

2019. gada oktobris

QuantiFERON[®]-CMV ELISA iepakojuma ieliktnis



Pilnasiņu IFN- γ tests, kas mēra atbildes reakciju uz cilvēku citomegalovīrusu peptīdu antigēniem



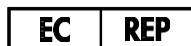
Lietošanai in vitro diagnostikā



0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, ASV. Tel.nr. +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
VĀCIJA

1075110 06. izd.



www.QuantiFERON.com

Saturs

Paredzētais lietojums	5
Kopsavilkums un skaidrojums	5
Procedūras princips.....	6
Laiks, kas nepieciešams analīzes veikšanai	7
Komplektācijā ietvertie materiāli	8
Komplekta saturs	8
Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā	9
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	9
Drošības informācija	11
Reaģentu glabāšana un lietošana	12
Paraugu ņemšana un apstrāde	13
Procedūra.....	15
1. posms: Asins paraugu inkubācija un plazmas atdalīšana	15
2. posms: QuantiFERON-CMV ELISA cilvēka IFN- γ noteikšanai.....	16
Aprēķini un analīzes rezultātu interpretācija	21
Standarta līknes izveidošana (ja netiek izmantota QF-CMV Analysis Software programmatūra)	21
Analīzes kvalitātes kontrole.....	22
Rezultātu interpretēšana	23
Ierobežojumi	24
Sagaidāmās vērtības.....	24
Veiktspējas raksturojums.....	27
Klīniskā veiktspēja.....	27
Analīzes sliekšnis	28

Klīniskie pētījumi	28
Specifiskums	28
Jutība	29
Pētījumi, kas izceļ klīnisko lietderību	29
Starptautiska konsensa pamatnostādnes par citomegalovīrusu izraisītu saslimšanu pārvaldību, transplantējot parenhimatozos orgānus	34
Analīzes veiktspējas raksturojums	35
Tehniskā informācija	37
Neskaidri rezultāti	37
Receklāini plazmas paraugi	37
Norādījumi par problēmu novēršanu	38
Atsauces	40
Simboli	42
Kontakinformācija	43
Saīsināta ELISA analīzes procedūra	44
1. posms: Asins paraugu inkubācija	44
2. posms: IFN- γ ELISA	44
Rokasgrāmatas pārskatījumu vēsture	47

Paredzētais lietojums

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

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

Kopsavilkums un skaidrojums

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

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

Procedūras princips

QF-CMV tests tiek veikts divos posmos. Vispirms tiek paņemts pilnasiņu paraugs katrā QF-CMV asins savākšanas stobriņā, t.i. Nil Control stobriņā, CMV Antigen stobriņā un Mitogen stobriņā.

Mitogen stobriņš QF-CMV testā tiek izmantots kā pozitīvā kontrole. Tas var būt īpaši nepieciešams, ja pastāv šaubas par personas imūnstatusu. Mitogen stobriņš var kalpot arī kā pareizas asins apstrādes un inkubācijas kontrole.

Stobriņi jāinkubē 37 °C pēc iespējas drīzāk, bet ne vēlāk kā 16 stundu laikā pēc parauga ņemšanas. Pēc 16–24 stundu inkubācijas perioda stobriņi tiek centrifugēti, tiek atdalīta plazma un ar QF-CMV ELISA testu tiek noteikts IFN- γ daudzums (SV/ml).

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

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

Tiek uzskatīts, ka IFN- γ atbilde testā ir pozitīva, ja CMV Antigen stobriņa rādījums ievērojami pārsniedz Nil stobriņa IFN- γ SV/ml vērtību. Mitogen stimulētais plazmas paraugs kalpo kā IFN- γ pozitīvā kontrole katram testētajam paraugam. Vāja atbildes reakcija uz Mitogen norāda uz neskaidru rezultātu, ja arī asins parauga atbilde uz CMV antigēniem ir negatīva. Šāds modelis var īstenoties, ja ir nepietiekams limfocītu daudzums, samazināta limfocītu aktivitāte nepareizas parauga apstrādes dēļ, nepareiza Mitogen stobriņa uzpilde/maisīšana, vai pacienta limfocīti nespēj veidot IFN- γ – piemēram, pacientiem, kuriem nesen veikta transplantācija. Nil paraugs tiek koriģēts ar fonu vai nespecifisku IFN- γ asins paraugos. Nil stobriņa IFN- γ līmenis tiek atņemts no IFN- γ CMV Antigen stobriņa un Mitogen stobriņa līmeņa (izklāstu par QF-CMV rezultātu interpretēšanu skatiet šī iepakojuma ieliktna sadaļā “Rezultātu interpretēšana 23 lpp.).

Laiks, kas nepieciešams analīzes veikšanai

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

Asins stobriņu inkubācija 37 °C

temperatūrā:

16–24 stundas

ELISA analīze:

Aptuveni 3 stundas vienai ELISA testa platei

Mazāk nekā 1 stunda darba.

Pieskaitiet 10–15 minūtes par katru papildu plati.

Komplektācijā ietvertie materiāli

Komplekta saturs

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (asins savākšanas stobriņi (viena pacienta komplekts))	
Kataloga Nr.	0192-0301
Sagatavju skaits	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON nulles kontrole) (pelēks vāciņš)	1 stobriņš
QuantiFERON CMV Antigen (QuantiFERON CMV antigēns) (zils vāciņš)	1 stobriņš
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogēna kontrole) (violets vāciņš)	1 stobriņš
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (QF-CMV asins savākšanas stobriņu iepakojuma ieliktnis)	1

QuantiFERON-CMV ELISA		2 plašu ELISA komplekts
Kataloga Nr.		0350-0201
Mikroplates plātnītes (12×8 iedobes), pārklātas ar IFN- γ monoklonālu antivielu, kas iegūta no pelēm un reaģē uz cilvēka imūnsistēmu	2 komplekti ar 12×8 iedobju mikroplates plātnītēm	
Cilvēka IFN- γ Standard (standarta materiāls), liofilizēts (satur rekombinantu cilvēka IFN- γ , liellopa kazeīnu, 0,01% svara/tilpuma timerosalu)	1 x flakons (8 SV/ml rekonstituēts)	
Green Diluent (Zaļais atšķaidītājs) (satur liellopu kazeīnu, standarta peļu serumu, timerosalu 0,01% w/v)	1 x 30 ml	
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (konjugāta 100x koncentrāts, liofilizēts) (no pelēm iegūts, uz cilvēku imūnsistēmu reaģējošs IFN- γ HRP, satur 0,01% svara/tilpuma timerosalu)	1 x 0,3 ml	
Wash Buffer 20x Concentrate (Skalošanas buferšķīdums, 20x koncentrāts) (pH 7,2, satur 0,05% tilpuma/tilpuma ProClin® 300)	1 x 100 ml	
Enzyme Substrate Solution (enzīmu substrāta šķīdums; satur H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidīnu)	1 x 30 ml	
Enzyme Stopping Solution (enzīmu darbības pārtraukšanas šķīdums) (satur 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml	
QF-CMV ELISA Package Insert (iekpojuma ieliktnis)	1	

* Satur sērskābi. Piesardzības pasākumus skatiet 9. lpp.

Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

- 37 °C inkubators; CO₂ nav nepieciešams
- Kalibrētas pipetes ar maināmu tilpumu 10–1000 µl šķīduma pārvešanai ar vienreizējas lietošanas uzgaļiem
- Kalibrētas daudzkanālu pipetes, piemērotas 50 µl un 100 µl šķīduma pārvešanai, ar vienreizējas lietošanas uzgaļiem
- Mikroplašu kratītājs
- Dejonizēts vai destilēts ūdens, 2 litri
- Ierīce mikroplašu skalošanai (ieteicama automātiska skalošanas ierīce)
- Mikroplašu lasītājs ar 450 nm filtru un 620–650 nm references filtru
- Plates vāks

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai in vitro diagnostikā

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizlietojamus cimdus un aizsargbrilles. Plašāku informāciju skatiet attiecīgajās drošības datu lapās (DDL). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas tiešsaistē, vietnē **www.qiagen.com/safety**, kur var atrast, apskatīt un izdrukāt katra QIAGEN® komplekta un tā komponentu DDL.

UZMANĪBU!



Ar cilvēku asinīm jārīkojas kā ar potenciāli infekciozu materiālu. Ievērojiet atbilstošās asins paraugu apstrādes vadlīnijas.

Tālāk norādītie riska un piesardzības pasākumu paziņojumi attiecas uz QuantiFERON-CMV ELISA komponentiem.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Satur sērskābi. Brīdinājums! Var izraisīt metālu koroziju. Izraisa ādas kairinājumu. Izraisa nopietnu acu kairinājumu. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsargus/sejas aizsargus.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Brīdinājums! Izraisa mērenu ādas kairinājumu. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsargus/sejas aizsargus.

QuantiFERON Green Diluent



Satur: trinātrija 5-hidroksi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo) pirazol-3-karboksilātu. Satur tartazīnu. Brīdinājums! Var izraisīt alerģisku ādas reakciju. Izmantot aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsargus/sejas aizsargus.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Satur: ProClin 300. Kaitīgs ūdens organismiem, ar ilgtermiņa ietekmi. Nepieļaujiet nokļūšanu vidē.

Drošības informācija

Papildinformācija

- Novirzes no QF-CMV iepakojuma ieliktnī sniegtajiem norādījumiem var izraisīt kļūdainus rezultātus. Pirms lietošanas rūpīgi izlasiet norādījumus.
- Nelietojiet komplektu, ja pirms lietošanas kāda reaģenta pudele izskatās bojāta vai tai ir noplūde.
- **Svarīgi!** Pirms lietošanas pārbaudiet flakonus. Neizmantojiet Conjugate vai IFN- γ Standard materiāla flakonus, kuriem redzamas bojājuma pazīmes vai kuriem ir bojāts gumijas aizbāznis. Neizmantojiet saplēstus flakonus. Veiciet atbilstošus piesardzības pasākumus, lai utilizētu flakonus drošā veidā.

Ieteikumi: Lai mazinātu metāla vāciņa radītu traumu risku, Conjugate vai IFN- γ Standard flakonu atvēršanai ieteicams izmantot flakona atvēršanas instrumentu.

- Nejauciet kopā un nelietojiet vienlaikus mikroplates plātnītes Microplate Strips, cilvēka IFN- γ Standard, Green Diluent vai Conjugate 100x Concentrate no dažādām QF-CMV komplektu partijām. Savstarpēji var mainīt dažādu komplektu citus reaģentus (Wash Buffer 20x Concentrate, Enzyme Substrate Solution un Enzyme Stopping Solution) ar nosacījumu, ka nav beidzies reaģentu derīguma termiņš un tiek reģistrēti partijas dati.
- Neizlietotos reaģentus un paraugus izmetiet saskaņā ar vietējiem un valstī pastāvošajiem noteikumiem.
- Neizmantojiet QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņus vai QF-CMV ELISA komplektus pēc derīguma termiņa beigām.
- Pārliecinieties, vai laboratorijas aprīkojums, piemēram, plašu mazgāšanas ierīces un datu nolasītāji, ir kalibrēts/apstiprināts lietošanai.

Reaģentu glabāšana un lietošana

Asins savākšanas stobriņi

- Uzglabājiet QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņus 4–25 °C temperatūrā.
- Asins paraugu ņemšanas laikā QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņu temperatūrai ir jābūt 17–25 °C.
- QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņu maksimālais uzglabāšanas laiks ir 15 mēneši no ražošanas datuma, ja tie tiek glabāti 4–25 °C temperatūrā.

ELISA komplekta reaģenti

- Uzglabājiet komplektu 2–8°C temperatūrā.
- Vienmēr aizsargājiet Enzyme Substrate Solution no tiešu saules staru iedarbības.

Rekonstituētie un neizmantotie reaģenti

Reaģentu rekonstituēšanas norādījumus skatiet sadaļā “2. posms: QuantiFERON-CMV ELISA cilvēka IFN- γ noteikšanai” (3. un 5. darbība 16. un 18. lpp.).

- Rekonstituēto cilvēka IFN- γ Standard var uzglabāt līdz 3 mēnešiem, ja to uzglabā 2–8 °C temperatūrā. Ievērojiet datumu, kurā cilvēka IFN- γ Standard tika rekonstituēts.
- Pēc rekonstituēšanas neizlietotais Conjugate 100x Concentrate atkal jānovieto glabāšanai 2–8 °C temperatūrā un jāizlieto 3 mēnešu laikā.
Pierakstiet datumu, kurā konjugāts tika rekonstituēts.
- Konjugāta darba šķīdums jāizlieto 6 stundu laikā pēc tā sagatavošanas.
- Skalošanas buferšķīduma darba šķīdumu var glabāt istabas temperatūrā (22±5 °C) ne ilgāk kā 2 nedēļas.

Paraugu ņemšana un apstrāde

QF-CMV testā tiek lietoti šādi asins savākšanas stobriņi:

- Nil Control (nulles kontrole) (pelēks vāciņš);
- CMV Antigen (CMV antigēns) (zils vāciņš);
- Mitogen Control (mitogēna kontrole) (violets vāciņš).

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

Lai iegūtu optimālus rezultātus, ievērojiet šīs procedūras:

1. Veicot vēnas punkciju, no katra pacienta paņemiet 1 ml asiņu tieši katrā QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņā. Šo procedūru drīkst veikt apmācīts flebotomists.

QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņus var izmantot, ja neatrodieties augstāk par 810 metriem virs jūras līmeņa.

Ja QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņus izmantojat vietās, kas atrodas augstāk par 810 metriem virs jūras līmeņa, vai ir vērojams mazs asins pieplūdums, asinis var ņemt ar šļirci un pa 1 ml uzreiz iepildīt katrā no trīs stobriņiem. Drošības apsvērumu dēļ šī procedūra jāveic, noņemot šļirci adatu, nodrošinot attiecīgās drošības procedūras, noņemot vāciņus no trīs QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņiem un iepildot 1 ml asiņu katrā no tiem (līdz melnajai atzīmei stobriņa uzlīmes malā). Stingri uzlieciet atpakaļ stobriņu vāciņus un samaisiet, kā aprakstīts tālāk. Tā kā, lietojot 1 ml stobriņus, asins ņemšana notiek samērā lēni, turiet stobriņu pie adatas vēl 2–3 sekundes pēc stobriņa uzpildes, lai nodrošinātu pareiza daudzuma paņemšanu.

Melnā atzīme uz stobriņa sāniem norāda 1 ml uzpildes tilpumu. QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņi ir validēti tilpumam diapazonā no 0,8 līdz 1,2 ml. Ja kādā no stobriņiem asins līmenis neietilpst atzīmētajā diapazonā, ir jāņem jauns asins paraugs.

Ja asins ņemšanai izmanto tauriņadatu, tad ar tukša stobriņa palīdzību jānodrošina, lai būtu piepildīta tauriņadatai pievienotā caurulīte, pirms tiek lietoti QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņi.

Asins paraugu var paņemt arī vienā kopējā asins savākšanas stobriņā, kurā kā antikoagulants ir litija heparīns, un pēc tam paraugu var pārliet QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņos. Kā asins antikoagulantu izmantojiet tikai litija heparīnu, jo citi antikoagulanti traucē analīzes veikšanai. Piepildiet asins savākšanas stobriņu (minimālais tilpums: 5 ml) un uzmanīgi samaisiet asinis, apgriežot stobriņu vairākas reizes, lai izšķīdinātu heparīnu. Šo procedūru drīkst veikt apmācīts flebotomists. Asins paraugi ir jāglabā istabas temperatūrā ($22\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), pirms asinis tiek pārlietas QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņos inkubācijai, kas ir jāsāk 16 stundu laikā pēc asins parauga paņemšanas.

2. Uzreiz pēc QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņu piepildīšanas sakratiet tos 10 reizes tikai tik spēcīgi, lai nodrošinātu visas stobriņa iekšējās virsmas pārklāšanos ar asinīm. Tādējādi tiek izšķīdināti uz stobriņa sienām esošie antigēni.

Asins uzpildes laikā stobriņa temperatūrai jābūt no 17 līdz $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pārāk spēcīga kratīšana var izraisīt gela izšķīšanu, kas var būt par iemeslu neprecīziem rezultātiem.

Ja asinis ir paņemtas litija heparīna stobriņā, paraugi pirms dozēšanas QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņos ir vienmērīgi jāsamaisa. Nodrošiniet, lai asinis tiktu kārtīgi samaisītas, uzmanīgi vairākkārt apgriežot stobriņu tieši pirms dozēšanas. Dozējiet 1 ml daļas (vienu katrā QF-CMV Blood Collection Tube stobriņā) atbilstošā Nil, CMV Antigen un Mitogen stobriņā. Šī darbība jāveic aseptiski, nodrošinot attiecīgo drošības procedūru ievērošanu, noņemot vāciņus no trīs QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņiem un iepildot 1 ml asiņu katrā no tiem (līdz melnajai atzīmei stobriņa uzlīmes sānos). Stingri uzlieciet atpakaļ stobriņu vāciņus un samaisiet, kā aprakstīts iepriekš.

3. Atbilstoši marķējiet stobriņus.

Pārliecinieties, vai katru stobriņu (Nil, CMV Antigen, Mitogen) var identificēt pēc etiķetes vai kā citādi.

4. Pēc piepildīšanas, sakratīšanas un marķēšanas stobriņi jāievieto inkubatorā $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā pēc iespējas drīzāk, bet ne vēlāk kā 16 stundas pēc parauga paņemšanas. Pirms inkubācijas glabājiet stobriņus istabas temperatūrā ($22\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Asins paraugus nedrīkst glabāt ledusskapī vai saldētavā.

Procedūra

1. posms: Asins paraugu inkubācija un plazmas atdalīšana

1. Inkubējiet stobriņus STĀVUS 16–24 stundas 37 ± 1 °C temperatūrā. Inkubatoram nav nepieciešams CO_2 vai mitrināšana.

Svarīgi! Ja asins paraugi netiek inkubēti uzreiz pēc paņemšanas, pirms inkubēšanas atkārtoti samaisiet to saturu, apvēršot stobriņus 10 reizes.

Pēc inkubācijas un pirms centrifugēšanas asins savākšanas stobriņus var glabāt ne ilgāk kā 3 diennaktis $4\text{--}27$ °C temperatūrā.

2. Pēc stobriņu inkubēšanas 37 °C temperatūrā plazmu var iegūt, 15 minūtes centrifugējot stobriņus ar ātrumu $2000\text{--}3000$ RCF (*g*). Gela korķis šūnas atdalīs no plazmas. Ja tas nenotiek, stobriņi jācentrifugē vēlreiz.

Plazmu var atdalīt arī bez centrifugēšanas, tomēr papildu uzmanība jāpievērš tam, lai plazmu atdalītu, nepieskaroties šūnām.

3. Pēc centrifugēšanas un pirms iegūšanas neveiciet pipetēšanu augšup un lejup, kā arī nekādā veidā nemaisiet plazmu. Vienmēr ievērojiet piesardzību, lai nepieskartos materiālam uz gela virsmas.

Svarīgi! Plazmas paraugus drīkst iegūt tikai ar pipeti.

No centrifugētiem asins savākšanas stobriņiem plazmas paraugus var pārliet tieši QF-CMV ELISA platē arī tad, ja tiek izmantotas automatizētas ELISA testa ierīces.

Plazmas paraugus var glabāt centrifugētos QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņos ne ilgāk kā 28 dienas $2\text{--}8$ °C temperatūrā, vai, iegūstot tīru plazmu, ilgāku laiku temperatūrā, kas zemāka par -20 °C (ieteicams zemākā par -70 °C).

Lai iegūtu piemērotus testa paraugus, iegūstiet vismaz 150 µl plazmas.

2. posms: QuantiFERON-CMV ELISA cilvēka IFN- γ noteikšanai

Informāciju par materiāliem, kuri nepieciešami ELISA analīzes veikšanai, skatiet sadaļā "Komplekta saturs", 8. lpp. un "Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā", 9. lpp.

1. Visi plazmas paraugi un reaģenti, izņemot Conjugate 100x Concentrate, pirms lietošanas jāsasilda līdz istabas temperatūrai (22 ± 5 °C). Nepieciešamās temperatūras sasniegšanai jāatvēl vismaz 60 minūtes.
2. Izņemiet no rāmja ELISA testa plātnītes, kas netiek izmantotas, ielieciet tās atpakaļ folija iepakojumā un līdz lietošanai glabājat ledusskapī.

Jāparedz vismaz viena plātnīte QF-CMV ELISA Standard testa standartiem un pietiekams skaits plātnīšu testējamajiem pacientiem. Pēc izmantošanas rāmi un vāku saglabājat lietošanai ar atlikušajām strēmeliņēm.

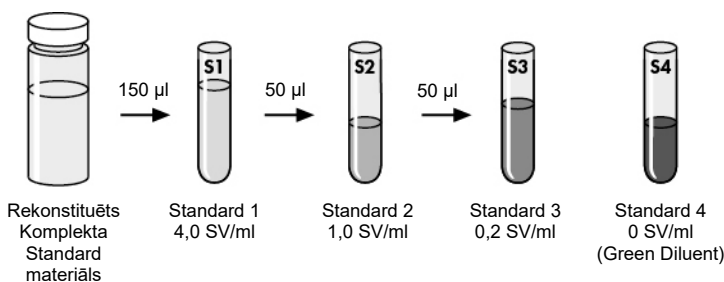
3. Rekonstituējiet Human IFN- γ Standard šķīdumu tādā daudzumā dejonizēta vai destilēta ūdens, kas norādīts uz flakona etiķetes. Uzmanīgi samaisiet, pēc iespējas samazinot putu veidošanos un nodrošinot pilnīgu izšķīšanu. Rekonstituējot pareizu IFN- γ Standard materiāla tilpumu, tiek iegūts šķīdums, kura koncentrācija ir 8,0 SV/ml.

Piezīme. Human IFN- γ Standard (komplekta standarts) rekonstituēšanas tilpums dažādām partijām atšķiras.

Izmantojot rekonstituēto standarta šķīdumu, sagatavojiet četru IFN- γ koncentrāciju atšķaidījuma virkni ar Green Diluent (zaļajā atšķaidītājā, GD) (1. attēls. nākamajā lapā). S1 (Standard 1) satur 4,0 SV/ml, S2 (Standard 2) satur 1,0 SV/ml, S3 (Standard 3) satur 0,25 SV/ml un S4 (Standard 4) satur 0 SV/ml (tīrs GD). Standarta materiālu analīze jāveic vismaz divas reizes. Katrai ELISA analīzes sesijai sagatavojiet svaigus komplekta standarta atšķaidījumus.

Dubultā standarta šķīdumu procedūras piemērs

Dubultā standarta šķīdumu procedūras piemērs	
A	Veiciet atzīmi uz četriem stobriņiem: S1, S2, S3, S4
B	Pievienojiet 150 µl GD stobriņā S1, S2, S3, S4
C	Pievienojiet 150 µl komplekta standarta materiāla stobriņā S1 un rūpīgi samaisiet
D	Pārnēsiet 50 µl no stobriņa S1 uz stobriņu S2 un rūpīgi samaisiet
E	Pārnēsiet 50 µl no stobriņa S2 uz stobriņu S3 un rūpīgi samaisiet
F	Tīru GD izmanto kā nulles standarta stobriņu (S4)



1. attēls. Standarta līknes sagatavošana ar sērijveida atšķaidījumu palīdzību.

- Rekonstruējiet liofilizēto Conjugate 100x Concentrate, izmantojot 0,3 ml dejonizēta vai destilēta ūdens. Uzmanīgi samaisiet, pēc iespējas samazinot putu veidošanos un nodrošinot pilnīgu konjugāta izšķīšanu.

Konjugāta darba šķīdumu sagatavo, atšķaidot nepieciešamo rekonstituētā Conjugate 100x Concentrate daudzumu ar Green Diluent (skat. 1 tabula nākamajā lapā).

Rūpīgi, bet uzmanīgi samaisiet, nepieļaujot putu veidošanos.

Neizlietoto Conjugate 100x Concentrate koncentrātu uzreiz pēc lietošanas uzglabājiēt 2–8 °C temperatūrā.

Izmantojiet tikai Green Diluent.

1 tabula. Konjugāta darba šķīduma sagatavošana

Strēmelišu skaits	Conjugate 100x Concentrate tilpums	Green Diluent atšķaidītāja tilpums
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Plazmas paraugus, kas iegūti no asins savākšanas stobriņiem un pēc tam sasaldēti vai pirms analīzes glabāti ilgāk par 24 stundām, rūpīgi samaisiet pirms pievienošanas ELISA iedobei.

Svarīgi! Ja plazmas paraugus ir paredzēts pievienot tieši no centrifugētiem QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņiem, plazmu nedrīkst maisīt. Vienmēr ievērojiet piesardzību, lai nesabojātu materiālu uz gela virsmas.

6. Ja nepieciešami kvantitatīvi rezultāti, atšķaidiet CMV un Mitogen plazmas paraugus ar Green Diluent attiecībā 1/10 (10 µl plazma + 90 µl GD). Nil plazmas paraugu nedrīkst atšķaidīt.

Ieteicams paralēli testēt šādus paraugus:

Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)

Tomēr QuantiFERON-CMV Analysis Software programmatūra atbalsta arī šādas pacientu paraugu iespējas:

Nil, CMV Antigen, Mitogen

Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)

Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10)

Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen

7. Ar daudzkanālu pipeti pievienojiet 50 µl tikko sagatavotā konjugāta darba šķīduma nepieciešamajās ELISA iedobēs.
8. Atbilstošajās iedobēs pievienojiet 50 µl testa plazmas parauga. Beigās pievienojiet pa 50 µl no katra Standard šķīduma no 1 līdz 4 atbilstošajās iedobēs. Standarta materiālu analīzi vajadzētu veikt vismaz divas reizes.
9. ELISA plati pārklājiet ar vāku un rūpīgi 1 minūti maisiet konjugātu un plazmas paraugus/standarta šķīdumus mikroplašu kratītājā ar ātrumu no 500 līdz 1000 apgr./min. Izvairieties no izšļakstīšanās.
10. ELISA plati pārklājiet ar vāku un 120±5 minūtes inkubējiet istabas temperatūrā (22±5 °C).

Inkubācijas laikā plates nedrīkst atrasties tiešu saules staru ietekmē. Novirzes no norādītā temperatūras diapazona var izraisīt kļūdainus rezultātus.

11. Inkubācijas laikā sagatavojiet skalošanas buferšķīduma darba šķīdumu. Atšķaidiet un rūpīgi samaisiet vienu daļu Wash Buffer 20x Concentrate koncentrāta ar 19 daļām dejonizēta vai destilēta ūdens.

Komplektā ir iekļauts tāds daudzums Wash Buffer 20x Concentrate koncentrāta, kas ir pietiekams 2 litru darba koncentrācijas mazgāšanas buferšķīduma sagatavošanai.

12. Kad ELISA plates inkubācija ir pabeigta, veiciet vismaz sešus skalošanas ciklus iedobēs ar 400 µl skalošanas buferšķīduma darba šķīdumu. Ieteicams lietot automātisku plates skalošanas ierīci.

Svarīgi! Rūpīga mazgāšana ir ļoti svarīgs analīzes veikspējas kritērijs. Nodrošiniet, lai katrā skalošanas ciklā katra iedobe būtu pilnīgi uzpildīta ar skalošanas buferšķīdumu līdz iedobes augšējai malai. Starp katru ciklu ieteicams vismaz 5 sekunžu mērcēšanas periods.

Notekūdeņu uzkrāšanas tvertnē jāpievieno standarta laboratorijas dezinfekcijas līdzeklis, kā arī jāievēro spēkā esošie noteikumi par iespējami infekcioza materiāla dekontamināciju.

13. Noteciniet otrādi apgrieztas plates uz uzsūcoša bezplūksnu dvieļa, lai atbrīvotos no atlikušā skalošanas buferšķīduma. Pievienojiet 100 µl Enzyme Substrate Solution katrā iedobē, plati pārklājiet ar vāku un 1 minūti rūpīgi samaisiet mikroplašu kratītājā ar ātrumu 500–1000 apgr./min.

14. Pārklājiet katru plati un 30 minūtes inkubējiet istabas temperatūrā (22 °C ± 5 °C). Inkubācijas laikā plates nedrīkst atrasties tiešu saules staru ietekmē.

-
15. Pēc 30 minūšu inkubācijas perioda pievienojiet 50 µl Enzyme Stopping Solution katrā iedobē tādā pašā secībā, kā tika pievienots substrāta šķīdums. Rūpīgi samaisiet mikroplašu kratītājā ar ātrumu no 500 līdz 1000 apgr./min.
 16. Ar mikroplašu lasītāju, kas aprīkots ar 450 nm filtru un 620–650 nm references filtru, izmēriet optisko blīvumu (OB) katrā iedobē 5 minūšu laikā pēc reakcijas pārtraukšanas. Rezultātu aprēķināšanai izmanto OB vērtības.

Aprēķini un analīzes rezultātu interpretācija

QuantiFERON-CMV Analysis Software programmatūra iegūto datu analīzei un rezultātu aprēķinam ir pieejama QIAGEN tīmekļa vietnē **www.QuantiFERON.com**. Pārliecinieties, ka tiek izmantota visjaunākā QF-CMV Analysis Software programmatūras versija.

Programmatūra veic analīzes kvalitātes kontroles novērtējumu, izveido standarta līkni un nodrošina analīzes rezultātu katram pacientam, kā tas detalizēti aprakstīts sadaļā “Rezultātu interpretēšana” 23. lpp. Programmatūra norāda vismazāko atšķaidījumu, kas devis rezultātu QF-CMV ELISA testa diapazonā, ņemot vērā atšķaidīšanas attiecību.

QF-CMV Analysis Software programmatūras izmantošanas alternatīva ir rezultātu noteikšana, izmantojot tālāk aprakstīto metodi.

Standarta līknes izveidošana (ja netiek izmantota QF-CMV Analysis Software programmatūra)

Nosakiet Kit Standard šķīduma atkārtojumu vidējās OB vērtības katrai platei.

Izveidojiet standarta līkni $\log_{(e)} - \log_{(e)}$, diagrammā iekļaujot vidējās OB vērtības $\log_{(e)}$ (y ass) attiecību pret standarta materiālu IFN- γ koncentrācijas $\log_{(e)}$, kas izteikts kā SV/ml (x ass), neiekļaujot aprēķinos nulles standartu. Aprēķiniet standarta līknei piemērotāko līniju, izmantojot regresijas analīzi.

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

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

Kā ziņotais rezultāts ir jānorāda tā vismazākā atšķaidījuma vērtība, kas devusi rezultātu QF-CMV ELISA testa diapazonā, nodrošinot, lai pēc nepieciešamības tiktu ņemts vērā atšķaidīšanas koeficients.

Analīzes kvalitātes kontrole

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

Lai ELISA analīze būtu derīga:

- Vidējai Standard 1 materiāla OB vērtībai jābūt $\geq 0,600$.
- Standard 1 un Standard 2 atkārtojumu OB vērtību %VK jābūt $< 15\%$.
- Standard 3 un Standard 4 atkārtojumu OB vērtību variācija nedrīkst pārsniegt 0,040 optiskā blīvuma vienības, salīdzinot ar to vidējo vērtību.
- No standartu vidējām absorbcijas vērtībām aprēķinātajam korelācijas koeficientam (r) jābūt $\geq 0,98$.

QF-CMV Analysis Software programmatūra aprēķina šos kvalitātes kontroles parametrus un sniedz par tiem atskaites. Ja iepriekš minētie kritēriji nav izpildīti, analīze nav derīga un ir jāatkārto.

Vidējai Zero Standard materiāla (Green Diluent) OB vērtībai jābūt $\leq 0,150$. Ja vidējā OB vērtība ir $> 0,150$, jāpārbauda plates skalošanas procedūra.

Rezultātu interpretēšana

QuantiFERON-CMV rezultāti tiek interpretēti, izmantojot kritērijus, kas norādīti 2 tabulā.

2 tabula. QuantiFERON-CMV rezultātu interpretācija

Nil (SV/ml)	CMV vērtība mīnus Nil vērtība (SV/ml)	Mitogen vērtība mīnus Nil vērtība (SV/ml)*	QF-CMV rezultāts	Pārskaits/interpretācija
≤8,0	≥0,20 un ≥25% no Nil vērtības	Jebkāds	Reaģējošs†	Ir noteikta imunitāte pret CMV
	<0,20 VAI ≥0,20 un <25% no Nil vērtības	≥0,5	Negatīvs	NAV noteikta imunitāte pret CMV
		<0,5	Neskaidrs‡	Atbildes reakcijas uz CMV rezultāts ir neskaidrs
>8,0§	Jebkāds	Jebkāds	Neskaidrs‡	Atbildes reakcijas uz CMV rezultāts ir neskaidrs

* Atbildes reakcija uz Mitogen pozitīvo kontroli (un palaiķam — CMV antigēniem) bieži var neatbilst mikroplates lasītāja diapazonam. Tas neietekmē testa rezultātus.

† Ja nav aizdomu par citomegalovīrusa infekciju, sākotnēji reaģējošos rezultātus var apstiprināt, veicot atkārtotu oriģinālo plazmas paraugu dubultu testēšanu ar QF-CMV ELISA. Ja viena vai abu atkārtojumu atkārtota testēšana ir pozitīva, jāpieņem, ka personas tests ir pozitīvs.

‡ Iespējamās cēloņus skatiet sadaļā “Norādījumi par problēmu novēršanu” (38. lpp.).

Klīniskajos pētījumos (1) neskaidrs rezultāts tiem pacientiem, kuriem veikta parenhimatozo orgānu transplantācija un donors ir CMV pozitīvs, bet Mitogen kontroles rezultāts bija mazāks par 0,5 SV/ml, ir klīniski nozīmīgs. Šādiem pacientiem ir vislielākais risks saslimt ar CMV slimību.

§ Klīniskajos pētījumos mazāk nekā 0,25% pētāmo personu IFN-γ koncentrācija Nil vērtībai bija >8,0 SV/ml.

Piezīme. Nosakot pacienta imūno reakciju uz CMV antigēniem, iegūtais IFN-γ līmenis jāizmanto kopā ar klīniskajām pazīmēm, slimības vēsturi un citiem diagnostiskiem izmeklējumiem. QF-CMV tests nav paredzēts CMV infekcijas noteikšanai, un to nedrīkst lietot CMV infekcijas izslēgšanai.

Ierobežojumi

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

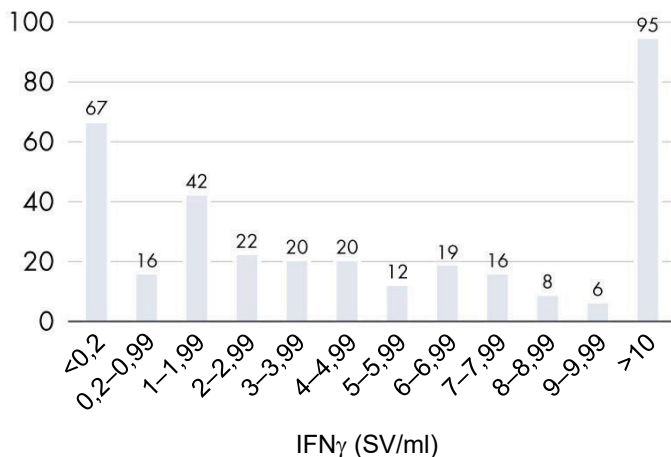
Tālāk norādīti neuzticamu un neskaidru rezultātu iespējamie iemesli.

- Novirzes no QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert aprakstītās procedūras
- Pārmērīgs IFN- γ līmenis kontroles stobriņā
- No asins parauga paņemšanas līdz inkubēšanai 37 °C temperatūrā pagājušas vairāk nekā 16 stundas.

Sagaidāmās vērtības

Sagaidāmās IFN- γ vērtības, izmantojot QuantiFERON-CMV testu, tika iegūtas, pētot 591 paraugu no veseliem pacientiem. 343 paraugi uzrādīja seropozitīvu un 248 paraugi – seronegatīvu CMV IgG testa rezultātu. QF-CMV testēšanas laikā CMV seroloģiskais statuss nebija zināms. No 248 pārbaudītajiem CMV seronegatīvo pacientu paraugiem 100% (248/248) paraugu QF-CMV ELISA testa rezultāti bija negatīvi. Tādējādi IFN- γ atbildes reakcijas uz CMV Antigen stobriņu (mīnus Nil vērtība) bija <0,2 SV/ml. Tālāk ir parādīts IFN- γ atbildes reakciju uz CMV Antigen stobriņu (mīnus Nil vērtība) sadalījums 343 CMV seropozitīvajiem pacientiem (2. attēls.).

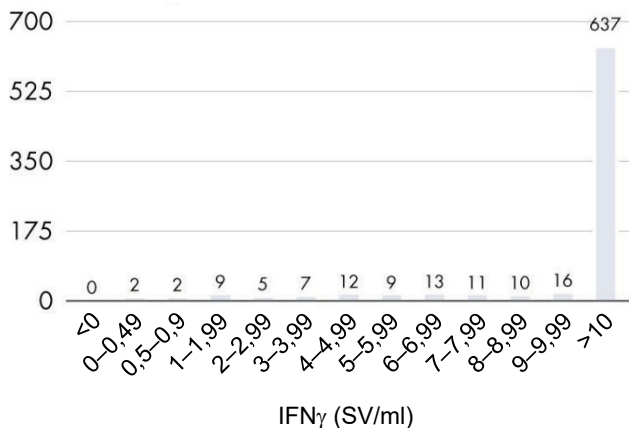
Paraugu skaits



2. attēls. QF-CMV IFN- γ atbildes reakciju sadalījums (mīnus Nil vērtība) seropozitīviem veseliem pacientiem (n=343).

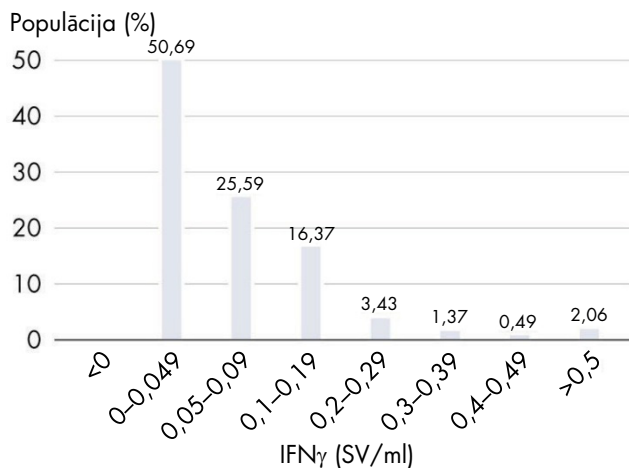
IFN- γ atbildes reakciju uz Mitogen sadalījums (mīnus Nil vērtība) tika noteikts, izmantojot 733 veselu pieaugušu pacientu paraugus un QF-CMV ELISA testu neatkarīgi no CMV IgG seroloģijas (3. attēls.). Mitogen stobriņa (mīnus Nil vērtība) rezultāts, kas mazāks par 0,5 SV/ml, norāda, ka tests nav izdevies vai personai ir novājinātas imunitātes stāvoklis. Veselo cilvēku populācijā tikai 2 no 733 rezultātiem bija šajā kategorijā.

Paraugu skaits



3. attēls. Mitogen IFN- γ atbildes reakciju sadalījums (mīnus Nil vērtība) veseliem pacientiem (n=733).

IFN- γ atbildes reakciju uz Nil stobriņiem sadalījums tika noteikts, izmantojot 1020 veselu pieaugušu pacientu plazmas paraugus un QF-CMV ELISA testu neatkarīgi no CMV IgG seroloģijas (4. attēls.).



4. attēls. Nil IFN- γ atbildes reakciju sadalījums veseliem pacientiem (n=1020), kas izteikts procentos no populācijas.

Veiktspējas raksturojums

Klīniskā veiktspēja

Izmantojot QF-CMV testu, tika izveidots testa sliekšnis iepriekšējas saskares ar CMV noteikšanai, pamatojoties uz veselu pieaugušo grupas (n=223) rezultātu analīzi, kurā QF-CMV testa rezultāti tika salīdzināti ar CMV IgG seroloģijas testa rezultātiem. ROC līknes analīzē tika noteikts, ka 0,04 SV/ml (pēc Nil vērtības atņemšanas) testa sliekšnis sniedz optimālas pozitīvas un negatīvas QF-CMV testa predikatīvās vērtības (laukums zem līknes = 0,9679 [95% TI: 0,9442–0,9915, p<0,0001]). Tādējādi ar šādām testa sliekšņa vērtībām analīze savu paredzēto uzdevumu veselo cilvēku populācijā veic visefektīvāk.

QF-CMV analīzes veiktspēja tika salīdzināta ar SeraQuest™ CMV IgG seroloģisko testu (Quest International). QF-CMV analīze parādīja 95% (294 no 310 indivīdiem) sakritību ar CMV IgG seroloģiskā testa rezultātiem veseliem pacientiem. QF-CMV testā nevienam no 149 seronegatīvajiem donoriem netika parādīts pozitīvs rezultāts. 145 no 161 seropozitīvajiem donoriem tika parādīta QF-CMV testa pozitīva atbildes reakcija. Kopējā pozitīvā sakritība bija 90%, bet negatīvās sakritības vērtība bija 100%. QF-CMV testa atbildes reakciju un CMV IgG seroloģiskā testa rezultātu sakritības līmenis veselo pacientu populācijā ir parādīts 3 tabulā.

3 tabula. QuantiFERON-CMV testa un CMV IgG seroloģijas testa rezultātu sakritība veseliem pacientiem

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

Analīzes sliekšnis

Šis analīzes ieteicamais klīniskais testa sliekšnis ir 0,2 SV/ml CMV Antigen stobriņā (mīnus Nil vērtība), lai gan dažādām klīniskajām vajadzībām var validēt dažādus sliekšņus.

Klīniskie pētījumi

Tā kā nav noteikta standarta citomegalovīrusa infekcijas apstiprināšanai vai izslēgšanai, QF-CMV testa jutību un specifiskumu nevar praktiski izvērtēt. QF-CMV testa specifiskums un jutība tika aptuveni noteikta, novērtējot QF-CMV testa atbildes reakciju un CMV IgG seroloģiskā testa rezultātu sakritības līmeni veseliem pacientiem.

QF-CMV testa specifiskums tika aptuveni noteikts, novērtējot aplami pozitīvus rādītājus (reaģējoša atbilde ar QF-CMV testu) veselu donoru paraugiem bez pierādījumiem par iepriekšēju saskari ar CMV (CMV IgG seronegatīvi indivīdi). Jutība tika aptuveni noteikta, novērtējot QF-CMV testa atbildes reakcijas veselu donoru paraugiem ar pierādījumiem par iepriekšēju saskari ar CMV (CMV IgG seropozitīvi indivīdi). QF-CMV testā tiek izmantots liels skaits specifisku CMV epitopu no dažādām CMV olbaltumvielām, tādējādi aptverot plašu populāciju ar dažādiem HLA I klases haplotipiem (aptuveni 98% no populācijas). Tā kā cilvēkiem, kuriem veica CMV seroloģiskos izmeklējumus, nebija zināmi HLA haplotipi, tika sagaidīts, ka nelielai daļai seroloģiski pozitīvo indivīdu nebūs reakcijas uz QF-CMV Blood Collection Tubes stobriņiem.

Specifiskums

591 veselu cilvēku parauga pētījumā indivīdiem ar seronegatīvu CMV IgG testa rezultātu netika konstatēts neviens aplami pozitīvs QF-CMV testa rezultāts — 248 paraugiem no 248 bija negatīvs QF-CMV ELISA tests un negatīvs CMV IgG seroloģiskais tests. Tādējādi QF-CMV testa un CMV IgG seroloģiskā testa rezultātu sakritība ir 100%.

Visos citos specifiskuma novērtējumos, kas tika veikti cilvēkiem, kuriem ir transplantēti parenhimatozie orgāni (1–8) vai ir veikta asinsrades cilmes šūnu transplantācija (9,10), kā arī ar HIV inficētiem pacientiem (11), arī tika pierādīts, ka QF-CMV testa un CMV IgG seroloģiskā testa rezultātu sakritības līmenis ir 100%.

Jutība

Pētījumā, kas tika veikts ar 343 no veseliem cilvēkiem iegūtiem paraugiem ar seropozitīvu CMV IgG testa rezultātu, tika konstatēts, ka QF-CMV atbildes reakciju un CMV IgG seroloģiskā testa rezultātu sakritības līmenis ir 80,5%. 276 no 343 paraugiem bija pozitīva atbildes reakcija uz QF-CMV testu un pozitīvs CMV IgG seroloģiskais tests. Novērotā neatbilstība var būt saistīta ar aplami pozitīvu CMV seroloģiju vai testēto personu pozitīvo HLA tipu neesamību.

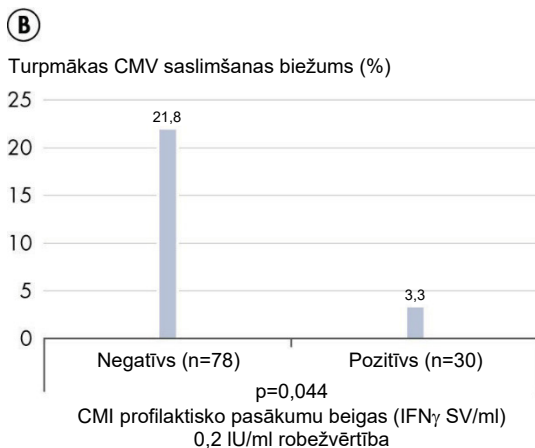
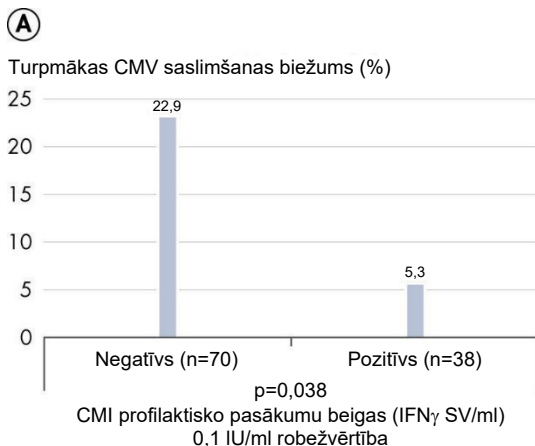
Jutības novērtējumos, kas tika veikti cilvēkiem, kuriem transplantēti parenhimatozie orgāni (1–8) vai veikta asinsrades cilmes šūnu transplantācija (9, 10), kā arī ar HIV inficētiem pacientiem (11), tika atklāts zemāks sakritības līmenis, kas varētu būt izskaidrojams ar aplami pozitīvu CMV seroloģiskā testa rezultātu, pārbaudāmo indivīdu pozitīvo HLA tipu neesamību vai reaģējošu T šūnu neesamību pacientiem, kuriem ir imūnsupresija.

Pētījumi, kas izceļ klīnisko lietderību

Gan CMV IgG seroloģisko analīzi, gan QF-CMV testa aprakstā ir norādīts, ka to paredzētais lietojums ļauj noteikt imunitāti pret CMV. Transplantācijas jomā CMV seroloģiskās analīzes tiek plaši izmantotas pirms transplantācijas, lai noteiktu CMV komplikāciju risku, kas pacientam varētu rasties pēc transplantācijas, tomēr šīm analīzēm ir ierobežota vērtība pēc transplantācijas. Toties QF-CMV testu var izmantot pacientiem, kuriem veikta transplantācija, lai novērtētu CMV imunitātes līmeni pacientiem, kuriem pastāv risks, ka attīstīsies simptomātiska CMV infekcija un/vai slimība imūnsupresijas dēļ (12–15).

QuantiFERON-CMV testa lietderību ir pierādījuši vairāki publicēti klīniskie pētījumi dažādās cilvēku grupās, kurās ir veikta transplantācija (1–11, 15, 16).

Lielā pētījumā, kas aptvēra 108 pacientus, kuriem veikta parenhimatozo orgānu transplantācija (4), tiem pacientiem, kam bija pozitīvs QF-CMV testa rezultāts, pabeidzot profilaktiskos pasākumus pret CMV, bija ievērojami zemāki turpmākas saslimšanas ar CMV rādītāji (3,3% jeb 1/30; izmantojot 0,2 SV/ml testa sliekšni), salīdzinot ar pacientiem, kam bija negatīvs QF-CMV testa rezultāts (21,8% jeb 17/78, $p=0,044$) (5. attēls.)



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

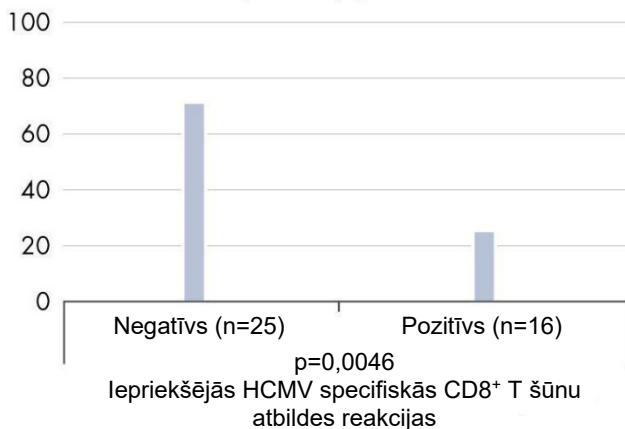
Turklāt CMV seronegatīvi pacienti, kam transplantēts CMV pozitīva donora (D+R-) orgāns ar pozitīvu QF-CMV testa rezultātu, profilaktisko pasākumu beigās biežāk un ilgāk neraslima ar CMV slimību. Tas liecina, ka QF-CMV testu var izmantot, lai identificētu pacientus, kuriem ir risks vēlīnai saslimšanai ar CMV slimību.

Šajā pētījumā arī uzsvērts, ka to pacientu grupā, kuriem veikta transplantācija un bija augstākais risks CMV slimības attīstībai (D+/R-), pozitīvs testa rezultāts jebkurā laikā pēc profilaktiskajiem pasākumiem tika saistīts ar lielāku varbūtību neraslimt ar CMV slimību.

Pētījumā ar 37 pacientiem, kuriem tika transplantēti parenhimatozie orgāni (6), CMV specifisko CD8⁺ T šūnu atbildes reakcijas novērtēšana ar QF-CMV testu palīdzēja prognozēt spontānu atbrīvošanos no vīrusiem, salīdzinot ar CMV slimības progresēšanu pēc CMV virēmijas pastiprināšanās. Šajā pētījumā 24 no 26 pacientiem (92,3%) ar pozitīvu QF-CMV testa rezultātu (izmantojot IFN- γ testa sliekšni $\geq 0,2$ SV/ml) spontāni atbrīvojās no CMV vīrusa, bet tikai 5 no 11 pacientiem (45,5%) ar negatīvu QF-CMV rezultātu bija līdzīgs iznākums.

Pētījumā ar 67 pacientiem, kuriem veica plaušu transplantāciju un novērtēja CMV virēmijas epizodes pēc transplantācijas (7), tika novērots, ka 18 no 25 (72%) CMV virēmijas epizodēm pirms tam bija negatīvs QF-CMV testa rezultāts, salīdzinot ar 4 no 16 (25%) epizodēm, pirms kurām bija pozitīva QF-CMV testa reakcija (Fišera kritērijs, $p=0,0046$; 6. attēls.).

Epizodes ar HCMV DNS asinīs ar
vīrusu slodzi >1000 kopijas/ml (%)



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

Lielā daudzcentru perspektīvā pētījumā ar 127 CMV seropozitīviem pacientiem, kuriem transplantēti parenhimatozie orgāni no CMV seronegatīviem donoriem (8) un kuri saņēma pretvīrusu profilaktiskos līdzekļus, pacientiem ar pozitīviem QF-CMV testa rezultātiem (izmantojot 0,1 SV/ml testa sliekšni) jebkurā laikā pēc profilaktisko pasākumu pret CMV pabeigšanas 12 mēnešus pēc transplantācijas bija ievērojami zemāki vēlīnas saslimšanas rādītāji (6,4%), salīdzinot ar tiem pacientiem, kuriem bija negatīvi QF-CMV testa rezultāti (22,2%) un neskaidri rezultāti (58,3%, p<0,001). Klasificējot arī neskaidros rezultātus kā “negatīvus”, turpmākais CMV slimības biežums bija 6,4%, salīdzinot ar 26,8%, p=0,024. Prediktīvās pozitīvās un negatīvās QF-CMV vērtības attiecībā uz aizsardzību pret CMV slimību bija attiecīgi 0,90 (95% TI 0,74–0,98) un 0,27 (95% TI 0,18–0,37). Šajā pētījumā tika atklāts, ka QF-CMV tests var būt noderīgs, lai prognozētu, vai pacientiem pēc profilaktiskajiem pasākumiem ir zems, vidējs vai augsts turpmākas CMV slimības attīstības risks.

Prospektīvā pētījumā ar 55 pacientiem, kuriem transplantēti parenhimatozie orgāni (8), tika analizēti QF-CMV testa rezultāti pirms transplantācijas un CMV replikācijas epizodes pēc transplantācijas, konstatējot, ka biežāka CMV replikācija pēc transplantācijas tika novērota CMV seropozitīviem orgānu saņēmējiem, kam pirms transplantācijas bija negatīvs (izmantojot 0,2 SV/ml testa sliekšni) QF-CMV testa rezultāts (7 no 14 jeb 50%), salīdzinot ar tiem CMV seropozitīviem orgānu saņēmējiem, kam pirms transplantācijas bija pozitīvs QF-CMV testa rezultāts (4 no 30 jeb 13,3%, $p=0,021$).

Šajā pētījumā tika atklāts, ka tiem orgānu saņēmējiem, kuriem pirms transplantācijas bija negatīvs QF-CMV testa rezultāts un kuri orgānu saņēma no CMV seropozitīva donora, bija desmitkārt lielāks CMV replikācijas risks, salīdzinot ar tiem orgānu saņēmējiem, kuriem pirms transplantācijas bija pozitīvs QF-CMV testa rezultāts (koriģētais relatīvais risks 10,49, 95% TI 1,88–58,46). Tādējādi QF-CMV analīze pirms transplantācijas var būt noderīgs, lai prognozētu CMV replikācijas risku pēc transplantācijas un līdz ar to atļautu veikt individualizētu CMV slimības ārstēšanu pēc parenhimatozo orgānu transplantācijas.

Visā pasaulē ir pabeigti (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) vai pašlaik notiek vairāki citi pētījumi par CMV specifisko CD8⁺ T šūnu atbildes reakciju noteikšanu ar QF-CMV testu to pacientu grupā, kuriem tiek veikta transplantācija.

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

Īpaša CMV imunoloģiskā monitoringa nozīme ir vispārēji atzīta un informācija par to ir publicēta izdevumā *Jaunākās starptautiska konsensa pamatnostādnes par citomegalovīrusu izraisītu saslimšanu pārvaldību, transplantējot parenhimatozos orgānus* (12). Šīs starptautiskās pamatnostādnes, ko izstrādājusi ekspertu grupa, kas specializējas CMV un parenhimatozo orgānu transplantāciju jomā un kuru sasaukusi Transplantācijas biedrības infekcijas slimību nodaļa, pārstāv uz pierādījumiem un ekspertu atzinumiem pamatotas pamatnostādnes par CMV izraisītu saslimšanu pārvaldību, tostarp diagnostiku, imunoloģiju, profilaksi un ārstēšanu.

Šajās pamatnostādnēs secināts, ka “Ar CMV specifisko T šūnu atbildes reakciju imunoloģisko monitoringu var prognozēt indivīdu CMV slimības risku pēc transplantācijas, un tas var būt noderīgs profilaktisko pasākumu vadīšanā un preventīvajā terapijā” (12).

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

- Spēju novērtēt transplantāta saņēmēja CD4⁺ un CD8⁺ T šūnu daudzumu un funkciju
- Spēju izmērīt IFN- γ
- Veikšanas vienkāršību, izmaksu efektivitāti un atkārtojamību
- Ātru izpildes laiku
- Vienkāršu paraugu pārvadāšanu uz specializētām laboratorijām, kurās tiek veiktas analīzes

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

Analīzes veikspējas raksturojums

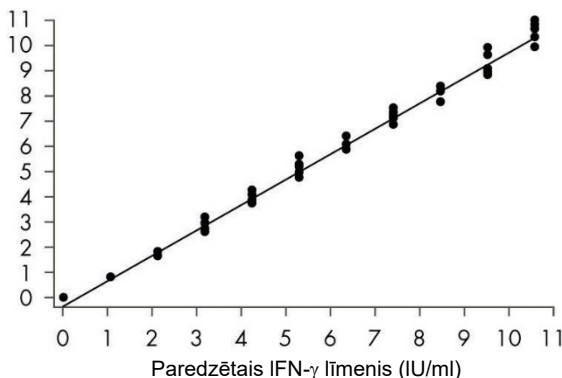
QF-CMV ELISA testā tiek izmantots rekombinants cilvēka IFN- γ standarts, kas ir analizēts attiecībā pret references IFN- γ šķīdumu (NIH ref.: Gxg01-902-535). Testa paraugu rezultāti ir noteikti starptautiskajās vienībās (SV) attiecībā pret standarta līkni, kas izveidota, testējot komplektā piegādātā sekundārā standarta atšķaidījumu.

Ir zināms, ka heterofilās (piemēram, cilvēka pretpeles) antivielas atsevišķu indivīdu serumā vai plazmā rada interferenci ar imūnanalīzēm. Heterofilo antivielu ietekme uz QF-CMV ELISA testu ir samazināta, pievienojot pie Green Diluent normālu peles serumu un izmantojot F(ab')₂ monoklonālu antivielu fragmentus kā IFN- γ uztverošu antivielu, kas uzklāta mikroplates iedobēm.

QF-CMV ELISA testa noteikšanas robeža ir 0,065 SV/ml, un nav pierādījumu par augstas devas āķa (prozona) efektu ar IFN- γ koncentrācijām līdz 10 000 SV/ml. Tika atklāts, ka QF-CMV ELISA antivielām nav krusteniskas reakcijas ne ar vienu analizēto citokīnu, ieskaitot IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 un IL12.

Ir pierādīts, ka QF-CMV ELISA testa rezultāti ir lineāri, uz ELISA plates nejaušā kārtībā novietojot 11 plazmas pūlu piecus atkārtojumus ar zināmām IFN- γ koncentrācijām. Lineārās regresijas līnijai ir $1,002 \pm 0,011$ slīpums un korelācijas koeficients 0,99 (7. attēls.).

Noteiktais IFN- γ līmenis



7. attēls. QF-CMV ELISA testa linearitātes profils, kuru nosaka, testējot 11 plazmas paraugus piecus atkārtojumus ar zināmām IFN- γ koncentrācijām.

QF-CMV ELISA testa atkārtojamība tika novērtēta, testējot 20 plazmas paraugus ar mainīgām IFN- γ koncentrācijām trīs atkārtojumos, ko veikuši trīs dažādi operatori trīs dažādās laboratorijās trīs dienās, kas nebija secīgas. Tādējādi katrs paraugs tika testēts 27 reizes deviņās neatkarīgās analīzes izpildēs. Viens paraugs bija Nil kontrolmateriāls, un tam bija aprēķināta IFN- γ koncentrācija 0,08 (95% TI: 0,07–0,09) SV/ml. Atlikušo 19 plazmas paraugu koncentrāciju diapazons bija no 0,33 (95% TI: 0,31–0,34) līdz 7,7 SV/ml (95% TI: 7,48–7,92).

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

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

Tehniskā informācija

Neskaidri rezultāti

Neskaidri rezultāti var būt saistīti ar testējamā indivīda imunoloģisko statusu, taču tos var izraisīt arī vairāki tehniski faktori:

- no asins parauga ņemšanas līdz inkubēšanai 37 °C temperatūrā pagājušas vairāk nekā 16 stundas;
- asins paraugi glabāti, neievērojot ieteicamo temperatūras diapazonu (22±5 °C);
- nepietiekami samaisīts asins savākšanas stobriņu saturs;
- nepietiekama ELISA plates skalošana.

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

Receklaini plazmas paraugi

Ja ilgi glabātos plazmas paraugos rodas fibrīna recekļi, centrifugējiet paraugus, lai receklainā daļa izgulsnētos un tiktu atvieglota plazmas pipetēšana.

Norādījumi par problēmu novēršanu

Šie norādījumi par problēmu novēršanu var palīdzēt atrisināt iespējamās problēmas. Papildu informāciju skatiet arī tehniskajā informācijā, kas sniegta tīmekļa vietnē www.QuantiFERON.com. Kontaktinformāciju skatiet uz aizmugurējā vāka.

Komentāri un ieteikumi

Zemas standarta materiālu optiskā blīvuma vērtības

- | | |
|---|---|
| a) Kļūda, sagatavojot standarta atšķaidījumu | Nodrošiniet, lai Kit Standard atšķaidījumi tiktu sagatavoti, precīzi ievērojot QF-CMV ELISA ELISA Package Insert ieliktnī sniegtos norādījumus. |
| b) Pipetēšanas kļūda | Nodrošiniet, lai pipetes būtu kalibrētas un tiktu lietotas atbilstoši ražotāja norādījumiem. |
| c) Pārāk zema inkubācijas temperatūra | ELISA testu inkubācija jāveic istabas temperatūrā (22 ± 5 °C). |
| d) Pārāk īss inkubācijas laiks | Platei ar konjugātu, standarta šķīdumiem un paraugiem jānodrošina 120 ± 5 minūtes ilgs inkubācijas periods. Enzyme Substrate Solution uz plates inkubē 30 minūtes. |
| e) Tiek lietots nepareizs plates datu nolasītāja filtrs | Plate jānolasa pie 450 nm ar 620–650 nm references filtru. |
| f) Reāģenti ir pārāk auksti | Visi reāģenti, izņemot Conjugate 100x Concentrate, pirms analīzes sākšanas jāsasilda līdz istabas temperatūrai. Tam nepieciešama aptuveni 1 stunda. |
| g) Beidzies komplekta/komponentu derīguma termiņš | Nodrošiniet, lai komplekts tiktu izlietots pirms derīguma termiņa beigām. Nodrošiniet, lai rekonstituētais Standard šķīdums un Conjugate 100x Concentrate tiktu izlietots 3 mēnešu laikā pēc rekonstitūēšanas datuma. |

Nespecifiskas krāsas veidošanās

- | | |
|---|--|
| a) Nepietiekama plates skalošana | Mazgājiet plati vismaz sešas reizes ar 400 µl skalošanas buferšķīduma uz katru iedobi. Atkarībā no izmantotās skalošanas ierīces var būt nepieciešami vairāk nekā seši skalošanas cikli. Starp cikliem jānodrošina vismaz 5 sekunžu ilgs mērcēšanas laiks. |
| b) ELISA iedobju krusteniskā kontaminācija | Lai mazinātu risku, pipetējiet un maisiet paraugu uzmanīgi. |
| c) Beidzies komplekta/komponentu derīguma termiņš | Nodrošiniet, lai komplekts tiktu izlietots pirms derīguma termiņa beigām. Nodrošiniet, lai rekonstituētais Standard šķīdums un Conjugate 100x Concentrate tiktu izlietots 3 mēnešu laikā pēc rekonstitūēšanas datuma. |

Komentāri un ieteikumi

- | | | |
|----|---|--|
| d) | Enzyme Substrate Solution ir kontaminēts | Atbrīvojieties no substrāta, ja tam ir zilgana nokrāsa. Nodrošiniet, lai tiktu izmantotas tīras reaģentu tvertnes. |
| e) | Plazmas maisīšana centrifūgas stobriņos pirms tās iegūšanas | Nodrošiniet, lai plazmas paraugi tiktu uzmanīgi iegūti virs gela, neveicot pipetēšanu augšup un lejup un uzmanoties, lai nesabojātu materiālu uz gela virsmas. |

Spilgts fons

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Nepietiekama plates skalošana | Mazgājiet plati vismaz sešas reizes ar 400 µl skalošanas buferšķīduma uz katru iedobi. Atkarībā no izmantotās skalošanas ierīces var būt nepieciešami vairāk nekā seši skalošanas cikli. Starp cikliem jānodrošina vismaz 5 sekunžu ilgs mērcēšanas laiks. |
| b) | Pārāk augsta inkubācijas temperatūra | ELISA analīzes inkubācija jāveic istabas temperatūrā ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| c) | Beidzies komplekta/komponentu derīguma termiņš | Nodrošiniet, lai komplekts tiktu izlietots pirms derīguma termiņa beigām. Nodrošiniet, lai rekonstituētais standarta šķīdums un Conjugate 100x Concentrate tiktu izlietots 3 mēnešu laikā pēc rekonstitūēšanas datuma. |
| d) | Enzyme Substrate Solution ir kontaminēts | Atbrīvojieties no substrāta, ja tam ir zilgana nokrāsa. Nodrošiniet, lai tiktu izmantotas tīras reaģentu tvertnes. |

Nelineāra standarta līkne un dublikātu mainīgums

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Nepietiekama plates skalošana | Mazgājiet plati vismaz sešas reizes ar 400 µl skalošanas buferšķīduma uz katru iedobi. Atkarībā no izmantotās skalošanas ierīces var būt nepieciešami vairāk nekā seši skalošanas cikli. Starp cikliem jānodrošina vismaz 5 sekunžu ilgs mērcēšanas laiks. |
| b) | Kļūda, sagatavojot standarta atšķaidījumu | Gādājiet, lai komplekta standarta atšķaidījumi tiktu sagatavoti, precīzi ievērojot šajā iepakojuma ieliktnī sniegtos norādījumus. |
| c) | Nepietiekama samaisīšana | Pirms reaģentu iepildīšanas platē maisiet tos, apvēršot vai uzmanīgi maisot. |
| d) | Nekonsekventa pipetēšanas tehnika vai pārtraukumi analīzes sagatavošanas laikā | Paraugu un standarta materiāla pievienošana ir jāveic vienmērīgā veidā. Visiem reaģentiem ir jābūt sagatavotiem pirms analīzes sākšanas. |

Informāciju par produktiem, kā arī tehniskās rokasgrāmatas bez maksas varat saņemt no QIAGEN, no izplatītāja vai vietnē **www.QuantiFERON.com**.

Atsauces

1. Manuel, O., et al. (2013) 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.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (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. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. 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, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. 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.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

-
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4⁺ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
 12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
 13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
 14. 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, 735.
 15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
 16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

Simboli

Uz iepakojuma un marķējuma var būt tālāk norādītie simboli.

Simbols	Simbola definīcija
 <N>	Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> reakcijām
	Izlietot līdz
	CE zīme
	In vitro diagnostikas medicīnas ierīce
	Kataloga numurs
	Partijas numurs
	Materiāla numurs
	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs
	Temperatūras ierobežojums
	Nelietot atkārtoti
	Sargāt no saules gaismas
	Skatīt lietošanas instrukcijas
	Ražotājs
	Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā

Kontaktinformācija

Lai saņemtu tehnisko palīdzību un papildu informāciju, apmeklējiet mūsu tehniskā atbalsta centra vietni **www.qiagen.com/Support**, zvaniet pa tālruņa numuru 00800-22-44-6000 vai sazinieties ar kādu no QIAGEN tehnisko pakalpojumu dienesta nodaļām vai vietējiem izplatītājiem (skatiet aizmugurējo vāku vai apmeklējiet vietni **www.qiagen.com**).

Saīsināta ELISA analīzes procedūra

1. posms: Asins paraugu inkubācija

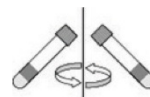
1. Asins savākšanas stobriņos paņemiet pacienta asins paraugu un samaisiet stobriņu saturu, sakratot stobriņus desmit (10) reizes tikai tik spēcīgi, lai visa stobriņa iekšējā virsma tiktu pārklāta ar asinīm, tādējādi izšķīdinot uz stobriņa sienām esošos antigēnus.



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



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



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



2. posms: IFN- γ ELISA

1. Nodrošiniet, lai visi ELISA testa komponenti, izņemot Conjugate 100x Concentrate, būtu istabas temperatūrā vismaz 60 minūtes.



2. Rekonstituējiet Kit Standard ar koncentrāciju 8,0 SV/ml, izmantojot destilētu vai dejonizētu ūdeni. Sagatavojiet četrus (4) standarta atšķaidījumus.



3. Rekonstituējiet liofilizēto Conjugate 100x Concentrate, izmantojot destilētu vai dejonizētu ūdeni.

4. Sagatavojiet konjugāta darba šķīdumu ar Green Diluent atšķaidītāju un iepildiet 50 µl visās iedobēs.



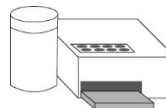
5. Atbilstošajās iedobēs ievadiet 50 µl testa plazmas paraugu un 50 µl standarta šķīdumu. Samaisiet ar kratītāju.



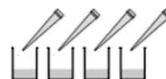
6. Inkubējiet 120 minūtes istabas temperatūrā.



7. Mazgājiet iedobes vismaz 6 reizes ar 400 µl skalošanas buferšķīduma uz katru iedobi.



8. Pievienojiet iedobēs 100 µl Enzyme Substrate Solution. Samaisiet ar kratītāju.



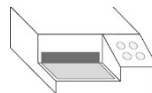
9. Inkubējiet 30 minūtes istabas temperatūrā.



10. Pievienojiet visās iedobēs 50 μ l Enzyme Stopping Solution.
Samaisiet ar kratītāju.



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



12. Analizējiet rezultātus.



Rokasgrāmatas pārskatījumu vēsture

Dokuments	Izmaiņas	Datums
L1075110-R06	Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā, pievienoti šķīvju vāki, 9. lpp.	2019. gada oktobris

Šī lappuse ir atstāta tukša ar nodomu

Šī lappuse ir atstāta tukša ar nodomu

Preču zīmes: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProCin® (Rohm and Haas Co.); SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

Ierobežots licences līgums QuantiFERON-CMV ELISA

Lietojot šo produktu, katrs produkta pircējs vai lietotājs piekrīt tālāk sniegtajiem nosacījumiem.

1. Šo produktu drīkst lietot tikai saskaņā ar protokolus, kuri ir iekļauti šī produkta komplektācijā un šajā rokasgrāmatā, un to drīkst lietot tikai kopā ar šajā panelī iekļautajiem komponentiem. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai izmantotu vai iekļautu šajā panelī ietvertos komponentus kopā ar jebkādiem komponentiem, kas nav iekļauti šajā panelī, izņemot gadījumus, kas aprakstīti kopā ar produktu piegādātajos protokolos un šajā rokasgrāmatā, kā arī papildu protokolos, kas pieejami vietnē www.qiagen.com. Dažus no šiem papildu protokolos QIAGEN lietotājiem ir nodrošinājuši QIAGEN lietotāji. QIAGEN nav veicis šo protokolu rūpīgu testēšanu vai optimizēšanu. Uzņēmums QIAGEN nedz apliecina, nedz garantē, ka tie nepārkāpj trešo personu tiesības.

2. Izņemot skaidri norādītās licences, uzņēmums QIAGEN nesniedz nekādas citas garantijas, ka šis panelis un/vai tā lietošana nepārkāpj trešo pušu tiesības.

3. Šis panelis un tā komponenti ir licencēti vienreizējai lietošanai, un tos nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.

4. Uzņēmums QIAGEN īpaši atsakās no jebkādām citām tiesām vai netiesām licencēm, kas nav skaidri norādītas.

5. Paneļa pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt jebkādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš minētajām aizliegtajām darbībām. Uzņēmums QIAGEN var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar paneli un/vai tā komponentiem.

Atjauninātos licences nosacījumus skatiet vietnē www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, visas tiesības paturētas.

