
QuantiFERON[®]-CMV

Kézikönyv 2x96

A humán citomegalovírus peptidantigénjeire adott válaszokat mérő gamma-interferon teljesvérteszt

IVD



REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Ausztrália

Tel.: (Ausztrália) +613-9840-9800, (Európa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, Németország

1075110HU Rev. 01



Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| Rendeltetés | 5 |
| Bevezető | 5 |
| A teszt alapelve | 6 |
| A teszt elvégzéséhez szükséges idő | 6 |
| Reagensek és tárolásuk | 7 |
| Szükséges, de nem tartozék eszközök | 8 |
| Tárolás és kezelés | 8 |
| Figyelmeztetések és óvintézkedések | 9 |
| Mintavétel és a minta kezelése | 10 |
| Alkalmazási útmutató | 11 |
| 1. fázis – A vér inkubálása és a plazma elválasztása | 11 |
| 2. fázis – QuantiFERON-CMV ELISA humán IFN- γ -teszt | 11 |
| Számítások és a teszt értékelése | 14 |
| Eredmények értelmezése | 15 |
| Korlátok | 15 |
| Várható értékek | 16 |
| Teljesítményjellemzők | 17 |
| Összehasonlító tesztelés | 17 |
| Tesztküszöbérték | 18 |
| Klinikai vizsgálatok | 18 |
| Specifikusság | 18 |
| Érzékenység | 19 |
| Klinikai hasznosságot alátámasztó vizsgálatok | 19 |
| Szervátültetettek citomegalovírusos eseteire vonatkozó közös nemzetközi irányelvek | 22 |
| Vizsgálat teljesítményjellemzői | 22 |
| Technikai tudnivalók | 24 |
| Határozatlan eredmények | 24 |
| Hibaelhárítási útmutató | 25 |

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Bibliográfia | 26 |
| Technikai ügyfélszolgálat | 27 |
| Rövidített tesztfolyamat | 30 |
| 1. fázis – vér inkubálása | 30 |
| 2. fázis – IFN- γ ELISA | 30 |

Rendeltetés

A QuantiFERON-CMV (QF-CMV) egy olyan in vitro teszt, amely humán citomegalovírus (CMV) fehérjéket szimuláló peptidkeverékkel stimulálja a sejteket heparinizált teljes vérben. A gamma-interferon (IFN- γ) enzimkött immunoszorbens tesztel (ELISA) végzett érzékelése a CMV-fertőzés által kiváltott immunválaszból eredő peptidantigénekre adott in vitro válaszok mennyiségi kiértékelésére szolgál. Ennek az immunválasznak a hiánya CMV megbetegedés kialakulását jelezheti. A QF-CMV a páciens CMV elleni immunitási szintjének vizsgálatára szolgál.

A QF-CMV nem a CMV-fertőzés megállapítására szolgáló teszt, és nem szabad a CMV-fertőzés kizárására használni.

Bevezető

A CMV egy olyan herpeszvírus, amely a felnőtt lakosság 50–85%-át fertőzi. A főként transzplantációt követően alkalmazott immunuszuppresszió gyakori szövődménye, és jelentősen hozzájárulhat a transzplantáltak morbiditásához és mortalitásához. A transzplantátum kilökődésének megakadályozására jelenleg alkalmazott immunuszuppressziós eljárások hátrányosan hatnak a T-limfocitákra és a celluláris (CMI) immunválaszra, ezzel fokozva a transzplantáltak vírusfertőzések iránti fogékonyságát. A T-sejteknek a CMV replikációját gátló hatását az teszi különösen fontossá, hogy a CD8⁺ CMV-specifikus citotoxikus (CTL) T-limfociták védelmet nyújthatnak a vírusos körfejlődés ellen. Az immunuszuppresszió átesett páciensek CD8⁺ CMV-specifikus CTL-jeinek és IFN- γ -termelődésének mennyiségi elemzése alkalmas lehet a CMV-fertőzés kialakulási kockázatának előjelzésére. Az IFN- γ -termelődés helyettesítő paraméterként szolgálhat a CMV-specifikus CTL-ek azonosításakor.

A QF-CMV a CMV-proteineket szimuláló peptidantigénekre adott CMI-válaszokat vizsgáló teszt. A CMV-peptidek kifejezetten a CD8⁺ T-sejteket célozzák meg, az A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 és Cw6 (A30, B13) HLA I. osztályú haplotípusokat, lefedve a népesség több mint 98%-át. A CMV-fertőzöttek vére rendszerint tartalmaz olyan CD8⁺ limfocitákat, amelyek ezeket az antigéneket felismerik. Az antigének felismerése IFN- γ citokin termelődésével és kiválasztásával jár. A jelen teszt lényege az IFN- γ érzékelése és az érzékelést követő mennyiségi meghatározása.

A teszt alapelve

A QF-CMV teszt 2 fázisú. Először teljes vért kell levenni a QF-CMV mindhárom vérvételi csövébe: a nullkontrollcsöbe, a CMV-antigéncsőbe és a mitogéncsőbe.

A mitogéncső a QF-CMV teszt pozitív kontrolljaként szolgál. Ennek különösen akkor lehet jelentősége, ha az alany immunállapota bizonytalan.

A csöveket a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül inkubálni kell 37 °C-on. A 16–24 órás inkubációt követően a csöveket centrifugálni kell, a plazmát el kell távolítani, majd az IFN- γ (IU/ml) mennyiségét QF-CMV ELISA teszttel meg kell mérni.

A CMV-antigén- és mitogéncsőből származó plazmaminták IFN- γ -tartalma még az enyhébb immunszuppressziót kapott alanyok esetén is gyakran meghaladja az általában használt ELISA tesztek felső méréshatárát. Ha **kvalitatív** eredményekre van szükség, használja a hígítatlan plazmára számított értékeket. A tényleges IU/ml értékeket adó **kvantitatív** eredményekhez a plazmamintákat 1/10 arányban hígítani kell zöld hígítóval, és az ELISA teszttel kell vizsgálni a hígítatlan plazmával együtt.

Figyelem: A QF-CMV ELISA teszt méréshatárán belüli (tehát maximum 10 IU/ml) minták esetén a hígítatlan plazmára kapott eredményt kell használni. Az ilyen IFN- γ -koncentrációk esetén az 1/10 hígítású plazmamintákra kapott eredmények pontatlanok lehetnek.

A teszt olyan IFN- γ -válasz esetén számít „reaktívnak”, amikor a CMV-antigéncső által mért érték jelentősen meghaladja a nullkontroll IFN- γ IU/ml értékét. A mitogénstimulált plazmaminta minden egyes vizsgált minta esetén az IFN- γ pozitív kontrolljaként szolgál. A gyenge mitogénreakció csak akkor jelent határozatlan eredményt, ha a vérminta CMV-antigénekre adott válasza sem reaktív. Ilyen eredményt akkor kaphatunk, ha elégtelen a limfociták száma, gyenge a limfocitatevékenység, mert helytelenül kezelték a mintát, hibásan töltötték vagy keverték a mitogéncsövet, illetve ha a páciens limfocitái képtelenek IFN- γ előállítására, például nemrégiben transzplantáltak esetén. A nullminta a vérben jelenlévő háttérérték, illetve nem specifikus IFN- γ érték kompenzálására szolgál. A nullcső IFN- γ -szintjét ki kell vonni a CMV-antigéncső és a mitogéncső IFN- γ értékéből (a QF-CMV eredményének értelmezését a jelen kézikönyv 15. oldalán található „Eredmények értelmezése” című rész ismerteti).

A teszt elvégzéséhez szükséges idő

A QF-CMV teszt elvégzéséhez szükséges becsült idő, valamint a több minta egyidejű tesztelésének időigénye:

| | |
|--|--|
| A vért tartalmazó csövek 37 °C-os inkubációja: | 16–24 óra |
| ELISA: | 1 ELISA-tálca esetén kb. 3 óra |
| | 1 munkaóránál kevesebb |
| | Minden további tálcára újabb 10-15 percet kell számolni. |

Reagensek és tárolásuk

| CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (CMV és kontrollantigén vérvételi csövek, egy páciens számára) | |
|--|--------------------------|
| Katalógusszám | 0192-0301 |
| Készítmények száma | 1 |
| QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON nullkontroll) (szürke kupak) | 1 cső |
| CMV Antigen (CMV antigén) (kék kupak) | 1 cső |
| QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogénkontroll) (lila kupak) | 1 cső |
| Kézikönyv | 1 |
| QuantiFERON-CMV ELISA Components (QuantiFERON-CMV ELISA-összetevők) | |
| Katalógusszám | 0350-0201 |
| Mikrolemezek | 24x8 lyukas mikrolemezek |
| Human IFN- γ Standard (humán IFN- γ standard), liofilizált | 1 üveg |
| Green Diluent (zöld hígító) | 1x30 ml |
| QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (konjugátum 100x koncentrátum), liofilizált | 1x0,3 ml |
| QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (mosópuffer 20x koncentrátum) | 1x100 ml |
| QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (enzimsubstrátoldat) | 1x30 ml |
| QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (enzimleállító oldat) | 1x15 ml |

Szükséges, de nem tartozék eszközök

- 37 °C-os inkubátor; CO₂ nem szükséges
- Kalibrált, változtatható térfogatú pipetták 10–1000 µl közti mennyiségekhez, eldobható véggel
- Kalibrált, többcsatornás pipetták 50–100 µl közti mennyiségekhez, eldobható véggel
- Mikrolemezzázó gép
- Ioncserélt vagy desztillált víz, 2 liter
- Mikrolemezmosó (automatikus mosó ajánlott)
- 450 nm-es szűrőjű mikrolemezolvasó 620–650 nm-es referenciaszűrővel

Tárolás és kezelés

Vérvételi csövek

- A vérvételi csöveket 4 és 25 °C közt kell tárolni.
- A QuantiFERON-CMV vérvételi csövek eltarthatósági ideje 4 és 25 °C közötti tárolás esetén a gyártástól számított max. 15 hónap.

ELISA készlet reagensei

- Tárolás 2 és 8 °C között.
- Az enzimszubsztrát-oldatot mindig napfénytől védett helyen kell tartani.

Rehidratált és maradék reagensek

A reagensek rehidratálására vonatkozó útmutató: „Alkalmazási útmutató – 2. fázis” (3. és 5. lépés a 11. és 12. oldalon).

- A rehidratált standardkészlet 2–8 °C-on tárolható maximum 3 hónapig.
Jegyezze fel a standardkészlet rehidratálásának dátumát.
- A maradék rehidratált QuantiFERON konjugátum 100× koncentrátumot vissza kell hűteni 2–8 °C-os tárolási hőmérsékletre, és 3 hónapon belül fel kell használni.
Jegyezze fel a konjugátum rehidratálásának dátumát.
- A készre hígított konjugátumot elkészítése után 6 órán belül fel kell használni.
- A készre hígított mosópuffer szobahőmérsékleten (17–27 °C-on), maximum 2 hétig tárolható.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai célra.

Vegyszerek használatakor mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági (SDS) adatlapok tartalmazzák. Az összes QIAGEN készlet és készletösszetevő SDS lapja praktikus és kis méretű PDF fájl formájában megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az interneten a www.qiagen.com/safety oldalon.



VIGYÁZAT: Az emberi vér kezelése fertőzésveszéllyel jár.
A vonatkozó vérkezelési előírásokat be kell tartani.

A QF-CMV ELISA készlet összetevőire az alábbi munkavédelmi figyelmeztetések vonatkoznak.

QuantifERON Enzyme Stopping Solution (enzimleállító oldat)



Kénsavat tartalmaz: Maró hatású. Munkavédelmi figyelmeztetések:* R36/38, S26-36/37/39

- **A zöld hígító** normál egérszérumot és kazeint tartalmaz, amelynek az allergiás reakciók veszélye miatt nem szabad bőrrel érintkeznie.

Vegyianyagokkal kapcsolatos vészhelyzetben

kiömlés, szivárgás, érintkezés vagy baleset esetén

éjjel-nappal hívható a CHEMTREC

az USA-ban és Kanadában: 1-800-424-9300

más országban: +1-703-527-3887 (R-beszélgetés kérhető)

További tájékoztatás

Biztonsági adatlapok: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Szembe és bőrre kerülve maró hatású; S26: Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni; S36/37/39: Megfelelő védőruházatot, védőkesztyűt, szem-/arcvédőt kell viselni.

Mintavétel és a minta kezelése

A munka megkezdése előtti fontos tudnivalók:

Az QF-CMV kézikönyvtől történő bármilyen eltérés hibás eredményt okozhat. A munka megkezdése előtt figyelmesen olvassa el az útmutatót.

- Sérültnek tűnő vagy szivárgó reagenspalackot tartalmazó készletet nem szabad használni.
- Eltérő QF-CMV készleteket ELISA reagenseit nem szabad keverni, illetve vegyesen használni.
- A fel nem használt reagensek és biológiai minták hulladékkezelését a helyi, tagállami és szövetségi előírások szerint kell végezni.
- A QF-CMV vérvételi csöveket és QF-CMV ELISA készleteket lejáratú időkön túl nem szabad felhasználni.

A QF-CMV az alábbi vérvételi csöveket alkalmazza:

1. Nullkontroll (szürke kupak)
2. CMV Antigen (antigén, kék kupak)
3. Mitogénkontroll (lila kupak)

Az antigének a vérvételi csövek belső falán, szárítva találhatóak meg, ezért lényeges a csövek tartalmát alaposan összekeverni a vérrel. A csöveket a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül 37 °C-os inkubátorba kell helyezni.

Az optimális eredmény érdekében betartandó utasítások:

1. Vegyen le páciensenként közvetlenül minden QF-CMV vérvételi csőbe 1 ml vénás vért.

- Mivel az 1 ml-es csövek a vért viszonylag lassan veszik fel, a cső látszólagos telítődése után még 2-3 másodpercig tartsa a csövet a tűn, hogy a megfelelő mennyiség biztosan meglegyen.

Az 1 ml-es töltési mennyiséget a cső oldalán feltüntetett fekete jel mutatja. A QF-CMV vérvételi csövek névleges térfogattartománya 0,8–1,2 ml. Ha valamely csőben a vérszint nincs a jelzővonal közelében, ajánlatos új vérmintát venni.

- A QF-CMV vérvételi csövek 0,8–1,2 ml-es névleges térfogattartománya 810 méteres tengerszint feletti magasságig érvényes. Ennél nagyobb magasság esetén a felhasználó minden cső esetén külön köteles gondoskodni a levett vérmennyiségre vonatkozó határértékek betartásáról. Ha a vérmennyiség nem elegendő, akkor a vér fecskendővel is levehető, majd 1-1 ml áthelyezhető mindhárom csőbe. Biztonsági okokból ennek legjobb módja a fecskendő tűjének biztonságos eltávolítása, a három QF-CMV-cső kupakjának eltávolítása, majd 1-1 ml vér betöltése (a cső oldalán található fekete jelzésig). A csövek kupakját gondosan vissza kell zárni, majd az alábbi módon keverést kell végezni.
- Ha a vérvétel pillangótűvel történik, akkor a QF-CMV vérvételi csöveinek megtöltése előtt egy „letisztító” csövet kell használni, hogy a csövek biztosan megteljenek a vérrel.

2. Közvetlenül a megtöltést követően rázza meg a csöveket tíz (10) alkalommal kellő erővel ahhoz, hogy a cső teljes belső felszínére eljutó vér leoldja a csőfalán található antigéneket.

- Megtöltésükkor a csöveknek 17–25 °C hőmérsékletűnek kell lennie.
- A túlságosan erős rázás a gélt felszakíthatja, és téves eredményt okozhat.

3. Megfelelően feliratozza a csöveket.

4. A csöveket a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül 37 ± 1 °C-os inkubátorba kell helyezni. A vérmintákat nem szabad hűteni vagy fagyasztani.

Alkalmazási útmutató

1. fázis – A vér inkubálása és a plazma elválasztása

1. Ha az inkubálás nem rögtön a vérvétel után történik, akkor közvetlenül az inkubálás előtt az előző fejezet 2. lépésében leírt módon ismét el kell végezni a keverést.
2. A csöveket **ÁLLÍTVÁ**, 37 °C hőmérsékleten kell inkubálni 16–24 órán keresztül. Inkubáláskor CO₂ vagy párásítás nem szükséges.
3. Az inkubálás után és a következő lépés előtt a vérvételi csövek 2–27 °C-on maximum 3 napig tárolhatók. A 37 °C-os inkubáció végeztével a csöveket 2000–3000 RCF (g) fordulatszámmal 15 percig kell centrifugálni. A géldugó elkülöníti a sejteket a plazmától. Ennek hiányában a csövek centrifugálását magasabb hőmérsékleten kell megismételni.
 - A plazma centrifugálás nélkül is elválasztható, de fokozottan ügyelni kell arra, hogy közben a vérsejtek ne keveredjenek fel.
4. A centrifugálás és az elválasztás művelete között kerülni kell a pipetta használatát, illetve a plazma bármilyen felkeverését. A teljes folyamat során gondosan meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.
 - A plazmamintákat csak pipettával szabad elválasztani.
 - A plazmaminták automatikus ELISA munkaállomás használata esetén is közvetlenül a centrifugált vérvételi csövekből tölthetők át a QF-CMV ELISA tálcába.
 - A plazmaminták 2–8 °C között maximum 28 napig, illetve elválasztva –20 °C alatt (lehetőleg kevesebb mint –70 °C-on) hosszú ideig megőrizhetők csövekben vagy plazmatartókban.

2. fázis – QuantiFERON-CMV ELISA humán IFN-γ-teszt

1. Felhasználás előtt a konjugátum 100× koncentrátum kivételével minden plazmamintát és reagenst szobahőmérsékletre (17–27 °C) kell hozni. A hőkiegyenlítődésre legalább 60 percet kell hagyni.
2. Vegye ki a keretből a szükségtelen csíkokat, ezeket zárja vissza a fóliatasakba, majd felhasználásig helyezze vissza a hűtött tárolóba.

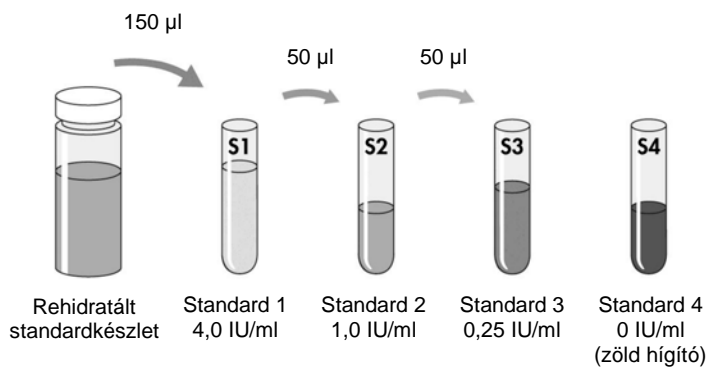
Számoljon legalább egy csíkkal a QF-CMV ELISA standardokhoz, plusz a tesztalanyok számának megfelelő számú csíkkal. Használat után a többi csík számára őrizze meg a keretet és a fedelet.

3. Rehidratálja a liofilizált standardkészletet az standardüveg címkéjén feltüntetett mennyiségű ioncserélt vagy desztillált vízzel. Óvatosan, minimális habképződéssel keverje, amíg teljesen fel nem oldódik. A standard megadott térfogatra rehidratálása 8,0 IU/ml koncentrációjú oldatot képez.
4. A standardgörbe a standardkészlet 3 hígításából, valamint különálló 4. standardként (0 IU/ml) zöld hígítóból készül.

A rehidratált standardkészletből készítse el a 3 IFN-γ-koncentrációból álló hígítási sorozatot. A hígítást zöld hígítóval (Green Diluent, GD) végezze (lásd 1. ábra a következő oldalon). A standardokat legalább duplán kell tesztelni, amihez a következő lépések elegendő mennyiséget eredményeznek majd.

- a. Címkézzon fel 4 csövet: S1, S2, S3, S4.
- b. Töltsön 150 µl zöld hígítót a 4 csőbe (S1–S4).
- c. Töltsön 150 µl mennyiséget a standardkészletből az S1-be, majd alaposan keverje meg.
- d. Töltsön át 50 µl mennyiséget az S1-ből az S2-be, majd alaposan keverje meg.

- e. Töltsön át 50 µl mennyiséget az S2-ből az S3-ba, majd alaposan keverje meg.
 f. Az üres zöld hígító szolgál nulla standardként (S4).



1. ábra. A standardgörbe elkészítése. Minden ELISA-munkafolyamathoz friss hígítást kell készíteni a standardkészletből.

5. **Rehidratálja a liofilizált QuantiFERON konjugátum 100× koncentrátumot 0,3 ml ioncserélt vagy desztillált vízzel. Óvatosan, minimális habképződéssel keverje, gondoskodjon a konjugátum teljes feloldódásáról.**
6. **A konjugátum készre hígításához a Konjugátumkészítés című 1. táblázat szerint hígítsa fel a kívánt mennyiségű rehidratált konjugátum 100× koncentrátumot zöld hígítóval.**
 - Keverje meg alaposan, de óvatosan, hogy ne habosodjon fel.
 - Az esetleg megmaradó összes konjugátum 100× koncentrátumot azonnal vissza kell hűteni 2–8 °C-ra.
 - Csak zöld hígítót használjon.

1. táblázat. Konjugátumkészítés

| Csíkok száma | A konjugátum 100× koncentrátum mennyisége | A zöld hígító mennyisége |
|--------------|---|--------------------------|
| 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. **A teszt előtt a plazmákat fel kell keverni, hogy minden egyes mintában egyenletes legyen az IFN- γ eloszlása. Ha számszerű eredményre van szükség, akkor a CMV- és mitogénplazmákat 1/10 arányban hígítani kell zöld hígítóval (10 μ l plazmát 90 μ l hígítóval). A nullplazmát nem kell hígítani.**

Az alábbi mintákat ajánlott tesztelni:

- Nullminta, CMV-antigén, mitogén, CMV-antigén (1/10), mitogén (1/10)

A QuantiFERON-CMV Analysis szoftver azonban az alábbi mintabeállításokat is támogatja:

- Nullminta, CMV-antigén, mitogén
- Nullminta, CMV-antigén (1/10), mitogén (1/10)
- Nullminta, CMV-antigén, mitogén, CMV-antigén (1/10)
- Nullminta, CMV-antigén (1/10), mitogén

8. **Töltsön 50 μ l frissen készre hígított konjugátumot a szükséges ELISA-lyukakba a többcsatornás pipettával.**

9. **Töltsön 50 μ l tesztplazmamintákat a megfelelő lyukakba többcsatornás pipettával. Végül töltsön 50 μ l mennyiséget 1-től 4-ig az összes standardba.**

10. **Keverje alaposan a konjugátumot, a plazmamintákat, illetve standardokat a mikrolemezrészével 1 percig.**

11. **Helyezzen minden tálcára fedelet, és végezzen 120 \pm 5 perces inkubációt szobahőmérsékleten (17–27 °C).**

- A tálcákat inkubáció alatt nem érheti közvetlen napfény.

12. **Az inkubáció alatt hígítson egy rész mosópuffer 20 \times koncentrátumot 19 rész ioncserélt vagy desztillált vízzel, és keverje meg alaposan. 2 liter készre hígított mosópuffer elkészítéséhez elegendő mosópuffer 20 \times koncentrátumot mellékelünk.**

A lyukakat 400 μ l készre hígított mosópufferrel kell mosni legalább 6 cikluson keresztül. Automatikus tálcamosó használata ajánlott.

- A teszt minősége érdekében nagyon fontos az alapos mosás. Ügyeljen arra, hogy minden lyuk **színültig telítődjön** a mosópufferrel minden mosási ciklusban. Ajánlott egy legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között.
- A szennyvíztartályba normál laboratóriumi fertőtlenítőszerrel kell tölteni, és a potenciálisan fertőző anyagot a szabályos eljárások szerint ártalmatlanítani kell.

13. **A tálcákat lefordítva nedvszívó kendőre kell helyezni, hogy a maradék mosópuffer eltávozzon. Töltsön 100 μ l enzimszubsztrát-oldatot minden lyukba, és végezzen alapos keverést mikrolemezrészével.**

14. **Helyezzen minden tálcára fedelet, és végezzen 30 perces inkubációt szobahőmérsékleten (17–27 °C).**

- A tálcákat inkubáció alatt nem érheti közvetlen napfény.

15. **A 30 perces inkubáció elteltével töltsön 50 μ l enzimleállító oldatot minden lyukba, és végezzen keverést.**

- Az enzimleállító oldatot a szubsztrátum 13. lépésben leírt kitöltésekor alkalmazott sorrendben és közel hasonló sebességgel töltsse ki.

16. **A reakció leállítását követő 5 percen belül mérje meg az összes lyukban az optikai denzitás (OD) értékét egy 450 nm-es szűrőjű és 620–650 nm-es referenciaszűrőjű mikrolemez-olvasóval. A teszteredményeket az OD értékekből kell kiszámolni.**

Számítások és a teszt értékelése

A nyers adatok elemzésére és az eredmények kiszámítására szolgáló QuantiFERON-CMV Analysis szoftver letölthető a QIAGEN webhelyéről: www.QuantiFERON.com.

A szoftver az „Eredmények értékelése” fejezetben leírtak szerint elvégzi a teszt minőségi felülvizsgálatát, létrehozza a standardgörbét és kiszámítja az egyes páciensek teszteredményét.

A QF-CMV Analysis szoftver alkalmazása helyett az eredmények az alábbi módon is megállapíthatók.

Standardgörbe létrehozása

Határozza meg minden tálcán a standardkészletek átlagos OD értékeit.

Szerkesszen egy $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ standardgörbét, amely az átlagos OD $\log_{(e)}$ értékét ábrázolja (y tengely) a standardok IU/ml-ben mért IFN- γ -koncentrációs értékének $\log_{(e)}$ függvényében (x tengely), a nullstandardot a számításból kihagyva. Számítsa ki regresszióanalízissel a standardgörbe legjobban illeszkedő vonalát.

Állapítsa meg a standardgörbe segítségével az egyes plazmaminták IFN- γ -koncentrációját (IU/ml) a hozzájuk tartozó OD értékből.

Ezeket a számításokat a mikrolemez-olvasóhoz mellékelt szoftvercsomagokkal, valamint hagyományos táblázatkezelő vagy statisztikai szoftverekkel (pl. Microsoft® Excel®) végezheti el. Ajánlatos ezeket a csomagokat használni a regresszióanalízis, valamint a standardokra vonatkozó ingadozási együttható (%CV) és a standardgörbe korrelációs együtthatójának (r) kiszámításához.

A teszt minőségi felülvizsgálata

A teszteredmények pontossága attól függ, hogy mennyire sikerült pontos standardgörbét létrehozni, ezért a minták adatainak értelmezését megelőzően felül kell vizsgálni a standardokból származó eredményeket.

Az ELISA teszt érvényességének feltételei:

- Az 1. standardra vonatkozó átlagos OD értéke $\geq 0,600$ kell, hogy legyen.
- Az 1. és 2. standardok ismétlődő OD értékeihez tartozó %CV együttható $< 15\%$ kell, hogy legyen.
- A 3. és 4. standardok ismétlődő OD értékei nem mutathatnak 0,040 optikai denzitási egységnél nagyobb szórást az átlagértéktől.
- A standardok átlagos abszorpció értékéből számított korrelációs együttható (r) $\geq 0,98$ kell, hogy legyen.

Ha a fenti követelmények nem teljesülnek, akkor a teszt érvénytelen, és meg kell ismételni.

A nullstandardhoz (zöld hígító) tartozó átlagos OD érték $\leq 0,150$ kell, hogy legyen. Ha az átlagos OD érték $> 0,150$, akkor a tálcamosási munkafolyamatot kell felülvizsgálni.

Eredmények értelmezése

A QuantiFERON-CMV eredményeit az alábbi követelmények szerint kell értelmezni:

| CMV mínusz nullminta (IU/ml)* | Mitogén mínusz nullminta (IU/ml) | QF-CMV eredmény | Lelet/értékelés |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------|--|
| < 0,2 | ≥ 0,5 | Nem reaktív | CMV elleni immunitás NEM észlelhető |
| ≥ 0,2 | Bármely | Reaktív | CMV elleni immunitás észlelhető |
| < 0,2 | < 0,5 | Határozatlan [†] | Az eredmény nem tudja megállapítani a CMV-reakció jelenlétét |

* Gyakran előfordul, hogy a CMV-antigén és a mitogén pozitív kontroll IFN- γ értékei kívül esnek a mikrolemez-olvasó mérési tartományán. Ez a kvalitatív eredményeket nem befolyásolja.

[†] A lehetséges okokat a Hibaelhárítás című fejezet tárgyalja.

Korlátok

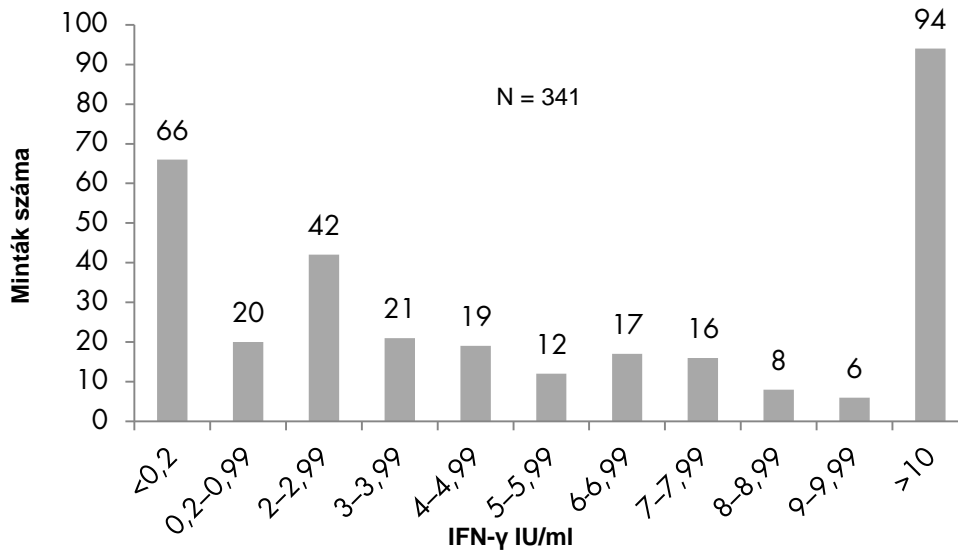
A QuantiFERON-CMV teszt eredményeit az egyes személyek epidemiológiai kórtörténetével együtt, aktuális egészségi állapotával összhangban és az egyéb diagnosztikai szempontok figyelembe vételével kell értékelni.

A megbízhatatlan és határozatlan eredmények lehetséges okai:

- A kézikönyvben meghatározott szabályoktól való eltérés.
- Túl magas IFN- γ érték a nullcsőben.
- 16 óránál hosszabb idő telt el a vérvétel és a 37 °C-os inkubáció között.

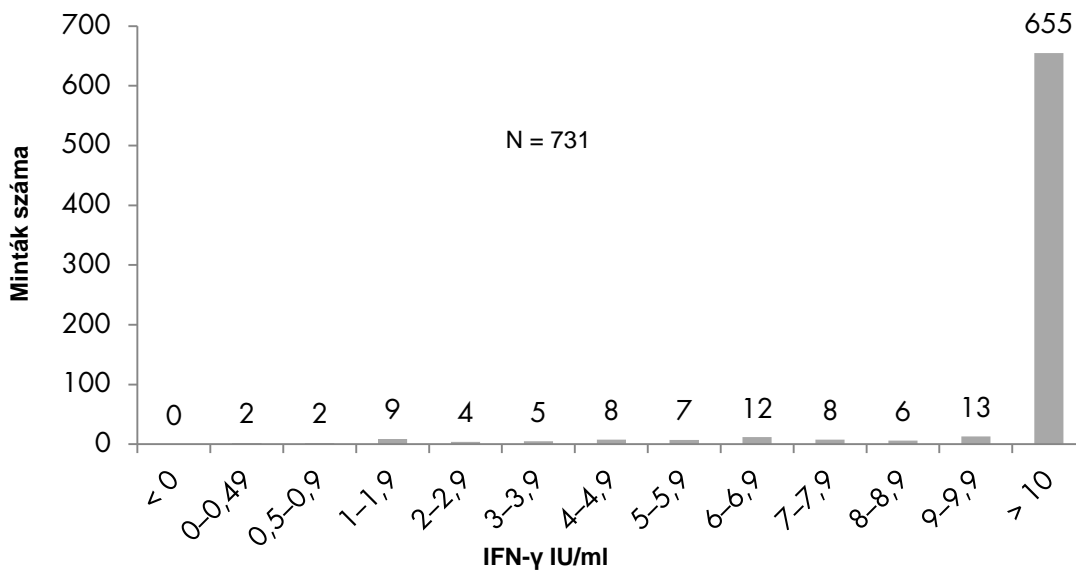
Várható értékek

A QuantiFERON-CMV tesztből várható IFN- γ értékek 591 egészséges felnőtt mintáján alapulnak, akik közül 341 volt CMV szeropozitív és 250 volt szeronegatív. A CMV elleni szerológia szerint CMV fertőzés nélküli (CMV szeronegatív) 250 egészséges felnőtt alany 100%-a 0,2 IU/ml alatti IFN- γ eredményeket produkált a CMV-antigén (mínusz nullminta) csőben. A CMV elleni szerológia szerint CMV-fertőzött (CMV szeropozitív) egészséges 341 alany CMV-antigén (mínusz nullminta) csöveinek eloszlását az 2. ábra mutatja.



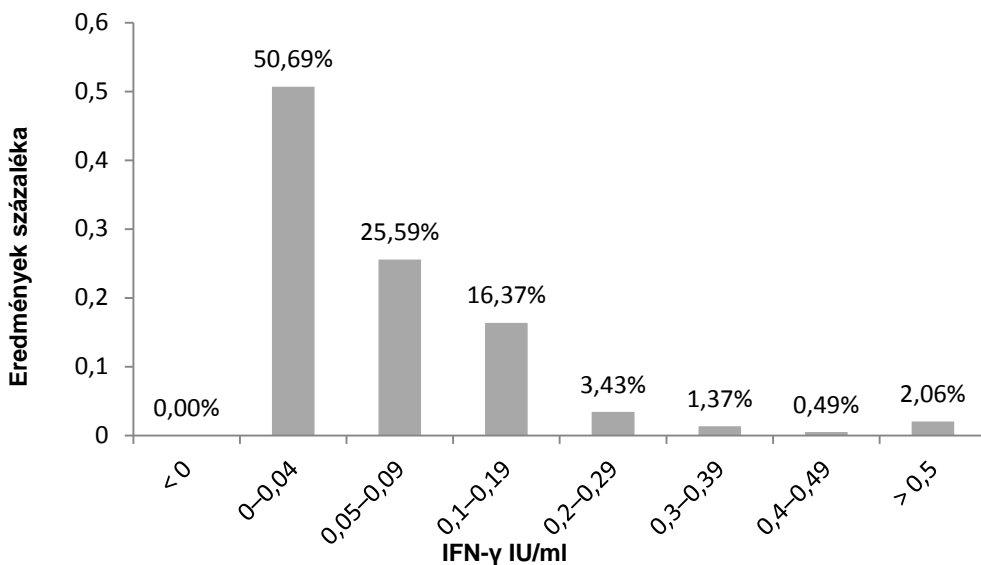
2. ábra. A CMV mínusz nullminta IFN- γ eredmények eloszlása szeropozitív egészséges alanyoknál (n = 341).

A 731 egészséges felnőtt alanytól származó normál vérminta mitogén (mínusz nullhátér) eredményeinek eloszlása a CMV-fertőzöttség figyelembe vétele nélkül a 3. ábrán látható. A 0,5 IU/ml alatti mitogén (mínusz nullminta) eredmények sikertelen tesztre vagy károsodott immunrendszerű alanyra utalnak. Az egészséges népességben 731 eredményből csak 2 esett ebbe a kategóriába.



3. ábra. A mitogén mínusz nullminta IFN- γ -értékeinek eloszlása egészséges felnőtt alanyoknál (n = 731).

A nullcsövek várható értékeit a 4. ábra mutatja. Az adatok QuantiFERON-CMV ELISA teszttel vizsgált egészséges felnőtt alanyok 1020 plazmamintájából származnak.



4. ábra. A nullminták IFN- γ értékeinek eloszlása (a népesség %-ában kifejezve) egészséges felnőtt alanyoknál (n = 1020).

Teljesítményjellemzők

Összehasonlító tesztelés

A korábbi CMV-fertőzés észlelési QF-CMV tesztküszöbértékeinek meghatározásához egy egészséges alanyokból álló csoport (n = 223) eredményeinek elemzését használták fel úgy, hogy a QF-CMV eredményeket összevetették a CMV-szerológiai eredményekkel. Egy ROC elemzés azt állapította meg, hogy a 0,04 IU/ml (nullérték levonása utáni) tesztküszöbérték optimális pozitív és negatív előrejelző értéket adott a QF-CMV-re (görbe alatti terület = 0,9679 [95%CI = 0,9442–0,9915; $p < 0,0001$]), így olyan küszöbértéket eredményezett, amellyel ez a teszt az egészséges népességben leghatékonyabban teljesíti rendeltetését.

A QF-CMV teljesítményét összehasonlító tesztelés keretében a SeraQuest CMV IgG szerológiai teszttel (Quest International) vetették össze. A QF-CMV teszt 95%-os (294/310 alany) egyezést mutatott az összehasonlítás alapjául szolgáló anti-HCMV szerológiai teszttel egészséges alanyoknál úgy, hogy a 149 szeronegatív donor közül egy sem mutatott „reaktív” eredményt a QF-CMV-ben, míg a 161 szeropozitív donor közül 145 mutatott „reaktív” IFN- γ -választ. Az összesített pozitív egyezés 90%, míg a negatív egyezési érték 100% volt. Az egészséges önkénteseknél a CMV-peptidekre a QF-CMV-vel kapott IFN- γ -eredmények, valamint az adott alanyok a SeraQuest CMV IgG szerológiai teszttel megállapított CMV elleni szerológiai állapota közti egyezés mértékét a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. Egyezés a QuantiFERON-CMV és a CMV IgG szerológiai teszt között egészséges alanyokban.

| | | CMV-szerológia | | Összes |
|-----------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Pozitív | Negatív | |
| QuantiFERON-CMV | Reaktív | 145 | 0 | 145 (46,8%) |
| | Nem reaktív | 16 | 149 | 165 (53,2%) |
| | Összes | 161 (51,9%) | 149 (48,1%) | 310 (100%) |

Tesztküszöbérték

A jelen teszt ajánlott klinikai tesztküszöbértéke 0,2 IU/ml a CMV-antigén csőben (mínusz nullminta), de különféle klinikai környezetekben ettől eltérő küszöbérték is érvényesíthető lehet. Ennek oka, hogy a normál tesztalanyok alapvető immunológiai különbségeket mutatnak azokhoz az alanyokhoz képest, akiknek az esetében a teszt klinikailag hasznosnak bizonyulhat, ez utóbbiak ugyanis immunszuppressziót kapott páciensek, akiknél legyengített immunrendszerük miatt nagyobb a kockázata a tünetekkel járó CMV-fertőzésnek és/vagy megbetegedésnek. Ezen fokozottan veszélyeztetett alanyoknál a QF-CMV klinikai hasznossága abban áll, hogy a CMV elleni immunitás szintjét pontosan megállapítja, mivel náluk az immunreakció hiánya a CMV betegség kialakulásával lehet összefüggésben (1–5, 7, 8, 11–16).

Klinikai vizsgálatok

Mivel a citomegalovírus-fertőzés diagnózisának megerősítésére és kizárására nincs meghatározó szabvány, a QF-CMV érzékenységének vagy specifikusságának pontos becslésére nincs gyakorlati eljárás. A QF-CMV érzékenységének és specifikusságának becslésére az egészséges önkénteseknél a CMV-peptidekre a QF-CMV-vel kapott IFN- γ -eredmények, valamint az adott alanyok a CMV IgG szerológiai teszttel megállapított CMV elleni szerológiai állapota közötti egyezés mértéke szolgált.

A QF-CMV specifikusságának becslésére a hamis pozitív eredmények arányának értékelése szolgált („reaktív” QF-CMV-válasz) korábbi ismert CMV-fertőzés nélküli (CMV-szeronegatív) önkénteseknél. Az érzékenység becslésére a korábbi ismert CMV-fertőzésen átesett (CMV szeropozitív) egészséges önkéntesek értékelése szolgált. Bár a QF-CMV nagy számú CMV-specifikus epitópot hasznosít különböző CMV-proteinekből, ami széles klinikai alkalmazhatóságot eredményez a legkülönbözőbb HLA I. osztályú haplotípusok esetében, a peptidek nem kínálnak 100% lefedettséget. Mivel a CMV elleni szerológiára tesztelt alanyok HLA haplotípusa nem ismeretes, a szeropozitív egyéneknek egy kisebb százalékánál várható volt, hogy nem reagál majd a QF-CMV-csővekre.

Specifikusság

Egy korábbi ismert CMV-fertőzés nélküli (CMV-szeronegatív) egészséges alanyokon végzett (n = 250) vizsgálat szerint a CMV-peptidekre adott QF-CMV szerinti IFN- γ -válaszok és a CMV elleni szerológiai információ között 100% volt az egyezés.

Az összes többi specifikussági értékelés is azt mutatta, hogy a szervátültetettek (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), a haemopoeticus őssejttranszplantáltak (7, 13) és a HIV-fertőzöttek (2) esetén a CMV-peptidekre adott QF-CMV szerinti IFN- γ -válaszok és a CMV elleni szerológiai adatok között következetesen 100% volt az egyezés.

Érzékenység

Egy korábbi ismert CMV-fertőzéses (CMV-szeropozitív) egészséges alanyokon végzett ($n = 341$) vizsgálat szerint a CMV-peptidekre adott QF-CMV szerinti IFN- γ -válaszok és a CMV elleni szerológiai adatok között 80,6% (275/341) volt az egyezés. Az észlelt disszonancia oka lehet a túl magas küszöbérték (0,2 IU/ml), a hamis pozitív CMV-szerológia, illetve az alany érzéketlensége a teszt által alkalmazott CMV-peptidekre.

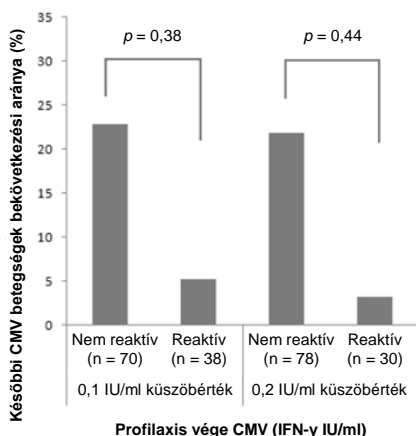
A szervátültetettek (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), haemopoeticus őssejttranszplantáltak (7, 13) és HIV-fertőzöttek (2) körében végzett érzékenységi vizsgálatokban esetenként valamivel alacsonyabb szintű egyezést találtak a CMV-peptidekre adott QF-CMV szerinti IFN- γ -válaszok és a CMV-szeropozitív válaszok között. Az alacsonyabb szintű egyezés oka lehet hamis pozitív CMV-szerológia, az alany érzéketlensége a teszt által alkalmazott CMV-peptidekre, illetve a reaktív T-sejtek immunszuppresszió okozta hiánya.

Klinikai hasznosságot alátámasztó vizsgálatok

Mind a szerológia, mind a QF-CMV meghatározott rendeltetése a CMV-immunitás észlelésének lehetővé tétele. Transzplantáció alkalmával a CMV-szerológiát széles körben alkalmazzák átültetés előtt a poszt-transzplantációs CMV-komplikációk kockázatának felmérésére, de az átültetést követően kevés haszna van. A QF-CMV alternatívaként szolgálhat az implantáltak esetén a CMV-immunitás szintjének felmérésében olyan páciensek esetén, akik immunszuppresszió (6, 9–11) miatt ki vannak téve a tünetekkel járó CMV-fertőzésnek és/vagy -megbetegedésnek.

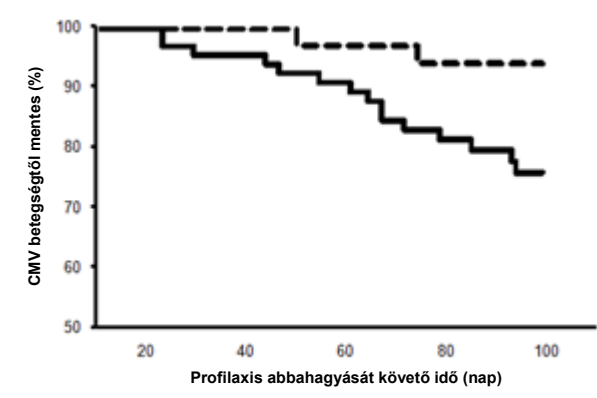
Számos publikált klinikai vizsgálat a transzplantáltak különféle csoportjai esetén igazolta a QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16) hasznosságát.

Egy széles körű, 108 szervátültetetten (4) elvégzett vizsgálat eredménye szerint a CMV elleni profilaxis elvégzésekor „reaktív” QF-CMV eredményűek esetén jelentősen alacsonyabb a későbbi megbetegedések aránya, mint a „nem reaktív” QF-CMV-eredményűeknél (előbbinél 5,3%, míg az utóbbinál 22,9%, $p = 0,044$) (5. ábra).



5. ábra. A profilaxis végeztével QuantiFERON-CMV szerint „reaktív” és a QuantiFERON-CMV szerint „nem reaktív” páciensek későbbi CMV megbetegedési hányadának összevetése. Adatforrás: Kumar et al. (4)

Továbbá a profilaxis végeztével QF-CMV szerint „reaktív” páciensek gyakrabban kerültek el a CMV-megbetegedést, és hosszabb időn keresztül (6. ábra), amely azt jelzi, hogy a QF-CMV alkalmazható a későbbi CMV-megbetegedés kockázatának kitett páciensek azonosítására.

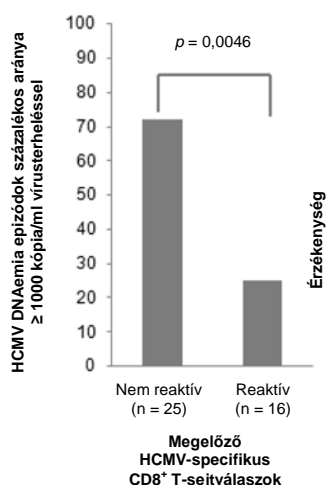


6. ábra. A profilaxis végén QuantiFERON-CMV szerint „reaktív” páciensek (szaggatott vonal), valamint a QuantiFERON-CMV szerint nem reaktív páciensek (folytonos vonal) CMV betegségének kialakulásáig eltelt idő.. Adatforrás: Kumar et al. (4)

Ez a vizsgálat arra is rámutatott, hogy a magasabb CMV-kockázatú implantáltaknál (CMV-szeropozitív donortól szövetet kapó CMV-szeronegatív pácienseknél, tehát D+/R-) a profilaxis után bármikor elvégzett „reaktív” eredményű QF-CMV azt jelentette, hogy az implantált 90%-os eséllyel elkerüli a CMV betegséget.

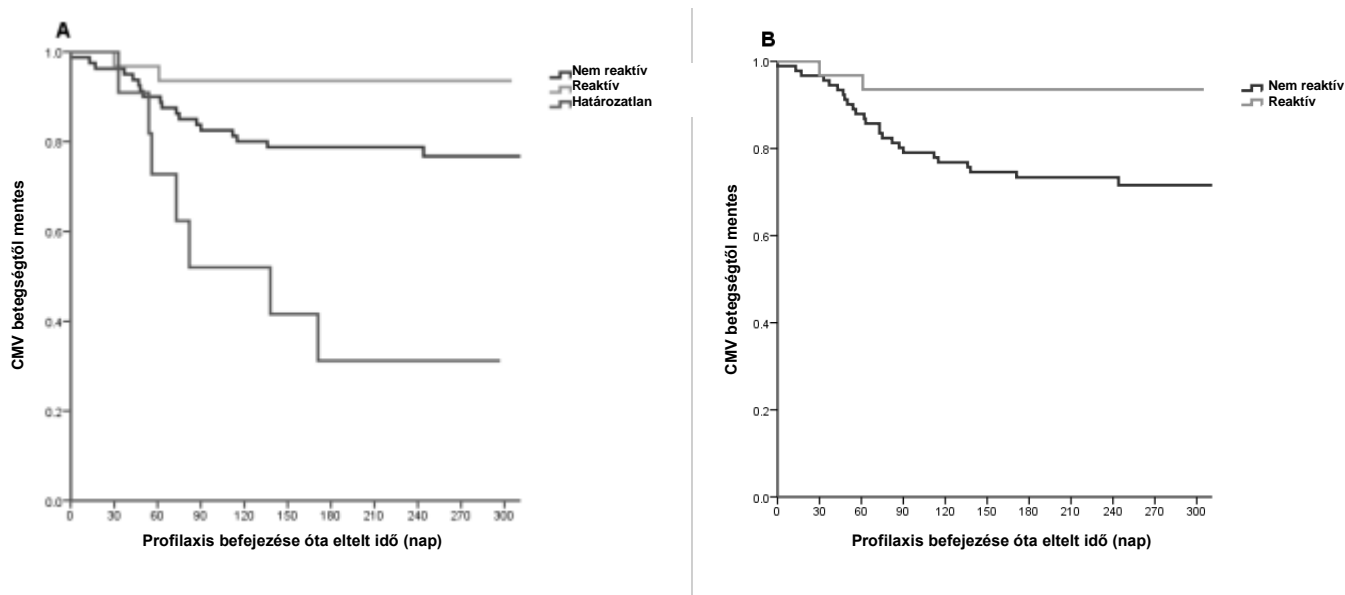
Egy 37 szervátültetett (12) végzett vizsgálat szerint a CMV-specifikus CD8⁺ T-sejtválaszainak QF-CMV-vel végzett vizsgálata a CMV-virémia növekedését követően segítette előrejelezni a spontán vírusürítést a CMV betegség kialakulásával szemben. Ebben a vizsgálatban 24/26 (92,3%) QF-CMV szerint „reaktív” páciens spontán ürítette a CMV-vírust, míg ugyanez mindössze 5/11 (45,5%) QF-CMV szerint „nem reaktív” páciens esetén történt meg.

Egy 67 tüdőátültetettre kiterjedő, poszttranszplantációs (14) CMV-virémiás epizódokat értékelő vizsgálat szerint a CMV-virémiás epizódok 18/25 (72%) arányát „nem reaktív” QF-CMV-eredmények előzték meg, míg 4/16 (25%) arányban előzték meg „reaktív” QF-CMV-eredmények (Fisher-féle egzakt teszt, $p = 0,0046$, lásd 7. ábra).



7. ábra. A QuantiFERON-CMV által észlelt CMV-specifikus CD8⁺ T-sejtválaszok és a CMV-virémia kialakulásának statisztikai elemzése (Fisher-féle egzakt teszt, $p = 0,0046$). Adatforrás: Weseslindtner et al. (14)

Egy 127 résztvevős, D+/R- típusú, vírus elleni profilaxisban részesült szervátültetettek (15) végzett, több központú prospektív vizsgálat kimutatta, hogy a CMV elleni profilaxis befejezése után tetszőleges időpontban elvégzett QF-CMV szerint (0,1 IU/ml tesztküszöbérték mellett) „reaktív” páciensek esetében jelentősen kisebb arányban fordult elő későbbi megbetegedés az átültetést követő 12 hónap alatt, mint a „nem reaktív” és a határozatlan QF-CMV-eredményűeknél (6,4% vs. 22,2% vs. 58,3% a fenti esetek sorrendjében, $p < 0,001$). Ha a határozatlan eredményt is „nem reaktív” eredménynek vesszük, akkor a későbbi CMV betegségek bekövetkezési arányai: 6,4% vs. 26,8%, $p = 0,024$ esetén (lásd 8. ábra). A QF-CMV által a CMV betegség elleni védelemre előrejelzett pozitív érték 0,90 (95% CI 0,74–0,98), míg a negatív érték 0,27 (95% CI 0,18–0,37) volt, ami azt jelzi, hogy a profilaxis után bármikor elvégzett „reaktív” eredményű QuantiFERON-CMV 90% eséllyel jelezte előre a CMV betegség elkerülését. A vizsgálati eredmények szerint a profilaxis utáni QF-CMV alkalmas annak előrejelzésére, hogy a páciens kis, közepes vagy nagy kockázatú a későbbi CMV megbetegedés szempontjából.



8. ábra. QF-CMV eredmények szerinti CMV-esetek előfordulásának Kaplan-Meier görbéje.

- A** Reaktív vs. nem reaktív vs. határozatlan QF-CMV-eredmények (log értékeszt, $p < 0,001$)
B Reaktív vs. nem reaktív, ha a határozatlant „nem reaktív” eredménynek vesszük (log értékeszt, $p = 0,024$)

Egy 55 szervátültetett alanyon (16) végzett, a transzplantáció előtti QF-CMV-eredmény és az átültetést követő CMV-replikációs esetek közötti összefüggést elemző prospektív vizsgálat megállapította, hogy gyakrabban fordult elő transzplantáció utáni CMV-replikáció olyan R(+) implantáltaknál, akiknél az átültetés előtti QF-CMV-eredmény „nem reaktív” volt (7/14, tehát 50%); mint azoknál az R(+) implantáltaknál, akiknél az átültetés előtti QF-CMV-eredmény „reaktív” volt (4/30, tehát 13,3%).

A vizsgálat szerint a CMV-szeropozitív donortól szervet fogadó, átültetés előtt „nem reaktív” QF-CMV-eredményű implantáltaknál tízszeres eséllyel fordult elő CMV-replikáció azokhoz képest, akiknél az implantáció előtti QF-CMV-eredmény „reaktív” volt (korrigált OR 10,49, 95% CI 1,88–58,46). Eszerint az átültetés előtti QF-CMV-teszt alkalmas az átültetés utáni CMV-replikáció kockázatának előrejelzésére, így lehetővé teszi, hogy előre számolni lehessen az egyedi esetekben a szervátültetést követő CMV-fertőzéssel.

Számos más, már elvégzett (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) vagy jelenleg folyamatban lévő vizsgálat irányul világszerte a transzplantáltak körében végzett QF-CMV által adott CMV-specifikus CD8⁺ T-sejtválaszok észlelésére.

Szervátültetettek citomegalovírusos eseteire vonatkozó közös nemzetközi irányelvek

A CMV-specifikus immunvizsgálat fontosságát az „International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation” (Szervátültetettek citomegalovírusos eseteire vonatkozó közös nemzetközi irányelvek) kiadványban ismerték el és publikálták (6). Ezek a The Transplantation Society (transzplantációs társaság) The Infectious Diseases Section (fertőző betegségek szekciója) által összeállított szakértői testület által létrehozott, a CMV-re és a szervátültetésre vonatkozó nemzetközi irányelvek bizonyítékokon és szakértői véleményeken alapuló közös irányelvekkel szolgálnak a CMV-intézkedésekkel kapcsolatosan: diagnózis, immunológia, megelőzés és kezelés.

Az irányelvek leszögezik, hogy „a CMV-specifikus T-sejtválaszok immunvizsgálata alkalmas a szervátültetést követő CMV-kockázat előrejelzésére, és alkalmas lehet a profilaxis és a megelőző terápiák irányának kijelölésére” (6).

Emellett az irányelvek az ideális immunvizsgálati teszt tulajdonságaira vonatkozó ajánlásokat is tartalmazzák, amelyek szerint:

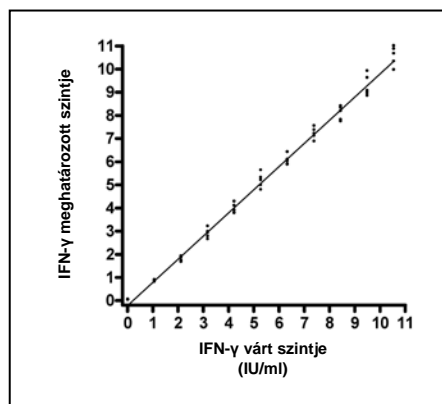
- Képes meghatározni a transzplantált CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtjeinek mennyiségét és működését
- Képes mérni az IFN- γ értékét
- Egyszerűen elvégezhető, költséghatékony és reprodukálható
- Rövid határidővel elvégezhető
- A minták egyszerűen szállíthatók a speciális laboratóriumokba

A QF-CMV az irányelvekben meghatározott lényegében összes követelménynek megfelel, és ez az egyetlen szabványos, IFN- γ -érzékelésre alkalmas, CMV-specifikus immunvizsgálati teszt.

Vizsgálat teljesítményjellemzői

Az IFN- γ -koncentrációnak a QF-CMV ELISA által alkalmazott mérési módszere bizonyítottan lineáris nulla és 10 IU/ml között (9. ábra). A linearitási vizsgálatban 11 ismert IFN- γ -koncentrációjú plazmaforrás 5 megismételt tételét helyezték véletlenszerűen az ELISA-tálcára.

A QF-CMV ELISA esetében semmi sem utal prozona jelenségre, még akár 100 000 IU/ml IFN- γ érték mellett sem.



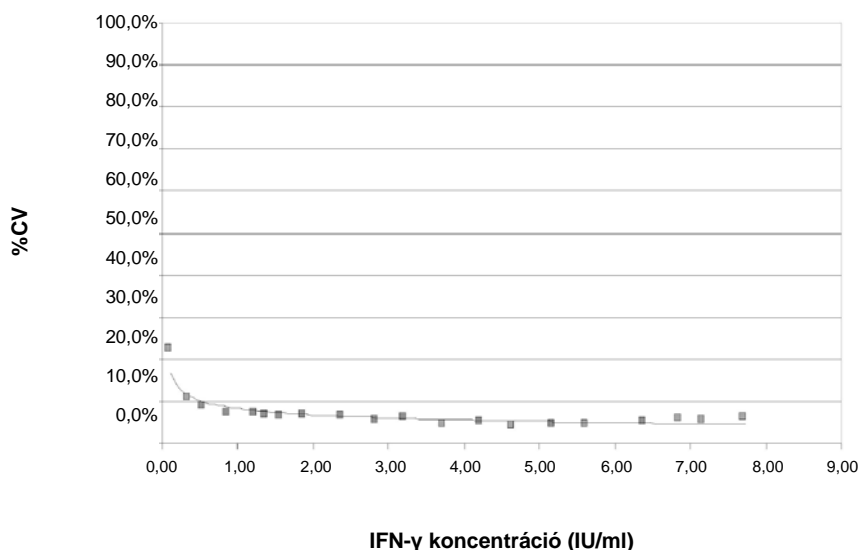
9. ábra. A QF-CMV ELISA linearitási profilját 11 ismert IFN- γ -koncentrációjú plazmaminta 5 megismételt tételének tesztelése alapján határozták meg. A lineáris regressziós vonal meredeksége $1,002 \pm 0,011$, korrelációs együtthatója 0,99.

A QF-CMV ELISA teszten belüli és a tesztek közötti pontatlanságát (%CV) 20 eltérő IFN- γ -koncentrációjú plazmaminta alapján állapították meg 3 ismétléssel, 3 laboratóriumban, 3 nem egymást követő napon, 3 különböző kezelővel. Ennek megfelelően minden mintát 9 független tesztmunkafolyamatban, összesen 27 alkalommal teszteltek. Az egyik minta 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml számított IFN- γ -koncentrációjú nullkontroll volt. A többi 19 plazmaminta koncentrációs értéktartománya 0,33 (0,31–0,34) és 7,7 IU/ml (7,48–7,92) között volt.

A munkafolyamaton belüli és a tesztek közötti pontatlanság közelítő értékét az egyes tesztmunkafolyamatokból származó (n = 9), 4,1 és 9,1 %CV érték közötti IFN- γ -tartalmú tesztplazmák %CV értékeinek átlagolásával kapták meg. A munkafolyamaton belüli átlagos %CV (\pm 95% CI) értéke 6,6% \pm 0,6% volt. A nulla IFN- γ értékű plazma átlaga 14,1 %CV volt.

Az összes teszten belüli pontatlanságot plazmamintánként 27 különféle 6,6 és 12,3 %CV közötti számított IFN- γ -koncentráció összevetésével határozták meg. Az összesített átlagos %CV (\pm 95% CI) értéke 8,7% \pm 0,7% volt. A nulla IFN- γ értékű plazma 26,1 %CV értéket mutatott. Ez egy elvárható szintű ingadozás, mert a számított IFN- γ -koncentráció alacsony értékű, és alacsony értékű becsült koncentrációk ingadozása mindig nagyobb, mint a magasabb koncentrációs értékeké.

A QF-CMV ELISA pontossági profilja a 10. ábrán látható, és azt mutatja, hogy a pontatlanság nagyobb IFN- γ -koncentrációknál sem növekszik.



10. ábra. A QF-CMV ELISA pontossági profilját 20 plazmaminta alapján állapították meg tripla ismétléssel, 3 nem egymást követő napon, 3 laboratóriumban, 3 különböző kezelővel. A trendvonalat a legkisebb négyzetek módszerével határozták meg.

A QF-CMV teszt reprodukálhatóságát 8 különféle, ismeretlen CMV-állapotú alanytól származó vérmintával vizsgálták. Az egyes alanyoktól származó vért három QF-CMV-csőkészletbe töltötték (3 db nullcső, 3 db CMV és 3 db mitogén). A három csőkészletet ezután a kézikönyvben meghatározottak szerint három eltérő helyszínen inkubálták (helyszínenként egy-egy nullkészletet, CMV-csővet és mitogéncsővet). 16–24 órás inkubációt követően a csöveket centrifugálták, majd a plazmát elválasztották.

Ezután minden helyszínen három alkalommal végezték el az ELISA teszteket, három QF-CMV-eredményesort hoztak létre minden alanyra és minden helyszínen (a helyszíneken összesen 9 eredmény született). Minden helyszínen más és más kezelő dolgozott. A vizsgálatokban alkalmazott tálcák nem feltétlenül tartoztak egy gyári számhoz, de mindegyik a lejárat idején belül volt.

Minden vérmintánál mind diagnosztikai eredmény (reaktív, nem reaktív vagy határozatlan), mind számszerű eredmény szempontjából megállapították a reprodukálhatóságot. A számszerű értékek reprodukálhatóságát csak a „reaktív” minták esetében vizsgálták (%CV értékben), mivel a „nem reaktív” IFN- γ -értékű minták a pontosság értelmezhető becsüléséhez túl alacsony értéket tartalmaztak.

Összességében a diagnosztikai reprodukálhatóság 100% volt, amelyben mind a 8 önkéntes QF-CMV diagnosztikai státusza reprodukálható volt minden helyszínen és minden alkalommal, határozatlan eredmények jelentése nélkül. A „reaktív” minták reprodukálhatósága mind helyszíneken belül, mind helyszínek között elfogadható volt. Az egyes teszhelyszínekhez tartozó átlagos %CV érték 4,5% (1. helyszín), 5,9% (2. helyszín) és 7,3% (3. helyszín) volt. Összességében a helyszínek közötti %CV ingadozás az 5 „reaktív” minta mindegyikére számítva 5,9% volt. A 10% alatti ingadozási együttható kiváló eredménynek számít.

Technikai tudnivalók

Határozatlan eredmények

A határozatlan eredményt a tesztalany immunállapota és számos technikai tényező is okozhatja:

- 16 óránál hosszabb idő telt el a vérvétel és a 37 °C-os inkubáció között.
- A vért az előírt tartományon (17–27 °C) kívül eső hőmérsékleten tárolták.
- Nem végezték el a vérvételi csövek tartalmának megfelelő keverését.

A vérminták levételekor vagy kezelésekor elkövetett technikai hibák gyanúja esetén a teljes QF-CMV tesztet meg kell ismételni új vérmintákkal. Az előírt ELISA-műveletsortól való bármely eltérés gyanúja esetén a stimulált plazmák ELISA tesztelése megismételhető. Az alacsony mitogénértékből eredő határozatlan eredmények valószínűleg a teszt megisméltésekor sem szűnnek meg, csak akkor, ha az ELISA teszteléskor történt hiba.

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. Részletesebb útmutató található a Technical Information (Technikai tudnivalók) alatt: www.QuantiFERON.com. Az elérhetőségek a 27. oldalon és a hátsó borítón találhatók.

ELISA-hibaelhárítás

Alacsony leolvasott optikai denzitás a standardoknál

| Lehetséges ok | Megoldás |
|---|--|
| a) Standardhígítási hiba | Ellenőrizze, hogy a kézikönyvben foglaltak szerint történt-e a standardkészlet hígítása. |
| b) Pipettakezelési hiba | A pipettákat mindig a gyártói utasítások betartásával kell kalibrálni és alkalmazni. |
| c) Túl alacsony inkubációs hőmérséklet | Az ELISA inkubációját szobahőmérsékleten kell elvégezni (17–27 °C). |
| d) Túl rövid inkubációs idő | A konjugátumot, a standardokat és a mintákat tartalmazó tálcát 120 ± 5 percen át kell inkubálni. Az enzimszubsztrát-oldatot 30 percen át kell a tálcán inkubálni. |
| e) Nem megfelelő szűrő tálcabeolvasásnál | A tálcabeolvasásnak 450 nm-en kell történnie 620–650 nm-es szűrővel. |
| f) Túl hideg reagensek | A konjugátum 100× koncentrátum kivételével minden reagenst szobahőmérsékletre kell hozni a tesztelés megkezdését megelőzően. Ehhez körülbelül 1 óra szükséges. |
| g) A készlet vagy annak összetevői lejártak | Ügyeljen arra, hogy a készletet a lejáratási időn belül felhasználja. A rehidratált standardot és konjugátum 100× koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő 3 hónapon belül fel kell használni. |

Nem specifikus szín kialakulása / magas háttérérték

| Lehetséges ok | Megoldás |
|---|--|
| a) A tálca nem teljes mosása | A tálcát legalább 6 alkalommal kell átmosni lyukanként 400 µl mosópufferrel. Az alkalmazott mosófolyadéktól függően 6-nál többszöri átmosásra is szükség lehet. Ajánlott egy legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között. |
| b) Túl magas inkubációs hőmérséklet | Az ELISA inkubációját szobahőmérsékleten kell elvégezni (17–27 °C). |
| c) A készlet vagy összetevői lejártak | Ügyeljen arra, hogy a készletet a lejáratási időn belül felhasználja. A rehidratált standardot és konjugátum 100× koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő három hónapon belül fel kell használni. |
| d) Az enzimszubsztrátoldat szennyezett | Kékes elszíneződés esetén a szubsztrátumot hulladékba kell helyezni. Ügyeljen a reagenstartály tisztaságára. |
| e) Elválasztás előtt felkeveredik a plazma a centrifugált csövekben | A plazmamintákat mindig óvatosan kell leválasztani a gél feletről, fel-le pipettázás nélkül, végig gondosan megőrizve a gélfelület sértetlenségét. |

Bibliográfia

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

Technikai ügyfélszolgálat

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

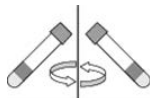
Ez az oldal szándékosan üres.

Ez az oldal szándékosan üres.

Rövidített tesztfolyamat

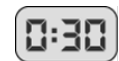
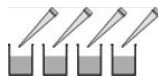
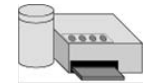
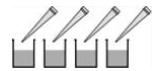
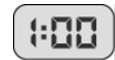
1. fázis – vér inkubálása

1. Vegye le a páciens-től a vért a vérvételi csövekbe, rázza meg a csöveket tíz (10) alkalommal kellő erővel ahhoz, hogy a cső teljes belső felszínére eljutó vér leoldja a csőfalon található antigéneket.
2. A csöveket álló helyzetben inkubálja $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ -on 16–24 órán keresztül.
3. Inkubálás után centrifugálja a csöveket 15 percig a csöveket 15 percig 2000–3000 RCF (g) fordulatszámra, hogy a plazma és a vörösvértestek elváljanak.
4. A centrifugálás és az elválasztás művelete között kerülni kell a pipetta használatát, illetve a plazma bármilyen felkeverését. Végig gondosan meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.



2. fázis – IFN- γ ELISA

1. Legalább 60 percen keresztül engedje, hogy az ELISA összetevői a konjugátum 100x koncentrátum kivételével felvegyék a szobahőmérsékletet.
2. Rehidratálja a standardkészletet 8,0 IU/ml mennyiségre desztillált vagy ioncserélt vízzel. Készítsen (4) standard hígítást.
3. Rehidratálja a liofilizált konjugátum 100x koncentrátumot desztillált vagy ioncserélt vízzel.
4. Készítsen készre hígított konjugátumot a zöld hígítóval, majd töltsön 50 μl mennyiséget minden lyukba.
5. Töltsön 50 μl tesztplazmamintát és 50 μl standardot a megfelelő lyukakba. Keverje a rázógéppel.
6. Inkubálja 120 percig szobahőmérsékleten.
7. A lyukakat legalább 6 alkalommal mossa át lyukanként 400 μl mosópufferrel.
8. Töltsön 100 μl enzimszubsztrát- oldatot a lyukakba. Keverje a rázógéppel.
9. Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.
10. Töltsön 50 μl enzimeállító oldatot a lyukakba. Keverje a rázógéppel.
11. Olvassa be az eredményeket 450 nm-en a 620–650 nm-es referenciaszűrővel.
12. Elemezze az eredményeket.



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

A QuantiFERON-CMV ELISA készlet korlátozott licencszerződése

A termék használatával a vásárló vagy felhasználó elfogadja a jelen termékre vonatkozó feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint szabad használni, és csak a készletben szereplő összetevőkkel. A QIAGEN egyetlen szellemi terméke esetén sem engedélyezi, hogy a mellékelt összetevőket bármely, a készlethez nem tartozó összetevővel együtt használják. Ez alól kivételt képeznek a termékhez tartozó, a jelen kézikönyvben leírt vagy a weblapon található egyéb protokollokban leírtak: www.qiagen.com. Egyes kiegészítő protokollokat a QIAGEN felhasználói bocsátják a QIAGEN felhasználóinak rendelkezésére. Ezeket a protokollokat a QIAGEN nem tesztelte vagy optimalizálta átfogó módon. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem szavatolja, hogy mások jogait a protokoll nem sérti.
2. A kifejezetten megemlített licenceken kívül a QIAGEN nem vállal felelősséget azért, hogy a készlet és/vagy annak használata(i) nem sérti(k) mások jogait.
3. A készletre és összetevőire egyszeri használatra szóló engedély vonatkozik, és tilos újrafelhasználni, felújítani vagy ismét eladni.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A készlet vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy tilos olyan lépéseket tennie vagy másvalakinek megengednie, amely a fent tiltott cselekedetek bármelyikét eredményezné vagy elősegítené. A QIAGEN a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak betartatása érdekében jogosult bármely bírósághoz fordulni, és az azzal kapcsolatos összes vizsgálati és perköltséget behajtani, beleértve a készlethez, illetve annak összetevőihöz kapcsolódó, a jelen korlátozott licencszerződésből vagy bármely szellemi termékhez fűződő jog érvényesítéséből eredő ügyvédi költséget.

A legfrissebb licencfeltételek: www.qiagen.com

© 2012 Cellestis, QIAGEN vállalat, minden jog fenntartva.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

