
QuantiFERON[®]-CMV

informacinis lapelis 2 x 96

Gama interferono gryno kraujo testas reakcijai į žmogaus citomegalo viruso peptidų antigenus nustatyti

IVD



REF

0350-0201



Cellestis, QIAGEN įmonė

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australija

Tel. +613-9840-9800 (Australija), +49-2103-29-12000 (Europa)

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, VOKIETIJA

1075110LT 01 leid.



Turinys

Numatytoji paskirtis	5
Išvadas	5
Tyrimo principai	6
Tyrimo trukmė	6
Reagentai ir laikymo sąlygos	7
Būtinoms, bet nepateikiamoms priemonėms	8
Sandėliavimas	8
Perspėjimai ir atsargumo priemonės	9
Mėginių paėmimas ir apdorojimas	10
Naudojimo instrukcija	11
1 etapas. Kraujo mėginio inkubacija ir plazmos paėmimas	11
2 etapas. QuantiFERON-CMV ELISA, skirtas žmogaus IFN- γ	11
Skaičiavimas ir rezultatų aiškinimas	14
Rezultatų aiškinimas	15
Apribojimai	15
Efektyvumo charakteristikos	17
Lyginamasis tyrimas	17
Tyrimo slenkstis	18
Klinikinės studijos	18
Tikslumas	18
Jautrumas	19
Tyrimai, pabrėžiantys klinikinę naudą	19
Tarptautinės gairės dėl citomegalo viruso valdymo vientiso organo transplantantuose	22
Tyrimo atlikimo charakteristikos	22
Techninė informacija	24
Neaiškūs rezultatai	24
Trikčių šalinimo vadovas	25
Literatūra	26

Techninis klientų aptarnavimas	27
Sutrumpinta testo procedūra	30
1 etapas. Kraujo mėginio inkubavimas	30
2 etapas. IFN- γ ELISA	30

Numatytoji paskirtis

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) – in vitro diagnostinis tyrimas, kurį sudaro peptidų kokteilis, simuliuojantis žmogaus citomegalo viruso (CMV) proteinus, kad būtų stimuliuojamos ląstelės gryname heparinuotame kraujyje. Gama interferono (IFN- γ) nustatymas Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodu naudojamas nustatant kiekį in vitro reakcijų į šiuos peptidų antigenus, kurie siejami su CMV infekcijos imunine kontrole. Šios imuninės funkcijos praradimas gali būti siejamas su CMV ligos vystymusi. Numatyta, kad QF-CMV naudojamas siekiant stebėti paciento CMV antigenų lygį.

QF-CMV tyrimas nėra skirtas CMV infekcijai nustatyti ir neturėtų būti naudojamas CMV infekcijai išskirti.

Įvadas

CMV yra herpes tipo virusas, kuriuo užsikrėtę 50–85 % visų suaugusiųjų. Tai dažnai pasitaikanti imuniteto slopinimo komplikacija (ypač kylanti po transplantacijų), kuri gali gerokai prisidėti prie organo recipientų susirgimų ir mirties. Modernios imuniteto slopinimo terapijos, naudojamos siekiant apsaugoti nuo persodintų organų atmetimo, neigiamai veikia T limfocitų ir ląstelių sukeltą imuniteto (CMI) atsakus, todėl padidėja persodinto organo recipientų imlumas virusinėms infekcijoms. T ląstelių funkcijos svarbą CMV replikavimo slopinimo procese taip pat pabrėžia faktas, kad CD8⁺ CMV būdingi citotoksiški T limfocitai (CTL) gali apsaugoti nuo su virusais susijusios patogenezės. CD8⁺ CMV būdingų CTL, esančių pacientuose, kurių imunitetas slopinamas, buvimas ir IFN- γ gaminimasis gali prognozuoti CMV ligos vystymosi riziką. IFN- γ gaminimasis gali būti pagrindinis CMV būdingų CTL identifikavimo pakaitas.

QF-CMV tyrimas testuoja CMI reakciją į peptidų antigenus, kurie stimuliuoja CMV proteinus. CMV peptidai sukurti taikytis į CD8⁺ T ląsteles, įskaitant HLA I klasės haplotipus: A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 ir Cw6 (A30, B13), kurių turi > 98 % visų žmonių. CMV užsikrėtę asmenys paprastai kraujyje turi CD8⁺ limfocitų, kurie atpažįsta šiuos antigenus. Šis atpažinimo procesas apima citokino, IFN- γ , generavimą ir sekreciją. IFN- γ aptikimas ir tolesnis jo formų kvantifikavimas sudaro šio tyrimo pagrindą.

Tyrimo principai

QF-CMV testas atliekamas 2 etapais. Pirmiausia grynas kraujo mėginys surenkamas į kiekvieną QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlį, tarp kurių yra nulinės kontrolės mėgintuvėlis, CMV antigeno mėgintuvėlis ir mitogeno mėgintuvėlis.

Mitogeno mėgintuvėlis QF-CMV testuojant naudojamas kaip teigiama kontrolė. Tai gali būti ypač pateisinama, jei asmens imuninės sistemos būseną nėra aiški.

Kraujas turi būti inkubuojamas kuo greičiau (per 16 valandų nuo surinkimo) 37 °C temperatūroje. Po 16–24 valandų trukusio inkubacijos periodo mėgintuvėliai centrifuguojami. Tada plazma atskiriama ir QF-CMV ELISA metodu nustatomas IFN- γ (IU/ml) kiekis.

IFN- γ kiekis plazmos mėginiuose, esančiuose CMV antigeno ir mitogeno mėgintuvėliuose, dažnai gali viršyti daugelio ELISA skaitytuvų ribas, net jei asmenų imunitetas yra tik šiek tiek slopinamas. Norėdami gauti **kokybinius** rezultatus, naudokite reikšmes apskaičiuotas pasitelkus neatskiestą plazmą. Norint gauti **kiekybinius** rezultatus, kai būtinos faktinės IU/ml reikšmės, plazmos mėginiai turi būti skiedžiami žaliame skiediklyje (1/10) ir tiriami ELISA metodu kartu su neskiesta plazma.

Pastaba: su į QF-CMV ELISA metodo intervalą (t. y. iki 10 IU/ml) patenkančiais mėginiais reikia naudoti rezultatą, gautą naudojant neatskiestos plazmos mėginį. Turint tokią IFN- γ koncentraciją, reikšmės, gautos praskiedus plazmos mėginius santykiu 1/10, gali būti netikslios.

Testas yra laikomas teigiamu IFN- γ reakcijai į CMV antigeno mėgintuvėlį, jei ši reikšmė yra gerokai virš nulinės kontrolės IFN- γ IU/ml reikšmės. Mitogeną stimuliuojantis plazmos mėginys veikia kaip IFN- γ pozityvi kontrolė kiekvienam patikrintam mėginiui. Silpna reakcija į mitogeną vertinama kaip neaiškus rezultatas, kai kraujo mėginys parodo neigiamą reakciją ir į CMV antigenus. Toks modelis gali būti taikomas esant nepakankamam limfocitų skaičiui, esant sumažėjusiam limfocitų aktyvumui dėl netinkamo elgesio su mėginiais, netinkamo mitogeno mėgintuvėlio užpildymo arba jo maišymo arba tada, kai paciento limfocitai negali gaminti IFN- γ , pvz., neseniai organų persodinimą patyrusių asmenų. Nulinis mėginys koreguoja fono reakcijas ar nespecifinį IFN- γ kraujo mėginiuose. Nulinio mėgintuvėlio IFN- γ reikšmė atimama iš CMV antigeno mėgintuvėlio ir mitogeno mėgintuvėlio IFN- γ reikšmės (žr. šio informacinio lapelio 15 puslapio skyrių „Rezultatų aiškinimas“ ir sužinokite, kaip interpretuojami QF-CMV tyrimo rezultatai).

Tyrimo trukmė

Toliau rasite informaciją apie apytiksliai nustatytą QF-CMV tyrimo trukmę, taip pat apie reikiamą laiką testuojant mėginių paketą:

Kraujo mėgintuvėlių inkubacija
esant 37 °C temperatūrai:

nuo 16 iki 24 val.

ELISA:

apie 3 valandos 1 ELISA plokštelei

mažiau nei 1 val. darbo laiko

plius 10–15 min. kiekvienai papildomai plokštelei

Reagentai ir laikymo sąlygos

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (CMV ir kontrolinio antigeno kraujo surinkimo mėgintuvėliai (vieno paciento paketas))	
Katalogo Nr.	0192-0301
Paruošimų skaičius	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON nulinės kontrolės mėgintuvėlis (pilkas dangtelis))	1 mėgintuvėlis
CMV Antigen (CMV antigeno mėgintuvėlis (mėlynas dangtelis))	1 mėgintuvėlis
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogeno kontrolinis mėgintuvėlis (violetinis dangtelis))	1 mėgintuvėlis
Informacinis lapelis	1
QuantiFERON-CMV ELISA Components (QuantiFERON-CMV ELISA komponentai)	
Katalogo Nr.	0350-0201
Mikroplokštės juostelės	24 x 8 plokštelės su duobutėmis
Human IFN- γ Standard (Žmogaus IFN- γ standartas), liofilizuotas	1 x buteliukas
Green Diluent (Žalias skiediklis)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate, (QuantiFERON konjugatas (100 x koncentratas), liofilizuotas)	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (QuantiFERON plovimo buferis (20 x koncentratas))	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON fermento substrato tirpalas)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON fermento stabdymo tirpalas)	1 x 15 ml

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

- 37 °C inkubatorius; CO₂ nebūtinus
- Kalibruotos reguliuojamojo tūrio pipetės (nuo 10 µl iki 1000 µl) su vienkartiniais švirkštais
- Kalibruota daugiakanalė pipetė tūriui nustatyti (nuo 50 µl iki 100 µl) su vienkartiniais švirkštais
- Mikroplokštelių kratytuvus
- Dejonizuotas arba distiliuotas vanduo (2 litrai)
- Mikroplokštelių plovimo aparatas (rekomenduojamas automatizuotas plovimo aparatas)
- Skaitymo įrenginys mikroplokštelėms su 450 nm filtru ir 620–650 nm referencijos filtru

Sandėliavimas

Kraujo surinkimo mėgintuvėliai

- Kraujo surinkimo mėgintuvėlius laikykite nuo 4 °C iki 25 °C temperatūroje.
- QuantiFERON-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių laikymo laikas yra ne ilgesnis nei 15 mėnesių nuo surinkimo datos, jei laikymo temperatūra yra nuo 4 °C iki 25 °C.

ELISA komplekto reagentai

- Komplektą laikykite nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje.
- Fermento substrato tirpalą visada saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.

Atkurti ir nepanaudoti reagentai

Nurodymų, kaip atkurti reagentus, žr. skyrių „Naudojimo nurodymai – 2 etapas“ (3 ir 5 veiksmas, 11 ir 12 psl.).

- Sandėliuojant 2–8 °C temperatūroje, atkurtas komplekto standartas gali būti laikomas iki 3 mėnesių.

Užrašykite komplekto standarto atkūrimo datą.

- Nepanaudotas QuantiFERON konjugatas (100x) po atkūrimo turi būti vėl sandėliuojamas 2–8 °C temperatūroje ir sunaudojamas per 3 mėnesius.

Užrašykite konjugato atkūrimo datą.

- Naudoti paruoštas konjugatas turi būti sunaudojamas per 6 valandas po paruošimo.
- Naudoti paruoštą plovimo buferį kambario temperatūroje (nuo 17 °C iki 27 °C) galima laikyti ne ilgiau nei dvi savaites.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirtas in vitro diagnostikai.

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.



ĮSPĖJIMAS: žmogaus kraujo mėginius visada laikykite potencialiai infekuojančiais. Laikykitės esminių elgsenos su krauju nurodymų.

QF-CMV ELISA komplektui taikomos toliau išvardytos rizikos ir saugos frazės.

QuantiFERON fermento stabdymo tirpalas



Sudėtyje yra sieros rūgštis: dirginanti. Rizikos ir saugos frazės:* R36/38, S26-36/37/39

- **Žalio skiediklio** sudėtyje yra normalaus pelių serumo ir kazeino, kurie gali sukelti alergines reakcijas. Venkite kontakto su oda.

Įvykus cheminei avarijai

Išsiliejus, nutekėjus medžiagoms, pavojaus ar nelaimingo atsitikimo atveju

visą parą skambinkite CHEMTREC

JAV ir Kanadoje: 1-800-424-9300

Už JAV ir Kanados ribų: +1-703-527-3887 (priimami skambučiai, kai apmoka adresatas)

Daugiau informacijos

Saugos duomenų lapuose: www.qiagen.com/safety

* R36/38: dirgina akis ir odą; S26: po sąlyčio su akimis tuoj pat praskalaukite dideliu kiekiu vandens ir kreipkitės į gydytoją; S36/37/39: dėvėkite tinkamą apsauginę aprangą, pirštines ir akių / veido apsaugą.

Mėginių paėmimas ir apdorojimas

Svarbi informacija prieš pradėdant:

Nesilaikant QF-CMV informacinio lapelio nurodymų, galima gauti klaidingus rezultatus. Prieš naudojimą atidžiai perskaitykite instrukcijas.

- Nenaudokite komplekto, jei kuris nors reagento buteliukas yra pažeistas ar ištekėjęs.
- Nemaišykite ELISA reagentų iš skirtingų QF-CMV ELISA komplekto partijų.
- Nepanaudotus reagentus ir biologinius mėginius išmeskite laikydamiesi vietinių ir šalies įstatymų.
- Nenaudokite QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių ar QF-CMV ELISA komplektų, jei pasibaigusi jų galiojimo data.

QF-CMV tyrimo metu naudojami šie kraujo surinkimo mėgintuvėliai:

1. Nulinis kontrolinis mėgintuvėlis (pilkas dangtelis)
2. CMV antigeno mėgintuvėlis (mėlynas dangtelis)
3. Mitogeno kontrolinis mėgintuvėlis (violetinis dangtelis)

Antigenai yra išdžiovinti ant vidinių kraujo surinkimo mėgintuvėlių sienelių, todėl kraujo mėginiai turi būti kruopščiai sumaišyti su mėgintuvėlio turiniu. Tada mėgintuvėliai yra kiek galima greičiau (ne vėliau kaip per 16 valandų nuo kraujo surinkimo) perkelti į inkubatorių (37 °C).

Optimalūs rezultatai yra pasiekiami laikantis šių procedūrų:

1. **Iš kiekvieno paciento paimkite po 1 ml veninio kraujo tiesiai į kiekvieną QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlį.**
 - Kadangi 1 ml mėgintuvėliai kraują įtraukia palyginti lėtai, kai atrodo, kad yra pasiektas reikiamas užpildymo lygis, mėgintuvėlį palikti ant adatos dar 2–3 sekundes.
Juoda žymė ant mėgintuvėlio šono reiškia 1 ml užpildymo tūrį. QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėliai turi patvirtintą tūrį nuo 0,8 ml iki 1,2 ml. Jeigu imant kraują ši indikatorinė linija nepasiekama, rekomenduojama paimti naują kraujo mėginį.
 - Aukštyje iki 810 metrų (2650 pėdų) virš jūros lygio turėtų būti naudojami QF-CMV kraujo mėgintuvėliai, kurių patvirtintas tūris yra nuo 0,8 ml iki 1,2 ml. Aukštyje virš nurodytos ribos vartotojai turi užtikrinti, kad kraujo kiekis patektų į šį intervalą. Esant mažiems mėginių kiekiams, kraujas gali būti paimamas ir švirkštu; tada į kiekvieną iš 3 mėgintuvėlių įpilama po 1 ml kraujo. Saugumo sumetimais nuimama švirkšto adata. Tai darydami laikykitės įprastų atsargumo priemonių. Nuimkite šių trijų QF-CMV mėgintuvėlių dangtelius ir kiekvieną mėgintuvėlį papildykite 1 ml kraujo (iki juodos žymos ant šoninės etiketės). Uždenkite dangtelius ir maišykite kaip nurodyta toliau.
 - Jei kraujui surinkti naudojama „drugelio“ tipo adata, prieš uždedant QF-CMV mėgintuvėlį, naudojant papildomą mėgintuvėlį reikia įsitikinti, kad jungiamasis vamzdelis yra užpildytas krauju.
2. **Pripildę mėgintuvėlius, pakratykite juos dešimt (10) kartų, kad visas vidinis mėgintuvėlio paviršius būtų padengtas krauju ir ištirptų ant mėgintuvėlio sienelių esantys antigenai.**
 - Kraujo surinkimo metu mėgintuvėliai turi būti 17–25 °C temperatūros.
 - Per stipriai pakračius gali būti suardytas gelis ir taip iškreipti rezultatai.
3. **Pažymėkite mėgintuvėlius tinkamomis etiketėmis.**
4. **Tada mėgintuvėliai yra kiek galima greičiau (ne vėliau kaip per 16 valandų nuo kraujo surinkimo) perkelti į inkubatorių (37 °C ± 1 °C). Kraujo mėginių nelaikyti šaldytuve ar šaldymo kameroje.**

Naudojimo instrukcija

1 etapas. Kraujo mėginio inkubacija ir plazmos paėmimas

1. Jeigu kraujo mėginiai po surinkimo nėra iš karto inkubuojami, mėgintuvėlių turinys prieš pat inkubaciją turi būti pakartotinai sumaišytas, kaip aprašyta ankstesnio skyriaus 2 veiksmo.
2. Inkubuokite mėgintuvėlius VERTIKALIOJE padėtyje 16–24 val., esant 37 °C temperatūrai. CO₂ arba drėkinimas inkubuojant nėra reikalingas.
3. Po inkubacijos ir prieš atliekant kitą veiksmą kraujo surinkimo mėgintuvėlius galima laikyti 2–27 °C temperatūroje ne ilgiau nei 3 dienas. Po inkubacijos 37 °C temperatūroje, mėgintuvėliai yra 15 minučių centrifuguojami esant 2000–3000 RCF (g). Susidarant gelio kamščiui ląstelės atsiskiria nuo plazmos. Jeigu tai neįvyksta, mėgintuvėliai turi būti centrifuguojami dar kartą ir didesniu greičiu.
 - Plazmą galima paimti ir be centrifugavimo, tačiau tai reikia daryti labai atsargiai, kad paimant plazmos nebūtų sujudintos ląstelės.
4. Po centrifugavimo ir prieš plazmos paėmimą kiekvienu atveju venkite mėginius traukyti pipete aukštyn ir žemyn arba plazmą sumaišyti. Visuomet dirbkite kruopščiai, kad nesujudintumėte medžiagos prie gelio paviršiaus.
 - Plazmos mėginį visada imkite naudodami pipetę.
 - Plazmos mėginiai iš centrifuguotų kraujo paėmimo mėgintuvėlių gali būti perkelti tiesiai į QF-CMV ELISA plokštelę. Tai galioja ir tais atvejais, kai yra naudojami ELISA automatai.
 - Plazmos mėginiai 2–8 °C temperatūroje gali būti laikomi iki 28 dienų; paėmus plazmą ją galima laikyti dar ilgiau –20 °C (rekomenduojama žemiau –70 °C) mėgintuvėliuose arba plazmos laikymo konteineriuose.

2 etapas. QuantiFERON-CMV ELISA, skirtas žmogaus IFN-γ

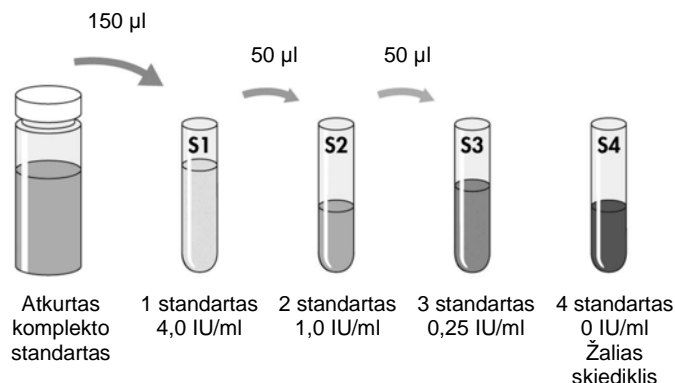
1. Visi plazmos mėginiai ir reagentai, išskyrus konjugato 100x koncentratą, prieš naudojimą turi pasiekti kambario temperatūrą (17–27 °C). Temperatūrai išlyginti paskirkite ne trumpiau nei 60 minučių.
2. Nereikalingas juosteles išimkite iš rėmelio, įdėkite jas atgal į folijos įpakavimą ir iki naudojimo laikykite šaldytuve.

Mažiausiai vieną juostelę paskirkite QF-CMV ELISA standartams ir paimkite dar pakankamą juostelių skaičių tiriamiems pacientams. Po naudojimo rėmelį ir dangtelį palikite kitam kartui su likusiomis juostelėmis.
3. **Atkurkite liofilizuotą komplekto standartą su ant standarto buteliuko etiketės nurodytu dejonizuoto arba distiliuoto vandens kiekiu. Atsargiai maišykite buteliuko turinį (vengdami putų susidarymo) ir įsitikinkite, kad turinys visai ištirpęs. Atkūrus standartą iki nurodyto tūrio, gaunamas tirpalas, kurio koncentracija yra 8,0 IU/ml.**
4. **Standarto kreivė parengiama naudojant 3 komplekto standarto skiedinius ir neskiestą žalią skiediklį kaip 4 standartą (0 IU/ml).**

Atkurtą komplekto standartą panaudokite gamindami 3 IFN-γ koncentracijų skiedinio serijas. Skieskite komplekto žaliame skiediklyje (ŽS) (žr. 1 pav. kitame puslapyje). Standartai turėtų būti ištirti mažiausiai du kartus. Tolesni veiksmai leis pagaminti pakankamą kiekį.

 - a. Užrašykite ant 4 mėgintuvėlių: S1, S2, S3, S4.
 - b. Įpilkite 150 μl žalio skiediklio į 4 mėgintuvėlius (S1–S4).
 - c. Įpilkite 150 μl komplekto standarto į S1 ir kruopščiai sumaišykite.

- d. Perkelkite 50 µl iš S1 į S2 ir kruopščiai sumaišykite.
 e. Perkelkite 50 µl iš S2 į S3 ir kruopščiai sumaišykite.
 f. Tik žalias skiediklis veikia kaip nulinis standartas (S4).



1 pav. Standarto kreivės sudarymas. Kiekvienam ELISA seansui paruoškite naujus komplekto standarto skiedinius.

5. **Atkurkite liofilizuotą konjugatą 100x koncentratą su 0,3 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens. Atsargiai sumaišykite buteliuko turinį (vengdami putų susidarymo) ir įsitikinkite, kad konjugatas visiškai ištirpo.**
6. **Naudoti tinkamą konjugatą pagaminsite skiesdami reikiamą atkurto konjugato 100x koncentrato kiekį žaliame skiediklyje, kaip nurodyta 1-oje lentelėje (Konjugato paruošimas).**
 - Kruopščiai, tačiau atsargiai išmaišykite, vengdami putų susidarymo.
 - Nesunaudotą konjugato 100x koncentratą nedelsiant grąžinkite į 2–8 °C temperatūrą.
 - Skiesdami naudokite tik žalią skiediklį.

1 lentelė. Konjugato paruošimas

Juostelių skaičius	Konjugato 100x koncentrato kiekis	Žalio skiediklio kiekis
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. **Prieš atliekant tyrimą, plazmą reikia sumaišyti, kad kiekviename mėginyje IFN- γ tolygiai pasiskirstytų. Jei reikia kiekybinių rezultatų, CMV ir mitogeno plazmą atskieskite žaliame skiediklyje santykiu 1/10 (10 μ l plazmos sumaišykite su 90 μ l ŽS). Nulinės plazmos skiesti nereikia. Rekomenduojama iširti šiuos mėginius:**
- nulinį, CMV antigenų, mitogeno, CMV antigenų (1/10), mitogeno (1/10)
- Tačiau QuantiFERON-CMV analizės programinė įranga taip pat palaiko ir šias paciento mėginių parinktis:
- nulinį, CMV antigenų, mitogeno
 - nulinį, CMV antigenų (1/10), mitogeno (1/10)
 - nulinį, CMV antigenų, mitogeno, CMV antigenų (1/10)
 - nulinį, CMV antigenų (1/10), mitogeno
8. **Į atitinkamas ELISA duobutes daugiakanale pipete įpilkite po 50 μ l šviežiai naudoti paruošto konjugato.**
9. **Į atitinkamas ELISA duobutes daugiakanale pipete įpilkite po 50 μ l plazmos mėginio. Galiausiai įpilkite po 50 μ l į kiekvieną iš standartų nuo 1 iki 4.**
10. **Konjugatą ir plazmos mėginius / standartus kruopščiai maišykite 1 minutę naudodami mikroplokštelių kratytuvą.**
11. **Kiekvieną plokštelę uždenkite dangteliu ir inkubuokite 120 \pm 5 minučių kambario temperatūroje (17–27 °C).**
- Inkubacijos metu plokšteles saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.
12. **Inkubacijos metu praskieskite 1 dalį plovimo buferio 20x koncentrato su 19 dalių dejonizuoto ar distiliuoto vandens ir kruopščiai išmaišykite. Iš pateikto plovimo buferio 20x koncentrato galima pagaminti 2 litrus naudoti tinkamo plovimo buferio.**
- Duobutes plaukite mažiausiai 6 kartus su 400 μ l naudojimui tinkamo plovimo buferio. Rekomenduojame naudoti mikroplokštelių plovimo automatą.
- Siekiant tikslių tyrimo rezultatų labai svarbu kruopščiai išplauti. Kiekvieno plovimo ciklo metu patikrinkite, ar visos duobutės yra **iki viršaus užpildytos** plovimo buferiu. Rekomenduotina tarp plovimo ciklų mažiausiai 5 sekundes pamirkyti.
 - Į atliekamų skysčių talpyklą turėtų būti įpilta laboratorijose įprastai naudojamos dezinfekcinės priemonės. Taip pat laikykitės potencialiai infekuojančios medžiagos padarymo nekenksmingomis taisyklių.
13. **Pastuksenkite plokštelę duobutėmis į apačią ant popierinio rankšluosčio, kad būtų pašalintas likęs plovimo buferis. Tada į kiekvieną duobutę įpilkite 100 μ l fermento substrato tirpalo ir maišykite mikroplokštelių kratytuve.**
14. **Kiekvieną plokštelę uždenkite dangteliu ir inkubuokite 30 minučių kambario temperatūroje (17–27 °C).**
- Inkubacijos metu plokšteles saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.
15. **Po 30 minučių trukusios inkubacijos į kiekvieną duobutę įpilkite po 50 μ l fermento stabdymo tirpalo ir išmaišykite.**
- Fermento stabdymo tirpalas į duobutes turėtų būti įpiltas ta pačia eilės tvarka ir tuo pačiu tempu kaip ir substratas (13 punktą).
16. **Pamatuokite optinį tankį (OT) kiekvienoje duobutėje 5 minučių intervalu nuo stabdymo tirpalo įpylimo. Naudokite skaitymo įrenginį, skirtą mikroplokštelėms, kuriame yra 450 nm filtras ir nuo 620 nm iki 650 nm referencijos filtras. OT reikšmės yra reikalingos skaičiuojant rezultatus.**

Skaiciavimas ir rezultatų aiškinimas

QuantiFERON-CMV analizės programinę įrangą, skirtą neapdorotų duomenų analizei ir rezultatų skaičiavimui, galite gauti iš QIAGEN svetainėje www.QuantiFERON.com.

Naudojant programinę įrangą atliekamas tyrimo kokybės kontrolės vertinimas, sudaroma standarto kreivė ir pateikiamas kiekvieno paciento tyrimo rezultatas pagal skyriuje „Rezultatų aiškinimas“ pateiktą metodą.

Užuot naudojus QF-CMV analizės programinę įrangą, rezultatai gali būti nustatomi ir pagal toliau paaiškintą metodą.

Standarto kreivės sudarymas

Nustatykite komplekto standarto pakartojimų vidutinės OT reikšmės ant kiekvienos plokštelės.

Sudarykite $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ standarto kreivę, pažymėdami vidutinės OT reikšmės $\log_{(e)}$ (y ašis) ir standarto IFN- γ koncentracijos $\log_{(e)}$ (x ašis), į šiuos skaičiavimus neįtraukdami nulinio standarto. Pasitelkę regresijos analizę, apskaičiuokite liniją su labiausiai standarto kreivei tinkančia forma.

Standarto kreivę panaudokite IFN- γ koncentracijai (IU/ml) nustatyti kiekvienam ištestuotam plazmos mėginiui, naudodami kiekvieno mėginio OT reikšmę.

Šiems skaičiavimams gali būti panaudoti programinės įrangos paketai, gaunami su mikroplokštelių skaitytuvais, taip pat standartinės skaičiuoklės arba statistikos programos (pvz., „Microsoft® Excel®“). Tokiais programinės įrangos paketais rekomenduojame naudotis atliekant regresijos analizę, skaičiuojant standartų variacijos koeficientą (%VK) bei koreliacijos koeficientą (r) standarto kreivei.

Testo kokybės patikrinimas

Testo rezultatų teisingumas priklauso nuo teisingos standarto kreivės sudarymo. Todėl, prieš pradėdant aiškinti testo rezultatus, turi būti patikrinti iš standartų išvesti rezultatai.

ELISA galioja, kai:

- 1 standarto vidutinė OT reikšmė privalo būti $\geq 0,600$.
- 1 ir 2 standarto replikuotų OT reikšmių VK % turi būti $\leq 15\%$.
- 3 ir 4 standartui replikuotos OT reikšmės nuo atitinkamų vidutinių reikšmių turi nukrypti ne daugiau kaip 0,040 OT vienetų.
- Iš standartų vidutinių absorbuojamumo reikšmių apskaičiuotas koreliacijos koeficientas (r) turi būti $\geq 0,98$.

Jeigu šie kriterijai neišpildomi, testas negalioja ir turi būti pakartotas.

Nulinio standarto (žalio skiediklio) vidutinė OT reikšmė turi būti $\leq 0,150$. Jeigu vidutinė OT reikšmė yra $> 0,150$, rekomenduojama patikrinti plokštelių plovimo procesą.

Rezultatų aiškinimas

QuantiFERON-CMV testo rezultatai turi būti interpretuojami pagal šiuos kriterijus:

CMV minus nulinė (IU/ml)*	Mitogenas minus nulinė (IU/ml)	QF-CMV rezultatas	Ataskaita / aiškinimas
< 0,2	≥ 0,5	Neigiamas	Anti-CMV infekcija NĖRA galima
≥ 0,2	Bet koks	Teigiamas	Anti-CMV infekcija galima
< 0,2	< 0,5	Neaiškus [†]	Rezultatai CMV antigeno reakcijai neaiškūs

* Pozityvios IFN-γ CMV antigeno ir mitogeno reakcijos dažnai yra už mikroplokštelių skaitymo aparato matavimo ribų. Tai neturi įtakos kokybei.

[†] Galimų priežasčių ieškokite skyriuje „Problemų sprendimas“.

Apribojimai

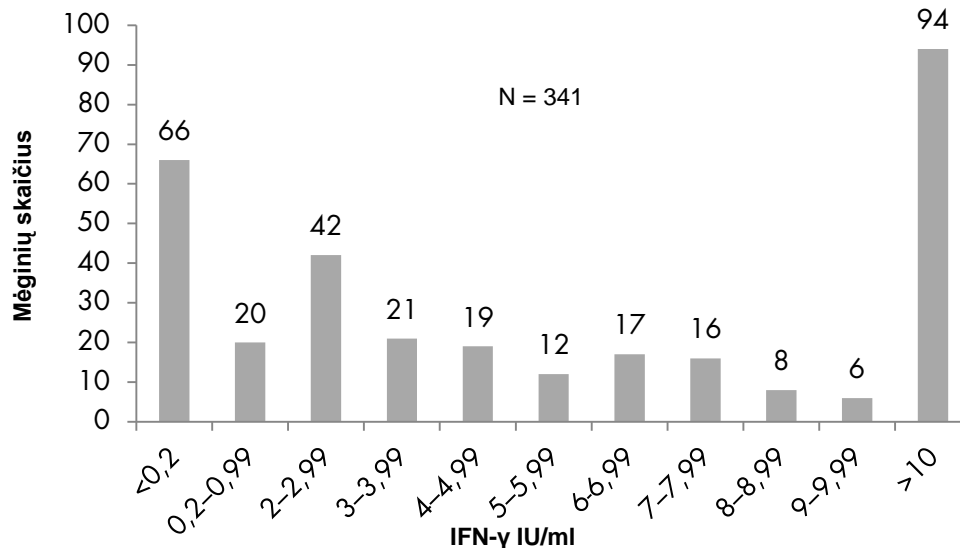
QuantiFERON-CMV testo rezultatai turi būti naudojami atsižvelgiant į kiekvieno asmens epidemiologinę istoriją, esamą būklę ir kitus diagnostinius vertinimus.

Nepatikimus ar neaiškius rezultatus galite gauti, nes:

- Nesilaikoma informaciniame lapelyje aprašytos procedūros.
- Per didelis IFN-γ lygis nulinės kontrolės mėgintuvėlyje.
- Ilgesnis nei 16 val. kraujo mėginio laikymas iki inkubavimo 37 °C temperatūroje.

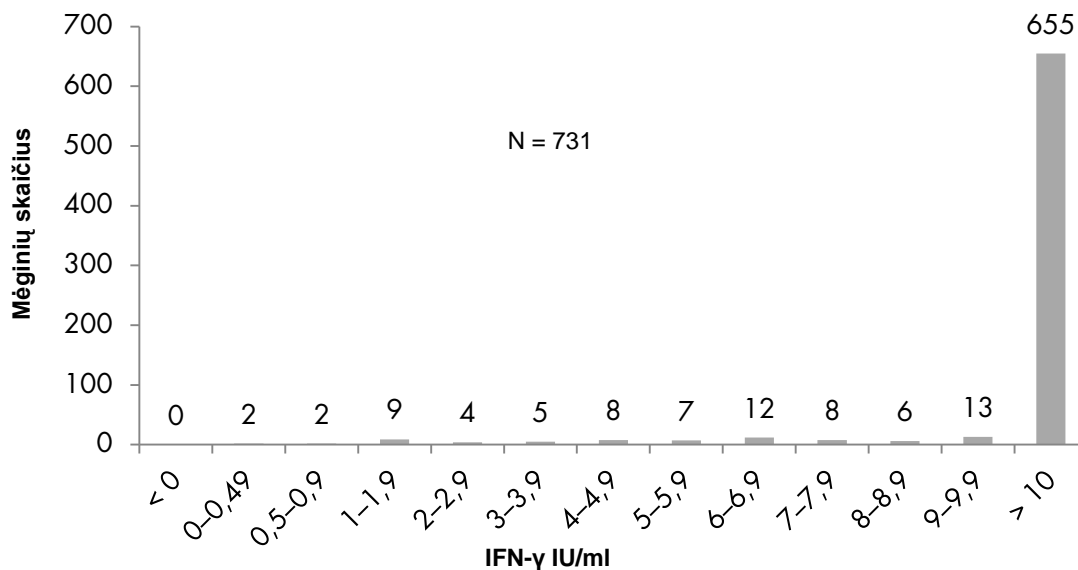
■ Tikėtinos reikšmės

Tikėtinos IFN- γ reikšmės, naudojant QuantiFERON-CMV, gautos tiriant 591 iš sveikų suaugusiųjų paimtą mėginį, 341 mėginį, paimtą iš turinčių serologiškai teigiamą CMV, ir 250, paimtų iš turinčių serologiškai neigiamą CMV. Tarp 250 suaugusiųjų neturinčių CMV infekcijos (serologiškai neigiamas CMV) 100 % tiriamųjų kraujo mėginiai parodė IFN- γ < 0,2 IU/ml reakcijas į CMV antigenus (minus nulinę). 2 paveikslėlyje pateikiamas 341 CMV infekciją turinčiųjų (nustatytą anti-CMV serologiniu testu (serologiškai teigiamas CMV) CMV antigeno mėgintuvėlio rezultatas (minus nulinę).



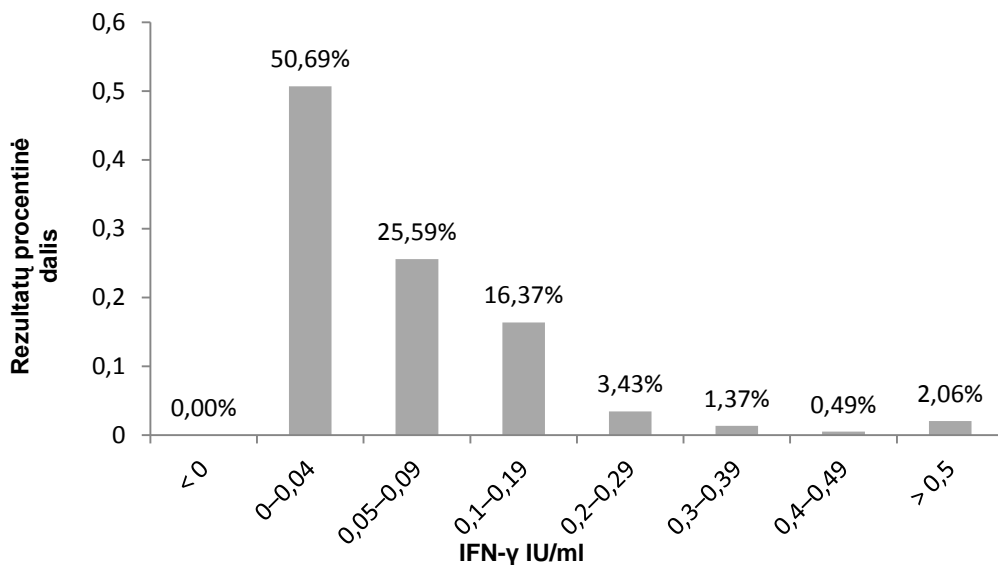
2 pav. CMV nulinės kontrolės IFN- γ reakcijos sveikuose asmenyse su serologiškai teigiamu rezultatu (n=341).

3 pav. pateikiami mitogeno (minus nulinis fonas) rezultatų, gautų iš 731 įprastų kraujo mėginių, kurie surinkti iš sveikų suaugusiųjų, pasiskirstymas neatsižvelgiant į žinomą CMV infekciją. Mažesnis nei 0,5 IU/ml mitogeno rezultatas (minus nulinis) rodo, kad tyrimas nepavyko arba asmens imunitetas yra slopinamas. Tiriant sveikus asmenis, į šią kategoriją patenka 2 iš 731.



3 pav. Mitogeno (minus nulinis fonas) IFN- γ reakcijų pasiskirstymas tiriant sveikus suaugusiuosius (n=731).

4 pav. pavaizduotos tikėtinos nulinio mėgintuvėlio reikšmės. Duomenys gauti iš 1020 plazmos mėginių, kurie paimti iš sveikų suaugusiųjų naudojant QuantiFERON-CMV ELISA metodą.



4 pav. Nulinių IFN-γ reakcijų pasiskirstymas (išreikštas procentais) tiriant sveikus suaugusiuosius (n=1020).

Efektivumo charakteristikos

Lyginamasis tyrimas

Aptikimo tyrimo slenkstis (prieš susergant CMV) naudojant QF-CMV sukurtas remiantis analize rezultatų, gautų iš sveikų tiriamų asmenų grupės (n=223), o QF-CMV rezultatai buvo palyginti su CMV serologiniais rezultatais. ROC analizė nustatė, kad 0,04 IU/ml tyrimo slenkstis (atėmus nulinę kontrolę) pateikė teigiamas ir neigiamas prognozuojamas QF-CMV reikšmes (sritis po kreive = 0,9679 [95 %CI = 0,9442 iki 0,9915, $p < 0,0001$), todėl gautas slenkstis, ties kuriuo šis tyrimas geriausiai atitiko naudojimo paskirtį tiriant sveikus asmenis.

Prognozuojamojo testavimo metu QF-CMV našumas buvo palygintas su SeraQuest CMV IgG serologinio testo našumu (Quest International). QF-CMV tyrimas parodė, tarp 95 % mėginių, paimtų iš sveikų tiriamųjų (294 iš 310), yra suderinami su prognozuojamu anti-HCMV serologiniu testu, nė vienas iš 149 serologiškai neigiamų donorų neturėjo teigiamo QF-CMV rezultato, o 145 iš 161 serologiškai teigiamų donorų turėjo teigiamą IFN-γ reakciją. Bendras teigiamų reakcijų suderinamumas buvo 90 %, o neigiama suderinamumo reikšmė buvo 100 %. 2 lentelėje pateikiamas QF-CMV tyrimo su sveikais savanoriais metu išmatuotas suderinamumo tarp IFN-γ reakcijų į CMV peptidus lygis, o šių tiriamųjų anti-CMV serologinė būseną, iširta pasitelkus SeraQuest CMV IgG serologinį testą.

2 lentelė. QuantiFERON-CMV testo ir CMV IgG serologinio testo suderinamumas, testus atliekant su sveikaisiais.

		CMV serologinis testas		Iš viso
		Teigiama	Neigiama	
QuantiFERON-CMV testas	Teigiama	145	0	145 (46,8 %)
	Neigiama	16	149	165 (53,2 %)
	Iš viso	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Tyrimo slenkstis

Šio testo rekomenduojamas klinikinio tyrimo slenkstis yra 0,2 IU/ml CMV antigeno mėgintuvėlyje (minus nulinė kontrolė), tačiau kitiems klinikiniams parametrams gali būti patvirtinti kiti slenksčiai. Priežastys kyla dėl pagrindinių imunologinių skirtumų tarp normalių tiriamų žmonių ir žmonių, kuriems, manoma, toks tyrimas būtų kliniškai naudingas – ypač žmonių, kurių imunitetas slopinamas ir dėl to jiems kyla rizika susirgti simptomine CMV infekcija ir (arba) liga. Į tokios didelės rizikos grupę patenkantiems asmenims QF-CMV tyrimo kliniškinis panaudojimas leidžia tiksliai nustatyti anti-CMV imuniteto lygį, nes imuniteto nebuvimas gali būti siejamas su CMV ligos atsiradimu (1–5, 7, 8, 11–16).

Klinikinės studijos

Nėra apibrėžto citomegalo viruso infekcijos patvirtinimo ar atmetimo standarto, todėl negalima praktiškai įvertinti QF-CMV jautrumo ir tikslumo. QF-CMV jautrumas ir tikslumas buvo apytiksliai nustatytas vertinant suderinamumo lygį tarp IFN- γ reakcijų į CMV peptidus. Įvertinta atlikus QF-CMV tyrimą su sveikais savanoriais ir CMV IgG serologiniu testu nustačius anti-CMV serologinę tiriamųjų būseną.

QF-CMV tyrimo tikslumas apytiksliai nustatytas įvertinant apgaulingai teigiamus rodiklius (QF-CMV teigiamas reakcijas) sveikų savanorių kraujo mėginiuose, kuriuose nebuvo ankstesnės CMV infekcijos buvimo įrodymų (CMV serologiškai neigiami asmenys). Jautrumas buvo apytiksliai nustatytas vertinant savanorių kraujo mėginius, kuriuose buvo ankstesnės CMV infekcijos buvimo įrodymų (CMV serologiškai teigiami asmenys). QF-CMV tyrimas naudoja daug CMV būdingų epitopių iš skirtingų CMV proteinų, tačiau po plataus klinikinio pritaikymo žmonėms, turintiems skirtingus HLA I klasės haplotipus, šių peptidų apimtis nėra 100 %. Tiriamųjų HLA haplotipai, tiriant juos pagal CMV serologinį testą, nebuvo žinomi, todėl tikimasi, kad nedidelė serologiškai teigiamų asmenų procentinė dalis turės neigiamą reakciją QF-CMV mėgintuvėliuose.

Tikslumas

Tiriant sveikų asmenų kraujo mėginius, kuriuose nebuvo ankstesnės CMV infekcijos įrodymų (CMV serologiškai teigiami asmenys (n=250), suderinamumo tarp IFN- γ reakcijų į CMV peptidus lygis, kuris išmatuotas pasitelkus QF-CMV ir anti-CMV serologinę informaciją, buvo 100 %.

Visuose kituose tikslumo vertinimuose, atliktuose su vientiso organo transplantantais (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), kraujo kūnelių kamieninių ląstelių transplantantais (7, 13) ir ŽIV infekuotaisiais (2), suderinamumo tarp IFN- γ reakcijų į CMV peptidus lygis, kuris išmatuotas pasitelkus QF-CMV tyrimą ir anti-CMV serologinę informaciją, buvo pastoviai 100 %.

Jautrumas

Tiriant sveikų asmenų kraujo mėginius, kuriuose buvo ankstesnės CMV infekcijos įrodymų (CMV serologiškai teigiami asmenys (n=341), suderinamumo tarp IFN-γ reakcijų į CMV peptidus lygis, kuris išmatuotas pasitelkus QF-CMV tyrimą ir anti-CMV serologinę informaciją, buvo 80,6 % (275 iš 341). Šio nesuderinamumo priežastys gali būti aukščiausio tyrimo slenksčio (0,2 IU/ml) naudojimas, apgaulingai teigiami CMV serologiniai rezultatai arba tiriamųjų reakcijos į tyrime naudotus CMV peptidus nebuvimas.

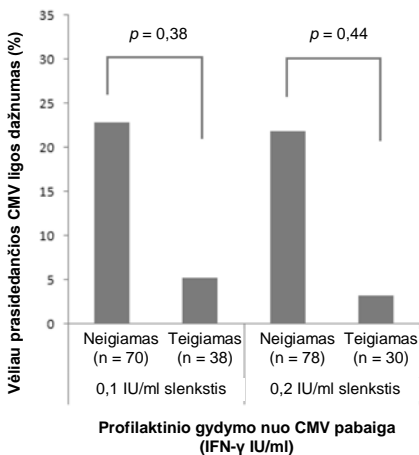
Jautrumo vertinimuose, atliktuose su vientiso organo transplantantais (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), kraujo kūnelių kamieninių ląstelių transplantantais (7, 13) ir ŽIV infekuotaisiais (2), suderinamumo tarp IFN-γ reakcijų į CMV peptidus lygis, kuris išmatuotas pasitelkus QF-CMV tyrimą ir anti-CMV serologinę informaciją, buvo šiek tiek žemesnis. Žemesnio suderinamumo lygio priežastis gali būti apgaulingai teigiami CMV serologiniai rezultatai, pacientų reakcijos į tyrime naudotus CMV peptidus nebuvimas arba teigiamų T ląstelių nebuvimas dėl imuniteto slopinimo.

Tyrimai, pabrėžiantys klinikinę naudą

Numatyta, kad tiek serologinis testas, tiek QF-CMV leidžia aptikti imunitetą CMV infekcijai. Ruošiantis organo persodinimui, serologinis testas yra plačiai naudojamas etape prieš transplantaciją siekiant nustatyti CMV komplikacijų recipientui po organo persodinimo riziką. Antra vertus, QF-CMV gali būti naudojamas vertinant organo recipiento imunitetą CMV infekcijai tiems pacientams, kurie rizikuoja užsikrėsti simptomine CMV infekcija ir (arba) susirgti CMV dėl imuniteto slopinimo (6, 9–11).

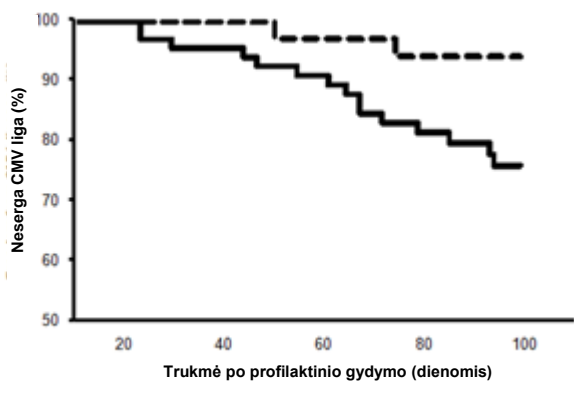
QuantIFERON-CMV tyrimo nauda aprašyta keliose išleistose klinikinėse studijose (1–5, 7, 8, 11–16).

Didelėje 108 recipientus, kuriems persodinti vientisi organai, nagrinėjusiose studijoje (5 pav.) nurodoma, kad profilaktiškai gydant anti-CMV pacientus, turinčius teigiamą QF-CMV rezultatą, vėliau prasidėjusios ligos lygis buvo gerokai žemesnis palyginti su pacientais, turinčiais neigiamą QF-CMV rezultatą (atitinkamai 5,3 % ir 22,9%, $p=0,044$, 5 pav.).



5 pav. Vėliau prasidėjusios CMV ligos lygis po profilaktinio gydymo pacientams, turintiems teigiamą ir neigiamą QuantIFERON-CMV rezultatą. Duomenys gauti iš Kumar ir kt. (4)

Be to, teigiamą QF-CMV rezultatą gavę pacientai ir pabaigę profilaktinį gydymą dažniau ir ilgiau nesusirgdavo CMV liga (6 pav.). Tai rodo, kad QF-CMV galima naudoti atpažįstant pacientus, kurie galbūt vėliau susirgs CMV liga.

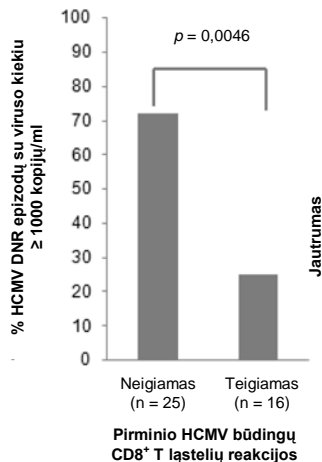


6 pav. CMV ligos išsivystymo laikas profilaktiškai gydant pacientams, turintiems teigiamą (punktyrinė linija) ir neigiamą QuantiFERON-CMV (vientisa linija) rezultatą. Duomenys gauti iš Kumar ir kt. (4)

Šis tyrimas taip pat parodė, kad organų persodinimo pacientų, turinčių aukščiausią užsikrėtimo CMV rizikos lygį (CMV serologiškai neigiami organų recipientai, organą gavę iš CMV serologiškai teigiamo donoro, tai yra D+/R-), teigiamas QF-CMV rezultatas rodo, kad yra 90 % galimybė, kad pacientas nesusirgs CMV po profilaktinio gydymo.

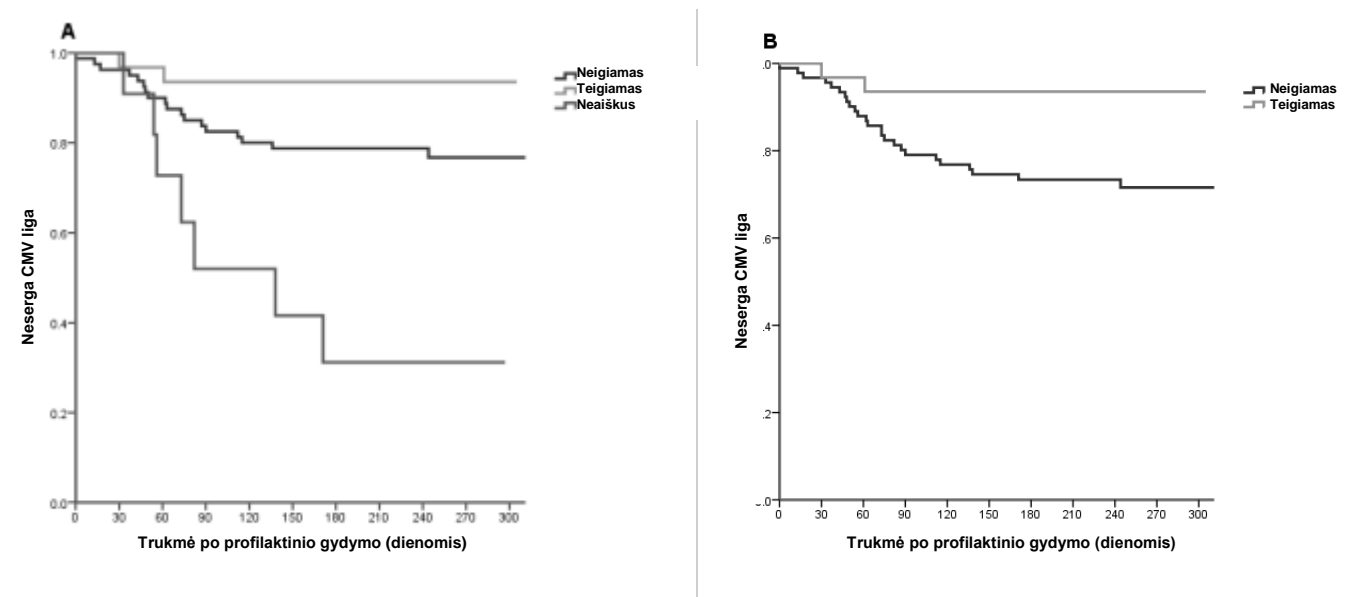
Tyrimė, kuriame ištirti 37 pacientai su persodintais vientisais organais (12), nustatant CMV būdingų CD8⁺ T ląstelių reakcijas (pasitelkus QF-CMV) ir stebint CMV viruso projekcijas kraujyje, prognozuojama, kad virusas savaime išnyks, o ne progresuos. Šiame tyrime 24 iš 26 pacientuose (92,3 %), turinčiuose teigiamą QF-CMV rezultatą, CMV virusas savaime išnyko, palyginti su 5 iš 11 pacientų (45,5 %), turinčių neigiamą QF-CMV rezultatą.

Tiriant 67 pacientus su persodintais plaučiais ir vertinant CMV viremijos epizodus laikotarpiu po transplantacijos (14), pastebėta, kad 18 iš 25 (72 %) CMV viremijos epizodai gauti tarp pacientų su neigiamu QF-CMV rezultatu, palyginti su 4 iš 16 (25 %) viremijos epizodais, gautais tarp pacientų su teigiamu QF-CMV rezultatu (Fisher testas, $p = 0,0046$, žr. 7 pav.).



7 pav. CMV būdingų CD8⁺ T- ląstelių reakcijų, nustatytų pagal QuantiFERON-CMV ir CMV viremijos vystymąsi, statistinė analizė (Fisher testas, $p = 0,0046$). Duomenys gauti iš Weseslindtner ir kt. (14).

Atlikus didelį kelis centrus apjungusį perspektyvų tyrimą, kuriame buvo tiriami 127 D+/R- vientiso organo recipientai (15), iš kurių visi gavo antivirusinį profilaktinį gydymą, nustatyta, kad praėjus 12 mėnesių po gydymo teigiamą QF-CMV tyrimo (naudojant 0,1 IU/ml slenkstį) rezultata turėję pacientai daug rečiau sirgo vėliau prasidėjusia liga, palyginti su neigiamu ir neaiškūs QF-CMV tyrimo rezultatų turėtojais (atitinkamai 6,4 %, 22,2 % ir 58,3 %, $p < 0,001$). Neaiškius rezultatus klasifikuojant kaip neigiamus, vėliau prasidedančios CMV ligos dažnumas buvo 6,4 % ir 26,8 %, $p = 0,024$ (žr. 8 pav.). Teigiamos ir neigiamos prognozuojamo QF-CMV tyrimo, skirto apsaugoti nuo CMV ligos, reikšmės atitinkamai buvo 0,90 (95 % CI 0,74–0,98) ir 0,27 (95 % CI 0,18–0,37). Teigiamas QuantiFERON-CMV rezultatas profilaktiškai gydant rodo, kad yra 90 % tikimybė, jog pacientas nesusirgs CMV. Šis tyrimas nustatė, kad QF-CMV gali būti naudingas prognozuojant, ar paciento rizika susirgti CMV profilaktiškai gydant yra maža, vidutinė ar didelė.



8 pav. Kaplan ir Meier sukurta CMV ligos dažnumo kreivė pagal QF-CMV tyrimo rezultatus.

A Teigiami, neigiami ir neaiškūs QF-CMV rezultatai („log rank“ testas, $p < 0,001$).

B Teigiami ir neigiami rezultatai, kai neaiškūs rezultatai taip pat buvo laikomi teigiamais („log rank“ testas, $p = 0,024$).

Prognozuojamajame tyrime, kuriame ištirti 55 vientiso organo recipientai (16) ir išanalizuotas paciento prieš transplantaciją buvusių QF-CMV rezultatų ir paciento po transplantacijos CMV replikacijos epizodų ryšys, nustatyta, kad dažniau CMV replikaciją po transplantacijos patirdavo R(+) recipientai, kurių QF-CMV tyrimas prieš transplantaciją rodė neigiamą rezultatą (7 iš 14 arba 50 %), palyginti su R(+) recipientais, kurių QF-CMV tyrimo rezultatas buvo teigiamas (4 iš 30 arba 13,3 %).

Tyrimo metu nustatyta, kad recipientai, kurių QF-CMV rezultatas prieš transplantaciją buvo neigiamas ir kurie organą gavo iš CMV serologiškai teigiamo donoro, patyrė dešimteriopai didesnę CMV replikacijos riziką, palyginti su recipientais, kurių QF-CMV rezultatas prieš transplantaciją buvo teigiamas (koreguotas šansų santykis 10,49, 95 % CI 1,88–58,46). Nustatyta, kad QF-CMV tyrimas prieš transplantaciją gali būti naudingas prognozuojant CMV replikacijos riziką po persodinimo ir todėl reikia individualiai vertinti į CMV infekcijos valdymą po vientiso organo persodinimo.

Šiuo metu visame pasaulyje yra atlikti arba atliekami keli kiti tyrimai su recipientais dėl CMV būdingų CD8⁺ T ląstelių reakcijų aptikimo pasitelkus QF-CMV (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13).

Tarptautinės gairės dėl citomegalo viruso valdymo vientiso organo transplantantuose

CMV būdingo imuniteto stebėjimo svarba pripažinta ir aprašyta dokumente „Tarptautinės gairėse dėl citomegalo viruso valdymo vientiso organo transplantantuose“ (6). Šiose tarptautinėse gairėse, kurias sukūrė CMV ir vientiso organo transplantacijos specialistai, o surinko Transplantacijos bendruomenės infekcinių ligų skyrius, pateikiami įrodymai ir specialistų žiniomis pagrįstos gairės apie CMV valdymą, įskaitant diagnostiką, imunologiją, prevenciją ir gydymą.

Šiose gairėse yra dokumentas „CMV būdingų T ląstelių reakcijų stebėjimas gali padėti prognozuoti recipiento CMV ligos riziką laikotarpiu po transplantacijos, padėti vykdyti profilaktinį gydymą ir išankstinę terapiją“ (6).

Be to, gairėse taip pat yra rekomendacijos, kaip vykdyti idealų imuninio stebėjimo tyrimą, kuris apima:

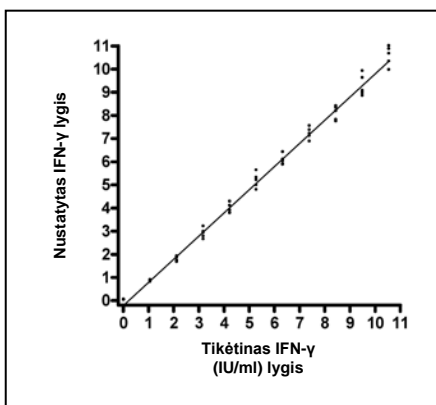
- Galimybę įvertinti persodinto organo recipiento CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelių kiekį ir funkciją
- Galimybę išmatuoti IFN- γ .
- Paprastą, nebrangų atlikimą ir atgaminamumą.
- Trumpą apdorojimo laiką.
- Paprastą mėginių į atitinkamas specializuotas laboratorijas siuntimą.

Iš esmės QF-CMV tyrimas atitinka visus šiose gairėse nurodytus kriterijus ir pateikiamas tik kaip standartizuotas, imuniteto stebėjimo tyrimas, leidžiantis nustatyti CMV būdingą IFN- γ .

Tyrimo atlikimo charakteristikos

IFN- γ koncentracijos matavimas QF-CMV ELISA metodu pateikiamas kaip tiesė nuo nulio iki 10 IU/ml (9 pav.). Tiesiškumo tyrimas atliktas ant ELISA plokštės atsitiktine tvarka sudėjus 11 žinomos IFN- γ koncentracijos plazmos mėginių (5 dublikatus).

QF-CMV ELISA metodas nepateikia jokių prozono efekto įrodymų, kai IFN- γ koncentracija yra iki 100 000 IU/ml.



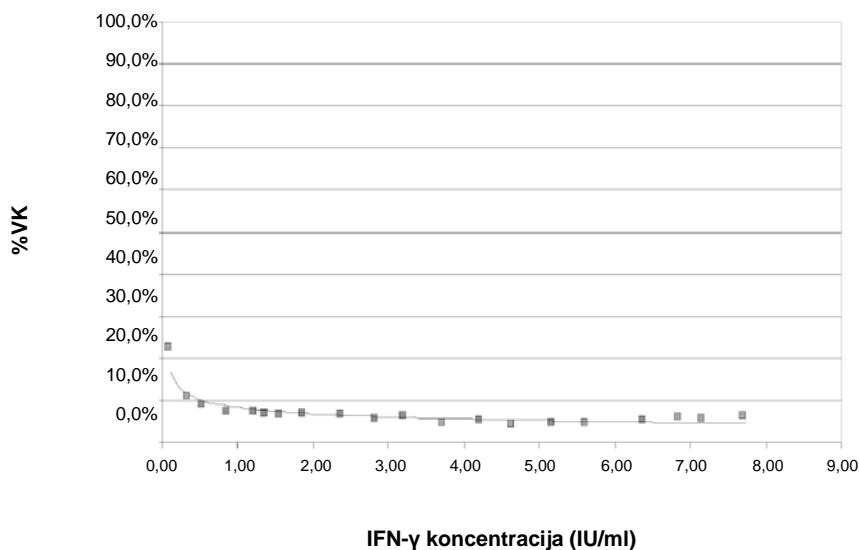
9 pav. QF-CMV ELISA tiesinis profilis nustatytas ištyrus 11 žinomos IFN- γ koncentracijos plazmos mėginių (5 dublikatus). Tiesinė regresinė linija turi $1,002 \pm 0,011$ nuožulnų kilimą ir 0,99 koreliacijos koeficientą.

Vidiniai tyrimo netikslumai (%VK), atliekant QF-CMV ELISA tyrimą, nustatyti testuojant 20 plazmos mėginių su įvairiomis IFN- γ koncentracijomis 3 dublikatuose, 3 operatoriams tyrimą atliekant 3 laboratorijose, per 3 paeiliui einančias dienas. Taigi kiekvienas mėginys buvo tirtas 27 kartus vykdant 9 nepriklausomus tyrimo seansus. Vienas mėginys buvo nulinė kontrolė ir IFN- γ koncentracija buvo 0,08 (95 % CI 0,07–0,09) IU/ml. Likusiuose 19 plazmos mėginių koncentracija svyravo nuo 0,33 (0,31–0,34) iki 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

Vykdyto ir vidinis tyrimo netikslumas apskaičiuotas išvedus %VK vidurkį kiekviename plazmos mėginyje su IFN- γ (mėginį imant iš kiekvienos plokštės (n=9), o %VK svyravo nuo 4,1 iki 9,1. Vykdyto %VK vidurkis ($\pm 95\%$ CI) buvo $6,6\% \pm 0,6\%$. Nulinio mėgintuvėlio IFN- γ plazmos vidurkis buvo 14,1 %VK.

Bendras arba vidinis tyrimo netikslumas nustatytas lyginant apskaičiuotą 27 kiekvieno plazmos mėginio IFN- γ koncentraciją. Intervalas siekė nuo 6,6 iki 12,3 %VK. Bendras %VK vidurkis ($\pm 95\%$ CI) buvo $8,7\% \pm 0,7\%$. Nulinio mėgintuvėlio IFN- γ plazmos rezultatas buvo 26,1 %VK. Šis svyravimo lygmuo yra tikėtinas, nes apskaičiuota IFN- γ koncentracija yra maža ir dėl to svyravimai bus didesni, nei esant didesnei koncentracijai.

QF-CMV ELISA tikslumo profilis pateiktas 9 pav. Jame rodoma, kad didėjant IFN- γ koncentracijai netikslumas nedidėja.



9 pav. QF-CMV ELISA tikslumo profilis nustatytas ištyrus 20 plazmos mėginių trimis egzemplioriais, 3 operatoriams tyrimą atliekant 3 laboratorijose, per 3 ne paeiliui einančias dienas. Kryptinė linija yra gauta iš mažiausių kvadratų metodo skaičiavimo.

Tyrimas atliktas siekiant QF-CMV tyrimo atgaminamumo naudojant kraujo mėginius iš 8 tiriamųjų su nežinoma CMV būseną. Kiekvieno tiriamojo kraujo mėginiai buvo surenkami į tris QF-CMV mėgintuvėlių rinkinius (3 x nulinis, 3 x CMV ir 3 x mitogeno mėgintuvėlis). Tada trys mėgintuvėlių rinkiniai buvo inkubuojami trijose skirtingose vietose (kiekvienoje vietoje po vieną nulinį, CMV ir mitogeno mėgintuvėlį), kaip nurodyta informaciniame lapelyje. Po 16–24 val. inkubacinio laikotarpio, mėgintuvėliai centrifuguoti ir paimta plazma.

ELISA metodas pritaikytas tris kartus kiekvienoje iš trijų vietų, gauta po tris tiriamojo QF-CMV rezultatus kiekvienoje vietoje (iš viso 9 rezultatai iš visų vietų). Visose vietose dirbo skirtingi operatoriai. Tyrimui naudotos plokštės nebūtinai buvo iš tos pačios partijos, tačiau visų galiojimo laikas buvo tinkamas.

Atsižvelgiant tiek į diagnostinę būseną (teigiamą, neigiamą ar neaiškų rezultatą) ir skaitinę reikšmę, atgaminamumas nustatytas kiekviename kraujo mėginyje. Skaitinė atgaminamumo reikšmė suskaičiuota tik teigiamuose mėginiuose (išreikšta procentais %VK), nes IFN- γ lygis teigiamuose mėginiuose buvo per žemas, kad būtų galima pateikti reikšmingą tikslumo įvertinimą.

Bendrai tariant, diagnostinis atgaminamumas buvo 100 %, jei atlikus tyrimą su 8 savanoriais gauta QF-CMV diagnostinė būseną visose vietose ir nebuvo jokių neaiškių rezultatų. Teigiamų mėginių atgaminamumas priimtinas tiek vietoje, tiek tarp vietų. Vidutinis kiekvienos tyrimo vietos %VK buvo 4,5 % (1 vieta), 5,9 % (2 vieta) ir 7,3 % (3 vieta). Bendrai tariant, %VK tarp vietų buvo 5,9 % tiriant visus 5 teigiamus mėginius. Mažesnė nei 10 % variacijos koeficiento procentinė reikšmė laikoma puikiu rezultatu.

Techninė informacija

Neaiškūs rezultatai

Neaiškūs rezultatai gali būti susiję su tiriamo asmens imuninės sistemos būkle, tačiau jie taip pat gali būti susiję su šiais techniniais faktoriais:

- Ilgesnis nei 16 val. kraujo mėginio laikymas iki inkubavimo 37 °C temperatūroje.
- Kraujo mėginių laikymas kitoje temperatūroje nei rekomenduojama (17–27 °C).
- Nepakankamas kraujo surinkimo mėgintuvėlių turinio maišymas.

Esant įtarimui, kad paimant kraują arba dirbant su kraujo mėginiais buvo techninių problemų, visas QF-CMV tyrimas turėtų būti pakartotas su nauju kraujo mėginiu. Stimuliuotų plazmos mėginių ELISA testas gali būti pakartotas, jeigu įtariama, kad buvo ELISA metodo procedūrinių nukrypimų. Neaiškūs rezultatai, gaunami dėl žemų mitogeno reikšmių, pakartojus testą turėtų nepasikeisti, išskyrus jei atliekant ELISA testą buvo padaryta klaida.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Norėdami gauti daugiau informacijos žr. techninę informaciją, pateiktą www.QuantiFERON.com. Norėdami susisiekti, žr. 27 psl. arba galinį viršelį.

ELISA trikčių šalinimas

Žema standartų optinio tankio reikšmė

Galima priežastis	Sprendimas
a) Standarto skiedinio ruošimo klaida	Komplekto standarto skiedinius paruoškite tiksliai laikydamiesi pakuotės informacinio lapelio nurodymų.
b) Klaida naudojantis pipete	Patikrinkite, ar pipetės yra kalibruotos ir naudojamos tiksliai pagal gamintojo nurodymus.
c) Per žema inkubacijos temperatūra	ELISA inkubacija turėtų vykti kambario temperatūroje (17–27 °C).
d) Per trumpos inkubacijos laikas	Plokštelės su konjugatu, standartais ir mėginiais inkubacijos trukmė turėtų būti 120 ± 5 min. Fermento substrato tirpalas ant plokštelės yra inkubuojamas 30 minučių.
e) Naudojamas netinkamas plokštelių skaitytuvo filtras	Plokštelės rezultatai turėtų būti skaitomi prie 450 nm naudojant 620–650 nm referencijos filtrą.
f) Per šalti reagentai	Visi reagentai (neįskaitant konjugato 100x koncentrato) prieš pradėdami tyrimą turi būti kambario temperatūros. Ją pasiekti trunka apie 1 valandą.
g) Pasibaigęs komplekto / komplekto sudėtinųjų dalių galiojimo laikas	Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100x koncentratas buvo naudoti 3 mėnesių laikotarpyje nuo atkūrimo.

Nespecifinės spalvos atsiradimas / didelis fonas

Galima priežastis	Sprendimas
a) Nepakankamai švariai išplautos plokštelės	Plokštelę plaukite mažiausiai 6 kartus po 400 µl plovimo buferio į duobutę. Atsižvelgiant į naudojamą plovimo aparatą, gali prireikti daugiau nei 6 plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų bent 5 sekundes pamirkyti.
b) Per aukšta inkubacijos temperatūra	ELISA inkubacija turėtų vykti kambario temperatūroje (17–27 °C).
c) Pasibaigęs komplekto / komplekto sudėtinųjų dalių galiojimo laikas	Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100x koncentratas buvo naudoti trijų mėnesių laikotarpyje nuo atkūrimo.
d) Fermento substrato tirpalas yra užterštas	Išmeskite substratą, jeigu nusidažo mėlynai. Įsitikinkite, kad naudojamos švarios reagentų talpyklos.
e) Plazmos maišymas centrifugos mėgintuvėliuose prieš paimant plazmos mėginį	Užtikrinkite, kad plazma virš gelio dangtelio būtų paimta atsargiai (pipete netraukinėjant aukštyn ir žemyn ir nepažeidžiant medžiagos ant gelio paviršiaus).

Literatūra

1. Walker, S. ir kt. (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. ir kt. (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. ir kt. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. Fleming, T. ir kt. (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. ir kt. (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. ir kt. (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. ir kt. (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. ir kt. (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. ir kt. (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. ir kt. (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).

Techninis klientų aptarnavimas

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

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias.

Sutrumpinta testo procedūra

1 etapas. Kraujo mėginio inkubavimas

1. Kraujo surinkimo mėgintuvėliu iš paciento paimkite kraujo mėginį ir 10 kartų stipriai pakratydami kruopščiai sumaišykite turinį, kad mėgintuvėlio sienelių vidinė pusė būtų visiškai padengta krauju, su kuriuo susimaišytų antigenai, esantys ant mėgintuvėlio vidinių sienelių.



2. Inkubuokite mėgintuvėlius vertikaliaje padėtyje 16–24 val. $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.



3. Po inkubavimo esant 2000–3000 RCF (g) mėgintuvėlius 15 minučių centrifuguokite, kad plazma atsiskirtų nuo raudonųjų kraujo ląstelių.



4. Po centrifugavimo ir prieš plazmos paėmimą kiekvienu atveju venkite mėginius traukti pipete aukštyn ir žemyn arba plazmą sumaišyti. Visuomet dirbkite kruopščiai, kad nesujudintumėte medžiagos prie gelio paviršiaus.



2 etapas. IFN- γ ELISA

1. ELISA komponentus, neįskaitant konjugato 100x koncentrato, palikite mažiausiai 60 minučių pastovėti, kad susilygintų su kambario temperatūra.

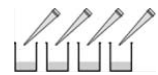


2. Komplekto standartą atkurkite naudodami 8,0 IU/ml distiliuoto arba dejonizuoto vandens. Pagaminkite keturis (4) standarto skiedinius.

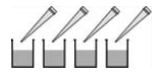


3. Naudodami distiliuotą arba dejonizuotą vandenį atkurkite liofilizuotą konjugato 100x koncentratą.

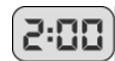
4. Pagaminkite darbui reikiamo stiprumo konjugatą su žaliu skiedikliu ir į visas duobutes įpilkite po 50 μ l.



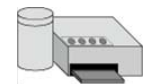
5. Į atitinkamas duobutes įpilkite po 50 μ l plazmos mėginio ir 50 μ l standartų. Išmaišykite naudodami kratytuvą.



6. 120 minučių inkubuokite kambario temperatūroje.



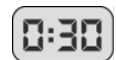
7. Duobutes plaukite mažiausiai 6 kartus įpildami po 400 μ l plovimo buferio į duobutę.



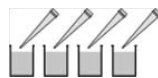
8. Į kiekvieną duobutę įpilkite po 100 μ l fermento substrato tirpalo. Išmaišykite naudodami kratytuvą.



9. 30 minučių inkubuokite kambario temperatūroje.



10. Į kiekvieną duobutę įpilkite po 50 μ l fermento stabdymo tirpalo. Išmaišykite naudodami kratytuvą.



11. Matuokite rezultatus prie 450 nm naudodami 620–650 nm referencijos filtrą.



12. Analizuokite rezultatus.



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

QuantiFERON-CMV ELISA komplekto ribotoji licencinė sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, esančiuose www.qiagen.com. QIAGEN vartotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis komplektas ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Komplektui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Komplekto pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo komplektu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Naujausios licencijos sąlygos pateiktos adresu www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, QIAGEN įmonė. Visos teisės saugomos.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

