
QuantiFERON[®]-CMV

Ένθετο συσκευασίας 2 x 96

Εξέταση ιντερφερόνης-γ σε ολικό αίμα για τη μέτρηση της απάντησης σε πεπτιδικά αντιγόνα του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Αυστραλία

Αρ. τηλεφώνου: (Αυστραλία) +613-9840-9800, (Ευρώπη) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

1075110EL Αναθ. 01



Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Εισαγωγή	5
Αρχές της μεθόδου	6
Απαιτούμενος χρόνος για την εκτέλεση της ανάλυσης	6
Αντιδραστήρια και αποθήκευση	7
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	8
Αποθήκευση και χειρισμός	8
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	9
Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων	10
Οδηγίες χρήσης	11
Στάδιο 1 — Επώαση αίματος και συλλογή πλάσματος	11
Στάδιο 2 — QuantiFERON-CMV ELISA για ανθρώπινη IFN-γ	12
Υπολογισμοί και ερμηνεία αναλύσεων	15
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	16
Περιορισμοί	16
Αναμενόμενες τιμές	17
Χαρακτηριστικά απόδοσης	18
Κατηγορηματική ανάλυση	18
Κατώφλιο μεθόδου	19
Κλινικές μελέτες	19
Ειδικότητα	20
Ευαισθησία	20
Μελέτες που αναδεικνύουν την κλινική χρησιμότητα της μεθόδου	20
Διεθνείς ομόφωνες κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την αντιμετώπιση του κυτταρομεγαλοϊού στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων	24
Χαρακτηριστικά απόδοσης ανάλυσης	25
Τεχνικές πληροφορίες	27
Απροσδιόριστα αποτελέσματα	27
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	28

Βιβλιογραφία	29
Τεχνική υποστήριξη	30
Συνοπτική διαδικασία εξέτασης	34
Στάδιο 1 — επώαση αίματος	34
Στάδιο 2 — IFN-γ ELISA	34

Προβλεπόμενη χρήση

Η ανάλυση QuantiFERON-CMV (QF-CMV) είναι μια ανάλυση *in vitro* η οποία χρησιμοποιεί ένα μείγμα πεπτιδίων που μιμείται τις πρωτεΐνες του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV) με στόχο τη διέγερση κυττάρων που περιέχονται σε ηπαρινισμένο ολικό αίμα. Εκτελείται ανίχνευση ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) μέσω μιας ενζυμικής μεθόδου ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της *in vitro* απάντησης σε αυτά τα πεπτιδικά αντιγόνα, τα οποία σχετίζονται με τον ανοσολογικό έλεγχο των λοιμώξεων από CMV. Η απώλεια αυτής της ανοσολογικής λειτουργίας ενδεχομένως συνδέεται με ανάπτυξη νόσου από CMV. Η προβλεπόμενη χρήση της ανάλυσης QF-CMV είναι η παρακολούθηση του επιπέδου ανοσίας των ασθενών κατά του CMV.

Η ανάλυση QF-CMV δεν είναι εξέταση για τον εντοπισμό των λοιμώξεων από CMV και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο λοίμωξης από CMV.

Εισαγωγή

Ο ιός CMV είναι ένας ερπητοϊός που μολύνει ένα ποσοστό 50–85% των ενηλίκων στον πληθυσμό. Αποτελεί μια συχνή επιπλοκή της ανοσοκαταστολής, ιδίως μετά από μεταμόσχευση, και μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των μεταμοσχευμένων ασθενών. Οι σύγχρονες αγωγές ανοσοκαταστολής που αποσκοπούν στο να αποτραπεί η απόρριψη των μεταμοσχευμένων οργάνων επηρεάζουν δυσμενώς τα T λεμφοκύτταρα και την κυτταροεξαρτώμενη ανοσία (CMI), με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία στις ιογενείς λοιμώξεις μετά τη μεταμόσχευση. Η σημασία της δράσης των T κυττάρων στην καταστολή του πολλαπλασιασμού του CMV αποδεικνύεται επίσης από το γεγονός ότι τα ειδικά για τον CMV κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL) CD8⁺ μπορούν να προσφέρουν προστασία από τις παθήσεις που συνδέονται με τον ιό. Η καταμέτρηση των ειδικών για τον CMV κυττάρων CTL CD8⁺ στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και η παραγόμενη ποσότητα IFN- γ αποτελούν δείκτες πρόβλεψης του κινδύνου ανάπτυξης νόσου από CMV. Η παραγωγή IFN- γ μπορεί να αποτελέσει λειτουργικό υποκατάστατο δείκτη αντί της αναγνώρισης κυττάρων CTL ειδικών για τον CMV.

Η ανάλυση QF-CMV είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της απάντησης CMI σε πεπτιδικά αντιγόνα που μιμούνται τις πρωτεΐνες του CMV. Τα πεπτιδία CMV έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να στοχεύουν τα T κύτταρα CD8⁺, συμπεριλαμβανομένων των απλοτύπων HLA τάξης I A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 και Cw6 (A30, B13), οι οποίοι καλύπτουν πάνω από το 98% του ανθρώπινου πληθυσμού. Το αίμα των ατόμων με μόλυνση CMV συνήθως περιέχει λεμφοκύτταρα CD8⁺ που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα αυτά. Η διαδικασία αναγνώρισης περιλαμβάνει την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης IFN- γ . Η ανίχνευση και ο επακόλουθος ποσοτικός προσδιορισμός της IFN- γ αποτελούν τη βάση για την ανάλυση αυτή.

Αρχές της μεθόδου

Η ανάλυση QF-CMV εκτελείται σε 2 στάδια. Αρχικά, ολικό αίμα συλλέγεται σε καθένα από τα σωληνάρια συλλογής αίματος της ανάλυσης QF-CMV: ένα σωληνάριο μηδενικού μάρτυρα, ένα σωληνάριο αντιγόνου CMV και ένα σωληνάριο μιτογόνου.

Το σωληνάριο μιτογόνου χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας στην ανάλυση QF-CMV. Η χρήση του επιβάλλεται ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν αμφιβολίες ως προς την κατάσταση ανοσίας του ατόμου.

Τα σωληνάρια θα πρέπει να επωαστούν στους 37°C το συντομότερο δυνατόν, εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος. Μετά από μια περίοδο επώασης διάρκειας 16 έως 24 ωρών, τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται και η ποσότητα της IFN-γ (IU/ml) προσδιορίζεται με τη μέθοδο QF-CMV ELISA.

Η ποσότητα της IFN-γ σε δείγματα πλάσματος από τα σωληνάρια αντιγόνου CMV και μιτογόνου είναι συχνά μεγαλύτερη από το ανώτατο όριο μέτρησης των περισσότερων συσκευών μέτρησης ELISA, ακόμα και σε άτομα υπό ανοσοκαταστολή μέτριου βαθμού. Για αποτελέσματα **ποιοτικού προσδιορισμού**, χρησιμοποιήστε τις τιμές που υπολογίζονται από μη αραιωμένο πλάσμα. Για αποτελέσματα **ποσοτικού προσδιορισμού**, όταν απαιτούνται πραγματικές τιμές σε IU/ml, τα δείγματα πλάσματος θα πρέπει να αραιωθούν σε αναλογία 1/10 με πράσινο αραιωτικό και να αναλυθούν μέσω ELISA μαζί με μη αραιωμένο πλάσμα.

Σημείωση: Για τα δείγματα που βρίσκονται εντός του εύρους μέτρησης της QF-CMV ELISA (δηλαδή μέχρι τις 10 IU/ml), θα πρέπει να χρησιμοποιείται το αποτέλεσμα που λαμβάνεται από το δείγμα μη αραιωμένου πλάσματος. Σε τέτοιες συγκεντρώσεις IFN-γ, οι τιμές που θα ληφθούν από τα αραιωμένα σε αναλογία 1/10 δείγματα πλάσματος ενδέχεται να είναι ανακριβείς.

Ένα δείγμα θεωρείται αντιδραστικό για την απάντηση IFN-γ όταν το σωληνάριο αντιγόνου CMV δίνει αποτέλεσμα σημαντικά μεγαλύτερο από την τιμή IFN-γ IU/ml του μηδενικού μάρτυρα. Το διεγερμένο με μιτογόνο δείγμα πλάσματος χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας IFN-γ για κάθε εξεταζόμενο δείγμα. Οι χαμηλές απαντήσεις στο μιτογόνο συνιστούν απροσδιόριστο αποτέλεσμα όταν το δείγμα αίματος παρουσιάζει επίσης μη αντιδραστική απάντηση στα αντιγόνα CMV. Τέτοιος συνδυασμός αποτελεσμάτων μπορεί να προκύψει εάν υπάρχουν ανεπαρκή λεμφοκύτταρα, μειωμένη λεμφοκυτταρική δραστηριότητα λόγω ακατάλληλου χειρισμού του δείγματος, λανθασμένη πλήρωση/ανάμειξη του σωληναρίου μιτογόνου, ή αδυναμία των λεμφοκυττάρων του ασθενούς να παραγάγουν IFN-γ, όπως συμβαίνει π.χ. στους πρόσφατα μεταμοσχευμένους ασθενείς. Το μηδενικό δείγμα χρησιμεύει στη διόρθωση των αποτελεσμάτων για το υπόβαθρο IFN-γ (μη ειδική παραγωγή) στα δείγματα αίματος. Το επίπεδο IFN-γ στο μηδενικό σωληνάριο αφαιρείται από το επίπεδο IFN-γ του σωληναρίου αντιγόνου CMV και του σωληναρίου μιτογόνου (βλ. «Ερμηνεία αποτελεσμάτων» στη σελ. 16 αυτού του ενθέτου συσκευασίας, για μια περιγραφή του τρόπου ερμηνείας των αποτελεσμάτων της ανάλυσης QF-CMV).

Απαιτούμενος χρόνος για την εκτέλεση της ανάλυσης

Παρακάτω υπολογίζεται ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση QF-CMV και αναφέρεται επίσης ο χρόνος για την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων σε παρτίδες:

Επώαση σωληναρίων αίματος στους 37°C: 16 έως 24 ώρες

ELISA:

Περίπου 3 ώρες για 1 πλάκα ELISA

Λιγότερο από 1 ώρα εργασίας

Υπολογίστε άλλα 10 έως 15 λεπτά για κάθε επιπλέον πλάκα

Αντιδραστήρια και αποθήκευση

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Σωληνάρια συλλογής αίματος με αντιγόνα CMV και μάρτυρες (συσκευασία για έναν ασθενή))	
Αρ. καταλόγου	0192-0301
Αριθμός παρασκευών	1
QuantiFERON Nil Control (Μηδενικός μάρτυρας QuantiFERON) (γκρίζο πώμα)	1 σωληνάριο
CMV Antigen (Αντιγόνο CMV) (μπλε πώμα)	1 σωληνάριο
QuantiFERON Mitogen Control (Μάρτυρας μιτογόνου QuantiFERON) (μωβ πώμα)	1 σωληνάριο
Ένθετο συσκευασίας	1
QuantiFERON-CMV ELISA Components (Συστατικά ανάλυσης QuantiFERON-CMV ELISA)	
Αρ. καταλόγου	0350-0201
Σειρές μικροπλάκας	Σειρές 24 x 8 βυθισμάτων
Human IFN- γ Standard (Πρότυπο ανθρώπινης IFN- γ), λυόφιλο	1 φιαλίδιο
Green Diluent (Πράσινο αραιωτικό)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου QuantiFERON 100X), λυόφιλο	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης QuantiFERON 20X)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (Διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου QuantiFERON)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης QuantiFERON)	1 x 15 ml

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Επωαστήρας 37°C, δεν απαιτείται CO₂
- Βαθμονομημένες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου για χορήγηση 10 μl έως 1000 μl, με ρύγχη μίας χρήσης
- Βαθμονομημένη πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα χορήγησης 50 μl και 100 μl, με ρύγχη μίας χρήσης
- Συσκευή ανακίνησης μικροπλακών
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό, 2 λίτρα
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακών (συνιστάται αυτόματη συσκευή)
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών με φίλτρο 450 nm και φίλτρο αναφοράς 620 nm έως 650 nm

Αποθήκευση και χειρισμός

Σωληνάρια συλλογής αίματος

- Αποθηκεύστε τα σωληνάρια συλλογής αίματος σε θερμοκρασία 4°C έως 25°C.
- Η διάρκεια ζωής των σωληναρίων συλλογής αίματος QuantiFERON-CMV φθάνει τους 15 μήνες από την ημερομηνία παραγωγής, εφόσον φυλάσσονται στους 4°C έως 25°C.

Αντιδραστήρια kit ELISA

- Αποθηκεύστε το kit σε θερμοκρασία 2°C έως 8°C.
- Να προστατεύετε διαρκώς το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου από το άμεσο ηλιακό φως.

Ανασυσταθέντα και αχρησιμοποίητα αντιδραστήρια

Για οδηγίες σχετικά με την ανασύσταση των αντιδραστηρίων, βλ. «Οδηγίες χρήσης – Στάδιο 2» (βήματα 3 και 5 στις σελίδες 12 και 13).

- Το ανασυσταθέν πρότυπο του kit μπορεί να διατηρηθεί μέχρι και για 3 μήνες εφόσον φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2°C έως 8°C.

Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του προτύπου του kit.

- Μετά την ανασύσταση, το αχρησιμοποίητο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου QuantiFERON 100X πρέπει να επιστραφεί σε χώρο φύλαξης με θερμοκρασία 2°C έως 8°C και να χρησιμοποιηθεί εντός 3 μηνών.

Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του διαλύματος συζευγμένου μορίου.

- Το διάλυμα εργασίας του συζευγμένου μορίου πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 6 ωρών από την παρασκευή του.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου (17°C έως 27°C) μέχρι και για 2 εβδομάδες.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Διατίθενται στο Διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να δείτε και να εκτυπώσετε τα SDS για κάθε κιτ της QIAGEN καθώς και για τα συστατικά του.



ΠΡΟΣΟΧΗ: Να χειρίζεστε το ανθρώπινο αίμα ως δυνητικά μολυσματικό υλικό. Τηρήστε τις σχετικές κατευθυντήριες οδηγίες περί χειρισμού δειγμάτων αίματος.

Οι παρακάτω φράσεις κινδύνου και ασφαλείας αφορούν τα συστατικά του κιτ QF-CMV ELISA.

Διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης QuantiFERON



Περιέχει θειικό οξύ: Ερεθιστικό. Φράσεις κινδύνου και ασφαλείας:* R36/38, S26-36/37/39

- Το πράσινο αραιωτικό περιέχει φυσιολογικό ορό ποντικού και καζεΐνη, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις - αποφύγετε την επαφή με το δέρμα.

Για επείγουσες καταστάσεις που αφορούν χημικές ουσίες

Διαφυγή, διαρροή, έκθεση ή ατύχημα

Καλέστε την CHEMTREC, ημέρα ή νύχτα

Εντός των ΗΠΑ και του Καναδά: 1-800-424-9300

Εκτός των ΗΠΑ και του Καναδά: +1-703-527-3887 (δεκτές και κλήσεις με χρέωση του καλούμενου)

Περισσότερες πληροφορίες

Δελτία δεδομένων ασφαλείας: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα, S26: Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, πλύνετε τα αμέσως με άφθονο νερό και ζητήστε ιατρική συμβουλή, S36/37/39: Να φοράτε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία, γάντια και μέσα προστασίας των ματιών/του προσώπου.

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη:

Οι αποκλίσεις από τις οδηγίες στο ένθετο συσκευασίας της ανάλυσης QF-CMV μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα. Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες πριν τη χρήση.

- Μη χρησιμοποιήσετε το κιτ εάν κάποιο φιαλίδιο αντιδραστήριου παρουσιάζει ενδείξεις ζημιάς ή διαρροής πριν τη χρήση.
- Μην αναμιγνύετε και μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια ELISA από κιτ QF-CMV ELISA άλλων παρτίδων.
- Απορρίψτε τα αχρησιμοποιήτα αντιδραστήρια και τα βιολογικά δείγματα όπως ορίζουν οι τοπικοί και οι εθνικοί κανονισμοί.
- Μη χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV και τα κιτ QF-CMV ELISA μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Η ανάλυση QF-CMV χρησιμοποιεί τα εξής σωληνάρια συλλογής αίματος:

1. Μηδενικός μάρτυρας (γκρίζο πώμα)
2. Αντιγόνο CMV (μπλε πώμα)
3. Μάρτυρας μιτογόνου (μωβ πώμα)

Στο εσωτερικό τοίχωμα των σωληναρίων συλλογής αίματος υπάρχουν αποξηραμένα αντιγόνα, και συνεπώς το περιεχόμενο των σωληναρίων πρέπει να αναμιγνύεται σχολαστικά με το αίμα. Τα σωληνάρια πρέπει να τοποθετηθούν σε επωαστήρα στους 37°C το συντομότερο δυνατόν, εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος.

Για τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα θα πρέπει να ακολουθούνται οι παρακάτω διαδικασίες:

1. **Για κάθε ασθενή, συλλέξτε μέσω φλεβοκέντησης 1 ml αίματος απευθείας στα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV.**
 - Επειδή τα σωληνάρια του 1 ml αναρροφούν το αίμα σχετικά αργά, αφήστε το σωληνάριο πάνω στη βελόνα για 2–3 δευτερόλεπτα επιπλέον από τη στιγμή που το σωληνάριο θα φαίνεται να έχει γεμίσει, ώστε να βεβαιωθείτε ότι θα ληφθεί ο σωστός όγκος.
Η μαύρη ένδειξη στο πλάι των σωληναρίων δείχνει τον όγκο πλήρωσης του 1 ml. Τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV έχουν επικυρωθεί για όγκους από 0,8 έως 1,2 ml. Εάν η στάθμη του αίματος σε κάποιο σωληνάριο δεν πλησιάζει στην ενδεικτική γραμμή, καλό είναι να ληφθεί νέο δείγμα αίματος.
 - Τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV έχουν επικυρωθεί για τη λήψη όγκων μεταξύ 0,8 ml και 1,2 ml σε υψόμετρο από τη στάθμη της θάλασσας μέχρι το υψόμετρο των 810 μέτρων (2.650 πόδια). Σε υψόμετρα μεγαλύτερα από αυτό, οι χρήστες πρέπει να διασφαλίσουν ότι η ποσότητα του λαμβανόμενου αίματος βρίσκεται εντός των ορίων αυτών. Εάν όμως ληφθεί ανεπαρκής ποσότητα αίματος, τότε μπορείτε να συλλέξετε αίμα με μια σύριγγα και να μεταφέρετε 1 ml σε καθένα από τα 3 σωληνάρια. Για λόγους ασφάλειας, καλό είναι να γίνει αυτό με αφαίρεση της βελόνας της σύριγγας (σύμφωνα με τις κατάλληλες διαδικασίες ασφάλειας), αφαίρεση των πωμάτων από τα τρία σωληνάρια QF-CMV και προσθήκη 1 ml αίματος σε καθένα από αυτά (μέχρι τη μαύρη ένδειξη στο πλάι της ετικέτας του σωληναρίου). Τοποθετήστε ξανά τα πώματα των σωληναρίων με ασφάλεια και αναμειξτε τα όπως περιγράφεται παρακάτω.
 - Εάν χρησιμοποιείται βελόνα τύπου πεταλούδας για την αιμοληψία, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα σωληνάριο εκκαθάρισης ώστε να διασφαλιστεί ότι η σωλήνωση έχει γεμίσει με αίμα προτού χρησιμοποιηθούν τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV.

2. **Αμέσως μόλις γεμίσετε τα σωληνάρια, ανακινήστε τα δέκα (10) φορές αρκετά έντονα ώστε να βεβαιωθείτε ότι όλη η εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου έχει καλυφθεί με αίμα, προκειμένου να διαλυθούν τα αντιγόνα που βρίσκονται στα τοιχώματα του σωληναρίου, αλλά όχι εντονότερα από αυτό.**
 - Κατά τη στιγμή της πλήρωσης με αίμα, τα σωληνάρια θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία 17°C–25°C.
 - Η υπερβολικά έντονη ανακίνηση μπορεί να προκαλέσει αποδιοργάνωση της γέλης και θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανώμαλα αποτελέσματα.
3. **Επισημάνετε κατάλληλα τα σωληνάρια.**
4. **Τα σωληνάρια πρέπει να τοποθετηθούν σε επωαστήρα στους 37°C ± 1°C το συντομότερο δυνατόν, εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος. Μην ψύχετε και μην καταψύχετε τα δείγματα αίματος.**

Οδηγίες χρήσης

Στάδιο 1 — Επώαση αίματος και συλλογή πλάσματος

1. **Εάν το αίμα δεν επωαστεί αμέσως μετά τη συλλογή, θα πρέπει να επαναληφθεί η ανάμειξη των σωληναρίων ακριβώς πριν από την επώαση, όπως περιγράφεται στο βήμα 2 της προηγούμενης ενότητας.**
2. **Επώαστε τα σωληνάρια σε ΚΑΤΑΚΟΡΥΦΗ θέση, στους 37°C, για 16 έως 24 ώρες. Για την επώαση δεν απαιτείται ούτε CO₂ ούτε ύγρανση.**
3. **Μετά την επώαση, τα σωληνάρια συλλογής αίματος μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία μεταξύ 2°C και 27°C μέχρι και για 3 ημέρες πριν από το επόμενο βήμα. Μετά την επώαση των σωληναρίων στους 37°C, φυγοκεντρήστε τα επί 15 λεπτά με ταχύτητα 2000 έως 3000 RCF (g). Το βύσμα γέλης θα διαχωρίσει τα κύτταρα από το πλάσμα. Εάν δεν συμβεί αυτό, τα σωληνάρια πρέπει να φυγοκεντρηθούν ξανά σε υψηλότερη ταχύτητα.**
 - Το πλάσμα μπορεί να συλλεχθεί και χωρίς φυγοκέντρηση, αλλά απαιτείται αυξημένη προσοχή ώστε να αφαιρεθεί το πλάσμα χωρίς να διαταραχθούν τα κύτταρα.
4. **Μετά τη φυγοκέντρηση, αποφύγετε την παλινδρόμηση του υγρού κατά την αναρρόφηση και γενικά την ανάδευση του πλάσματος κατ' οποιονδήποτε τρόπο πριν τη συλλογή. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.**
 - Τα δείγματα πλάσματος θα πρέπει να συλλέγονται αποκλειστικά και μόνο με πιπέτα.
 - Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να φορτωθούν απευθείας από τα φυγοκεντρημένα σωληνάρια συλλογής αίματος στην πλάκα QF-CMV ELISA, ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται αυτοματοποιημένοι σταθμοί εργασίας ELISA.
 - Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να φυλαχθούν μέχρι και για 28 ημέρες σε θερμοκρασία 2°C έως 8°C ή σε θερμοκρασία μικρότερη των -20°C (κατά προτίμηση μικρότερη των -70°C) για παρατεταμένες χρονικές περιόδους σε σωληνάρια ή σε δοχεία φύλαξης πλάσματος.

Στάδιο 2 — QuantiFERON-CMV ELISA για ανθρώπινη IFN-γ

1. Όλα τα δείγματα πλάσματος και τα αντιδραστήρια, εκτός από το συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100X, πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (17°C έως 27°C) πριν τη χρήση. Αφήστε να περάσουν τουλάχιστον 60 λεπτά για εξισορρόπηση.

2. Αφαιρέστε τις περιττές σειρές από το πλαίσιο, σφραγίστε ξανά τη θήκη αλουμινίου και τοποθετήστε την ξανά στο ψυγείο για φύλαξη μέχρι την επόμενη χρήση.

Αφήστε τουλάχιστον μία σειρά για τα πρότυπα διαλύματα της QF-CMV ELISA, και επαρκή αριθμό σειρών για τον αριθμό των εξεταζόμενων ασθενών. Μετά τη χρήση, φυλάξτε το πλαίσιο και το καπάκι για χρήση με τις υπόλοιπες σειρές.

3. Ανασυστήστε το λυόφιλο πρότυπο του kit με τον όγκο απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου του προτύπου. Αναμείξτε ήπια ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο ο σχηματισμός αφρού και να διασφαλιστεί πλήρης επαναδιαλυτοποίηση. Η ανασύσταση του προτύπου μέχρι τον καθορισμένο όγκο θα δώσει ένα διάλυμα με συγκέντρωση 8,0 IU/ml.

4. Η πρότυπη καμπύλη σχεδιάζεται με χρήση 3 αραιώσεων του προτύπου του kit, μαζί με πράσινο αραιωτικό μόνο ως πρότυπο 4 (0 IU/ml).

Χρησιμοποιήστε το ανασυσταθέν πρότυπο του kit για να δημιουργήσετε μια σειρά αραιώσεων με 3 συγκεντρώσεις IFN-γ. Αραιώστε με το πράσινο αραιωτικό (GD) του kit (βλ. Εικόνα 1). Τα πρότυπα θα πρέπει να αναλυθούν τουλάχιστον εις διπλούν – με τα βήματα που περιγράφονται παρακάτω παράγεται επαρκής όγκος για την ανάλυση αυτή.

α. Επισημάνετε 4 σωληνάρια ως «S1», «S2», «S3», «S4».

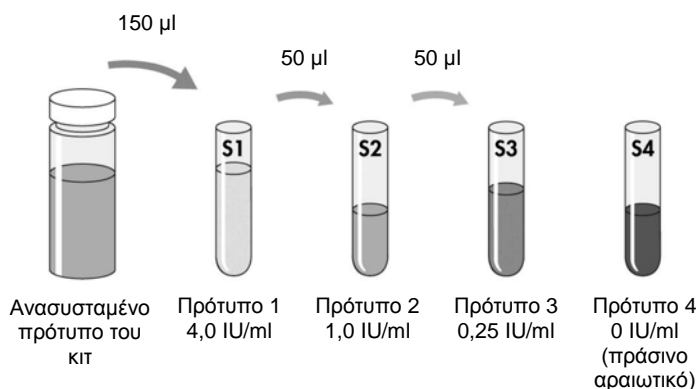
β. Προσθέστε 150 μl πράσινου αραιωτικού στα 4 σωληνάρια (S1–S4).

γ. Προσθέστε 150 μl του προτύπου του kit στο S1 και αναμείξτε καλά.

δ. Μεταφέρετε 50 μl από το S1 στο S2 και αναμείξτε καλά.

ε. Μεταφέρετε 50 μl από το S2 στο S3 και αναμείξτε καλά.

στ. Ένα σωληνάριο με πράσινο αραιωτικό μόνο θα χρησιμοποιηθεί ως μηδενικό πρότυπο (S4).



Εικόνα 1. Σχεδίαση της πρότυπης καμπύλης. Παρασκευάστε νέες αραιώσεις του προτύπου του kit για κάθε περίοδο εργασίας ELISA.

5. Ανασυστήστε το λυόφιλο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου QuantiFERON 100X με 0,3 ml απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού. Αναμείξτε ήπια ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο ο σχηματισμός αφρού και να διασφαλιστεί πλήρης διαλυτοποίηση του συζευγμένου μορίου.
6. Η συγκέντρωση εργασίας του συζευγμένου μορίου παρασκευάζεται με αραιώση της απαιτούμενης ποσότητας ανασυσταθέντος συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100X σε πράσινο αραιωτικό, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 1 – Παρασκευή συζευγμένου μορίου.
 - Αναμείξτε σχολαστικά αλλά ήπια ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.
 - Επιστρέψτε το αχρησιμοποίητο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100X στους 2°C έως 8°C αμέσως μετά τη χρήση.
 - Χρησιμοποιήστε αποκλειστικά πράσινο αραιωτικό.

Πίνακας 1. Παρασκευή συζευγμένου μορίου

Αριθμός σειρών	Όγκος συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100X	Όγκος πράσινου αραιωτικού
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. Πριν από την ανάλυση, τα δείγματα πλάσματος πρέπει να αναμειχθούν ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή της IFN-γ σε κάθε δείγμα. Αραιώστε επίσης τα δείγματα πλάσματος με αντιδραστήριο CMV και μιτογόνο σε αναλογία 1/10 με πράσινο αραιωτικό (10 µl πλάσματος αναμειγμένα με 90 µl GD) εάν απαιτούνται ποσοτικά αποτελέσματα. Το πλάσμα μηδενικού μάρτυρα δεν πρέπει να αραιωθεί.

Συνιστάται η ανάλυση των παρακάτω δειγμάτων:

- Μηδενικό, αντιγόνο CMV, μιτογόνο, αντιγόνο CMV (1/10), μιτογόνο (1/10)

Ωστόσο, το λογισμικό ανάλυσης QuantiFERON-CMV υποστηρίζει επίσης τους παρακάτω συνδυασμούς δειγμάτων ασθενούς:

- Μηδενικό, αντιγόνο CMV, μιτογόνο
- Μηδενικό, αντιγόνο CMV (1/10), μιτογόνο (1/10)
- Μηδενικό, αντιγόνο CMV, μιτογόνο, αντιγόνο CMV (1/10)
- Μηδενικό, αντιγόνο CMV (1/10), μιτογόνο

8. Προσθέστε 50 µl πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος συζευγμένου μορίου σε συγκέντρωση εργασίας στα απαιτούμενα βυθίσματα ELISA, χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.

9. Προσθέστε 50 μl από τα εξεταζόμενα δείγματα πλάσματος στα κατάλληλα βυθίσματα, χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα. Τέλος, προσθέστε 50 μl από καθένα από τα πρότυπα 1 έως 4.
10. Αναμείξτε σχολαστικά το συζευγμένο μόριο και τα δείγματα πλάσματος/πρότυπα χρησιμοποιώντας συσκευή ανακίνησης μικροπλακών επί 1 λεπτό.
11. Καλύψτε κάθε πλάκα με ένα καπάκι και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (17°C έως 27°C) επί 120 ± 5 λεπτά.
 - Οι πλάκες δεν θα πρέπει να εκτεθούν σε άμεσο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της επώασης.
12. Κατά τη διάρκεια της επώασης, αραιώστε ένα μέρος συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 20X με 19 μέρη απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού και αναμείξτε σχολαστικά. Παρέχεται επαρκές συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 20X για να παρασκευαστούν 2 λίτρα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας.
Εκπλύνετε τα βυθίσματα με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας επί 6 κύκλους τουλάχιστον. Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακών.
 - Η σχολαστική έκπλυση είναι πολύ σημαντική για την εκτέλεση της ανάλυσης. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα βυθίσματα **γεμίζουν εντελώς** με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μέχρι το χείλος του βυθίσματος για κάθε κύκλο έκπλυσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων μεταξύ των κύκλων.
 - Θα πρέπει να προστίθεται τυπικό απολυμαντικό εργαστηρίου στη δεξαμενή εκροής και θα πρέπει να εφαρμόζονται οι καθιερωμένες διαδικασίες για την απολύμανση των δυνητικά λοιμογόνων υλικών.
13. Χτυπήστε τις πλάκες ανάποδα πάνω σε απορροφητικό χαρτί για να απομακρυνθεί το εναπομένον ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Προσθέστε 100 μl διαλύματος υποστρώματος-ενζύμου σε κάθε βύθισμα και αναμείξτε σχολαστικά με μια συσκευή ανακίνησης μικροπλακών.
14. Καλύψτε κάθε πλάκα με ένα καπάκι και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (17°C έως 27°C) επί 30 λεπτά.
 - Οι πλάκες δεν θα πρέπει να εκτεθούν σε άμεσο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της επώασης.
15. Μετά την 30λεπτη επώαση, προσθέστε 50 μl διαλύματος διακοπής ενζυμικής αντίδρασης σε κάθε βύθισμα και αναμείξτε.
 - Το διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης θα πρέπει να προστίθεται στα βυθίσματα με την ίδια σειρά και με την ίδια περίπου ταχύτητα όπως και το υπόστρωμα στο βήμα 13.
16. Μετρήστε την οπτική πυκνότητα (OD) σε κάθε βύθισμα μέσα σε 5 λεπτά από τη διακοπή της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών που διαθέτει φίλτρο 450 nm και φίλτρο αναφοράς 620 nm έως 650 nm. Οι τιμές OD χρησιμοποιούνται για να υπολογιστούν τα αποτελέσματα.

Υπολογισμοί και ερμηνεία αναλύσεων

Λογισμικό ανάλυσης QuantiFERON-CMV, για την ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων και τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, προσφέρεται από την QIAGEN στη διεύθυνση www.QuantiFERON.com.

Το λογισμικό εκτελεί εκτίμηση ελέγχου ποιότητας στην ανάλυση, σχεδιάζει την πρότυπη καμπύλη και δίνει ένα αποτέλεσμα εξέτασης για κάθε ασθενή, όπως περιγράφεται στην ενότητα περί ερμηνείας αποτελεσμάτων.

Εναλλακτικά, αντί για τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης QF-CMV, ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει με την εξής μέθοδο.

Παραγωγή της πρότυπης καμπύλης

Προσδιορίστε τις μέσες τιμές OD από τις επαναλήψεις του προτύπου του kit σε κάθε πλάκα.

Κατασκευάστε μια πρότυπη καμπύλη $\log_{(e)}-\log_{(e)}$, σχεδιάζοντας τις τιμές $\log_{(e)}$ της μέσης OD (άξονας y) έναντι των τιμών $\log_{(e)}$ της συγκέντρωσης IFN- γ των προτύπων, σε IU/ml (άξονας x-), παραλείποντας το μηδενικό πρότυπο από τους υπολογισμούς αυτούς. Μέσω ανάλυσης παλινδρόμησης, υπολογίστε την καμπύλη καλύτερης προσαρμογής για την πρότυπη καμπύλη.

Χρησιμοποιήστε την πρότυπη καμπύλη για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση της IFN- γ (IU/ml) για καθένα από τα εξεταζόμενα δείγματα πλάσματος, με βάση την τιμή OD κάθε δείγματος.

Αυτοί οι υπολογισμοί μπορούν να εκτελεστούν με τα πακέτα λογισμικού που συνοδεύουν τις συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών ή με κοινό λογισμικό λογιστικών φύλλων ή στατιστικής επεξεργασίας (όπως το Microsoft® Excel®). Συνιστάται η χρήση αυτών των πακέτων για την εκτέλεση της ανάλυσης παλινδρόμησης και για τον υπολογισμό του συντελεστή μεταβλητότητας (%CV) για τα πρότυπα και του συντελεστή συσχέτισης (r) για την πρότυπη καμπύλη.

Έλεγχος ποιότητας εξέτασης

Η ορθότητα των αποτελεσμάτων εξέτασης εξαρτάται από την παραγωγή μιας ορθής πρότυπης καμπύλης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα πρότυπα πρέπει να εξετάζονται προτού ερμηνευτούν τα αποτελέσματα των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Για μια έγκυρη ανάλυση ELISA:

- Η μέση τιμή OD για το πρότυπο 1 πρέπει να είναι $\geq 0,600$.
- Ο συντελεστής %CV για τις τιμές OD των επαναληπτικών μετρήσεων του προτύπου 1 και του προτύπου 2 πρέπει να είναι $< 15\%$.
- Οι τιμές OD των επαναληπτικών μετρήσεων των προτύπων 3 και 4 δεν πρέπει να διαφέρουν από τη μέση τιμή κατά περισσότερες από 0,040 μονάδες οπτικής πυκνότητας.
- Ο συντελεστής συσχέτισης (r) που υπολογίζεται από τις μέσες τιμές απορρόφησης των προτύπων πρέπει να είναι $\geq 0,98$.

Εάν δεν πληρούνται τα παραπάνω κριτήρια, η ανάλυση είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

Η μέση τιμή OD για το μηδενικό πρότυπο (πράσινο αραιωτικό) πρέπει να είναι $\leq 0,150$. Εάν οι μέσες τιμές OD είναι $> 0,150$ τότε θα πρέπει να ελεγχθεί η διαδικασία έκπλυσης των πλακών.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης QuantiFERON-CMV ερμηνεύονται με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

CMV μείον τον μηδενικό μάρτυρα (IU/ml)*	Μιτογόνο μείον τον μηδενικό μάρτυρα (IU/ml)	Αποτέλεσμα QF-CMV	Αναφορά/Ερμηνεία
< 0,2	≥ 0,5	Μη αντιδραστικό	ΔΕΝ διαπιστώνεται ανοσία anti-CMV
≥ 0,2	Οποιοδήποτε	Αντιδραστικό	Διαπιστώνεται ανοσία anti-CMV
< 0,2	< 0,5	Απροσδιόριστο [†]	Απροσδιόριστο αποτέλεσμα αντιδραστικότητας στον CMV

* Οι απαντήσεις IFN-γ στο αντιγόνο CMV και στον θετικό μάρτυρα μιτογόνου είναι συχνά εκτός του εύρους μέτρησης της συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών. Αυτό δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα ποιοτικού προσδιορισμού.

[†] Ανατρέξτε στην ενότητα περί αντιμετώπισης προβλημάτων για να βρείτε τις πιθανές αιτίες.

Περιορισμοί

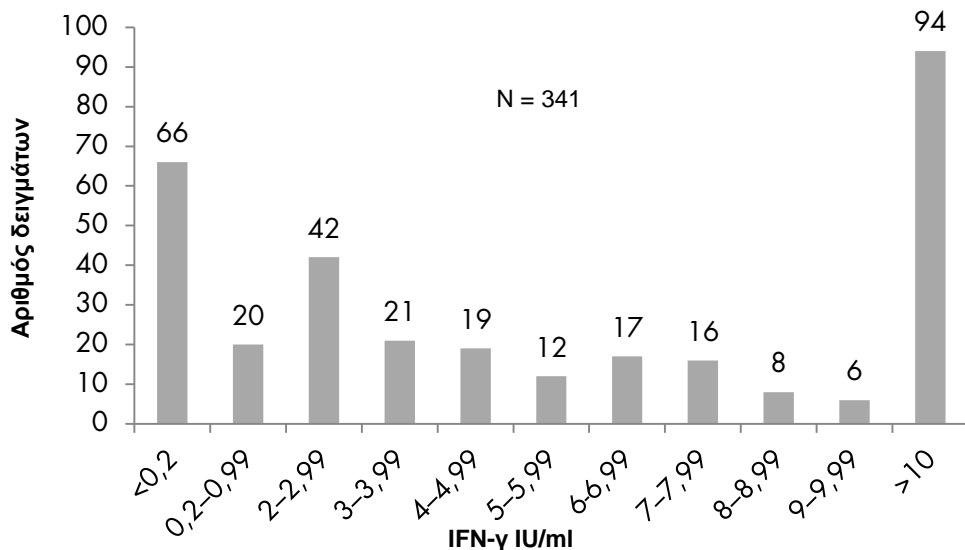
Τα αποτελέσματα των εξετάσεων QuantiFERON-CMV πρέπει να αξιοποιούνται σε συνδυασμό με πληροφορίες από το επιδημιολογικό ιστορικό, την υφιστάμενη κατάσταση της υγείας και άλλες διαγνωστικές αξιολογήσεις του ατόμου.

Αναξιόπιστα ή απροσδιόριστα αποτελέσματα ενδέχεται να ληφθούν λόγω:

- Αποκλίσεων από τη διαδικασία που περιγράφεται στο ένθετο συσκευασίας.
- Υπερβολικών επιπέδων IFN-γ στο σωληνάριο μηδενικού μάρτυρα.
- Παρέλευσης άνω των 16 ωρών μεταξύ της αιμοληψίας και της επώασης στους 37°C.

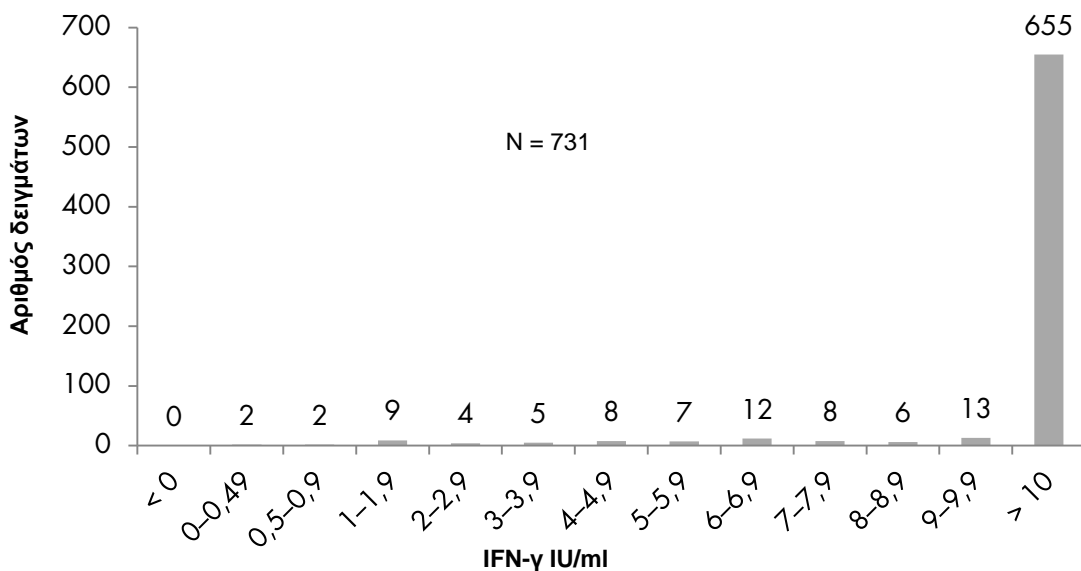
Αναμενόμενες τιμές

Οι αναμενόμενες τιμές IFN- γ κατά τη χρήση της ανάλυσης QuantiFERON-CMV προσδιορίστηκαν με εξέταση 591 δειγμάτων από υγιείς ενήλικες, από τους οποίους οι 341 ήταν οροθετικοί για τον CMV και οι 250 ήταν οροαρνητικοί. Στους 250 υγιείς ενήλικες χωρίς μόλυνση CMV, όπως αυτό διαπιστώθηκε με οροδιαγνωστική εξέταση anti-CMV (οροαρνητικοί για CMV), 100% των εξετασθέντων έδωσαν απάντηση IFN- γ < 0,2 IU/ml στο σωληνάριο αντιγόνου CMV (μείον τον αρνητικό μάρτυρα). Η κατανομή του σωληναρίου αντιγόνου CMV (μείον τον αρνητικό μάρτυρα) στα 341 υγιή άτομα με μόλυνση CMV, όπως αυτή διαπιστώθηκε με οροδιαγνωστική εξέταση anti-CMV (οροθετικοί για CMV), φαίνεται στην Εικόνα 2.



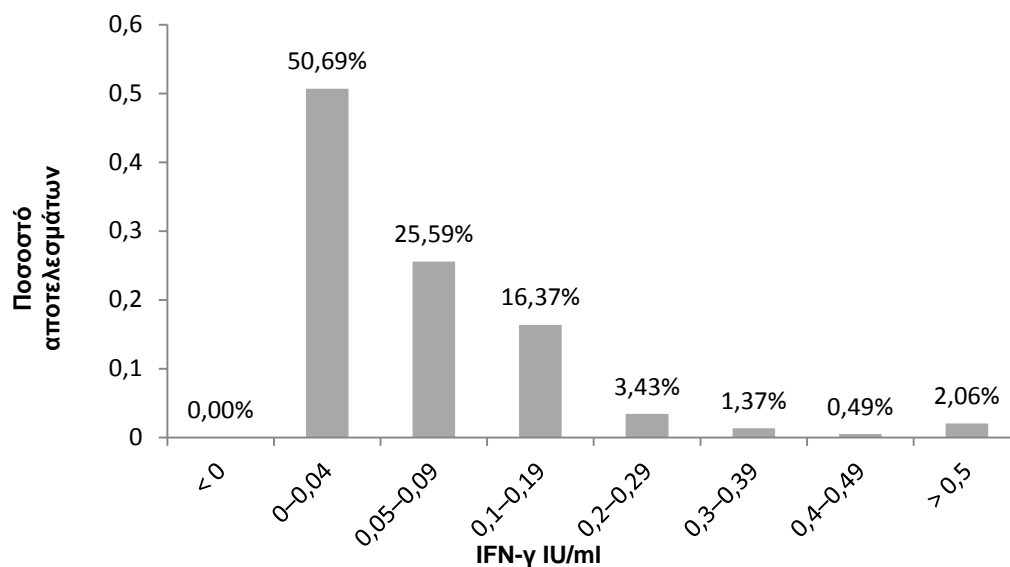
Εικόνα 2. Κατανομή των απαντήσεων IFN- γ στο σωληνάριο CMV μείον τον μηδενικό μάρτυρα σε οροθετικά υγιή άτομα (n=341).

Η κατανομή των αποτελεσμάτων μιτογόνου (μείον το υπόβαθρο μηδενικού μάρτυρα) σε 731 φυσιολογικά δείγματα αίματος από υγιείς ενήλικες, ανεξάρτητα από την παρουσία γνωστής μόλυνσης CMV, φαίνεται στην Εικόνα 3. Ένα αποτέλεσμα μιτογόνου (μείον τον μηδενικό μάρτυρα) μικρότερο από 0,5 IU/ml υποδηλώνει είτε αποτυχία της ανάλυσης είτε άτομο με ανοσοανεπάρκεια. Σε έναν πληθυσμό υγιών ατόμων, μόνον 2/731 αποτελέσματα ανήκαν στην κατηγορία αυτή.



Εικόνα 3. Κατανομή των απαντήσεων IFN- γ στο σωληνάριο μιτογόνου μείον τον μηδενικό μάρτυρα σε υγιείς ενήλικες (n = 731).

Οι αναμενόμενες τιμές για τα σωληνάρια μηδενικού μάρτυρα φαίνονται στην Εικόνα 4. Τα δεδομένα προήλθαν από 1.020 δείγματα πλάσματος από υγιείς ενήλικες που εξετάστηκαν με τη μέθοδο QuantiFERON-CMV ELISA.



Εικόνα 4. Κατανομή (εκφρασμένη ως ποσοστό % του πληθυσμού) των απαντήσεων IFN- γ του μηδενικού μάρτυρα σε υγιείς ενήλικες (n = 1.020).

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Κατηγορηματική ανάλυση

Ένα κατώφλιο εξέτασης για την ανίχνευση προηγούμενης έκθεσης στον CMV με τη μέθοδο QF-CMV προσδιορίστηκε μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων από μια ομάδα υγιών ατόμων (n = 223) και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων QF-CMV με αποτελέσματα οροδιαγνωστικών εξετάσεων CMV. Μια ανάλυση ROC έδειξε ότι ένα κατώφλιο εξέτασης 0,04 IU/ml (μετά από αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα) έδωσε βέλτιστες θετικές και αρνητικές προβλεπτικές τιμές για τη μέθοδο QF-CMV [εμβαδόν κάτω από την καμπύλη = 0,9679 (95% CI = 0,9442 έως 0,9915, $p < 0,0001$)], και συνεπώς αντιπροσωπεύει το κατώφλιο στο οποίο η μέθοδος αυτή επιτελεί αποτελεσματικότερα την προβλεπόμενη χρήση της σε υγιείς πληθυσμούς.

Κατά την κατηγορηματική ανάλυση, η απόδοση της μεθόδου QF-CMV συγκρίθηκε με την οροδιαγνωστική μέθοδο SeraQuest CMV IgG (Quest International). Η μέθοδος QF-CMV παρουσίασε συμφωνία 95% (294/310 άτομα) με την κατηγορηματική οροδιαγνωστική μέθοδο anti-HCMV σε υγιή άτομα, καθώς κανένας από τους 149 οροαρνητικούς δότες δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα στην εξέταση QF-CMV ενώ 145 από τους 161 οροθετικούς δότες παρουσίασαν αντιδραστική απάντηση IFN- γ . Η συνολική θετική συμφωνία ήταν 90% ενώ η τιμή αρνητικής συμφωνίας ήταν 100%. Ο βαθμός συμφωνίας των απαντήσεων IFN- γ σε πεπτίδια CMV, όπως αυτές μετρήθηκαν με τη μέθοδο QF-CMV σε υγιείς εθελοντές, και η οροδιαγνωστική κατάσταση anti-CMV των ίδιων ατόμων με βάση την οροδιαγνωστική μέθοδο SeraQuest CMV IgG φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συμφωνία μεταξύ της μεθόδου QuantiFERON-CMV και της οροδιαγνωστικής εξέτασης CMV IgG σε υγιή άτομα.

		Οροδιαγνωστική εξέταση CMV		Σύνολο
		Θετικά	Αρνητικά	
QuantiFERON-CMV	Αντιδραστικά	145	0	145 (46,8%)
	Μη αντιδραστικά	16	149	165 (53,2%)
	Σύνολο	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Κατώφλιο μεθόδου

Το συνιστώμενο κλινικό κατώφλιο εξέτασης για τη μέθοδο αυτή είναι 0,2 IU/ml στο σωληνάριο αντιγόνου CMV (μείον τον μηδενικό μάρτυρα), αν και μπορούν να επικυρωθούν διαφορετικές τιμές κατωφλίου για διάφορες κλινικές καταστάσεις. Αυτό αιτιολογείται λόγω των θεμελιωδών ανοσολογικών διαφορών μεταξύ του φυσιολογικού πληθυσμού και των πληθυσμών στους οποίους η εξέταση θεωρείται κλινικώς χρήσιμη – συγκεκριμένα, ανοσοκατεσταλμένα άτομα τα οποία διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν συμπτωματική λοίμωξη ή/και νόσο CMV λόγω της ανοσοκαταστολής. Σε τέτοια άτομα υψηλού κινδύνου, η κλινική χρησιμότητα της μεθόδου QF-CMV συνίσταται στον ορθό προσδιορισμό του ποσοστού ανοσίας anti-CMV στα άτομα αυτά, καθώς η έλλειψη ανοσίας ίσως συνδέεται με την ανάπτυξη νόσου CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

Κλινικές μελέτες

Καθώς δεν υπάρχει καθορισμένο πρότυπο για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της διάγνωσης της μόλυνσης από κυτταρομεγαλοϊό, δεν είναι πρακτικά εφικτό να αξιολογηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου QF-CMV. Η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου QF-CMV προσδιορίστηκαν κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης του βαθμού συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων IFN-γ στα πεπτιδία CMV, όπως αυτές μετρήθηκαν σε υγιείς εθελοντές μέσω QF-CMV, και της ορολογικής κατάστασης anti-CMV των ίδιων ατόμων με χρήση μιας οροδιαγνωστικής μεθόδου CMV IgG.

Η ειδικότητα της μεθόδου QF-CMV προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης του ποσοστού ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (αντιδραστική απάντηση QF-CMV) σε υγιείς εθελοντές χωρίς ενδείξεις προηγούμενης έκθεσης στον CMV (άτομα οροαρνητικά για τον CMV). Η ευαισθησία προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης υγιών εθελοντών με ενδείξεις παλαιότερης έκθεσης στον CMV (άτομα οροθετικά για τον CMV). Παρότι η μέθοδος QF-CMV χρησιμοποιεί έναν μεγάλο αριθμό επιτόπων ειδικών για τον CMV από διάφορες πρωτεΐνες του CMV, ώστε να επιτυγχάνει ευρεία κλινική εφαρμογή σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού με ποικίλους απλοτύπους HLA τάξης I, δεν προσφέρει κάλυψη 100% για τα πεπτιδία αυτά. Επειδή οι απλότυποι HLA των ατόμων που εξετάστηκαν ως προς την ορολογική κατάσταση CMV ήταν άγνωστοι, ένα μικρό ποσοστό των οροθετικών ατόμων αναμενόταν να βρεθούν μη αντιδραστικοί στα σωληνάρια QF-CMV.

Ειδικότητα

Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε υγιή άτομα χωρίς ενδείξεις παλαιότερης έκθεσης στον CMV (τα οροαρνητικά για τον CMV άτομα ήταν $n = 250$), βρέθηκε ότι ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων IFN- γ στα πεπτίδια CMV, όπως αυτές μετρήθηκαν μέσω της QF-CMV, και των στοιχείων για την ορολογική κατάσταση anti-CMV ήταν 100%.

Σε όλες τις άλλες αξιολογήσεις ειδικότητας που διεξήχθησαν σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (7, 13) και ασθενείς με λοίμωξη HIV (2), ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων IFN- γ στα πεπτίδια CMV, όπως αυτές μετρήθηκαν μέσω QF-CMV και μέσω οροδιαγνωστικής μεθόδου anti-CMV, έχει προσδιοριστεί σταθερά στο 100%.

Ευαισθησία

Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε υγιή άτομα με ενδείξεις παλαιότερης έκθεσης στον CMV (τα οροθετικά για τον CMV άτομα ήταν $n = 341$), βρέθηκε ότι ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων IFN- γ στα πεπτίδια CMV, όπως αυτές μετρήθηκαν μέσω της QF-CMV, και των στοιχείων για την ορολογική κατάσταση anti-CMV ήταν 80,6% (275/341). Η παρατηρούμενη ασυμφωνία μπορεί να οφείλεται στη χρήση της υψηλότερης τιμής κατωφλίου εξέτασης (0,2 IU/ml), σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα οροδιαγνωστικών εξετάσεων CMV ή στην απουσία αντίδρασης των εξεταζόμενων στα πεπτίδια CMV που περιλαμβάνονται στη μέθοδο.

Σε αξιολογήσεις ευαισθησίας που διεξήχθησαν σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), σε λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (7, 13) και σε ασθενείς με λοίμωξη HIV (2), βρέθηκαν ελαφρώς μικρότεροι βαθμοί συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων IFN- γ στα πεπτίδια CMV, όπως αυτές μετρήθηκαν μέσω QF-CMV, και των οροθετικών απαντήσεων CMV στους ίδιους ασθενείς.

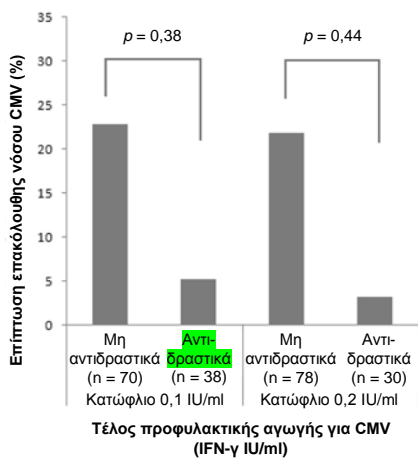
Ο χαμηλότερος βαθμός συμφωνίας ίσως οφείλεται σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα στις οροδιαγνωστικές εξετάσεις CMV, σε απουσία αντίδρασης των ασθενών στα πεπτίδια CMV που περιλαμβάνονται στη μέθοδο, ή σε απουσία αντιδραστικών T κυττάρων στους ασθενείς αυτούς λόγω της ανοσοκαταστολής.

Μελέτες που αναδεικνύουν την κλινική χρησιμότητα της μεθόδου

Όπως δηλώνεται τόσο για τις οροδιαγνωστικές εξετάσεις όσο και για τη μέθοδο QF-CMV, η προβλεπόμενη χρήση είναι η ανίχνευση της ανοσίας στον CMV. Στις περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων, οροδιαγνωστικές εξετάσεις CMV χρησιμοποιούνται εκτεταμένα πριν τη μεταμόσχευση για να προσδιοριστεί ο κίνδυνος επιπλοκών από τον CMV στον λήπτη μετά τη μεταμόσχευση, αλλά έχουν περιορισμένη αξία όταν εκτελούνται μετά τη μεταμόσχευση. Εναλλακτικά, η μέθοδος QF-CMV μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε λήπτες μοσχευμάτων για την εκτίμηση του βαθμού ανοσίας στον CMV στους ασθενείς εκείνους που διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν συμπτωματική λοίμωξη CMV ή/και νόσο λόγω ανοσοκαταστολής (6, 9–11).

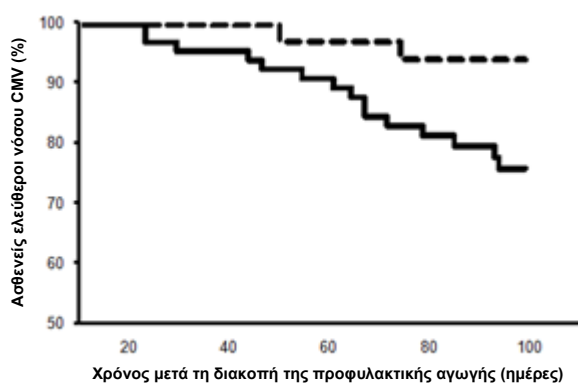
Μια σειρά από δημοσιευμένες κλινικές μελέτες σε μια ποικιλία ομάδων μεταμοσχευμένων ασθενών έχουν αποδείξει τη χρησιμότητα της μεθόδου QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

Σε μια μεγάλη μελέτη με 108 λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (4), οι ασθενείς που έδωσαν αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV μετά την ολοκλήρωση της προφυλακτικής αγωγής anti-CMV παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό νόσου όψιμης εκδήλωσης σε σύγκριση με τους ασθενείς που έδωσαν μη αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV (5,3% έναντι 22,9% αντίστοιχα, $p=0,044$) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 Ποσοστά νόσου CMV όψιμης εκδήλωσης σε ασθενείς με αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QuantiFERON-CMV έναντι ασθενών με μη αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QuantiFERON-CMV μετά το τέλος της προφυλακτικής αγωγής. Τα στοιχεία αναπαράγονται από την εργασία των Kumar et al. (4)

Επιπλέον, οι ασθενείς με αντιδραστικό αποτέλεσμα εξέτασης QF-CMV μετά την ολοκλήρωση της προφυλακτικής αγωγής παρέμεναν ελεύθεροι νόσου CMV σε μεγαλύτερο ποσοστό και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Εικόνα 6), εύρημα που δείχνει ότι η QF-CMV μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναγνωριστούν οι ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν νόσο CMV όψιμης εκδήλωσης.

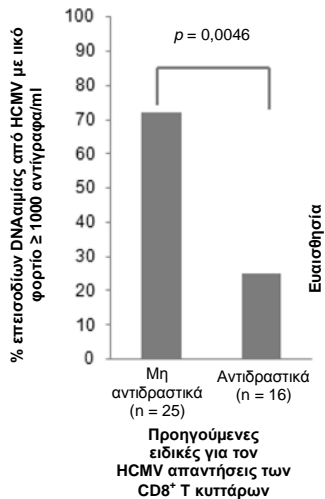


Εικόνα 6. Χρόνος μέχρι την εκδήλωση νόσου CMV σε ασθενείς με αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QuantiFERON-CMV (διακεκομμένη γραμμή) έναντι ασθενών με μη αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QuantiFERON-CMV (συνεχής γραμμή) μετά το τέλος της προφυλακτικής αγωγής. Τα στοιχεία αναπαράγονται από την εργασία των Kumar et al. (4)

Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης ότι στην ομάδα των μεταμοσχευμένων ασθενών που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν νόσο CMV (λήπτες μοσχευμάτων οροαρνητικοί για τον CMV οι οποίοι έλαβαν όργανο από δότη οροθετικό για CMV, δηλαδή D+/R-), οι ασθενείς που έδωσαν αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV οποιαδήποτε στιγμή μετά την αγωγή προφύλαξης είχαν 90% πιθανότητες να παραμείνουν ελεύθεροι νόσου CMV.

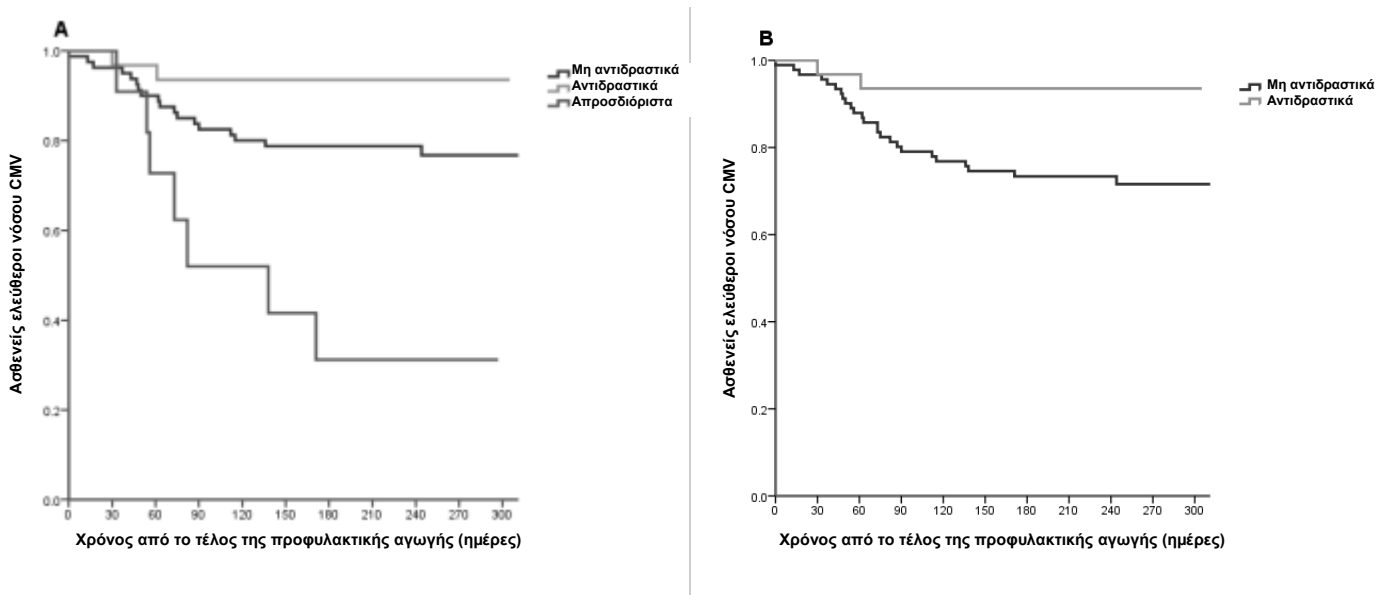
Σε μια μελέτη με 37 λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (12), η αξιολόγηση της απάντησης των ειδικών για τον CMV CD8⁺ T κυτάρων βάσει εξέτασης QF-CMV βοήθησε στην πρόβλεψη της αυτόματης κάθαρσης του ιού αντί της εξέλιξης της νόσου CMV μετά από αύξηση της ιαιμίας του CMV. Σε αυτή τη μελέτη, 24/26 ασθενείς (92,3%) με αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV σημείωσαν αυτόματη κάθαρση του ιού CMV ενώ μόνο 5/11 (45,5%) ασθενείς με μη αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV πέτυχαν το ίδιο αποτέλεσμα.

Μια μελέτη με 67 λήπτες μοσχεύματος πνεύμονα κατά την οποία αξιολογήθηκαν τα επεισόδια ιαιμίας CMV μετά τη μεταμόσχευση (14) έδειξε ότι 18/25 (72%) επεισόδια ιαιμίας CMV σημειώθηκαν μετά από μη αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV, έναντι 4/16 (25%) επεισοδίων που ακολούθησαν μια αντιδραστική απάντηση QF-CMV (ακριβής έλεγχος Fisher, $p = 0,0046$, βλ. Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Στατιστική ανάλυση των απαντήσεων των ειδικών για τον CMV CD8⁺ T κυττάρων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο QuantiFERON-CMV, και της ανάπτυξης ιαιμίας CMV (ακριβής έλεγχος Fisher, $p = 0,0046$). Τα στοιχεία αναπαράγονται από την εργασία των Weseslindtner et al. (14).

Σε μια μεγάλη πολυκεντρική προοπτική μελέτη με 127 λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων D+/R- (15), οι οποίοι έλαβαν όλοι αντιική προφυλακτική αγωγή, οι ασθενείς με αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV (με κατώφλιο εξέτασης 0,1 IU/ml) σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μετά την ολοκλήρωση της προφυλακτικής αγωγής anti-CMV είχαν σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης νόσου όψιμης εκδήλωσης στους 12 μήνες μετά τη μεταμόσχευση, σε σύγκριση με τους ασθενείς που έδωσαν μην αντιδραστικό αποτέλεσμα και τους ασθενείς με απροσδιόριστο αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV (6,4% έναντι 22,2% έναντι 58,3% αντίστοιχα, $p < 0,001$). Όταν τα απροσδιόριστα αποτελέσματα συνδυάστηκαν με τα μη αντιδραστικά, η επίπτωση επακόλουθης νόσου CMV ήταν 6,4% έναντι 26,8%, $p = 0,024$ (βλ. Εικόνα 8). Η θετική και η αρνητική προβλεπτική αξία της εξέτασης QF-CMV ως προς την προστασία από τη νόσο CMV ήταν 0,90 (95% CI 0,74-0,98) και 0,27 (95% CI 0,18-0,37) αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει ότι ένα αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QuantiFERON-CMV οποιαδήποτε στιγμή μετά την προφυλακτική αγωγή συνδέεται με 90% πιθανότητα του ασθενούς να παραμείνει ελεύθερος νόσου CMV. Αυτή η μελέτη βρήκε ότι η εξέταση QF-CMV είναι ενδεχομένως χρήσιμη στην πρόβλεψη χαμηλού, μέτριου ή υψηλού κινδύνου επακόλουθης ανάπτυξης νόσου CMV μετά από προφυλακτική αγωγή.



Εικόνα 8. Καμπύλες Kaplan-Meier για την επίπτωση της νόσου CMV σε σχέση με το αποτέλεσμα της ανάλυσης QF-CMV.

Α Αντιδραστικά έναντι μη αντιδραστικών έναντι απροσδιόριστων αποτελεσμάτων QF-CMV (έλεγχος log rank, $p < 0,001$).

Β Αντιδραστικά έναντι μη αντιδραστικών αποτελεσμάτων, όταν τα απροσδιόριστα αποτελέσματα συνεκτιμούνται με τα μη αντιδραστικά (έλεγχος log-rank, $p = 0,024$).

Σε μια προοπτική μελέτη με 55 λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (16) στην οποία αναλύθηκε η σχέση μεταξύ των προμεταμοσχευτικών αποτελεσμάτων QF-CMV και των επεισοδίων πολλαπλασιασμού του CMV μετά τη μεταμόσχευση, βρέθηκε ότι η υψηλότερη επίπτωση επεισοδίων πολλαπλασιασμού του CMV μετά τη μεταμόσχευση παρατηρήθηκε σε λήπτες R(+) με μη αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV πριν τη μεταμόσχευση (7/14 ή 50%), σε σύγκριση με τους λήπτες R(+) που είχαν αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV (4/30 ή 13,3%).

Η μελέτη αυτή βρήκε ότι οι λήπτες με μη αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV πριν τη μεταμόσχευση, οι οποίοι έλαβαν όργανο από δότη οροθετικό για CMV, είχαν δεκαπλάσιο κίνδυνο πολλαπλασιασμού του CMV σε σύγκριση με τους λήπτες με αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV πριν τη μεταμόσχευση (ρυθμισμένος OR 10,49, 95% CI 1,88–58,46), και ότι η προμεταμοσχευτική εξέταση QF-CMV ίσως είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη του κινδύνου πολλαπλασιασμού του CMV μετά τη μεταμόσχευση και άρα επιτρέπει την εξατομίκευση της αντιμετώπισης της λοίμωξης CMV μετά από μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων.

Μια σειρά άλλων μελετών που διερεύνησαν την ανίχνευση ειδικών για τον CMV απαντήσεων των CD8⁺ T κυττάρων μέσω QF-CMV σε μια ομάδα ληπτών μοσχευμάτων έχουν ήδη ολοκληρωθεί (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) ή βρίσκονται σήμερα σε εξέλιξη σε ολόκληρο τον κόσμο.

Διεθνείς ομόφωνες κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την αντιμετώπιση του κυτταρομεγαλοϊού στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων

Η σημασία της παρακολούθησης της ειδικής για τον CMV ανοσίας είναι αναγνωρισμένη και έχει περιγραφεί στο έντυπο «International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation» (Διεθνείς ομόφωνες κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την αντιμετώπιση του κυτταρομεγαλοϊού στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων) (6). Αυτές οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, που συντάχθηκαν από μια επιτροπή ειδικών στον CMV και τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων η οποία συγκλήθηκε από το Τμήμα Λοιμωδών Νοσημάτων (The Infectious Diseases Section) της Διεθνούς Εταιρείας Μεταμοσχεύσεων (The Transplantation Society), εκφράζουν πειστήρια και ομόφωνες κατευθυντήριες οδηγίες βασισμένες σε γνώμες ειδικών πάνω στην αντιμετώπιση του CMV, σε θέματα όπως η διάγνωση, η ανοσολογία, η πρόληψη και η θεραπεία.

Αυτές οι κατευθυντήριες οδηγίες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι «η ανοσολογική παρακολούθηση των ειδικών για τον CMV απαντήσεων των T κυττάρων ίσως βοηθά στην αναγνώριση των ατόμων που διατρέχουν κίνδυνο νόσου CMV μετά τη μεταμόσχευση και ίσως είναι χρήσιμη στην καθοδήγηση της προφυλακτικής αγωγής και των προληπτικών θεραπειών» (6).

Επιπλέον, οι κατευθυντήριες οδηγίες περιλαμβάνουν επίσης συστάσεις σχετικά με τις ιδιότητες της ιδανικής μεθόδου παρακολούθησης της ανοσίας, όπως:

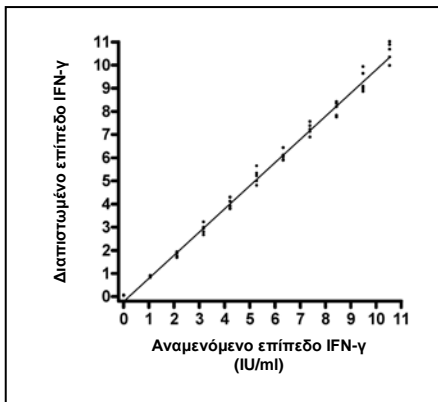
- Δυνατότητα αξιολόγησης του αριθμού και της λειτουργίας των T κυττάρων CD4⁺ και CD8⁺ ενός λήπτη μοσχεύματος
- Δυνατότητα μέτρησης της IFN-γ
- Απλή εκτέλεση, οικονομία και αναπαραγωγιμότητα
- Σύντομος χρόνος λήψης αποτελεσμάτων
- Εύκολη αποστολή δειγμάτων σε εξειδικευμένα εργαστήρια αναφοράς

Η μέθοδος QF-CMV ικανοποιεί όλα τα κριτήρια που καθορίζονται σε αυτές τις κατευθυντήριες οδηγίες και αποτελεί τη μοναδική ειδική για τον CMV τυποποιημένη μέθοδο παρακολούθησης ανοσίας με δυνατότητα ανίχνευσης της IFN-γ.

Χαρακτηριστικά απόδοσης ανάλυσης

Η μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωσης της IFN- γ μέσω QF-CMV ELISA είναι αποδεδειγμένα γραμμική στην κλίμακα από μηδέν έως 10 IU/ml (Εικόνα 9). Η μελέτη γραμμικότητας διεξήχθη με τυχαία τοποθέτηση 5 επαναληπτικών δειγμάτων από καθεμία από 11 δεξαμενές πλάσματος με γνωστή συγκέντρωση IFN- γ πάνω στην πλάκα ELISA.

Η μέθοδος QF-CMV ELISA δεν εμφανίζει στοιχεία φαινομένου προζώνης (υψηλών δόσεων) σε συγκεντρώσεις IFN- γ μέχρι και τις 100.000 IU/ml.



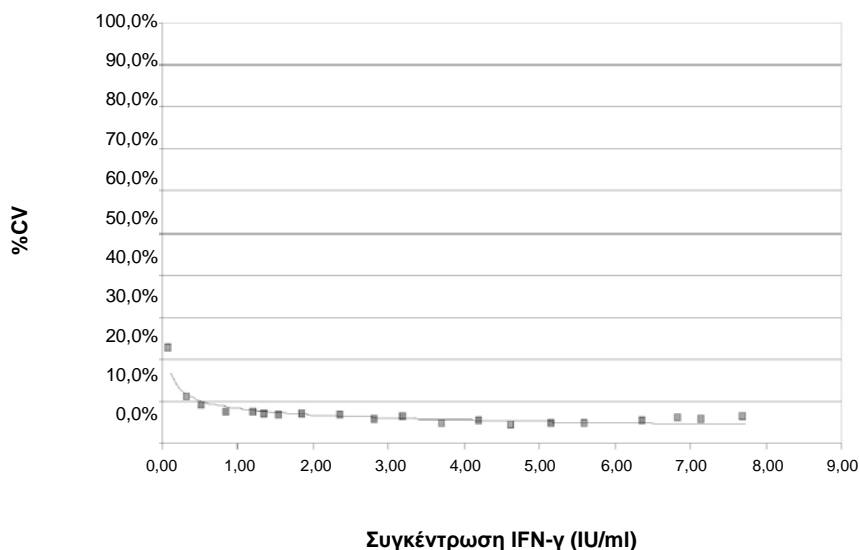
Εικόνα 9. Το προφίλ γραμμικότητας της μεθόδου QF-CMV ELISA, όπως προσδιορίστηκε με ανάλυση 5 επαναλήψεων 11 δειγμάτων πλάσματος με γνωστή συγκέντρωση IFN- γ . Η καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης έχει κλίση $1,002 \pm 0,011$ και συντελεστή συσχέτισης 0,99.

Η ανακρίβεια εντός και μεταξύ αναλύσεων (%CV) της μεθόδου QF-CMV ELISA υπολογίστηκε με ανάλυση 20 δειγμάτων πλάσματος με ποικίλες συγκεντρώσεις IFN- γ σε 3 επαναλήψεις, σε 3 εργαστήρια, σε 3 μη διαδοχικές ημέρες, από 3 χειριστές. Συνεπώς κάθε δείγμα εξετάστηκε 27 φορές σε 9 ανεξάρτητες σειρές αναλύσεων. Το ένα δείγμα ήταν δείγμα μηδενικού μάρτυρα και είχε υπολογιζόμενη συγκέντρωση IFN- γ ίση με 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. Στα υπόλοιπα 19 δείγματα πλάσματος, η κλίμακα συγκεντρώσεων ήταν 0,33 (0,31–0,34) έως 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

Η ανακρίβεια εντός σειράς αναλύσεων ή εντός αναλύσεων εκτιμήθηκε με υπολογισμό του μέσου όρου των συντελεστών %CV για κάθε εξεταζόμενο πλάσμα που περιείχε IFN- γ από κάθε σειρά αναλύσεων πλάκας ($n = 9$) και κυμάνθηκε από 4,1 έως 9,1%CV. Η μέση τιμή %CV εντός σειράς αναλύσεων ($\pm 95\%$ CI) ήταν 6,6% $\pm 0,6\%$. Το δείγμα πλάσματος μηδενικής IFN- γ είχε μέση τιμή 14,1%CV.

Η συνολική ανακρίβεια (μεταξύ αναλύσεων) προσδιορίστηκε με σύγκριση των 27 υπολογισμένων συγκεντρώσεων IFN- γ για κάθε δείγμα πλάσματος και κυμάνθηκε από 6,6 έως 12,3%CV. Η συνολική μέση τιμή %CV ($\pm 95\%$ CI) ήταν 8,7% $\pm 0,7\%$. Το δείγμα πλάσματος μηδενικής IFN- γ είχε 26,1%CV. Αυτό το επίπεδο μεταβλητότητας είναι αναμενόμενο επειδή η υπολογιζόμενη συγκέντρωση IFN- γ είναι χαμηλή και η μεταβλητότητα γύρω από τις χαμηλές εκτιμώμενες τιμές συγκέντρωσης θα είναι υψηλότερη απ' ό,τι γύρω από υψηλές συγκεντρώσεις.

Το προφίλ ακρίβειας της QF-CMV ELISA φαίνεται στην Εικόνα 10 και δείχνει ότι η ανακρίβεια δεν αυξάνεται στις υψηλές συγκεντρώσεις IFN-γ.



Εικόνα 10. Προφίλ ακρίβειας της QF-CMV ELISA, όπως προσδιορίστηκε με την ανάλυση 20 δειγμάτων πλάσματος εις τριπλούν, σε 3 μη διαδοχικές ημέρες, σε 3 εργαστήρια και από 3 χειριστές. Η γραμμή τάσης προκύπτει από υπολογισμό της προσαρμογής ελαχίστων τετραγώνων.

Διεξήχθη μια μελέτη με σκοπό να προσδιοριστεί η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου QF-CMV με χρήση δειγμάτων αίματος από 8 άτομα με άγνωστη κατάσταση μόλυνσης από CMV. Αίμα από καθένα από τα άτομα αυτά προστέθηκε σε τρεις σειρές σωληναρίων QF-CMV (3 μηδενικοί μάρτυρες, 3 σωληνάρια CMV και 3 σωληνάρια μιτογόνου). Οι τρεις σειρές σωληναρίων επωάστηκαν κατόπιν σε τρία διαφορετικά κέντρα (μία σειρά με μηδενικό μάρτυρα, CMV και μιτογόνο ανά κέντρο), όπως περιγράφεται στο ένθετο συσκευασίας. Μετά από επώαση 16–24 ωρών, τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν και το πλάσμα συλλέχθηκε.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε ανάλυση ELISA τρεις φορές σε καθένα από τα τρία κέντρα, με λήψη τριών αποτελεσμάτων QF-CMV για κάθε άτομο ανά κέντρο (συνολικά 9 αποτελέσματα από όλα τα κέντρα). Σε κάθε κέντρο χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός χειριστής. Οι πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη δεν προέρχονταν αναγκαστικά από την ίδια παρτίδα αλλά βρισκόνταν όλες πριν την ημερομηνία λήξης τους.

Για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε η αναπαραγωγικότητα ως προς τη διαγνωστική κατάσταση (αντιδραστικό, μη αντιδραστικό ή απροσδιόριστο) και την αριθμητική τιμή. Η αναπαραγωγικότητα της αριθμητικής τιμής αξιολογήθηκε μόνο στα αντιδραστικά δείγματα (και εκφράστηκε ως %CV), καθώς τα επίπεδα της IFN-γ στα μη αντιδραστικά δείγματα ήταν υπερβολικά χαμηλά για να δώσουν αξιόλογη εκτίμηση της ακρίβειας.

Συνολικά, η διαγνωστική αναπαραγωγικότητα ήταν 100% καθώς η διαγνωστική κατάσταση βάσει της QF-CMV και για τους 8 εθελοντές αναπαρήχθη σε όλα τα κέντρα και σε όλες τις περιπτώσεις, χωρίς να αναφερθούν απροσδιόριστα δείγματα. Η αναπαραγωγικότητα των αντιδραστικών δειγμάτων ήταν αποδεκτή, τόσο εντός κάθε κέντρου όσο και μεταξύ κέντρων. Ο μέσος %CV για καθένα από τα κέντρα ανάλυσης ήταν 4,5% (Κέντρο 1), 5,9% (Κέντρο 2) και 7,3% (Κέντρο 3). Συνολικά, ο %CV μεταξύ κέντρων ήταν 5,9% και για τα 5 αντιδραστικά δείγματα. Οι τιμές ποσοστιαίου συντελεστή μεταβλητότητας κάτω από το 10% θεωρούνται άριστες.

Τεχνικές πληροφορίες

Απροσδιόριστα αποτελέσματα

Η λήψη απροσδιόριστων αποτελεσμάτων μπορεί να οφείλεται στην κατάσταση ανοσίας του εξεταζόμενου ατόμου, αλλά μπορεί και να συνδέεται με μια σειρά τεχνικών παραγόντων:

- Παρέλευση άνω των 16 ωρών μεταξύ της αιμοληψίας και της επώασης στους 37°C.
- Φύλαξη του αίματος εκτός του συνιστώμενου εύρους θερμοκρασίας (17°C έως 27°C).
- Ανεπαρκής ανάμειξη των σωληναρίων συλλογής αίματος.

Εάν υποπτεύεστε τεχνικά προβλήματα κατά τη συλλογή ή τον χειρισμό των δειγμάτων αίματος, επαναλάβετε ολόκληρη την ανάλυση QF-CMV με νέα δείγματα αίματος. Μπορείτε να επαναλάβετε την ανάλυση ELISA σε διεγερμένα δείγματα πλάσματος εάν υποψιάζεστε οποιαδήποτε διαδικαστική απόκλιση στην ανάλυση ELISA. Τα απροσδιόριστα αποτελέσματα (λόγω χαμηλών τιμών μιτογόνου) δεν αναμένεται να μεταβληθούν κατά την επανάληψη, εκτός εάν είχε προκύψει κάποιο σφάλμα κατά την ανάλυση ELISA.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, δείτε επίσης τις τεχνικές πληροφορίες που παρέχονται στον ιστότοπο: www.QuantiFERON.com. Για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. σελίδα 30 και το οπισθόφυλλο.

Αντιμετώπιση προβλημάτων με την ανάλυση ELISA

Χαμηλές μετρήσεις οπτικής πυκνότητας με τα πρότυπα

Πιθανή αιτία	Λύση
α) Σφάλμα αραίωσης προτύπου	Βεβαιωθείτε ότι οι αραιώσεις του προτύπου του kit παρασκευάζονται σωστά, σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας.
β) Σφάλμα αναρρόφησης	Βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες βαθμονομούνται και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
γ) Πολύ χαμηλή θερμοκρασία επώασης	Η επώαση της ELISA θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (17°C έως 27°C).
δ) Πολύ μικρός χρόνος επώασης	Η επώαση της πλάκας με το συζευγμένο μόριο, τα πρότυπα και τα δείγματα θα πρέπει να διαρκεί 120 ± 5 λεπτά. Το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου επωάζεται στην πλάκα επί 30 λεπτά.
ε) Χρήση λανθασμένου φίλτρου ανάγνωσης πλάκας	Η ανάγνωση της πλάκας θα πρέπει να γίνει στα 450 nm με φίλτρο αναφοράς μεταξύ 620 και 650 nm.
στ) Υπερβολικά ψυχρά αντιδραστήρια	Όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100X, πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού ξεκινήσει η ανάλυση. Για να γίνει αυτό χρειάζεται περίπου 1 ώρα.
ζ) Το kit ή τα συστατικά του έχουν λήξει	Βεβαιωθείτε ότι το kit θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100X θα χρησιμοποιηθούν εντός 3 μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης.

Μη ειδική ανάπτυξη χρώματος/έντονο υπόβαθρο

Πιθανή αιτία	Λύση
α) Ατελής έκπλυση της πλάκας	Εκπλύνετε την πλάκα τουλάχιστον 6 φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα. Πιθανόν να χρειαστούν περισσότεροι από 6 κύκλοι έκπλυσης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συσκευή πλύσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας 5 δευτερολέπτων τουλάχιστον μεταξύ των κύκλων.
β) Πολύ υψηλή θερμοκρασία επώασης	Η επώαση της ELISA θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (17°C έως 27°C).
γ) Το kit ή τα συστατικά του έχουν λήξει	Βεβαιωθείτε ότι το kit θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100X θα χρησιμοποιηθούν εντός τριών μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης.
δ) Το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου είναι ακάθαρτο	Απορρίψτε το υπόστρωμα εάν παρουσιάζει μπλε χρωματισμό. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιούνται καθαρά δοχεία αντιδραστηρίων.
ε) Ανάμειξη του πλάσματος στα σωληνάρια φυγοκέντρου πριν τη συλλογή	Φροντίστε να συλλεχθούν με προσοχή τα δείγματα πλάσματος πάνω από τη γέλη, χωρίς παλινδρόμηση του υγρού στην πιπέτα και χωρίς να διαταραχθεί το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.

Βιβλιογραφία

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.* Ηλεκτρονική δημοσίευση πριν την έντυπη, 29 Φεβρουαρίου 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.* (χειρόγραφο δεκτό τον Νοέμβριο του 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.* (χειρόγραφο δεκτό τον Νοέμβριο του 2012).

Τεχνική υποστήριξη

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

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

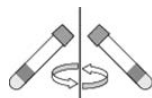
Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

Συνοπτική διαδικασία εξέτασης

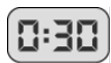
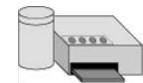
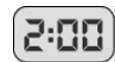
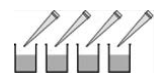
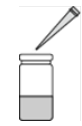
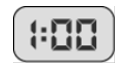
Στάδιο 1 — επώαση αίματος

1. Συλλέξτε το αίμα του ασθενούς σε σωληνάρια συλλογής αίματος και αναμείξτε ανακινώντας τα δέκα (10) φορές, αρκετά καλά ώστε να βεβαιωθείτε ότι ολόκληρη η εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου έχει καλυφθεί με αίμα, προκειμένου να διαλυθούν τα αντιγόνα που βρίσκονται στα τοιχώματα του σωληναρίου, αλλά όχι εντονότερα από αυτό.
2. Επώαστε τα σωληνάρια σε κατακόρυφη θέση, στους $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ επί 16 έως 24 ώρες.
3. Μετά την επώαση, φυγοκεντρήστε τα σωληνάρια επί 15 λεπτά σε ταχύτητα 2000 έως 3000 RCF (g) για να διαχωρίσετε το πλάσμα από τα ερυθροκύτταρα.
4. Μετά τη φυγοκέντρηση, αποφύγετε την παλινδρόμηση του υγρού κατά την αναρρόφηση και γενικά την ανάδευση του πλάσματος κατ' οποιονδήποτε τρόπο πριν τη συλλογή. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.



Στάδιο 2 — IFN- γ ELISA

1. Αφήστε τα συστατικά της ELISA, εκτός του συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100X, να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου επί 60 λεπτά τουλάχιστον.
2. Ανασυστήστε το πρότυπο του κιτ μέχρι μια συγκέντρωση 8,0 IU/ml με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Παρασκευάστε τέσσερις (4) τυπικές αραιώσεις.
3. Ανασυστήστε το λυόφιλο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100X με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό.
4. Παρασκευάστε ένα διάλυμα εργασίας συζευγμένου μορίου σε πράσινο αραιωτικό και προσθέστε 50 μl σε όλα τα βυθίσματα.
5. Προσθέστε 50 μl των εξεταζόμενων δειγμάτων πλάσματος και 50 μl προτύπων στα κατάλληλα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.
6. Επώαστε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Εκπλύνετε τα βυθίσματα τουλάχιστον 6 φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα.
8. Προσθέστε 100 μl διαλύματος υποστρώματος-ενζύμου στα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.
9. Επώαστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Προσθέστε 50 μl διαλύματος διακοπής ενζυμικής αντίδρασης στα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.
11. Διαβάστε τα αποτελέσματα στα 450 nm, με φίλτρο αναφοράς στα 620 έως 650 nm.
12. Αναλύστε τα αποτελέσματα.



Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QuantiFERON® (Όμιλος QIAGEN), Microsoft®, Excel® (Microsoft).

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το kit QuantiFERON-CMV ELISA

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή των παρακάτω όρων εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό, και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο εγχειρίδιο αυτό, και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα συμπληρωματικά πρωτόκολλα παρέχονται από χρήστες της QIAGEN για χρήση από χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν δοκιμαστεί σχολαστικά ούτε έχουν βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση επί αυτών, ούτε εγγυάται πως αυτά δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε κανέναν να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοσδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, μέλος του ομίλου QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

