
QuantiFERON[®]-CMV

Uputstvo za upotrebu 2 x 96

Interferon-gama test pune krvi koji meri reakcije na peptidne antigene humanog citomegalovirusa

IVD

CE

REF 0350-0201



Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australija

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

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NEMAČKA

1075110SR Rev. 01



Sadržaj

Predviđena upotreba	5
Uvod	5
Principi testa	6
Vreme potrebno za obavljanje testa	6
Reagensi i skladištenje	7
Potreban materijal koji se ne isporučuje	8
Skladištenje i rukovanje	8
Upozorenja i mere opreza	9
Prikupljanje uzoraka i rukovanje njima	10
Uputstva za upotrebu	11
Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme	11
Faza 2 – QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ	11
Izračunavanje i tumačenje rezultata	14
Tumačenje rezultata	15
Ograničenja	15
Očekivane vrednosti	16
Karakteristike učinka	17
Komparativno testiranje	17
Granična vrednost testa	18
Kliničke studije	18
Specifičnost	18
Osetljivost	19
Studije koje ističu kliničku upotrebu	19
Smernice međunarodnog koncenzusa o upravljanju citomegalovirusom kod transplantacije čvrstih organa	22
Karakteristike učinka testa	22
Tehničke informacije	24
Nejasni rezultati	24
Vodič za rešavanje problema	25

Bibliografija	26
Tehnički servis	27
Skraćena procedura testiranja	30
Faza 1 – inkubacija krvi	30
Faza 2 – IFN- γ ELISA	30

Predviđena upotreba

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) je in vitro test koji stimuliše ćelije u heparinizovanoj punoj krvi pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine humanog citomegalovirusa (CMV). Otkrivanje interferon-gama (IFN- γ) putem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testa služi za određivanje količine in vitro reakcija na ove peptidne antigene koji su povezani sa kontrolom imunološkog sistema nad CMV infekcijom. Gubitak ove funkcije imuniteta može da bude povezan sa razvojem CMV bolesti. Predviđena namena QF-CMV testa je praćenje nivoa imuniteta na CMV kod pacijenta.

QF-CMV nije test za utvrđivanje CMV infekcije i ne sme da se koristi za izuzimanje CMV infekcije.

Uvod

CMV je virus herpesa koji inficira između 50% i 85% odraslih osoba u populaciji. Predstavlja čestu komplikaciju imunosupresije, posebno nakon transplantacije, i može u velikoj meri da doprinese stopi smrtnosti kod pacijenata sa transplantiranim organima. Imunosupresivne terapije koje se trenutno koriste za sprečavanje odbacivanja transplantiranog organa imaju štetno dejstvo na T-limfocite i ćelijske imunske odgovore, što dovodi do povećane podložnosti virusnim infekcijama nakon transplantacije. Važnost funkcije T-ćelija u suzbijanju replikacije CMV virusa takođe se ističe činjenicom da CD8⁺ citotoksični T-limfociti (CTL) specifični za CMV mogu da zaštite od patogeneze povezane sa virusima. Utvrđivanje broja CD8⁺ CTL limfocita specifičnih za CMV kod imunosuprimiranih pacijenata i proizvodnja proteina IFN- γ mogu da ukažu na postojanje rizika od razvoja CMV bolesti. Proizvodnja proteina IFN- γ može da bude funkcionalni surogat za identifikovanje CTL limfocita specifičnih za CMV.

QF-CMV je test za ćelijske imunske odgovore na peptidne antigene koji simuliraju CMV proteine. CMV peptidi su napravljeni da ciljaju CD8⁺ T ćelije, uključujući A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 i Cw6 (A30, B13) HLA klasu I haplotipova koji pokrivaju >98% humane populacije. Pojedinci inficirani CMV virusom najčešće imaju CD8⁺ limfocite u krvi koji prepoznaju ove antigene. Ovaj proces prepoznavanja uključuje generisanje i sekreciju citokina, IFN- γ . Otkrivanje i naknadna kvantifikacija IFN- γ proteina čine osnovu ovog testa.

Principi testa

QF-CMV test se obavlja u dve faze. Prvo se prikuplja puna krv u svaku od QF-CMV epruveta za prikupljanje krvi, a one obuhvataju nultu kontrolnu epruvetu, epruvetu sa CMV antigenom i epruvetu sa mitogenom.

Epruveta sa mitogenom se koristi u QF-CMV testu kao pozitivna kontrola. Ovo može da bude dodatna garancija tamo gde postoji sumnja na status imuniteta pojedinca.

Epruvete moraju da se inkubiraju na temperaturi od 37 °C u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 16 sati nakon prikupljanja. Nakon perioda inkubacije od 16 do 24 sati, epruvete se podvrgavaju centrifugi, uklanja se plazma, a količina proteina IFN- γ (IU/ml) se meri QF-CMV ELISA testom.

Količina proteina IFN- γ u uzorcima plazme iz epruveta za CMV antigen i mitogen često može da bude iznad gornje granice na većini ELISA uređaja za očitavanje, čak i kada su pojedinci umereno imunosuprimirani. Da biste dobili **kvalitativne** rezultate, koristite vrednosti izračunate za nerazređenu plazmu. Da biste dobili **kvantitativne** rezultate, gde su potrebne stvarne IU/ml vrednosti, uzorci plazme moraju da se razblaže u odnosu 1/10 sa zelenim razblaživačem i ispitaju ELISA testom zajedno sa nerazređenom plazmom.

Napomena: Za uzorke koji su u opsegu testa QF-CMV ELISA (npr. do 10 IU/ml), trebalo bi koristiti rezultat dobijen analizom uzorka nerazređene plazme. Za takve koncentracije proteina IFN- γ vrednosti dobijene pomoću 1/10 rastvora uzoraka plazme mogu da budu netačne.

Test se smatra reaktivnim za IFN- γ odgovor kada se vrednosti epruvete za CMV antigen nalaze znatno iznad IFN- γ IU/ml vrednosti za nultu epruvetu. Uzorak plazme stimulisan mitogenom služi kao pozitivna kontrola proteina IFN- γ za svaki testirani uzorak. Nizak odgovor na mitogen ukazuje na nejasan rezultat kada uzorak krvi ima i nereaktivan odgovor na CMV antigene. Ovaj šablon može da se pojavi kada postoji nedovoljno limfocita, kada je smanjena aktivnost limfocita usled nepravilnog rukovanja uzorkom, usled nepravilnog punjenja ili mešanja epruvete sa mitogenom ili nemogućnost limfocita pacijenta da generišu IFN- γ , kao što je slučaj sa pacijentima koji su nedavno imali transplantaciju. Nultim uzorkom se koriguju pozadina ili nespecifični IFN- γ u uzorcima krvi. Nivo IFN- γ proteina u nultoj epruveti oduzima se od nivoa IFN- γ proteina u epruveti sa CMV antigenom i epruveti sa mitogenom (pogledajte „Tumačenje rezultata“ na 15. stranici ovog uputstva za upotrebu da biste videli kako se tumače QF-CMV rezultati).

Vreme potrebno za obavljanje testa

Procene vremena potrebnog za obavljanje QF-CMV testa date su u nastavku; navedeno je i vreme za istovremeno testiranje više uzoraka:

Inkubacija na 37 °C za epruvete sa uzorkom krvi: 16 do 24 sati

ELISA: Približno 3 sata za 1 ELISA ploču

Manje od 1 sata rada

Dodajte od 10 do 15 minuta za svaku narednu ploču

Reagensi i skladištenje

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Epruvete za prikupljanje krvi za CMV i kontrolne antigene (pakovanje za jednog pacijenta))

Broj u katalogu 0192-0301

Broj priprema 1

QuantiFERON Nil Control
(QuantiFERON nulta kontrola) (sivi poklopac) 1 epruveta

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

QuantiFERON Mitogen Control
(QuantiFERON mitogen kontrola) (ljubičasti poklopac) 1 epruveta

Uputstvo za upotrebu 1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (QuantiFERON-CMV ELISA komponente)

Broj u katalogu 0350-0201

Trake za mikroploču 24 x 8 trake za udubljenja

Human IFN- γ Standard (Humani IFN- γ standardizovani), liofilizovani 1 x bočica

Green Diluent (Zeleni razblaživač) 1 x 30 ml

QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate
(QuantiFERON 100X koncentrovani konjugat), liofilizovani 1 x 0,3 ml

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

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

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(QuantiFERON enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije) 1 x 15 ml

Potreban materijal koji se ne isporučuje

- Inkubator za 37 °C; CO₂ nije potreban
- Kalibrisane pipete sa promenljivom zapreminom koje mogu da doziraju od 10 µl do 1000 µl sa vrhovima za jednokratnu upotrebu
- Kalibrisana pipeta sa više kanala koja može da dozira 50 µl i 100 µl sa vrhovima za jednokratnu upotrebu
- Šejker za mikroploče
- Dejonizovana ili destilovana voda, 2 litra
- Perač mikroploče (preporučuje se automatski perač)
- Čitač mikroploče opremljen filterom od 450 nm i referentnim filterom od 620 nm do 650 nm

Skladištenje i rukovanje

Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi

- Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi čuvajte na temperaturi od 4 °C do 25 °C.
- Rok trajanja QuantiFERON-CMV epruveta za prikupljanje uzoraka krvi iznosi maksimalnih 15 meseci od datuma proizvodnje, kada se čuvaju na temperaturi od 4 °C do 25 °C.

Reagensi za ELISA komplet

- Komplet čuvajte na temperaturi od 2 °C do 8 °C.
- Rastvor enzimskog supstrata uvek štite od direktne sunčeve svetlosti.

Rekonstituisani i neupotrebljeni reagensi

Da biste dobili uputstva o tome kako da rekonstituišete reagense, pogledajte „Uputstva za upotrebu – faza 2” (koraci 3 i 5 na stranicama 11 i 12).

- Rekonstituisani standard iz kompleta može da se čuva najviše 3 meseca ako se skladišti na temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Zabeležite datum kada je standard iz kompleta rekonstituisan.

- Kada se rekonstituiše, neiskorišćeni QuantiFERON 100X koncentrovani konjugat mora da se vrati u skladište na temperaturu od 2 °C do 8 °C i mora da se iskoristi u roku od 3 meseca.

Zabeležite datum kada je konjugat rekonstituisan.

- Konjugat spreman za upotrebu mora da se upotrebi u roku od 6 sati od pripreme.
- Pufer za ispiranje spreman za upotrebu može da se čuva na sobnoj temperaturi (od 17 °C do 27 °C) najviše 2 nedelje.

Upozorenja i mere opreza

Za korišćenje u in vitro dijagnostici.

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety gde možete da pronađete, pogledate i odštampate SDS-ove za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.



OPREZ: Rukujte humanom krvlju kao da je potencijalno zarazna. Sledite relevantne smernice za rukovanje krvlju.

Sledeći izjave o rizicima i bezbednosti važe za komponente QF-CMV ELISA kompleta.

QuantiFERON enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije



Sadrži sumpornu kiselinu: Može da iritira. Izjave o rizicima i bezbednosti:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zeleni razblaživač** sadrži normalni mišji serum i kazein, koji mogu da podstaknu alergijske reakcije; izbegavajte kontakt sa kožom.

U slučaju hemijske nezgode

Prosipanje, curenje, izloženost ili nezgoda

Pozovite kompaniju CHEMTREC u bilo koje doba dana ili noći

U SAD i Kanadi: 1-800-424-9300

Izvan SAD i Kanade: +1-703-527-3887 (prihvataju se i pozivi na naš račun)

Dodatne informacije

List sa bezbednosnim podacima: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Iritira oči i kožu; S26: U slučaju kontakta sa očima, odmah isperite sa mnogo vode i potražite medicinsku pomoć; S36/37/39: Nosite odgovarajuću zaštitnu odeću, rukavice i zaštitu za oči/lice.

Prikupljanje uzoraka i rukovanje njima

Važne napomene pre početka:

Odstupanja od QF-CMV uputstva za upotrebu mogu da dovedu do pogrešnih rezultata. Pažljivo pročitajte uputstva pre upotrebe.

- Nemojte da koristite komplet ako neka od bočica sa reagensima pokazuje znake oštećenja ili curenja pre upotrebe.
- Nemojte da mešate ili da koristite ELISA reagense iz drugih QF-CMV ELISA kompleta.
- Neupotrebljene reagense i biološke uzorke odložite na otpad u skladu sa lokalnim, državnim i federalnim odredbama.
- Nemojte da koristite QF-CMV epruvete za prikupljanje uzoraka krvi ili QF-CMV ELISA komplete nakon isteka roka upotrebe.

QF-CMV koristi sledeće epruvete za prikupljanje uzoraka krvi:

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

Antigeni su nataloženi u suvom obliku na unutrašnji zid epruveta za prikupljanje uzoraka krvi, tako da je izuzetno bitno da se sadržaj epruvete dobro promeša sa krvlju. Epruvete moraju da se prenesu u inkubator sa temperaturom od 37 °C u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 16 sati nakon prikupljanja uzorka.

Poštujte sledeće procedure da biste dobili optimalne rezultate:

1. **Za svakog pacijenta prikupite 1 ml venske krvi direktno u svaku QF-CMV epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi.**
 - Pošto epruvete od 1 ml relativno sporo uzimaju krv, zadržite epruvetu na igli oko 2–3 sekunde nakon što se punjenje naizgled završi, kako biste bili sigurni da je uzeta dovoljna količina.
Crna oznaka sa strane epruvete ukazuje na zapreminu punjenja od 1 ml. QF-CMV epruvete za prikupljanje uzoraka krvi su proverene za zapremine od 0,8 do 1,2 ml. Ako nivo krvi u nekoj od epruveta nije blizu linije indikatora, preporučuje se uzmete drugi uzorak.
 - Potvrđeno je da QF-CMV epruvete za prikupljanje uzoraka krvi prikupljaju između 0,8 ml i 1,2 ml na visinama do 810 metara (2650 stopa) iznad nivoa mora. Iznad ove visine, korisnici moraju da se uvere da se krv prikuplja u svaku epruvetu u okviru ovih ograničenja. Ako ipak dođe do uzimanja male količine krvi, možete da uzmete krv pomoću šprica i prenesete 1 ml u svaku od 3 epruvete. Iz bezbednosnih razloga, najbolji način za to je da se ukloni igla šprica uz praćenje odgovarajućih bezbednosnih procedura, da se uklone poklopci sa tri QF-CMV epruvete i doda 1 ml krvi u svaku od njih (do crne oznake sa strane epruvete). Vratite poklopce epruveta i čvrsto ih zatvorite, a zatim promešajte kao što je opisano u nastavku.
 - Ako se krv prikuplja pomoću leptir igle, morate da koristite epruvetu za „pročišćavanje“ kako biste se uverili da je cev popunjena krvlju pre upotrebe QF-CMV epruveta za prikupljanje krvi.
2. **Odmah nakon popunjavanja epruveta, protresite ih deset (10) puta dovoljno jako da se uverite da je cela unutrašnja površina epruvete prekrivena krvlju kako bi se agensi na zidovima epruvete rastvorili.**
 - Epruvete bi trebalo čuvati na temperaturi od 17 °C do 25 °C u vreme punjenja.
 - Prejako protresanje može da ošteti sloj gela i dovede do pogrešnih rezultata.

3. Označite epruvete na odgovarajući način.
4. Epruvete moraju da se prenesu u inkubator sa temperaturom od $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 16 sati nakon prikupljanja uzorka. Uzorke krvi nemojte da stavljate u frižider ili u zamrzivač.

Uputstva za upotrebu

Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme

1. Ako se krv ne inkubira odmah nakon prikupljanja, mešanje epruveta mora da se ponovi neposredno pre inkubacije, kao što je opisano u 2. koraku prethodnog odeljka.
2. Inkubirajte epruvete u USPRAVNOM položaju na 37 °C u periodu od 16 do 24 sata. Inkubator ne zahteva CO_2 ili dodatnu vlagu.
3. Nakon inkubacije, epruvete za prikupljanje uzoraka krvi mogu da se čuvaju na temperaturi od 2 °C do 27 °C najviše 3 dana pre sledećeg koraka. Nakon inkubacije epruveta na temperaturi od 37 °C , centrifugirajte epruvete 15 minuta na 2000 do 3000 RCF (g). Sloj gela će odvojiti ćelije od plazme. Ukoliko ne dođe to toga, epruvete je potrebno ponovo centrifugirati na većoj brzini.
 - Plazma može da se prikupi i bez centrifugiranja, ali je potreban dodatni oprez da bi se plazma uklonila bez remećenja ćelija.
4. Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.
 - Uzorke plazme prikupljajte isključivo pomoću pipete.
 - Uzorci plazme mogu da se ubace direktno iz centrifugiranih epruveta za prikupljanje uzoraka krvi u QF-CMV ELISA ploču, čak i kada se koriste automatizovane ELISA radne stanice.
 - Uzorci plazme smeju da se čuvaju najviše 28 dana na temperaturi od 2 °C do 8 °C ili, ako je plazma izolovana, mogu da se čuvaju tokom dužeg vremenskog perioda na temperaturi manjoj od -20 °C (ako je moguće, manjoj od -70 °C) u epruvetama ili u kontejnerima za skladištenje plazme.

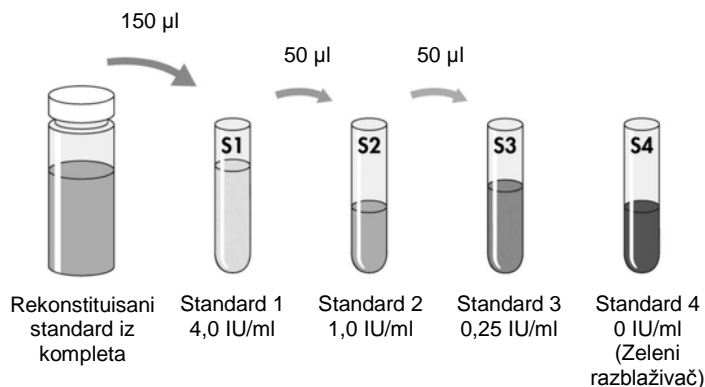
Faza 2 – QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100X koncentrovanog konjugata, moraju da se dovedu na sobnu temperaturu (od 17 °C do 27 °C) pre korišćenja. Planirajte najmanje 60 minuta za nivelisanje temperature.
2. Iz okvira uklonite suvišne trake, vratite ih u foliju, a zatim čuvajte u frižideru dok ne budu potrebne. Odvojite najmanje jednu traku za QF-CMV ELISA standarde i dovoljno traka za broj pacijenata koji se testiraju. Nakon korišćenja, sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.
3. Rekonstituišite suvo zamrznuti standard iz kompleta pomoću određene količine dejonizovane ili destilovane vode koja je naznačena na etiketi bočice standarda. Mešajte lagano da biste smanjili stvaranje pene i uverite se da je u potpunosti rastopljen. Rekonstitucija standarda na navedeni volumen proizvodi rastvor sa koncentracijom od 8,0 IU/ml.

4. Kriva standarda se priprema pomoću 3 rastvora standarda iz kompleta i jednog samog zelenog razblaživača koji predstavlja standard 4 (0 IU/ml).

Pomoću rekonstituisanog standarda iz kompleta proizvedite seriju rastvora od 3 koncentracije IFN- γ proteina. Razblažite u zelenom razblaživaču iz kompleta (pogledajte sliku 1). Standardi bi trebalo da se testiraju najmanje u dva primerka; naredni koraci generišu dovoljno volumena za to.

- Označite 4 epruvete „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- Dodajte 150 μ l zelenog razblaživača u 4 epruvete (S1–S4).
- Dodajte 150 μ l standarda iz kompleta u S1 i dobro promešajte.
- Prenesite 50 μ l iz S1 u S2 i dobro promešajte.
- Prenesite 50 μ l iz S2 u S3 i dobro promešajte.
- Sam zeleni razblaživač služi kao nulti standard (S4).



Slika 1. Priprema krive standarda. Pripremite sveže rastvore standarda iz kompleta za svaku ELISA sesiju.

- Rekonstituišite zamrznuti QuantiFERON 100X koncentrovani konjugat pomoću 0,3 ml dejonizovane ili destilovane vode. Mešajte lagano da biste smanjili stvaranje pene i uverite se da je konjugat u potpunosti rastopljen.**
- Konjugat spreman za upotrebu priprema se razređivanjem potrebne količine rekonstituisanog 100X koncentrovanog konjugata u zelenom razblaživaču kao što je navedeno u tabeli 1 „Priprema konjugata“.**
 - Dobro promešajte, ali pažljivo da biste izbegli stvaranje pene.
 - Vratite sav neiskorišćen 100X koncentrovani konjugat na temperaturu od 2 °C do 8 °C odmah nakon upotrebe.
 - Koristite samo zeleni razblaživač.

Tabela 1. Priprema konjugata

Broj traka	Zapremina 100X koncentrovanog konjugata	Zapremina zelenog razblaživača
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. **Pre testa pomešajte plazmu da biste se uverili da je IFN- γ ravnomerno raspoređen u svakom uzorku. Pored toga, plazme za CMV i mitogen razblažite u odnosu 1/10 u zelenom razblaživaču (10 µl plazme pomešano sa 90 µl zelenog razblaživača) ako su potrebni kvantitativni rezultati. Nulta plazma ne sme da se razblažuje.**

Preporučuje se testiranje sledećih uzoraka:

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

Međutim, QuantiFERON-CMV softver za analizu podržava i sledeće opcije za uzorke pacijenata:

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

8. **Dodajte 50 µl sveže pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuća ELISA udubljenja pomoću višekanalne pipete.**
9. **Dodajte 50 µl uzoraka plazme u odgovarajuća udubljenja pomoću višekanalne pipete. Na kraju, dodajte po 50 µl standarda od 1 do 4.**
10. **Temeljno pomešajte rastvor i uzorke plazme/standarde korišćenjem šejkera za mikroploče tokom 1 minuta.**
11. **Stavite poklopac preko svake ploče i inkubirajte na sobnoj temperaturi (od 17 °C do 27 °C) tokom 120 ± 5 minuta.**
- Ploče ne smeju da se izlažu direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije.

12. **Tokom inkubacije, razblažite jedan deo 20X koncentrovanog pufera za ispiranje sa 19 delova dejonizovane ili destilovane vode i dobro promešajte. Obezbeđeno je dovoljno 20X koncentrovanog pufera za ispiranje za pripremu 2 litra pufera za ispiranje spremnog za upotrebu.**
Isperite udubljenja sa **400 µl** pufera za ispiranje spremnog za upotrebu tokom najmanje 6 ciklusa. Preporučuje se upotreba automatskog uređaja za pranje ploče.
 - Detaljno pranje je veoma važno za učinak testa. Uverite se da je svako udubljenje **u potpunosti ispunjeno** puferom za ispiranje do vrha udubljenja tokom svakog ciklusa pranja. Preporučuje se potapanje od najmanje 5 sekundi između ciklusa.
 - Potrebno je da se standardno laboratorijsko sredstvo za dezinfekciju doda u odvodni rezervoar i da se prate procedure za dekontaminaciju potencijalno zaraznog materijala.
13. **Lupkajte ploče sa udubljenjima dok su okrenute nadole, prema upijajućem papiru, kako biste otklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100 µl rastvora enzimskog supstrata u svaku posudu i dobro promešajte pomoću šejkera za mikroploče.**
14. **Stavite poklopac preko svake ploče i inkubirajte na sobnoj temperaturi (od 17 °C do 27 °C) tokom 30 minuta.**
 - Ploče ne smeju da se izlažu direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije.
15. **Nakon inkubacije od 30 minuta, dodajte 50 µl enzimskog rastvora za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje i promešajte.**
 - Enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije trebalo bi da se doda u udubljenja istim redosledom i istom brzinom kao i supstrat u koraku 13.
16. **Izmerite optičku gustinu svakog udubljenja u roku od 5 minuta od dodavanja rastvora za zaustavljanje reakcije pomoću čitača za mikroploče sa filterom od 450 nm i referentnim filterima od 620 nm do 650 nm. Vrednosti optičke gustine se koriste za izračunavanje rezultata.**

Izračunavanje i tumačenje rezultata

QuantiFERON-CMV softver za analizu koji se koristi za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata obezbeđuje kompanija QIAGEN, a dostupan je na adresi www.QuantiFERON.com.

Ovaj softver obavlja procenu kontrole kvaliteta testa, generiše krivu standarda i obezbeđuje rezultate testiranja za svakog pacijenta, kao što je detaljno navedeno u odeljku „Tumačenje rezultata“.

Kao alternativno rešenje u odnosu na QF-CMV softver za analizu, rezultati mogu da se utvrde i korišćenjem sledećeg metoda.

Generisanje krive standarda

Odredite srednju vrednost optičke gustine replikata standarda iz kompleta na svakoj ploči.

Konstruišite $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ krivu standarda tako što ćete grafički prikazati $\log_{(e)}$ srednje vrednosti optičke gustine (y-osa) u odnosu na $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IU/ml (x-osa), izuzimajući nulti standard iz ovog proračuna. Regresionom analizom izračunajte najbolju liniju krive standarda.

Pomoću te krive standarda odredite koncentraciju IFN- γ proteina (IU/ml) za svaki od uzoraka plazme za testiranje, koristeći vrednost optičke gustine svakog uzorka.

Ove proračune možete da obavite pomoću softverskih paketa dostupnih sa čitačima za mikroploču i standardnih unakrsnih tabela ili programa za statistiku (kao što je Microsoft[®] Excel[®]). Preporučuje se da se ovi paketi koriste za izračunavanje regresione analize, koeficijenta varijacije (%CV) za standarde, koeficijenta korelacije (r) krive standarda.

Kontrola kvaliteta testa

Tačnost rezultata testa zavisi od pravilnog formiranja krive standarda. Zbog toga je neophodno da se ispituju rezultati dobijeni iz standarda da bi rezultati testiranja uzoraka mogli da se protumače.

ELISA test je važeći ako su ispunjeni sledeći uslovi:

- Srednja vrednost optičke gustine za standard 1 mora da bude $\geq 0,600$.
- %CV za ponovljene vrednosti optičke gustine za standard 1 i standard 2 mora da bude $< 15\%$.
- Ponovljene vrednosti optičke gustine za standarde 3 i 4 ne smeju da odstupaju više od 0,040 jedinica optičke gustine od svoje srednje vrednosti.
- Koeficijent korelacije (r) izračunat iz srednjih vrednosti apsorpcije standarda mora da bude $\geq 0,98$.

Ako gorenavedeni kriterijumi nisu ispunjeni, test nije važeći i mora da se ponovi.

Srednja vrednost optičke gustine nultog standarda (zeleni razblaživač) mora da bude $\leq 0,150$. Ako je srednja vrednost optičke gustine $> 0,150$, mora da se istraži procedura ispiranja ploče.

Tumačenje rezultata

QuantiFERON-CMV rezultati se tumače na osnovu sledećih kriterijuma:

CMV minus nulta (IU/ml)*	Mitogen minus nulta (IU/ml)	QF-CMV rezultat	Izveštaj/tumačenje
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Nereaktivno	Imunitet za CMV NIJE otkriven
$\geq 0,2$	Bilo koja vrednost	Reaktivno	Imunitet za CMV je otkriven
$< 0,2$	$< 0,5$	Nejasno [†]	Nejasan rezultat za postojanje odgovora na CMV

* IFN- γ odgovori na CMV antigen i pozitivnu kontrolu mitogenom često mogu da budu izvan opsega čitača mikroploče. Ovo nema uticaja na kvalitativne rezultate.

[†] Pogledajte odeljak „Rešavanje problema“ da biste videli moguće uzroke.

Ograničenja

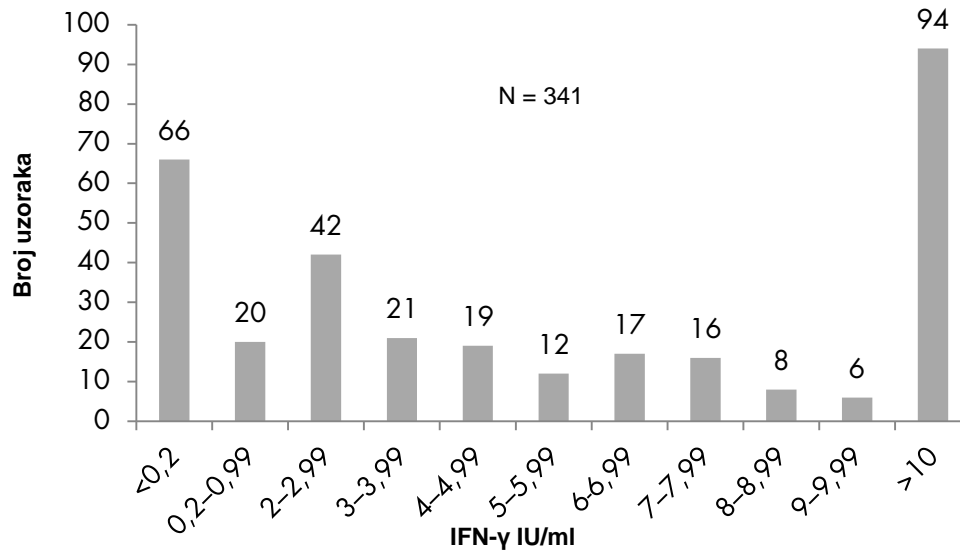
Rezultati QuantiFERON-CMV testiranja moraju da se koriste zajedno sa epidemiološkom istorijom svakog pojedinca, trenutnim medicinskim statusom i drugim dijagnostičkim procenama.

Nepouzdana ili nejasni rezultati mogu da se pojave u sledećim slučajevima:

- Došlo je do odstupanja od procedure opisane u uputstvu za upotrebu.
- Nivo proteina IFN- γ u nultoj epruveti je previsok.
- Od uzimanja uzoraka krvi do inkubacije na 37 °C je proteklo više od 16 sati.

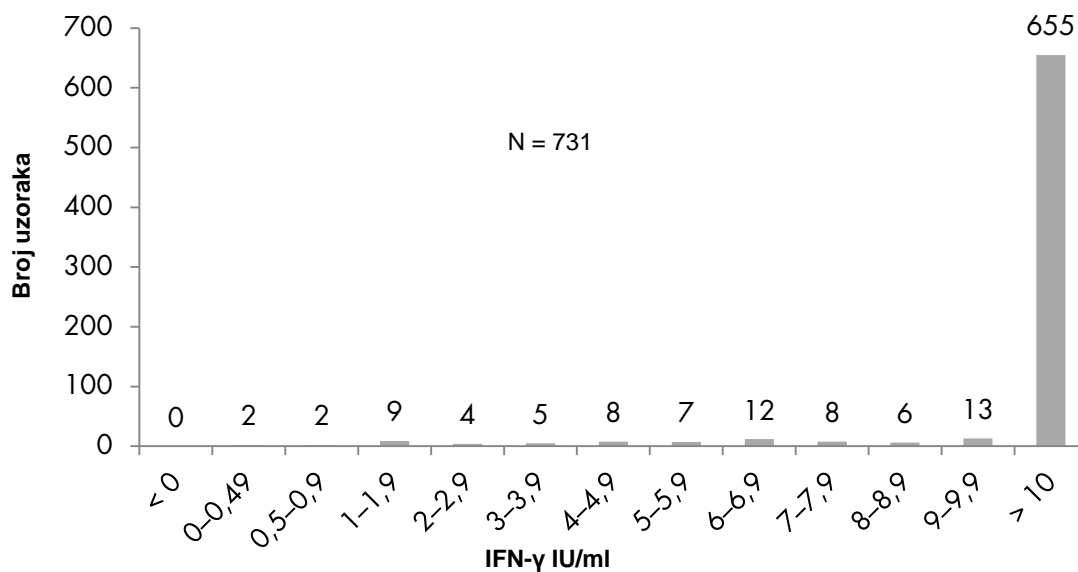
Očekivane vrednosti

Očekivane vrednosti proteina IFN- γ kada se koristi softver QuantiFERON-CMV dobijene su testiranjem 591 uzorka zdravih odraslih osoba, od kojih je 341 bilo CMV seropozitivno, a 250 seronegativno. Kod 250 zdravih odraslih osoba bez CMV infekcije, što je određeno anti-CMV serologijom (CMV seronegativni), 100% subjekata imalo je IFN- γ odgovor < 0,2 IU/ml u epruveti sa CMV antigenom (minus nulta). Raspodela epruvete sa CMV antigenom (minus nulta) za 341 zdravog subjekta sa CMV infekcijom, što je određeno anti-CMV serologijom (CMV seropozitivni), prikazana je na slici 2.



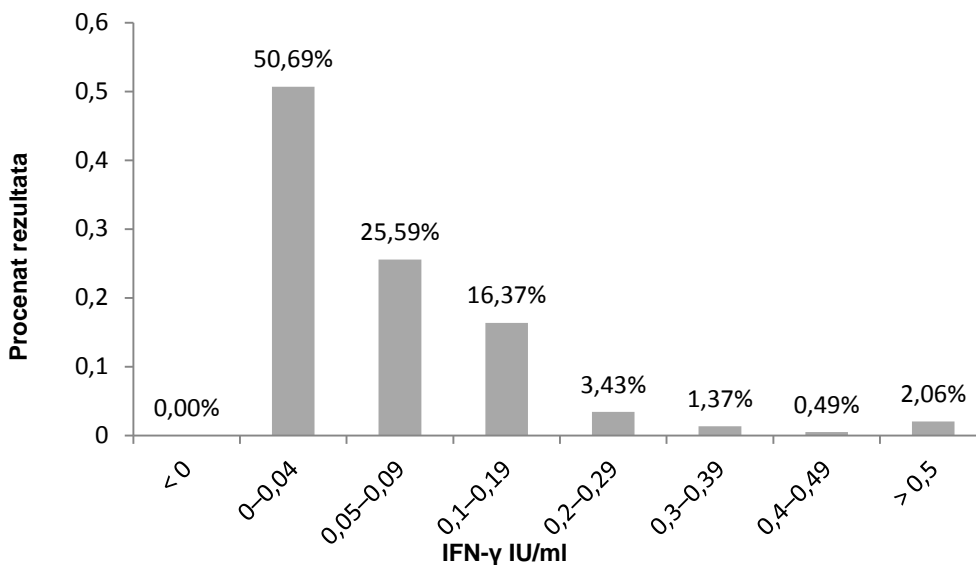
Slika 2. Raspodela IFN- γ odgovora za CMV-nulta kod seropozitivnih zdravih subjekata (n=341).

Raspodela mitogena (minus nulta pozadina) rezultuje 731 normalnim uzorkom krvi zdravih odraslih osoba, bez obzira na poznatu CMV infekciju, kao što je prikazano na slici 3. Vrednost za mitogen (minus nulta) koja je manja od 0,5 IU/ml ukazuje na grešku u testu ili na to da je osoba u imunokompromitovanom stanju. Kod zdrave populacije, samo 2/731 rezultata spada u ovu kategoriju.



Slika 3. Raspodela IFN- γ odgovora za mitogen-nulta kod zdravih odraslih osoba (n = 731).

Očekivane vrednosti za nulte epruvete prikazane su na slici 4. Podaci su dobijeni iz 1020 uzoraka plazme zdravih odraslih osoba testiranih QuantiFERON-CMV ELISA testom.



Slika 4. Raspodela (izražena kao % populacije) IFN-γ odgovora za nultu kod zdravih odraslih subjekata (n = 1020).

Karakteristike učinka

Komparativno testiranje

Granična vrednost testa za otkrivanje prethodne izloženosti CMV virusu koristeći QF-CMV ustanovljena je nakon analize rezultata dobijenih od grupe zdravih subjekata (n = 223) gde su QF-CMV rezultati upoređivani sa rezultatima CMV seroloških testiranja. ROC analiza utvrdila je da je granična vrednost testa od 0,04 IU/ml (nakon oduzimanja nulte) dala optimalne pozitivne i negativne komparativne vrednosti za QF-CMV (oblast ispod krive = 0,9679 [95%CI = od 0,9442 do 0,9915, $p < 0,0001$]) i na taj način predstavila graničnu vrednost pri kojoj se ovaj test najefikasnije obavlja kod zdrave populacije.

Kod komparativnog testiranja, učinak QF-CMV testa se upoređuje sa SeraQuest CMV IgG serološkim testom (Quest International). QF-CMV test pokazao je poklapanje od 95% (294 od 310 pojedinaca) sa komparativnim anti-HCMV serološkim testom kod zdravih pojedinaca, gde nijedan od 149 seronegativnih donora nije pokazao reaktivnost na QF-CMV, a 145 od 161 seropozitivnog donora je pokazalo reaktivan IFN-γ odgovor. Ukupno pozitivno poklapanje bilo je 90%, uz vrednost negativnog poklapanja od 100%. Nivo poklapanja između IFN-γ odgovora na CMV peptide, kako je izmerio QF-CMV kod zdravih dobrovoljaca i anti-CMV serološkog statusa ovih subjekata izmerenog pomoću SeraQuest CMV IgG serološkog testa prikazan je u tabeli 2.

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

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

Granična vrednost testa

Preporučena granična vrednost kliničkog testiranja za ovaj test iznosi 0,2 IU/ml u epruveti za CMV antigen (minus nulta), iako drugačije granične vrednosti mogu da se utvrde za druge kliničke potrebe. Razlog leži u osnovnim imunološkim razlikama između normalne populacije za testiranje i populacija u kojima se testiranje smatra klinički korisnim – posebno kod imunosuprimiranih osoba koje su usled toga izložene riziku od razvoja simptomatske CMV infekcije i/ili bolesti. Kod pojedinaca sa visokim rizikom, korisnost QF-CMV testa ogleda se u preciznom otkrivanju nivoa imuniteta za CMV kod ovih subjekata jer nedostatak imuniteta može da bude povezan sa razvojem CMV bolesti (1–5, 7, 8, 11–16).

Kliničke studije

Pošto ne postoji određeni standard za potvrđivanje ili izuzimanje dijagnoze za infekciju citomegalovirusom, procena osetljivosti i specifičnosti za QF-CMV ne može praktično da se oceni. Specifičnost i osetljivost za QF-CMV približno se određuje na osnovu procene nivoa poklapanja između IFN- γ odgovora na CMV peptide, koje je izmereno QF-CMV testom kod zdravih dobrovoljaca, i anti-CMV serološkog statusa tih subjekata određenog pomoću CMV IgG serološkog testa.

Specifičnost za QF-CMV približno se određuje na osnovu procene stope lažno pozitivnih rezultata (QF-CMV reaktivni odgovor) kod zdravih dobrovoljaca bez dokaza o prethodnoj izloženosti CMV virusu (CMV seronegativne osobe). Osetljivost se približno određuje procenom zdravih dobrovoljaca sa dokazima o prethodnoj izloženosti CMV virusu (CMV seropozitivne osobe). Iako QF-CMV koristi veliki broj epitopa specifičnih za CMV iz različitih CMV proteina i na taj način obezbeđuje široku kliničku primenu na veliki deo populacije sa različitim haplotipovima HLA klase I, pokrivenost ovih peptida nije 100%. Pošto su HLA haplotipovi subjekata testiranih na CMV serologiju bili nepoznati, od malog procenta serološki pozitivnih pojedinaca se očekuje da budu neresponsivni na QF-CMV epruvete.

Specifičnost

U studiji sprovedenoj kod zdravih subjekata bez evidencije o prethodnoj izloženosti CMV virusu (CMV seronegativni pojedinci gde je $n = 250$), nivo poklapanja između IFN- γ odgovora na CMV peptide izmerenog QF-CMV testom i anti-CMV seroloških informacija iznosi 100%.

U svim drugim procenama specifičnosti obavljenim kod primalaca transplantacije čvrstih organa (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), primalaca transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (7, 13) i pacijenata inficiranih HIV virusom (2), nivo poklapanja između INF- γ odgovora na CMV peptide izmeren QF-CMV testom i anti-CMV serologijom stalno je imao vrednost od 100%.

Osetljivost

U studiji sprovedenoj kod zdravih subjekata bez evidencije o prethodnoj izloženosti CMV virusu (CMV seropozitivni pojedinci gde je $n = 341$), nivo poklapanja između IFN- γ odgovora na CMV peptide izmerenog QF-CMV testom i anti-CMV seroloških informacija iznosi 80,6% (275/341). Primećeno neslaganje može da se pojavi usled korišćenja više granične vrednosti za testiranje (0,2 IU/ml), lažno pozitivnih rezultata CMV serologije ili nereaktivnosti subjekta na CMV peptide uključene u testiranje.

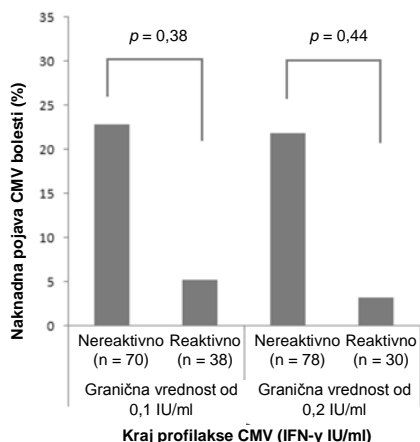
Kod procene osetljivosti obavljene kod primalaca transplantacije čvrstih organa (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), primalaca transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (7, 13) i kod pacijenata inficiranih HIV virusom (2), otkriven je niži nivo poklapanja između IFN- γ odgovora na CMV peptide izmeren QF-CMV testom i CMV seropozitivnih odgovora kod ovih pacijenata. Niži nivo poklapanja može da bude rezultat lažno pozitivnih rezultata CMV serologije, nereaktivnosti pacijenta na CMV peptide uključene u testiranje ili odsustva reaktivnih T ćelija kod ovih pacijenata usled imunosupresije.

Studije koje ističu kliničku upotrebu

Serologija i QF-CMV u opisu svoje predviđene upotrebe navode omogućavanje otkrivanja imuniteta na CMV. U slučajevima transplantacije, CMV serologija se često koristi pre transplantacije za procenu rizika od komplikacija izazvanih CMV virusom do kojih dolazi nakon transplantacije kod primaoca organa, ali ima ograničenu primenu nakon same transplantacije. Druga mogućnost je korišćenje QF-CMV testa kod primalaca transplantacije kako bi se procenio nivo imuniteta za CMV kod tih pacijenata kada postoji rizik od razvoja simptomatične CMV infekcije i/ili bolesti usled imunosupresije (6, 9–11).

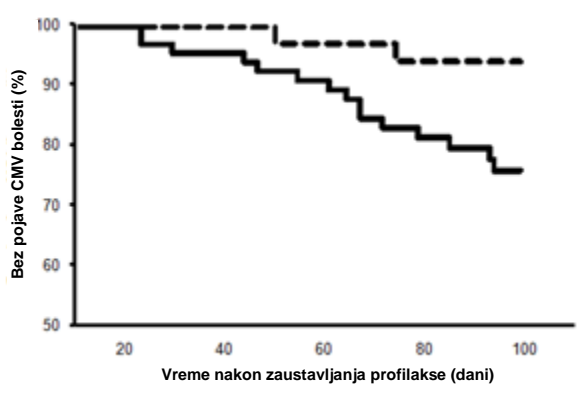
Mnoge objavljene kliničke studije za različite slučajeve transplantacije pokazale su korisnost testa QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

U velikoj studiji obavljenoj sa 108 primalaca transplantiranih čvrstih organa (4), pacijenti sa QF-CMV reaktivnim rezultatom na završetku anti-CMV profilakse imali su značajno nižu stopu zakasnelih prvih simptoma zaraze od onih koji su imali QF-CMV nereaktivan rezultat (5,3% u poređenju sa 22,9% odnosno, $p=0,044$) (Slika 5).



Slika 5. Stope zakasnele pojave prvih simptoma CMV zaraze kod pacijenata sa QuantiFERON-CMV reaktivnim rezultatom u poređenju sa QuantiFERON-CMV nereaktivnim rezultatom na kraju profilakse. Podaci su dobijeni na osnovu rada Kumar et al.(4)

Pored toga, pacijenti sa reaktivnim QF-CMV testom ne ispoljavaju znake bolesti izazvane CMV virusom nakon završetka profilakse češće i tokom dužeg perioda (slika 6), što ukazuje na to da QF-CMV test može da se koristi za identifikaciju osoba koje imaju rizik od razvoja zakasnelih prvih simptoma CMV bolesti.

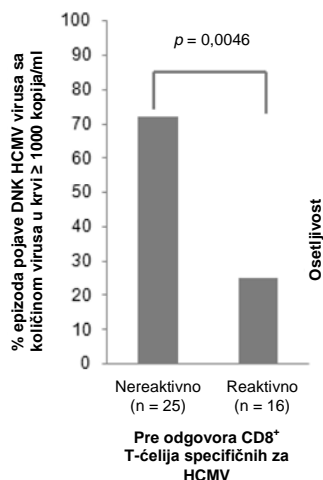


Slika 6. Vreme razvoja CMV bolesti kod pacijenata sa QuantiFERON-CMV reaktivnim rezultatom (označeno isprekidanom crtom) u poređenju sa QuantiFERON-CMV nereaktivnim rezultatom (označeno pravom linijom) na kraju profilakse. Podaci su dobijeni na osnovu rada Kumar et al.(4)

Ova studija je takođe istakla da u grupi pacijenata podvrgnutih transplantaciji koji imaju najveći rizik od razvoja CMV bolesti (CMV seronegativni primaoci organa koji su organ dobili od CMV seropozitivnog donatora, tj. D+/R-), QF-CMV reaktivni rezultat u bilo kom trenutku nakon profilakse ukazuje na to da postoji 90% mogućnosti da se ne dobije CMV bolest.

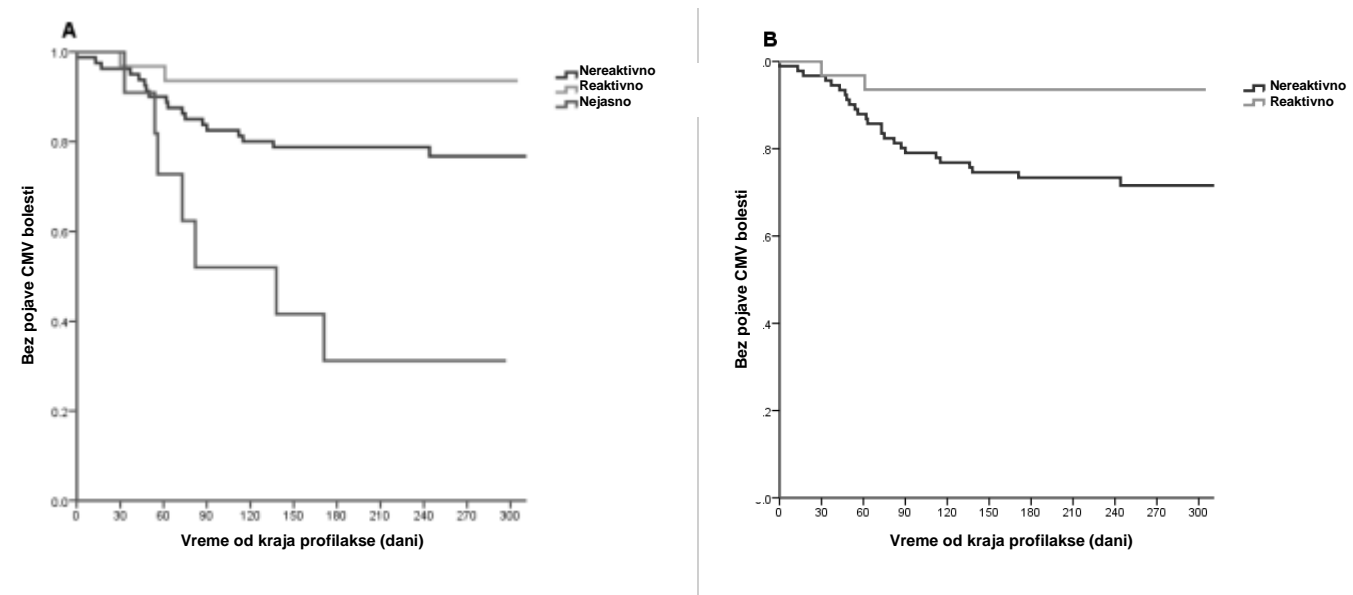
U studiji obavljenoj na 37 pacijenata sa transplantiranim čvrstim organima (12), procena CMV specifičnih odgovora CD8⁺ T-ćelija dobijena QF-CMV testom doprinela je predviđanju spontanog nestajanja virusa, u poređenju sa napretkom CMV bolesti, nakon povećanja vrednosti u CMV viremiji. U ovoj studiji, kod 24 od 26 pacijenata (92,3%) sa QF-CMV reaktivnim rezultatom CMV virus je spontano nestao, dok je samo 5 od 11 (45,5%) pacijenata sa QF-CMV nereaktivnim rezultatom imalo isti ishod.

Studija obavljena sa 67 primalaca transplantacije pluća kod kojih su procenjivane epizode CMV viremije nakon transplantacije (14), primećeno je da su 18 od 25 (72%) CMV epizoda viremije dolazile nakon nereaktivnog QF-CMV rezultata, u poređenju sa 4 od 16 (25%) epizoda kojima je prethodio reaktivni QF-CMV odgovor (Fišerov egzaktni test, $p = 0,0046$, pogledajte sliku 7).



Slika 7. Statistička analiza odgovora CD8⁺ T ćelija specifičnih za CMV koje je otkrio QuantiFERON-CMV test i razvoja CMV viremije (Fišerov egzaktni test, $p = 0,0046$). Podaci su dobijeni na osnovu rada Weseslindtner et al (14).

U velikoj studiji sa više centara u kojoj je učestvovalo 127 D+/R- primalaca transplantacije čvrstog organa (15), od kojih su svi primili antivirusnu profilaksu sa QF-CMV reaktivnim rezultatom (granična vrednost testa od 0,1 IU/ml) u bilo kom trenutku nakon završetka anti-CMV profilakse, imali su značajno nižu stopu zakasnelih prvih simptoma bolesti u periodu od 12 meseci nakon transplantacije, u poređenju sa osobama koje su imale QF-CMV nereaktivni rezultat i nejasan rezultat (6,4% u poređenju sa 22,2% u poređenju sa 58,3%, tim redosledom, $p < 0,001$). Kada se nejasni rezultati klasifikuju kao da su „nereaktivni“, procenat naknadnog pojavljivanja CMV bolesti iznosi 6,4% u odnosu na 26,8%, $p = 0,024$ (pogledajte sliku 8). Pozitivne i negativne prediktivne vrednosti testa QF-CMV za zaštitu od CMV bolesti bile su 0,90 (95% CI 0,74-0,98) i 0,27 (95% CI 0,18-0,37) tim redosledom, što ukazuje na to da je QuantiFERON-CMV reaktivni rezultat u bilo kom trenutku posle profilakse ukazivao na to da postoji 90% šansi da ne dođe do CMV zaraze. Ova studija je pokazala da QF-CMV test može da se koristi da bi se predvidelo da li pacijenti imaju nizak, srednji ili visok rizik od naknadnog razvoja CMV bolesti nakon profilakse.



Slika 8. Kaplan-Mejer krive pojave CMV bolesti prema rezultatu QF-CMV testa.

A Upoređeni reaktivni, nereaktivni i nejasni rezultati QF-CMV testa (log-rank test, $p < 0,001$).

B Reaktivni u poređenju sa nereaktivnim, gde su nejasni rezultati posmatrani kao „nereaktivni“ (log-rank test, $p = 0,024$).

U studiji koja je obuhvatala 55 primalaca transplantiranog čvrstog organa (16), gde je analiziran odnos između QF-CMV rezultata pre transplantacije i CMV epizoda replikacije nakon transplantacije, otkrivena je veća stopa replikacije CMV virusa kod R(+) primalaca sa QF-CMV nereaktivnim rezultatom pre transplantacije (7/14 ili 50%), u poređenju sa onim R(+) primaocima sa QF-CMV reaktivnim rezultatom (4/30 ili 13,3%).

Ova studija je pokazala da primaoci koji su bili QF-CMV nereaktivni u periodu pre transplantacije i koji su dobili organ od CMV seropozitivnog donatora imaju deset puta veći rizik od CMV replikacije u poređenju sa primaocima koji su bili QF-CMV reaktivni u periodu pre transplantacije (prilagođeni odnos verovatnoće 10,49, 95% CI 1,88–58,46), te da QF-CMV testiranje pre transplantacije može da bude korisno za predviđanje rizika od CMV replikacije nakon transplantacije i da na taj način omogući individualizaciju upravljanja CMV infekcijom nakon transplantacije čvrstog organa.

Veliki broj drugih studija koje istražuju otkrivanje odgovora CD8⁺ T ćelija specifičnih za CMV pomoću QF-CMV testa u grupi primalaca transplantacije je završeno (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) ili su trenutno u toku širom sveta.

Smernice međunarodnog koncenzusa o upravljanju citomegalovirusom kod transplantacije čvrstih organa

Važnost praćenja imuniteta specifičnog za CMV priznata je i objavljena u članku „Smernice međunarodnog koncenzusa o upravljanju citomegalovirusom kod transplantacije čvrstih organa“ (6). Te međunarodne smernice koje je razvila grupa stručnjaka za CMV i transplantaciju čvrstih organa, pod nadzorom Odeljenja za infektivne bolesti u Društvu za transplantacije, predstavljaju dokaze i saglasne smernice zasnovane na stručnim mišljenjima o upravljanju CMV infekcijom, a odnose se na: dijagnostiku, imunologiju, prevenciju i lečenje.

U ovim smernicama zaključuje se da „Praćenje imuniteta u pogledu odgovora T ćelija specifičnih za CMV može kod pojedinaca da predvidi rizik od CMV zaraze nakon transplantacije i može da bude koristan za usmeravanje profilakse i preventivne terapije“ (6).

Pored toga, smernice sadrže i preporuke u vezi sa karakteristikama idealnog testa za praćenje imuniteta, koje obuhvataju sledeće:

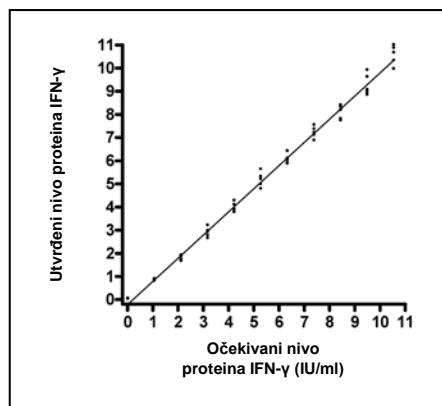
- Mogućnost procene količine i funkcije CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija kod primaoca transplantacije
- Mogućnost merenja vrednosti za IFN- γ
- Jednostavnost za obavljanje, isplativost i mogućnost ponavljanja
- Brzo dobijanje rezultata
- Lako slanje uzoraka u specijalizovane referentne laboratorije

QF-CMV ispunjava sve kriterijume navedene u ovim smernicama i predstavlja jedini standardizovani test za praćenje imunološkog sistema koji može da otkrije protein IFN- γ , specifičan za CMV.

Karakteristike učinka testa

Metod merenja koncentracije proteina IFN- γ koji QF-CMV ELISA test koristi prikazan je kao linearan od nula do 10 IU/ml (slika 9). Studija linearnosti je obavljena tako što je na ploču za ELISA test nasumično postavljeno 5 replikata za 11 uzoraka plazme sa poznatom koncentracijom proteina IFN- γ .

Test QF-CMV ELISA ne pokazuje da postoji efekat prozona pri koncentracijama proteina IFN- γ od najviše 100.000 IU/ml.



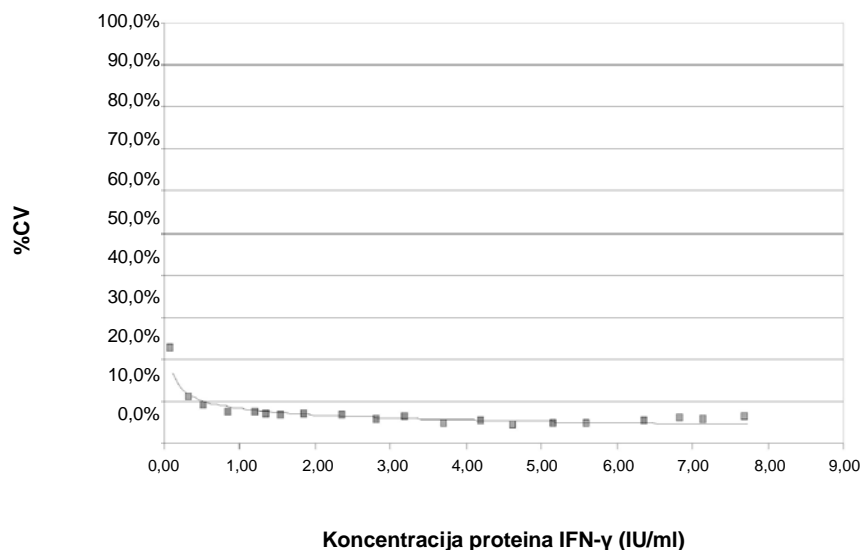
Slika 9. Profil linearnosti testa QF-CMV ELISA utvrđen na osnovu testiranja 5 replikata za 11 uzoraka plazme sa poznatom koncentracijom proteina IFN- γ . Prava linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99.

Nepreciznost unutar testa i između testova (%CV) za QF-CMV ELISA test procenjena je na osnovu testiranja 20 uzoraka plazme sa promenljivim koncentracijama proteina IFN- γ u 3 replikacije, u 3 laboratorije na 3 dana koja nisu uzastopna i od strane 3 operatera. Na taj način, svaki uzorak je testiran 27 puta u 9 nezavisnih testova. Jedan uzorak je bio nulta kontrola i njegova izračunata koncentracija proteina IFN- γ iznosila je 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. Od preostalih 19 uzoraka plazme, opseg koncentracija iznosio je od 0,33 (0,31–0,34) do 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

Nepreciznost tokom obavljanja testa ili između testova procenjena je na osnovu proseka %CV za svaku testiranu plazmu sa IFN- γ proteinom sa svake obrađene ploče (n=9) i iznosi od 4,1 do 9,1 %CV. Prosečni %CV (\pm 95% CI) tokom obrade iznosio je 6,6% \pm 0,6%. Nulta IFN- γ plazma u proseku je iznosila 14,1 %CV.

Ukupna nepreciznost ili nepreciznost između testova određena je poređenjem 27 izračunatih koncentracija IFN- γ proteina za svaki uzorak plazme i iznosila je od 6,6 do 12,3 %CV. Ukupan prosečni %CV (\pm 95% CI) iznosio je 8,7% \pm 0,7%. Nulta IFN- γ plazma pokazala je vrednost od 26,1 %CV. Ovaj nivo varijacija je očekivan zato što je izračunata koncentracija IFN- γ proteina niska, a varijacije u odnosu na nisku koncentraciju će biti veće nego kada je u pitanju visoka koncentracija.

Profil preciznosti QF-CMV ELISA testa prikazan je na slici 10 i pokazuje da se nepreciznost ne povećava sa većim koncentracijama IFN- γ proteina.



Slika 10. Profil preciznosti za QF-CMV ELISA test određen je na osnovu testiranja 20 uzoraka plazme u tri primerka, na 3 dana koja nisu uzastopna, u 3 laboratorije i kod 3 operatera. Linija trenda predstavlja proračun za kvadrate koji se najmanje uklapaju.

Studija koja za cilj ima da utvrdi mogućnost ponavljanja QF-CMV testa obavljena je na osnovu uzoraka krvi 8 subjekata sa nepoznatim CMV statusom. Krv za svakog subjekta prikupljena je u tri kompleta QF-CMV epruveta (3 x nulta, 3 x CMV i 3 x mitogen). Ta tri kompleta epruveta su zatim inkubirana na tri različite lokacije (jedan komplet nultih epruveta, epruveta za CMV i mitogen po lokaciji), kao što je navedeno u uputstvu za upotrebu. Nakon inkubacije od 16 do 24 sata, epruvete su centrifugirane, a plazma izdvojena.

ELISA testovi su naknadno obavljani tri puta na svakoj od tri lokacije, generišući QF-CMV rezultate za svaki subjekat po lokaciji (ukupno 9 rezultata na svim lokacijama). Svaka lokacija je angažovala drugog operatera. Ploče korišćene u studiji nisu uvek bile iz iste serije, ali su bile u okviru važećih datuma roka trajanja.

Mogućnost reprodukcije, u smislu dijagnostičkog statusa (reaktivno, nereaktivno ili nejasno) i numerička vrednost određeni su kod svakog uzorka krvi. Reprodukcija numeričke vrednosti procenjena je samo kod reaktivnih uzoraka (izraženo u %CV), jer su nivoi proteina IFN- γ u nereaktivnim uzorcima bili premali da bi se dobila odgovarajuća precizna procena.

Generalno, mogućnost ponavljanja dijagnoze iznosila je 100%, gde je QF-CMV dijagnostički status svih 8 dobrovoljaca bio reprodukovan na svim lokacijama i u svim prilikama, bez prijavljenih uzoraka sa nejasnim rezultatom. Mogućnost ponavljanja za reaktivne uzorke bila je prihvatljiva i u okviru lokacije i između lokacija. Srednja vrednost %CV koeficijenta za svaku lokaciju testiranja iznosila je 4,5% (lokacija 1), 5,9% (lokacija 2) i 7,3% (lokacija 3). Ukupno, vrednost za %CV između lokacija iznosila je 5,9% za svih 5 reaktivnih uzoraka. Vrednosti procenta koeficijenta varijacije ispod 10% smatraju se odličnim.

Tehničke informacije

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati mogu da budu u vezi sa stanjem imunološkog sistema testiranog pojedinca, ali mogu i da budu u vezi sa nekim tehničkim faktorima:

- Od uzimanja uzoraka krvi do inkubacije na 37 °C je proteklo više od 16 sati.
- Krv je čuvana izvan preporučenog temperaturnog opsega (od 17 °C do 27 °C).
- Epruvete za prikupljanje krvi nisu dovoljno mešane.

Ako sumnjate da je došlo do tehničkih problema prilikom prikupljanja uzoraka krvi ili prilikom rukovanja njima, ponovite ceo QF-CMV test na novim uzorcima krvi. Može da se obavi ponavljanje ELISA testiranja stimulisanih plazmi ako se sumnja na odstupanje od procedure za ELISA test. Nejasni rezultati (dobijeni na osnovu niskih vrednosti mitogena) neće se promeniti prilikom ponavljanja, osim u slučaju da je došlo do greške prilikom ELISA testiranja.

Vodič za rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može da bude koristan pri rešavanju svih problema do kojih može doći. Više informacija potražite u tehničkim informacijama navedenim na adresi: www.QuantiFERON.com. Kontakt informacije možete pronaći na strani 27 i na poslednjoj strani.

Rešavanje problema sa ELISA testom

Očitavanje niske optičke gustine za standarde

Mogući uzrok	Rešenje
a) Greška u razređivanju standarda	Uverite se da su rastvori standarda iz kompleta pravilno pripremljeni u skladu sa uputstvima.
b) Greška pri korišćenju pipeta	Uverite se da su pipete kalibrisane i da se koriste u skladu sa uputstvima proizvođača.
c) Temperatura inkubacije je suviše niska	Inkubacija ELISA testova mora da se obavlja na sobnoj temperaturi (od 17 °C do 27 °C).
d) Vreme inkubacije je prekratko	Inkubacija ploče sa konjugatom, standardima i uzorcima trebalo bi da traje 120 ± 5 minuta. Rastvor enzimskog supstrata se inkubira na ploči 30 minuta.
e) Korišćen je neodgovarajući filter za čitač ploče	Ploču se očitava pri 450 nm sa referentnim filterom između 620 i 650 nm.
f) Reagensi su previše hladni	Svi reagensi, osim 100X koncentrovanog konjugata, moraju da se dovedu na sobnu temperaturu pre započinjanja testa. Za to je potreban približno 1 sat.
g) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti	Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100X koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od 3 meseca od datuma rekonstituisanja.

Razvoj nespecifične boje / visoka pozadina

Mogući uzrok	Rešenje
a) Nedovršeno pranje ploče	Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 µl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme potapanja od najmanje 5 minuta između ciklusa.
b) Temperatura inkubacije je suviše visoka	Inkubacija ELISA testova mora da se obavlja na sobnoj temperaturi (od 17 °C do 27 °C).
c) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti	Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100X koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od tri meseca od datuma rekonstituisanja.
d) Rastvor enzimskog supstrata je kontaminiran	Bacite supstrat ako se pojavi plava boja. Obavezno koristite čiste rezervoare za reagens.
e) Mešanje plazme u epruvetama za centrifugiranje pre prikupljanja	Uverite se da su uzorci plazme pravilno izdvojeni iz gela iznad bez pomeranja pipete nagore i nadole i budite pažljivi da ne poremetite materijal na površini gela.

Bibliografija

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

Tehnički servis

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ■ techservice-ap@qiagen.com

Europe ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

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

USA/Canada ■ techservice-na@qiagen.com

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

Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

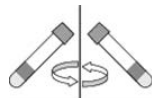
Ova stranica je namerno ostavljena prazna.

Ova stranica je namerno ostavljena prazna.

Skraćena procedura testiranja

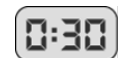
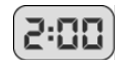
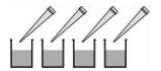
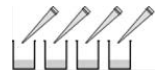
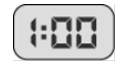
Faza 1 – inkubacija krvi

1. Prikupite krv pacijenata u epruvete i promešajte tako što ćete ih protresti (10) puta dovoljno jako da budete sigurni da je cela unutrašnja površina epruvete prekrivena krvlju kako bi se agensi na zidovima epruvete rastvorili.
2. Inkubirajte epruvete u uspravnom položaju na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ u periodu od 16 do 24 sata.
3. Nakon inkubacije centrifugirajte epruvete tokom 15 minuta pri 2000 do 3000 RCF (g) da biste razdvojili plazmu i crvena krvna zrnca.
4. Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.



Faza 2 – IFN- γ ELISA

1. Kalibrišite ELISA komponente, sa izuzetkom 100X koncentrata konjugata, na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.
2. Rekonstituišite standard iz kompleta na 8,0 IU/ml sa destilovanom ili dejonizovanom vodom. Pripremite četiri (4) rastvora standarda.
3. Rekonstituišite zamrznuti 100X koncentrovani konjugat pomoću destilovane ili dejonizovane vode.
4. Pripremite konjugat spreman za upotrebu u zelenom razblaživaču i dodajte 50 μ l u sva udubljenja.
5. Dodajte 50 μ l uzoraka plazme za testiranje i 50 μ l standarda u odgovarajuća udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Udubljenja operite najmanje 6 puta sa 400 μ l po udubljenju koristeći pufer za ispiranje.
8. Dodajte 100 μ l rastvora enzimskog supstrata u udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.
10. Dodajte 50 μ l enzimskog rastvora za zaustavljanje reakcije u sva udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
11. Pročitajte rezultate na 450 nm sa referentnim filterom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



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

Ugovor o ograničenoj licenci za QuantiFERON-CMV ELISA komplet

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

1. Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučenih komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu i dodatnim protokolima dostupnim na adresi www.qiagen.com. Neke od ovih dodatnih protokola su obezbedili korisnici QIAGEN proizvoda za korisnike QIAGEN proizvoda. Kompanija QIAGEN nije detaljno testirala niti optimizovala te protokole. QIAGEN ne daje garancije za njih niti tvrdi da oni ne krše prava nezavisnih proizvođača.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne garantuje da ovaj komplet i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
3. Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu upotrebu i ne smeju da se ponovo koriste, dorađuju ili ponovo prodaju.
4. Kompanija QIAGEN posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u prethodnom tekstu. QIAGEN može da primeni zabrane ovog Ugovora o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Ugovora o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Da biste videli ažurirane uslove licenciranja, posetite www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, QIAGEN Company, sva prava zadržana.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

