmožnostjo zaznavanja IFN- γ , ki je specifičen za CMV.

Značilnosti izvedbe testa

Metoda za merjenje koncentracije IFN- γ s QF-CMV ELISA je dokazano linearna od nič do 10 IE/ml (slika 9). Študija linearnosti je bila narejena z naključno postavitvijo 5 reprodukcij 11 skupin znanih koncentracij IFN- γ na ploščo ELISA.

Pri QF-CMV ELISA ni opaziti krivulje zaradi visoke koncentracije (prozonski učinek) pri koncentracijah IFN- γ do 100.000 IE/ml.



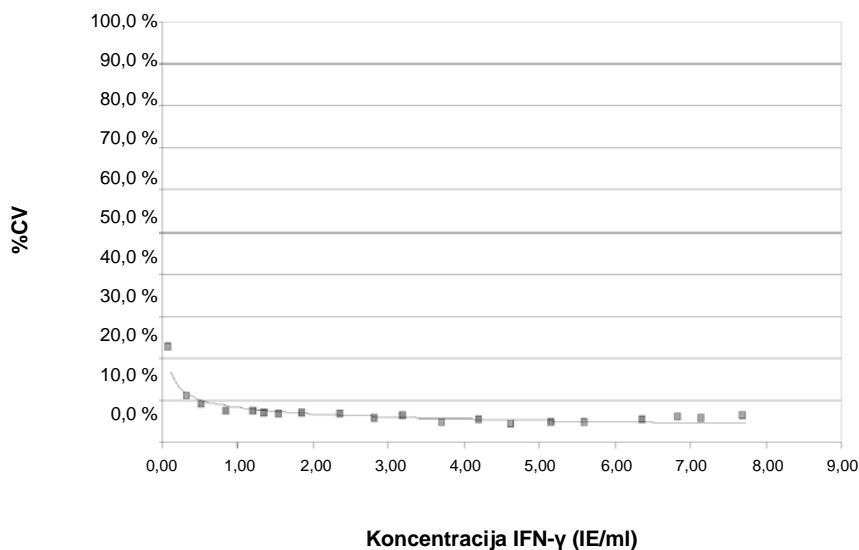
Slika 9. Profil linearnosti QF-CMV ELISA, določen pri testiranju 5 reprodukcij 11 vzorcev plazme z znanimi koncentracijami IFN- γ . Linearna črta regresije ima nagib $1,002 \pm 0,011$ in koeficient korelacije 0,99.

Intra- in inter-testna nenatančnost (%CV) QF-CMV ELISA je bila ocenjena s testiranjem 20 vzorcev plazme z različnimi koncentracijami IFN- γ s 3 replikacijami, v 3 laboratorijih, v 3 ne-zaporednih dneh, s strani 3 ponudnikov. Vsak vzorec je bil tako testiran 27-krat, v 9 neodvisnih testiranjih. En vzorec je bil nična kontrola z izračunano koncentracijo IFN- γ 0,08 (95 % CI 0,07–0,09) IE/ml. Od preostalih 19 vzorcev plazme so bile koncentracije v razponu od 0,33 (0,31–0,34) do 7,7 IE/ml (7,48–7,92).

Intra-testna nenatančnost ali nenatančnost znotraj testiranja je bila izračunana s povprečkom %CV za vsako testno plazmo z IFN- γ v vsakem testiranju ($n = 9$) v razponu od 4,1 do 9,1 %CV. Povprečje znotraj testiranja %CV (± 95 % CI) je bilo 6,6 % \pm 0,6 %. Povpreček ničelne IFN- γ plazme je bil 14,1 %CV.

Skupna nenatančnost ali nenatančnost med testi je bila določena s primerjavo 27 izračunanih koncentracij IFN- γ za vsak vzorec plazme v razponu od 6,6 do 12,3 %CV. Skupno povprečje %CV (± 95 % CI) je bilo 8,7 % \pm 0,7 %. Povpreček ničelne IFN- γ plazme je bil 26,1 %CV. Ta stopnja odklona je pričakovana, ker je izračunana koncentracija IFN- γ nizka, tako da bo odklon okoli nizke ocenjene koncentracije večji kot pri višjih koncentracijah.

Profil natančnosti za QF-CMV ELISA je prikazan na sliki 10 in prikazuje, da se nenatančnost z višjimi koncentracijami IFN- γ ne zviša.



Slika 10. Profil natančnosti QF-CMV ELISA, določen s testiranjem 20 vzorcev plazme v 3 zaporednih dneh, v 3 laboratorijih in s strani 3 ponudnikov. Trendna črta je izračun po metodi najmanjših kvadratov.

Izvedena je bila študija za določitev zmožnosti za reprodukcijo testa QF-CMV s pomočjo vzorcev krvi 8 oseb z neznanim stanjem CMV. Kri vsake osebe je bila zbrana v tri komplete epruvet QF-CMV (3 x nični, 3 x CMV in 3 x mitogeni). Ti trije kompleti epruvet so bili nato inkubirani na treh različnih lokacijah (po en nični, CMV in mitogeni komplet na lokacijo), kot je opisano v priloženih navodilih. Po 16–24-urni inkubaciji so bile epruvete centrifugirane, plazma pa odvzeta.

Testi ELISA so bili izvedeni trikrat zaporedno na vsaki od treh lokacij, s čimer so dobili po tri QF-CMV rezultate za vsako osebo na lokaciji (skupaj 9 rezultatov z vseh lokacij). Na vsaki lokaciji je bil uporabljen drug ponudnik. Plošče, ki so bile uporabljene v študiji, niso bile nujno iz serije z isto številko, vendar pa so bile vse znotraj obdobja veljavnosti.

Za vsak vzorec krvi je bila določena zmožnost reprodukcije v povezavi s stanjem diagnostike (reaktivno, nereaktivno ali nejasno) in v povezavi z numerično vrednostjo. Zmožnost reprodukcije numerične vrednosti je bila ocenjena samo pri reaktivnih vzorcih (izraženih kot %CV), saj so bile ravni IFN- γ v nereaktivnih vzorcih prenizke, da bi lahko z njimi prišli do veljavne ocene natančnosti.

Skupna zmožnost reprodukcije diagnostike je bila 100 %, pri čemer je bilo diagnostično stanje QF-CMV vseh 8 prostovoljcev reproducirano na vseh lokacijah, brez poročanja o nejasnih vzorcih. Zmožnost reprodukcije reaktivnih vzorcev je bila sprejemljiva tako na sami lokaciji kot med lokacijami. Povprečni %CV za vsako od testnih lokacij je bil 4,5 % (lokacija 1), 5,9 % (lokacija 2) in 7,3 % (lokacija 3). Skupni %CV med lokacijami je bil 5,9 % za vseh 5 reaktivnih vzorcev. Koeficient odstotka odklonskih vrednosti pod 10 % velja za odličnega.

Tehnične informacije

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati so lahko povezani s stanjem imunosti testiranega posameznika, vzrok zanje pa so lahko tudi naslednji tehnični dejavniki:

- Prekoračenje 16-urnega roka med odvzemom krvi in inkubacijo pri 37 °C.
- Skladiščenje vzorcev krvi zunaj predpisanega temperaturnega območja (od 17 do 27 °C).
- Nezdostno mešanje epruвет za odvzem krvi.

Pri domnevnih tehničnih težavah pri odvzemu krvi ali med rokovanjem z vzorci je treba celoten test QF-CMV ponoviti z novimi vzorci krvi. Test ELISA simuliranih vzorcev plazme pa se lahko ponovi, kadar se domneva odstopanje od predpisane testne metode ELISA. Nejasni rezultati, ki si jih lahko razlagamo z nizkimi vrednostmi mitogena, se pri ponovnem testiranju ne smejo ponoviti, razen če je pri testu ELISA prišlo do napake.

Navodila za odpravljanje težav

Ta navodila za odpravljanje težav vam lahko pomagajo pri odpravljanju morebitnih težav. Za več informacij glejte tudi »Tehnične informacije«, ki so na voljo na spletnem mestu: www.QuantiFERON.com. Za kontaktne informacije glejte stran 27 in hrbtno platnico.

ELISA – odpravljanje težav

Nizke vrednosti optične gostote za standarde

Možen vzrok	Rešitev
a) Napaka pri redčenju standarda	Redčenje kompleta standarda opravite natančno po priloženih navodilih.
b) Napaka pri pipetiranju	Preverite, ali so pipete kalibrirane in uporabljene točno v skladu z navodili proizvajalca.
c) Prenizka inkubacijska temperatura	Inkubacija za metodo ELISA mora biti opravljena pri sobni temperaturi (17–27 °C).
d) Prekratek čas inkubacije	Čas inkubacije plošče s konjugatom, standardi in vzorci naj znaša 120 ± 5 minut. Raztopina encimskega substrata naj se na plošči inkubira 30 minut.
e) Napačen filter plošče	Plošča naj se odčita pri 450 nm z referenčnim filtrom 620–650 nm.
f) Prehladni reagenti	Vsi reagenti (razen 100x koncentrata konjugata) morajo biti pred začetkom testa segreti na sobno temperaturo. To traja približno 60 minut.
g) Pretečen rok uporabnosti kompleta/sestavlin kompleta	Komplet uporabite preden mu poteče rok. Poskrbite, da bosta standard in 100x koncentrat konjugata porabljeni v 3 mesecih po rekonstruiranju.

Nespecifična barvna reakcija/visoko ozadje

Možen vzrok	Rešitev
a) Nezadostno pranje plošče	Ploščo operite najmanj 6x s 400 µl pufru na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebnih več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje.
b) Previsoka temperatura inkubacije	Inkubacija za metodo ELISA naj po opravljena pri sobni temperaturi (17–27 °C).
c) Pretečen rok uporabnosti kompleta/sestavlin kompleta	Komplet uporabite preden mu poteče rok. Poskrbite, da bosta standard in 100x koncentrat konjugata porabljeni v 3 mesecih po rekonstruiranju.
d) Kontaminirana raztopina encimskega substrata	Modrikasto obarvan substrat zavržite. Poskrbite, da bodo uporabljeni čisti rezervoarji reagentov.
e) Mešanje plazme v centrifugiranih epruvetah pred odvzemom	Poskrbite za to, da bodo vzorci plazme previdno odvzeti iz zgornjega gela brez pipetiranja navzgor in navzdol, pri čemer pazite, da ne poškodujete materiala 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).

TEHNIČNA 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

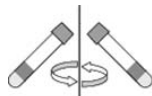
Ta stran je namenoma prazna.

Ta stran je namenoma prazna.

Testni postopek (skrajšana oblika)

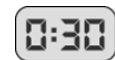
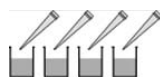
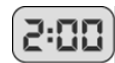
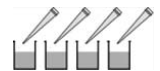
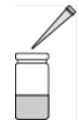
1. faza – inkubacija krvi

1. Kri pacientov shranite v epruvete za odvzem krvi in jo premešajte, tako da jih deset (10) krat stresete dovolj močno, da je celotna notranja površina epruvete prekrita s krvjo, tako da se raztopijo antigeni na stenah epruvete.
2. Epruvete inkubirajte v stoječem položaju pri temperaturi $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ od 16 do 24 ur.
3. Po inkubaciji epruvete 15 minut centrifugirajte pri 2000 do 3000 RCF (g), da ločite plazmo in rdeče krvničke.
4. Po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvzemanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.



2. faza – IFN- γ ELISA

1. Uravnovežite sestavine ELISA z izjemo 100X koncentrata konjugata na sobno temperaturo za vsaj 60 minut.
2. Rekonstruirajte standardni komplet na 8,0 IE/ml z destilirano ali deionizirano vodo. Pripravite štiri (4) standardne raztopine.
3. Rekonstruirajte suho zamrznjen 100X koncentrat konjugata z destilirano ali deionizirano vodo.
4. V zeleni raztopini za redčenje pripravite konjugat za uporabo in dodajte 50 μ l v vse vdolbine.
5. V ustrezne vdolbine dodajte 50 μ l testnih vzorcev plazme in 50 μ l standarda. Premešajte v vibratorju.
6. Inkubirajte 120 minut pri sobni temperaturi.
7. Vdolbine operite najmanj 6-krat s 400 μ l pufra na vsako vdolbino.
8. V vdolbine dodajte 100 μ l raztopine encimskega substrata. Premešajte v vibratorju.
9. Inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi.
10. V vse vdolbine dodajte 50 μ l raztopine za blokiranje encimov. Premešajte v vibratorju.
11. Rezultate odčitajte pri 450 nm s 620- do 650-nm referenčnim filtrom.
12. Analizirajte rezultate.



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

Sporazum o omejeni licenci za komplet QuantiFERON-CMV ELISA

Uporaba tega izdelka pomeni, da se kupec ali uporabnik izdelka strinja z naslednjimi pogoji:

1. Izdelek se lahko uporablja zgolj v skladu s protokoli, ki so priloženi izdelku, in s to knjižico ter skupaj s sestavnimi deli v kompletu. QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo ali vključitev priloženih sestavnih delov tega kompleta s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu kompletu, kot je opisano v protokolih, ki so priloženi izdelku, temu priročniku in dodatnimi protokoli, ki so na voljo na www.qiagen.com. Nekatere od teh dodatnih protokolov so ustvarili uporabniki QIAGEN za uporabnike QIAGEN. Družba QIAGEN teh protokolov ni temeljito testirala ali optimizirala. QIAGEN ne ponuja garancije ali jamstva, da ti ne kršijo pravic drugih strank.
2. Razen izrecno navedenih licenc QIAGEN ne jamči, da ta komplet in/ali njegova uporaba ne krši pravic drugih strank.
3. Ta komplet in njegovi sestavni deli so licencirani za enkratno uporabo in jih ni dovoljeno ponovno uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej.
4. QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
5. Kupec in uporabnik tega kompleta se strinjata, da ne bosta ukrepala ali dovolila drugim, da ukrepajo v smeri, ki bi vodila v ali omogočala katero od zgoraj prepovedanih dejanj. QIAGEN lahko prepovedi iz tega Sporazuma o licenčnih omejitvah uveljavlja na katerem koli sodišču ter dobi povrnjene vse svoje stroške za preiskavo in sodišče, vključno s stroški za odvetnika, pri katerem koli dejanju za uveljavitev tega Sporazuma o licenčnih omejitvah ali pravice intelektualne lastnine v povezavi s tem kompletom in/ali njegovimi sestavnimi deli.

Za posodobljene licenčne pogoje glejte www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, družba QIAGEN, vse pravice pridržane.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

