

Οκτώβριος 2019

# Ένθετο συσκευασίας QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV ELISA



Εξέταση IFN- $\gamma$  σε ολικό αίμα για τη μέτρηση της απάντησης σε πεπτιδικά αντιγόνα του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού



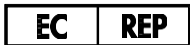
Για in vitro διαγνωστική χρήση



0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,  
MD 20874, ΗΠΑ +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANIA

1075110 Αναθ. 06



[www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)



# Περιεχόμενα

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Προβλεπόμενη χρήση .....                                                                       | 5  |
| Σύνοψη και επεξήγηση .....                                                                     | 5  |
| Αρχή της διαδικασίας.....                                                                      | 6  |
| Χρόνος που απαιτείται για την εκτέλεση του προσδιορισμού.....                                  | 7  |
| Υλικά που παρέχονται .....                                                                     | 8  |
| Περιεχόμενα του κιτ.....                                                                       | 8  |
| Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται .....                                                | 9  |
| Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....                                                           | 9  |
| Πληροφορίες για την ασφάλεια .....                                                             | 11 |
| Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων .....                                                      | 12 |
| Συλλογή και προετοιμασία δοκιμών.....                                                          | 13 |
| Διαδικασία .....                                                                               | 16 |
| Στάδιο 1: Επώαση αίματος και συλλογή πλάσματος.....                                            | 16 |
| Στάδιο 2: QuantiFERON-CMV ELISA για ανθρώπινη IFN- $\gamma$ .....                              | 17 |
| Υπολογισμοί και ερμηνεία δοκιμασιών .....                                                      | 22 |
| Παραγωγή της πρότυπης καμπύλης (εάν δεν χρησιμοποιείται το λογισμικό<br>ανάλυσης QF-CMV) ..... | 22 |
| Έλεγχος ποιότητας δοκιμασίας .....                                                             | 23 |
| Ερμηνεία αποτελεσμάτων .....                                                                   | 25 |
| Περιορισμοί .....                                                                              | 26 |
| Αναμενόμενες τιμές .....                                                                       | 26 |
| Χαρακτηριστικά επιδόσεων .....                                                                 | 29 |
| Κλινική απόδοση .....                                                                          | 29 |
| Κατώφλιο μεθόδου .....                                                                         | 30 |

---

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Κλινικές μελέτες.....                                                                                                                | 30 |
| Ειδικότητα .....                                                                                                                     | 31 |
| Ευαισθησία.....                                                                                                                      | 31 |
| Μελέτες που επισημαίνουν την κλινική χρησιμότητα.....                                                                                | 32 |
| Διεθνείς ομόφωνες κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την αντιμετώπιση του<br>κυτταρομεγαλοϊού στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ..... | 37 |
| Χαρακτηριστικά απόδοσης προσδιορισμού.....                                                                                           | 38 |
| Τεχνικές πληροφορίες .....                                                                                                           | 41 |
| Απροσδιόριστα αποτελέσματα .....                                                                                                     | 41 |
| Θρομβωμένα δείγματα πλάσματος .....                                                                                                  | 41 |
| Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....                                                                                                | 42 |
| Βιβλιογραφία .....                                                                                                                   | 44 |
| Σύμβολα .....                                                                                                                        | 46 |
| Στοιχεία επικοινωνίας .....                                                                                                          | 47 |
| Συνοπτική διαδικασία ανάλυσης ELISA.....                                                                                             | 48 |
| Στάδιο 1: Επώαση αίματος.....                                                                                                        | 48 |
| Στάδιο 2: ΑΝΑΛΥΣΗ ELISA ΓΙΑ ΤΗΝ IFN-γ .....                                                                                          | 48 |
| Ιστορικό αναθεώρησης εγχειριδίου.....                                                                                                | 51 |

# Προβλεπόμενη χρήση

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

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

## Σύνοψη και επεξήγηση

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

Η ανάλυση QF-CMV είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της απάντησης CMI σε πεπτιδικά αντιγόνα που μιμούνται τις πρωτεΐνες του CMV. Τα πεπτίδια CMV έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να στοχεύουν τα Τ κύτταρα CD8<sup>+</sup>, συμπεριλαμβανομένων των απλοτύπων HLA τάξης Ι Α1, Α2, Α3, Α11, Α23, Α24, Α26, Β7, Β8, Β27, Β35, Β40, Β41, Β44, Β51, Β52, Β57, Β58, Β60 και Cw6 (Α30, Β13), οι οποίοι καλύπτουν > 98% του ανθρώπινου πληθυσμού. Το αίμα των ατόμων με μόλυνση CMV συνήθως περιέχει λεμφοκύτταρα CD8<sup>+</sup> που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα αυτά. Αυτή η διαδικασία αναγνώρισης περιλαμβάνει την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης IFN-γ. Η ανίχνευση και ο επακόλουθος ποσοτικός προσδιορισμός της IFN-γ αποτελούν τη βάση για αυτή τη δοκιμασία.

## Αρχή της διαδικασίας

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

Το σωληνάριο μιτογόνου χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας στην ανάλυση QF-CMV. Η χρήση του επιβάλλεται ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν αμφιβολίες ως προς την κατάσταση ανοσίας του ατόμου. Το σωληνάριο μιτογόνου μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως μάρτυρας για την ορθότητα των χειρισμών και της επώασης του αίματος.

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

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

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

Ένα δείγμα θεωρείται αντιδραστικό για την απάντηση IFN-γ όταν το σωληνάριο αντιγόνου CMV δίνει αποτέλεσμα σημαντικά μεγαλύτερο από την τιμή IFN-γ IU/ml του μηδενικού μάρτυρα. Το διεγερμένο με μιτογόνο δείγμα πλάσματος χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας IFN-γ για κάθε εξεταζόμενο δείγμα. Οι χαμηλές απαντήσεις στο μιτογόνο συνιστούν απροσδιόριστο αποτέλεσμα όταν το δείγμα αίματος παρουσιάζει επίσης μη αντιδραστική απάντηση στα αντιγόνα CMV. Τέτοιος συνδυασμός αποτελεσμάτων μπορεί να προκύψει εάν υπάρχουν ανεπαρκή λεμφοκύτταρα, μειωμένη λεμφοκυτταρική δραστηριότητα λόγω ακατάλληλου χειρισμού του δείγματος, λανθασμένη πλήρωση/ανάμειξη του σωληναρίου μιτογόνου, ή αδυναμία των λεμφοκυττάρων του ασθενούς να παραγάγουν IFN-γ, όπως συμβαίνει π.χ. στους πρόσφατα μεταμοσχευμένους ασθενείς. Το μηδενικό δείγμα χρησιμεύει στη διόρθωση των αποτελεσμάτων για το υπόβαθρο IFN-γ (μη ειδική παραγωγή) στα δείγματα αίματος. Το επίπεδο IFN-γ στο μηδενικό σωληνάριο αφαιρείται από το επίπεδο IFN-γ του σωληναρίου αντιγόνου CMV και του σωληναρίου μιτογόνου (βλ. «Ερμηνεία αποτελεσμάτων» στη σελ. 25 αυτού του ενθέτου συσκευασίας, για μια περιγραφή του τρόπου ερμηνείας των αποτελεσμάτων της ανάλυσης QF-CMV).

## Χρόνος που απαιτείται για την εκτέλεση του προσδιορισμού

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

Επώαση σωληναρίων αίματος στους

37 °C:

16–24 ώρες

ELISA:

Περίπου 3 ώρες για μία πλάκα ELISA

Λιγότερο από 1 ώρα εργασίας

Υπολογίστε άλλα 10–15 λεπτά για κάθε επιπλέον πλάκα

# Υλικά που παρέχονται

## Περιεχόμενα του kit

| Σωληνάρια συλλογής αίματος (συσκευασία για έναν ασθενή)   |             |
|-----------------------------------------------------------|-------------|
| Αρ. καταλόγου                                             | 0192-0301   |
| Αριθμός παρασκευασμάτων                                   | 1           |
| Μηδενικός μάρτυρας QuantiFERON Nil Control (γκρίζο πώμα)  | 1 σωληνάριο |
| Αντιγόνο QuantiFERON CMV Antigen (μπλε πώμα)              | 1 σωληνάριο |
| Μάρτυρας μιτογόνου QuantiFERON Mitogen Control (μωβ πώμα) | 1 σωληνάριο |
| Ένθετο συσκευασίας σωληναρίων συλλογής αίματος QF-CMV     | 1           |

| QuantiFERON-CMV ELISA                                                                                                         | Kit ELISA 2 πλακών                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Αρ. καταλόγου                                                                                                                 | 0350-0201                                       |
| Σειρές μικροπλάκας (12 × 8 βυθίσματα) επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της ανθρώπινης IFN-γ                | 2 σετ με 12 σειρές μικροπλάκας των 8 βυθισμάτων |
| Πρότυπο ανθρώπινης IFN-γ, λυοφιλοποιημένο (περιέχει ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IFN-γ, καζεΐνη βοοειδούς, θιμεροσάλη 0,01% κ.ό.) | 1 φιαλίδιο (8 IU/ml μετά την ανασύσταση)        |
| Green Diluent (Πράσινο αραιωτικό) (περιέχει καζεΐνη βοοειδούς, φυσιολογικό ορό ποντικού, θιμεροσάλη 0,01% κ.ό.)               | 1 x 30 ml                                       |
| Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x, λυόφιλο (αντίσωμα ποντικού κατά της ανθρώπινης IFN-γ-HRP, περιέχει θιμεροσάλη 0,01% κ.ό.) | 1 x 0,3 ml                                      |
| Wash Buffer 20x Concentrate (Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 20x) (pH 7,2, περιέχει ProClin® 300 0,05% κ.ό.)         | 1 x 100 ml                                      |
| Διάλυμα υποστρώματος ενζύμου (περιέχει H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3',5,5' τετραμεθυλοβενζιδίνη)                        | 1 x 30 ml                                       |
| Enzyme Stopping Solution (Διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης) (περιέχει H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M)*             | 1 x 15 ml                                       |
| Ένθετο συσκευασίας QF-CMV ELISA                                                                                               | 1                                               |

\* Περιέχει θειικό οξύ. Βλ. προφυλάξεις στη σελ. 9.



# Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

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

## Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (safety data sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στον ιστότοπο **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**, όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα SDS για κάθε κιτ της QIAGEN®, καθώς και για το περιεχόμενό του.

ΠΡΟΣΟΧΗ



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

Οι παρακάτω δηλώσεις επικινδυνότητας και προφυλάξεων αφορούν τα συστατικά του kit QuantiFERON-CMV ELISA.

#### QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Περιέχει: θειικό οξύ. Προειδοποίηση! Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

#### QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Προειδοποίηση! Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

#### QuantiFERON Green Diluent



Περιέχει: 5-υδροξυ-1-(4-σουλφοφαινυλο)-4-(4-σουλφοφαινυλαζω)πυραζολο-3-καρβοξυλικό τρινάτριο. Περιέχει: ταρτραζίνη. Προειδοποίηση! Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

#### QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Περιέχει: ProClin 300. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Αποφύγετε την ελευθέρωσή του στο περιβάλλον.

## Πληροφορίες για την ασφάλεια

### Περαιτέρω πληροφορίες

- Οι αποκλίσεις από τις οδηγίες στο ένθετο συσκευασίας της ανάλυσης QF-CMV μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα. Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες πριν από τη χρήση.
- Μη χρησιμοποιήσετε το κιτ εάν κάποιο φιαλίδιο αντιδραστήριου παρουσιάζει ενδείξεις ζημιάς ή διαρροής πριν από τη χρήση.
- **Σημαντικό:** Επιθεωρήστε τα φιαλίδια πριν από τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε φιαλίδια συζευγμένου μορίου ή προτύπου IFN- $\gamma$  με ενδείξεις ζημιάς ή εάν το σφράγισμα από καουτσούκ έχει παραβιαστεί. Μην πιάνετε σπασμένα φιαλίδια. Λάβετε τις απαραίτητες προφυλάξεις για την ασφαλή απόρριψη των φιαλιδίων.  
**Σύσταση:** Χρησιμοποιήστε εργαλείο αποσφράγισης για να ανοίξετε τα φιαλίδια Συζευγμένου μορίου ή Προτύπου IFN- $\gamma$ , ώστε να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο τραυματισμού από το μεταλλικό πρεσαριστό κάλυμμα.
- Μην αναμειγνύετε και μη χρησιμοποιείτε σειρές μικροπλάκας, πρότυπο ανθρώπινης IFN- $\gamma$ , πράσινο αραιωτικό ή συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100 $\times$  από κιτ QF-CMV διαφορετικών παρτίδων. Για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 20 $\times$ , διάλυμα υποστρώματος ενζύμου και διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης), μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαλύματα από άλλα κιτ εφόσον δεν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης και εφόσον καταγραφούν τα στοιχεία των παρτίδων.
- Απορρίψτε τα αχρησιμοποιήτα αντιδραστήρια και τα βιολογικά δείγματα όπως ορίζουν οι τοπικοί, οι εθνικοί και οι ομοσπονδιακοί κανονισμοί.
- Μη χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV και τα κιτ QF-CMV ELISA μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Βεβαιωθείτε ότι ο εργαστηριακός εξοπλισμός, όπως οι συσκευές έκπλυσης και ανάγνωσης πλακών, έχει βαθμονομηθεί και επικυρωθεί για χρήση.

# Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

## Σωληνάρια συλλογής αίματος

- Αποθηκεύστε τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV σε θερμοκρασία 4–25 °C.
- Κατά τη στιγμή της πλήρωσης με αίμα, τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία μεταξύ 17–25 °C.
- Η μέγιστη διάρκεια ζωής των σωληναρίων συλλογής αίματος QF-CMV φθάνει τους 15 μήνες από την ημερομηνία παραγωγής, εφόσον φυλάσσονται στους 4–25 °C.

## Αντιδραστήρια kit ELISA

- Φυλάσσετε το kit σε θερμοκρασία 2–8 °C.
- Προστατεύετε διαρκώς το διάλυμα υποστρώματος ενζύμου από το άμεσο ηλιακό φως.

## Ανασυσταθέντα και αχρησιμοποίητα αντιδραστήρια

Για οδηγίες σχετικά με την ανασύσταση των αντιδραστηρίων, ανατρέξτε στην ενότητα «Στάδιο 2: QuantiFERON-CMV ELISA για ανθρώπινη IFN- $\gamma$ » (βήματα 3 και 5 στις σελίδες 17 και 19).

- Το ανασυσταθέν πρότυπο ανθρώπινης IFN- $\gamma$  μπορεί να διατηρηθεί για έως 3 μήνες, εφόσον φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2–8 °C. Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του προτύπου ανθρώπινης IFN- $\gamma$ .
- Μετά την ανασύσταση, το αχρησιμοποίητο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100 $\times$  πρέπει να επιστραφεί σε χώρο φύλαξης με θερμοκρασία 2–8 °C και να χρησιμοποιηθεί εντός 3 μηνών.

Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του διαλύματος συζευγμένου μορίου.

- Το διάλυμα εργασίας του συζευγμένου μορίου πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 6 ωρών από την παρασκευή του.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C  $\pm$  5 °C) μέχρι και για 2 εβδομάδες.

# Συλλογή και προετοιμασία δοκιμών

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

- Μηδενικός μάρτυρας (γκρίζο πώμα)
- Αντιγόνο CMV (μπλε πώμα)
- Μάρτυρας μιτογόνου (μωβ πώμα)

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

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

1. Για κάθε εξεταζόμενο, συλλέξτε μέσω φλεβοκέντησης 1 ml αίματος απευθείας στα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV. Αυτή η διαδικασία πρέπει να εκτελείται από εκπαιδευμένο αιμολήπτη.

Τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψόμετρο μέχρι 810 μέτρων.

Εάν τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV χρησιμοποιηθούν σε υψόμετρο μεγαλύτερο από τα 810 μέτρα, ή εάν ληφθεί μικρός όγκος αίματος, μπορεί να συλλεχθεί αίμα με μια σύριγγα και να μεταφερθεί αμέσως 1 ml σε καθένα από τα τρία σωληνάρια. Για λόγους ασφάλειας, καλό είναι να γίνει αυτό με αφαίρεση της βελόνας της σύριγγας (σύμφωνα με τις κατάλληλες διαδικασίες ασφάλειας), αφαίρεση των πωμάτων από τα τρία σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV και προσθήκη 1 ml αίματος σε καθένα από αυτά (μέχρι τη μαύρη ένδειξη στο πλάι της ετικέτας του σωληναρίου). Τοποθετήστε ξανά τα πώματα των σωληναρίων με ασφάλεια και αναμείξτε τα όπως περιγράφεται παρακάτω. Επειδή τα σωληνάρια του 1 ml αναρροφούν το αίμα σχετικά αργά, αφήστε το σωληνάριο πάνω στη βελόνα για 2–3 δευτερόλεπτα επιπλέον από τη στιγμή που το σωληνάριο θα φαίνεται να έχει γεμίσει, ώστε να βεβαιωθείτε ότι θα ληφθεί ο σωστός όγκος.

Η μαύρη ένδειξη στο πλάι των σωληναρίων δείχνει τον όγκο πλήρωσης του 1 ml. Τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV έχουν επικυρωθεί για όγκους από 0,8 έως 1,2 ml. Εάν το επίπεδο αίματος σε κάποιο σωληνάριο δεν είναι κοντά στην ένδειξη, θα πρέπει να ληφθεί νέο δείγμα αίματος.

Εάν χρησιμοποιείται βελόνα τύπου πεταλούδας για την αιμοληψία, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα σωληνάριο εκκαθάρισης ώστε να διασφαλιστεί ότι η σωλήνωση έχει γεμίσει με αίμα προτού χρησιμοποιηθούν τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV.

Εναλλακτικά, το αίμα μπορεί να συλλεχθεί σε ένα κοινό σωληνάριο με λιθιούχο ηπαρίνη ως αντιπηκτικό και κατόπιν να μεταφερθεί σε σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV. Χρησιμοποιήστε αποκλειστικά λιθιούχο ηπαρίνη ως αντιπηκτικό αίματος καθώς τα άλλα αντιπηκτικά επηρεάζουν την ανάλυση. Γεμίστε ένα σωληνάριο συλλογής αίματος (ελάχιστος όγκος 5 ml) και ανακινήστε προσεκτικά αναστρέφοντας το σωληνάριο αρκετές φορές ώστε να διαλυθεί η ηπαρίνη. Αυτή η διαδικασία πρέπει να εκτελείται από εκπαιδευμένο αιμολήπτη. Το αίμα θα πρέπει να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) προτού μεταφερθεί στα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV για την επώαση, η οποία πρέπει να ξεκινήσει εντός 16 ωρών από την αιμοληψία.

2. Αμέσως μόλις γεμίσετε τα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV, ανακινήστε τα 10 φορές αρκετά έντονα ώστε να βεβαιωθείτε ότι όλη η εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου έχει καλυφθεί με αίμα, προκειμένου να διαλυθούν τα αντιγόνα που βρίσκονται στα τοιχώματα του σωληναρίου, αλλά όχι εντονότερα από αυτό.

Κατά τη στιγμή της πλήρωσης με αίμα, τα σωληνάρια θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία  $17^{\circ}\text{C}$ – $25^{\circ}\text{C}$ .

Η υπερβολική ανακίνηση μπορεί να προκαλέσει αποδιοργάνωση της γέλης και θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανώμαλα αποτελέσματα.

Εάν το αίμα έχει συλλεχθεί σε σωληνάριο λιθιούχου ηπαρίνης, τα δείγματα πρέπει να αναμειχθούν ομοιόμορφα προτού μεταφερθούν σε σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV. Βεβαιωθείτε ότι το αίμα έχει αναμειχθεί σχολαστικά με προσεκτική αναστροφή ακριβώς πριν τη μεταφορά. Μεταφέρετε κλάσματα του 1 ml (ένα για κάθε σωληνάριο συλλογής αίματος QF-CMV) σε κατάλληλα σωληνάρια μηδενικού μάρτυρα, αντιγόνου CMV και μιτογόνου. Αυτό θα πρέπει να γίνει με άσηπτη τεχνική, σύμφωνα με τις κατάλληλες διαδικασίες ασφάλειας, με αφαίρεση των πωμάτων από τα τρία σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV και προσθήκη 1 ml αίματος σε καθένα από αυτά (μέχρι τη μαύρη ένδειξη στο πλάι της ετικέτας του σωληναρίου).

---

Τοποθετήστε ξανά τα πώματα των σωληναρίων με ασφάλεια και αναμείξτε τα όπως περιγράφεται παραπάνω.

3. Επισημάνετε κατάλληλα τα σωληνάρια.

Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια (μηδενικού μάρτυρα, αντιγόνου CMV, μιτογόνου) μπορούν να αναγνωριστούν από την ετικέτα τους ή με άλλον τρόπο.

4. Μετά την πλήρωση, την ανακίνηση και την επισήμανση, τα σωληνάρια πρέπει να τοποθετηθούν σε επωαστήρα στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  το συντομότερο δυνατόν, εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος. Πριν από την επώαση, φυλάξτε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Μην ψύχετε και μην καταψύχετε τα δείγματα αίματος.

# Διαδικασία

## Στάδιο 1: Επώαση αίματος και συλλογή πλάσματος

1. Επωάστε τα σωληνάρια σε ΚΑΤΑΚΟΡΥΦΗ θέση, στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , για 16–24 ώρες. Η θερμοκοιτίδα δεν απαιτεί  $\text{CO}_2$  ή υγρασία.

**Σημαντικό:** Εάν το αίμα δεν επωαστεί αμέσως μετά τη συλλογή, επαναλάβετε την ανάμειξη των σωληναρίων με αναστροφή τους 10 φορές, πριν την επώαση.

Μετά την επώαση, τα σωληνάρια συλλογής αίματος μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία  $4\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι και για 3 ημέρες πριν από τη φυγοκέντριση.

2. Μετά την επώαση των σωληναρίων στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , η συλλογή του πλάσματος διευκολύνεται με φυγοκέντριση των σωληναρίων επί 15 λεπτά με ταχύτητα  $2.000\text{--}3.000\text{ RCF (g)}$ . Το βύσμα γέλης θα διαχωρίσει τα κύτταρα από το πλάσμα. Εάν δεν συμβεί αυτό, τα σωληνάρια πρέπει να φυγοκεντρηθούν ξανά.

Το πλάσμα μπορεί να συλλεχθεί και χωρίς φυγοκέντριση, αλλά απαιτείται αυξημένη προσοχή ώστε να αφαιρεθεί το πλάσμα χωρίς να διαταραχθούν τα κύτταρα.

3. Μετά τη φυγοκέντριση, αποφύγετε την παλινδρόμηση του υγρού κατά τη διανομή με πιπέτα και γενικά την ανάδευση του πλάσματος κατ' οποιονδήποτε τρόπο πριν από τη συλλογή. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.

**Σημαντικό:** Τα δείγματα πλάσματος θα πρέπει να συλλέγονται αποκλειστικά και μόνο με πιπέτα.

Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να φορτωθούν απευθείας από τα φυγοκεντρημένα σωληνάρια συλλογής αίματος στην πλάκα QF-CMV ELISA, ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται αυτοματοποιημένοι σταθμοί εργασίας ELISA.

Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να φυλαχθούν σε φυγοκεντρημένα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV μέχρι και για 28 ημέρες σε θερμοκρασία  $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ή σε θερμοκρασία μικρότερη των  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (κατά προτίμηση μικρότερη των  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) για παρατεταμένη χρονική περίοδο εφόσον έχει συλλεχθεί το πλάσμα.

Για να εξασφαλιστεί η επάρκεια των δειγμάτων, συλλέξτε τουλάχιστον 150  $\mu\text{l}$  πλάσματος.



## Στάδιο 2: QuantiFERON-CMV ELISA για ανθρώπινη IFN- $\gamma$

Ανατρέξτε στην ενότητα «Περιεχόμενα του κιτ», σελίδα 8 και «Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται», σελίδα 9, για τα υλικά που απαιτούνται για τη διενέργεια ELISA.

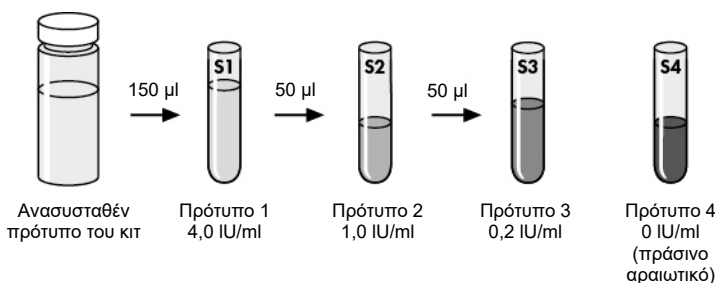
1. Όλα τα δείγματα πλάσματος και τα αντιδραστήρια, εκτός από το Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x, πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) πριν από τη χρήση. Αφήστε να περάσουν τουλάχιστον 60 λεπτά για εξισορρόπηση.
2. Αφαιρέστε τις περιπτώσεις σειρές πλακών ELISA από το πλαίσιο, σφραγίστε ξανά τη θήκη αλουμινίου και τοποθετήστε την ξανά στο ψυγείο για φύλαξη μέχρι την επόμενη χρήση. Αφήστε τουλάχιστον μία σειρά για τα πρότυπα διαλύματα της QF-CMV ELISA, και επαρκή αριθμό σειρών για τον αριθμό των εξεταζόμενων ασθενών. Μετά τη χρήση, φυλάξτε το πλαίσιο και το καπάκι για χρήση με τις υπόλοιπες σειρές.
3. Ανασυστήστε το πρότυπο ανθρώπινης IFN- $\gamma$  με τον όγκο αποιονισμένου ή απεσταγμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Αναμείξτε ήπια ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο ο σχηματισμός αφρού και να διασφαλιστεί πλήρης επαναδιαλυτοποίηση. Η ανασύσταση του προτύπου IFN- $\gamma$  μέχρι τον σωστό όγκο θα δώσει ένα διάλυμα με συγκέντρωση 8,0 IU/ml.

**Σημείωση:** Ο όγκος ανασύστασης του προτύπου ανθρώπινης IFN- $\gamma$  (πρότυπο του κιτ) διαφέρει ανάλογα με την παρτίδα.

Χρησιμοποιώντας το ανασυσταθέν πρότυπο, παρασκευάστε μια σειρά αραιώσεων τεσσάρων συγκεντρώσεων της IFN- $\gamma$  σε πράσινο αραιωτικό (Green Diluent, GD) (Εικόνα 1, επόμενη σελίδα). Το πρότυπο S1 (Πρότυπο 1) περιέχει 4,0 IU/ml, το S2 (Πρότυπο 2) περιέχει 1,0 IU/ml, το S3 (Πρότυπο 3) περιέχει 0,25 IU/ml και το S4 (Πρότυπο 4) περιέχει 0 IU/ml (GD μόνο). Τα πρότυπα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον εις διπλούν. Παρασκευάστε νέες αραιώσεις του προτύπου του κιτ για κάθε περίοδο εργασίας ELISA.

## Παράδειγμα διαδικασίας για διπλά πρότυπα

| Παράδειγμα διαδικασίας για διπλά πρότυπα |                                                                     |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| A                                        | Επιστημάνετε τέσσερα σωληνάρια: S1, S2, S3, S4                      |
| B                                        | Προσθέστε 150 μl GD στα S1, S2, S3, S4                              |
| Γ                                        | Προσθέστε 150 μl του προτύπου του kit στο S1 και αναμείξτε καλά     |
| Δ                                        | Μεταφέρετε 50 μl από το S1 στο S2 και αναμείξτε καλά                |
| Ε                                        | Μεταφέρετε 50 μl από το S2 στο S3 και αναμείξτε καλά                |
| ΣΤ                                       | Ένα σωληνάριο με GD μόνο θα χρησιμοποιηθεί ως μηδενικό πρότυπο (S4) |



**Εικόνα 1. Προετοιμασία της πρότυπης καμπύλης με διαδοχικές αραιώσεις.**

- Ανασυστήστε το λυόφιλο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100× με 0,3 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Αναμείξτε ήπια ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο ο σχηματισμός αφρού και να διασφαλιστεί πλήρης διαλυτοποίηση του συζευγμένου μορίου.

Η συγκέντρωση εργασίας του συζευγμένου μορίου παρασκευάζεται με αραιώση της απαιτούμενης ποσότητας ανασυσταθέντος συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100× σε πράσινο αραιωτικό (βλ. Πίνακα 1, επόμενη σελίδα).

Αναμείξτε σχολαστικά αλλά ήπια ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.

Επαναφέρετε το αχρησιμοποίητο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση.

Χρησιμοποιήστε αποκλειστικά Πράσινο αραιωτικό.

**Πίνακας 1. Προετοιμασία διαλύματος εργασίας συζευγμένου μορίου**

| Αριθμός σειρών | Όγκος Συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100x | Όγκος πράσινου αραιωτικού |
|----------------|---------------------------------------------|---------------------------|
| 2              | 10 $\mu$ l                                  | 1,0 ml                    |
| 3              | 15 $\mu$ l                                  | 1,5 ml                    |
| 4              | 20 $\mu$ l                                  | 2,0 ml                    |
| 5              | 25 $\mu$ l                                  | 2,5 ml                    |
| 6              | 30 $\mu$ l                                  | 3,0 ml                    |
| 7              | 35 $\mu$ l                                  | 3,5 ml                    |
| 8              | 40 $\mu$ l                                  | 4,0 ml                    |
| 9              | 45 $\mu$ l                                  | 4,5 ml                    |
| 10             | 50 $\mu$ l                                  | 5,0 ml                    |
| 11             | 55 $\mu$ l                                  | 5,5 ml                    |
| 12             | 60 $\mu$ l                                  | 6,0 ml                    |

5. Τα δείγματα πλάσματος που λαμβάνονται από τα σωληνάρια συλλογής αίματος και κατόπιν καταψύχονται ή φυλάσσονται επί περισσότερες από 24 ώρες πριν την ανάλυση πρέπει να ανακινούνται σχολαστικά προτού προστεθούν στο βύθισμα ELISA.

Σημαντικό: Εάν τα δείγματα πλάσματος πρόκειται να προστεθούν απευθείας από τα φυγοκεντρημένα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV, θα πρέπει να αποφευχθεί οποιαδήποτε ανακίνηση του πλάσματος. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.

6. Εάν απαιτούνται ποσοτικά αποτελέσματα, αραιώστε δείγματα πλάσματος για CMV και μιτογόνο με πράσινο αραιωτικό (GD) σε αναλογία 1/10 (10  $\mu$ l πλάσματος + 90  $\mu$ l GD). Το πλάσμα μηδενικού μάρτυρα δεν πρέπει να αραιωθεί.

Συνιστάται η παράλληλη ανάλυση των παρακάτω δειγμάτων:

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

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

Μηδενικό, αντιγόνο CMV, μιτογόνο

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

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

Μηδενικό, αντιγόνο CMV (1/10), μιτογόνο

7. Προσθέστε 50 μl πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος συζευγμένου μορίου σε συγκέντρωση εργασίας στα απαιτούμενα βυθίσματα ELISA, χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.
8. Προσθέστε 50 μl των εξεταζόμενων δειγμάτων πλάσματος στα κατάλληλα βυθίσματα. Τέλος, προσθέστε 50 μl από καθένα από τα πρότυπα 1 έως 4 στα κατάλληλα βυθίσματα. Τα πρότυπα θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον εις διπλούν.
9. Καλύψτε την πλάκα ELISA και αναμείξτε σχολαστικά το συζευγμένο μόριο και τα δείγματα πλάσματος/πρότυπα χρησιμοποιώντας συσκευή ανακίνησης μικροπλακών επί 1 λεπτό στις 500 έως 1.000 rpm. Αποφύγετε την εκτίναξη υγρού.
10. Καλύψτε την πλάκα ELISA και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) επί  $120 \pm 5$  λεπτά.  
  
Οι πλάκες δεν θα πρέπει να εκτεθούν σε άμεσο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της επώασης. Τυχόν αποκλίσεις από το καθορισμένο θερμοκρασιακό εύρος μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
11. Κατά τη διάρκεια της επώασης, παρασκευάστε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας. Αραιώστε ένα μέρος συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 20x με 19 μέρη απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού και αναμείξτε σχολαστικά.  
  
Παρέχεται επαρκές συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 20x για να παρασκευαστούν 2 λίτρα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε συγκέντρωση εργασίας.
12. Όταν η επώαση της πλάκας ELISA ολοκληρωθεί, εκπλύνετε τα βυθίσματα με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας για τουλάχιστον έξι κύκλους. Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακών.

**Σημαντικό:** Η σχολαστική πλύση είναι πολύ σημαντική για την εκτέλεση του προσδιορισμού. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα βυθίσματα γεμίζουν εντελώς με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μέχρι το χείλος του βυθίσματος για κάθε κύκλο έκπλυσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων μεταξύ των κύκλων.

Θα πρέπει να προστίθεται τυπικό απολυμαντικό εργαστηρίου στη δεξαμενή εκροής και θα πρέπει να εφαρμόζονται οι καθιερωμένες διαδικασίες για την απολύμανση των δυνητικά λοιμογόνων υλικών.

13. Χτυπήστε τις πλάκες ανάποδα πάνω σε απορροφητικό χαρτί χωρίς χνούδι για να απομακρυνθεί το εναπομένον ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Προσθέστε 100 μl διαλύματος υποστρώματος ενζύμου σε κάθε βύθισμα, καλύψτε την πλάκα και αναμείξτε σχολαστικά επί 1 λεπτό στις 500 έως 1.000 rpm σε μια συσκευή ανακίνησης μικροπλακών.
14. Καλύψτε κάθε πλάκα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) επί 30 λεπτά. Οι πλάκες δεν θα πρέπει να εκτεθούν σε άμεσο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της επώασης.
15. Μετά από 30 λεπτά επώασης, προσθέστε 50 μl διαλύματος διακοπής ενζυμικής αντίδρασης σε κάθε βύθισμα, με την ίδια σειρά με την οποία προστέθηκε το υπόστρωμα και αναμείξτε σχολαστικά στις 500 έως 1.000 rpm σε μια συσκευή ανακίνησης μικροπλακών.
16. Μετρήστε την οπτική πυκνότητα (OD) σε κάθε βύθισμα μέσα σε 5 λεπτά από τη διακοπή της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών που διαθέτει φίλτρο 450 nm και φίλτρο αναφοράς 620 nm έως 650 nm. Οι τιμές OD χρησιμοποιούνται για να υπολογιστούν τα αποτελέσματα.

# Υπολογισμοί και ερμηνεία δοκιμασιών

Λογισμικό ανάλυσης QuantiFERON-CMV, για την ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων και τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, προσφέρεται από την QIAGEN στη διεύθυνση **[www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)**. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε την πιο πρόσφατη έκδοση του λογισμικού ανάλυσης QF-CMV.

Το λογισμικό εκτελεί εκτίμηση ελέγχου ποιότητας στην ανάλυση, σχεδιάζει την πρότυπη καμπύλη και δίνει ένα αποτέλεσμα εξέτασης για κάθε εξεταζόμενο, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Ερμηνεία αποτελεσμάτων» στη σελίδα 25. Το λογισμικό αναφέρει τη μικρότερη αραίωση που δίνει αποτέλεσμα εντός του εύρους της μεθόδου QF-CMV ELISA, λαμβάνοντας υπόψη τον συντελεστή αραίωσης.

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

## Παραγωγή της πρότυπης καμπύλης (εάν δεν χρησιμοποιείται το λογισμικό ανάλυσης QF-CMV)

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

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

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

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

Το αναφερόμενο αποτέλεσμα θα πρέπει να ληφθεί από τη μικρότερη αραίωση που δίνει αποτέλεσμα εντός του εύρους τιμών της μεθόδου QF-CMV ELISA, λαμβάνοντας υπόψη τον συντελεστή αραίωσης, όπου εφαρμόζεται.

## Έλεγχος ποιότητας δοκιμασίας

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

Για μια έγκυρη ανάλυση ELISA:

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

Το λογισμικό ανάλυσης QF-CMV υπολογίζει και αναφέρει αυτές τις παραμέτρους ελέγχου ποιότητας. Εάν δεν πληρούνται τα παραπάνω κριτήρια, η ανάλυση είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

---

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



# Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης QuantiFERON-CMV ερμηνεύονται με βάση τα κριτήρια στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης QuantiFERON-CMV

| Nil (IU/ml) | CMV μείον τον μηδενικό μάρτυρα (IU/ml)                | Mitogen μείον Nil (IU/ml)* | Αποτέλεσμα QF-CMV | Αναφορά/Ερμηνεία                                      |
|-------------|-------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------|
| ≤ 8,0       | ≥ 0,20 και ≥ 25% τιμής μηδενικού μάρτυρα              | Οποιοδήποτε                | Αντιδραστικό†     | Διαπιστώνεται ανοσία anti-CMV                         |
|             | < 0,20 Ή ≥ 0,20 και < 25% της τιμής μηδενικού μάρτυρα | ≥ 0,5                      | Μη αντιδραστικό   | ΔΕΝ διαπιστώνεται ανοσία anti-CMV                     |
|             |                                                       | <0,5                       | Απροσδιόριστο‡    | Απροσδιόριστα αποτελέσματα αντιδραστικότητας στον CMV |
| >8,0§       | Οποιοδήποτε                                           | Οποιοδήποτε                | Απροσδιόριστο‡    | Απροσδιόριστα αποτελέσματα αντιδραστικότητας στον CMV |

\* Οι απαντήσεις στον θετικό μάρτυρα μιτογόνου (και ενίοτε στα αντιγόνα CMV) βρίσκονται πολλές φορές εκτός της κλίμακας της συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών. Αυτό δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της εξέτασης.

† Όταν δεν υπάρχουν υποψίες για μόλυνση από κυτταρομεγαλοϊό, ένα αρχικά αντιδραστικό αποτέλεσμα μπορεί να επιβεβαιωθεί με επανεξέταση των αρχικών δειγμάτων πλάσματος εις διπλούν με τη μέθοδο QF-CMV ELISA. Εάν η μία ή και οι δύο επαναλήψεις δώσουν θετικό αποτέλεσμα στην επανεξέταση, το άτομο θα πρέπει να θεωρείται αντιδραστικό στην ανάλυση.

‡ Ανατρέξτε στην ενότητα «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων» (σελίδα 42) για πιθανές αιτίες.

Σε κλινικές μελέτες (1), τυχόν απροσδιόριστο αποτέλεσμα σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων, όπου ο δότης ήταν αντιδραστικός για CMV αλλά ο μάρτυρας μιτογόνου ήταν κάτω από 0,5 IU/ml, έχει καταδειχθεί ότι είναι κλινικά σημαντικό. Αυτοί οι ασθενείς διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης νόσου από CMV.

§ Σε κλινικές μελέτες, λιγότεροι από το 0,25% των ατόμων έδωσαν επίπεδα IFN-γ > 8,0 IU/ml για την τιμή του Nil.

**Σημείωση:** Τα μετρούμενα επίπεδα της IFN-γ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα, το ιατρικό ιστορικό και άλλες διαγνωστικές αξιολογήσεις κατά την εξακρίβωση της ανοσολογικής απάντησης σε αντιγόνα CMV. Η ανάλυση QF-CMV δεν είναι εξέταση για τον εντοπισμό των λοιμώξεων από CMV και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο λοίμωξης από CMV.

# Περιορισμοί

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

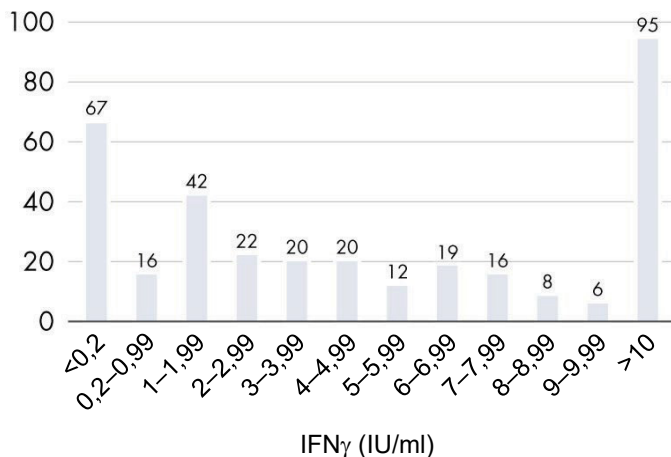
Αναξιόπιστα ή απροσδιόριστα αποτελέσματα ενδέχεται να ληφθούν λόγω:

- Αποκλίσεων από τη διαδικασία που περιγράφεται στο ένθετο συσκευασίας QuantiFERON-CMV ELISA
- Υπερβολικά επίπεδα IFN- $\gamma$  στο σωληνάριο ελέγχου
- Παρέλευσης άνω των 16 ωρών μεταξύ της αιμοληψίας και της επώασης στους 37 °C.

## Αναμενόμενες τιμές

Οι αναμενόμενες τιμές IFN- $\gamma$  κατά τη χρήση της ανάλυσης QuantiFERON-CMV ελήφθησαν από την εξέταση 591 δειγμάτων από υγιή άτομα. 343 δείγματα βρέθηκαν οροθετικά και 248 δείγματα βρέθηκαν οροαρνητικά για CMV IgG. Η οροδιαγνωστική κατάσταση CMV δεν ήταν γνωστή τη στιγμή της ανάλυσης QF-CMV. Στα 248 δείγματα από οροαρνητικά για CMV άτομα, το 100% (248/248) των δειγμάτων που εξετάστηκαν ήταν μη αντιδραστικά στη μέθοδο QF-CMV ELISA και έδωσαν απαντήσεις IFN- $\gamma$  <0,2 IU/ml στο σωληνάριο αντιγόνου CMV (μείον τον μηδενικό μάρτυρα). Απεικονίζεται η κατανομή των απαντήσεων IFN- $\gamma$  στο σωληνάριο αντιγόνου CMV (μείον τον μηδενικό μάρτυρα) για τα 343 οροθετικά για CMV άτομα (Εικόνα 2).

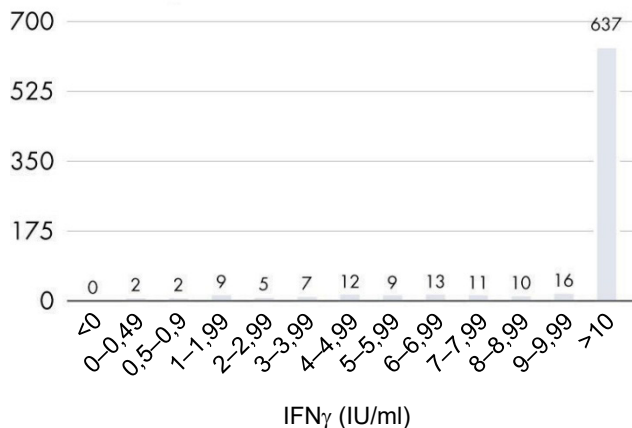
## Αριθμός δειγμάτων



**Εικόνα 2.** Κατανομή των απαντήσεων IFN- $\gamma$  στην ανάλυση QF-CMV (μείον τον μηδενικό μάρτυρα) σε υγιή οροθετικά άτομα (n = 343).

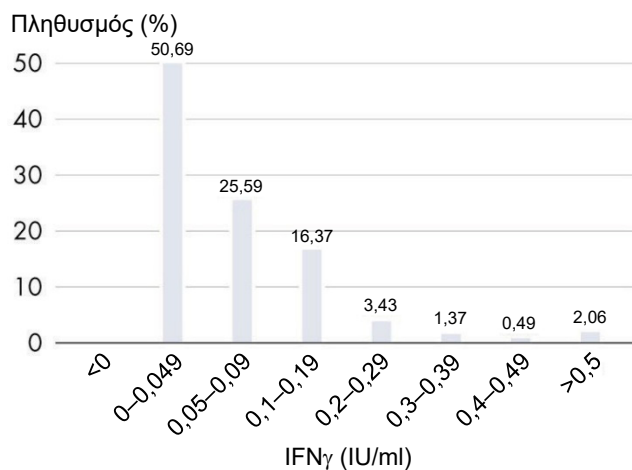
Η κατανομή των απαντήσεων IFN- $\gamma$  στο μιτογόνο (μείον τον μηδενικό μάρτυρα) προσδιορίστηκε με ανάλυση 733 δειγμάτων από υγιείς ενήλικες με χρήση της μεθόδου QF-CMV ELISA, ανεξάρτητα από την οροδιαγνωστική εξέταση CMV IgG (Εικόνα 3). Ένα αποτέλεσμα μιτογόνου (μείον τον μηδενικό μάρτυρα) μικρότερο από 0,5 IU/ml δείχνει είτε αποτυχία της εξέτασης είτε άτομο με ανοσοανεπάρκεια. Σε έναν πληθυσμό υγιών ατόμων, μόνον 2/733 αποτελέσματα ανήκαν στην κατηγορία αυτή.

Αριθμός δειγμάτων



**Εικόνα 3.** Κατανομή των απαντήσεων IFN- $\gamma$  στο μιτογόνο (μείον τον μηδενικό μάρτυρα) σε υγιή άτομα (n = 733).

Η κατανομή των απαντήσεων IFN- $\gamma$  στα σωληνάρια μηδενικού μάρτυρα προσδιορίστηκε με ανάλυση 1.020 δειγμάτων πλάσματος από υγιή άτομα, με χρήση της μεθόδου QF-CMV ELISA, ανεξάρτητα από την οροδιαγνωστική εξέταση CMV IgG (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Κατανομή των απαντήσεων IFN- $\gamma$  σε μηδενικό μάρτυρα, σε υγιή άτομα (n = 1020) εκφρασμένη ως ποσοστό πληθυσμού.

# Χαρακτηριστικά επιδόσεων

## Κλινική απόδοση

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

Η απόδοση της μεθόδου QF-CMV συγκρίθηκε με την οροδιαγνωστική εξέταση SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). Η μέθοδος QF-CMV παρουσίασε συμφωνία 95% (294/310 άτομα) με την οροδιαγνωστική εξέταση CMV IgG σε υγιή άτομα, καθώς κανένας από τους 149 οροαρνητικούς δότες δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα στην εξέταση QF-CMV. 145 από τους 161 οροθετικούς δότες παρουσίασαν αντιδραστική απάντηση QF-CMV. Η συνολική θετική συμφωνία ήταν 90% ενώ η τιμή αρνητικής συμφωνίας ήταν 100%. Ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων QF-CMV και της οροδιαγνωστικής κατάστασης CMV IgG σε υγιή άτομα παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συμφωνία μεταξύ της μεθόδου QuantiFERON-CMV και της οροδιαγνωστικής εξέτασης CMV IgG σε υγιή άτομα

|                 |                 | Οροδιαγνωστική εξέταση CMV |                     | Σύνολο      |
|-----------------|-----------------|----------------------------|---------------------|-------------|
|                 |                 | Positive (Θετικό)          | Negative (Αρνητικό) |             |
| QuantiFERON-CMV | Αντιδραστικό    | 145                        | 0                   | 145 (46,8%) |
|                 | Μη αντιδραστικό | 16                         | 149                 | 165 (53,2%) |
|                 | Σύνολο          | 161 (51,9%)                | 149 (48,1%)         | 310 (100%)  |

## Κατώφλιο μεθόδου

Το συνιστώμενο κλινικό κατώφλιο εξέτασης για τη μέθοδο αυτή είναι 0,2 IU/ml στο σωληνάριο αντιγόνου CMV (μείον τον μηδενικό μάρτυρα), αν και μπορούν να επικυρωθούν διαφορετικές τιμές κατωφλίου για διάφορες κλινικές καταστάσεις.

## Κλινικές μελέτες

Καθώς δεν υπάρχει καθορισμένο πρότυπο για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της διάγνωσης της μόλυνσης από κυτταρομεγαλοϊό, δεν είναι πρακτικά εφικτό να αξιολογηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου QF-CMV. Η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου QF-CMV προσδιορίστηκαν κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης του βαθμού συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων QF-CMV και της οροδιαγνωστικής κατάστασης CMV IgG σε υγιή άτομα.

Η ειδικότητα της μεθόδου QF-CMV προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης του ποσοστού ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (αντιδραστική απάντηση QF-CMV) σε δείγματα από υγιείς δότες, χωρίς ενδείξεις προηγούμενης έκθεσης στον CMV (άτομα οροαρνητικά για CMV IgG). Η ευαισθησία προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης της απάντησης στη μέθοδο QF-CMV σε δείγματα από υγιείς δότες με ενδείξεις προηγούμενης έκθεσης στον CMV (άτομα οροθετικά για CMV IgG). Η μέθοδος QF-CMV χρησιμοποιεί έναν μεγάλο αριθμό επιτόπων ειδικών για τον CMV από διάφορες πρωτεΐνες του CMV, παρέχοντας έτσι ευρεία κάλυψη για τον πληθυσμό με ποικίλους απλότυπους HLA τάξης I (περίπου το 98% του πληθυσμού). Επειδή οι απλότυποι HLA των ατόμων που εξετάστηκαν ως προς την ορολογική κατάσταση CMV ήταν άγνωστοι, ένα μικρό ποσοστό των οροθετικών ατόμων αναμενόταν να βρεθούν μη αντιδραστικοί στα σωληνάρια συλλογής αίματος QF-CMV.

## Ειδικότητα

Σε μια μελέτη που διενεργήθηκε σε 591 δείγματα από υγιή άτομα, δεν ανιχνεύθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα QF-CMV σε άτομα που βρέθηκαν οροαρνητικά για CMV IgG, με 248/248 δείγματα να είναι μη αντιδραστικά στην εξέταση QF-CMV ELISA και αρνητικά στην οροδιαγνωστική μέθοδο CMV IgG. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με χρήση της μεθόδου QF-CMV και της οροδιαγνωστικής μεθόδου CMV IgG παρουσίασαν 100% συμφωνία.

Σε όλες τις άλλες αξιολογήσεις ειδικότητας που διεξήχθησαν σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (1–8), λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (9,10) και ασθενείς με λοίμωξη HIV (11), η συμφωνία μεταξύ της μεθόδου QF-CMV και της οροδιαγνωστικής μεθόδου CMV IgG έχει επίσης προσδιοριστεί στο 100%.

## Ευαισθησία

Σε μια μελέτη που διενεργήθηκε σε 343 δείγματα από υγιή άτομα που βρέθηκαν οροθετικά για CMV IgG, ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των απαντήσεων QF-CMV και των αποτελεσμάτων της οροδιαγνωστικής μεθόδου CMV IgG ήταν 80,5%, με 276/343 δείγματα να είναι αντιδραστικά στην εξέταση QF-CMV και θετικά στην οροδιαγνωστική μέθοδο CMV IgG. Η παρατηρούμενη ασυμφωνία μπορεί να οφείλεται σε ψευδώς θετική ορολογία CMV ή στην απουσία αντιδρώντων τύπων HLA στα άτομα που εξετάστηκαν.

Ο βαθμός συμφωνίας σε αξιολογήσεις ευαισθησίας που διεξήχθησαν σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (1–8), σε λήπτες μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (9, 10) και σε ασθενείς με λοίμωξη HIV (11) έχει βρεθεί ότι είναι χαμηλότερος και μπορεί να οφείλεται σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα οροδιαγνωστικών εξετάσεων CMV, στην απουσία αντιδρώντων τύπων HLA στα εξεταζόμενα άτομα ή στην απουσία αντιδραστικών T κυττάρων στους ασθενείς αυτούς, λόγω της ανοσοκαταστολής.

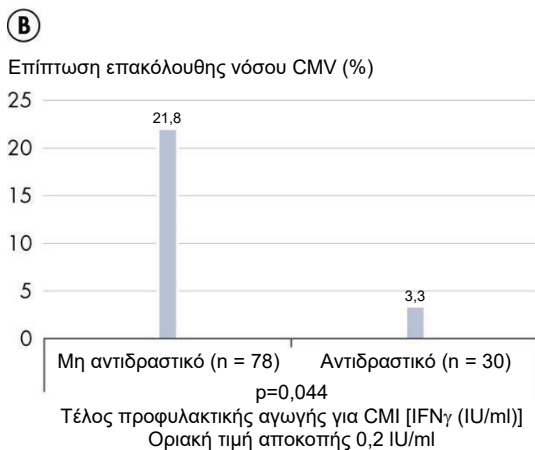
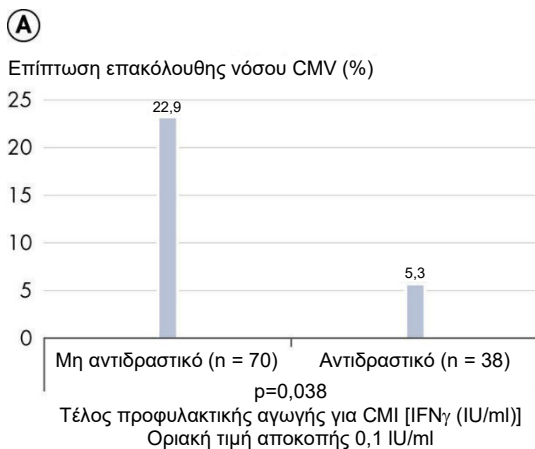
## Μελέτες που επισημαίνουν την κλινική χρησιμότητα

Όπως δηλώνεται τόσο για την οροδιαγνωστική μέθοδο CMV IgG όσο και για τη μέθοδο QF-CMV, η προβλεπόμενη χρήση τους είναι η ανίχνευση της ανοσίας στον CMV. Στις περιπτώσεις μεταμόσχευσεων, οροδιαγνωστικές εξετάσεις CMV χρησιμοποιούνται εκτεταμένα πριν τη μεταμόσχευση για να προσδιοριστεί ο κίνδυνος επιπλοκών από τον CMV στον λήπτη μετά τη μεταμόσχευση, αλλά έχουν περιορισμένη αξία όταν εκτελούνται μετά τη μεταμόσχευση. Εναλλακτικά, η μέθοδος QF-CMV μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε λήπτες μοσχευμάτων για την εκτίμηση του βαθμού ανοσίας στον CMV στους ασθενείς εκείνους που διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν συμπτωματική λοίμωξη CMV ή/και νόσο λόγω ανοσοκαταστολής (12–15).

Μια σειρά από δημοσιευμένες κλινικές μελέτες σε μια ποικιλία ομάδων ασθενών που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση έχουν αποδείξει τη χρησιμότητα της μεθόδου QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

Σε μια μεγάλη μελέτη με 108 λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (4), οι ασθενείς που έδωσαν αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV μετά την ολοκλήρωση της προφυλακτικής αγωγής κατά του CMV παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό επακόλουθης νόσου από CMV (3,3% ή 1/30, με χρήση κατωφλίου 0,2 IU/ml) σε σύγκριση με τους ασθενείς που έδωσαν μη αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV (21,8% ή 17/78,  $p = 0,044$ ) (Εικόνα 5).





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

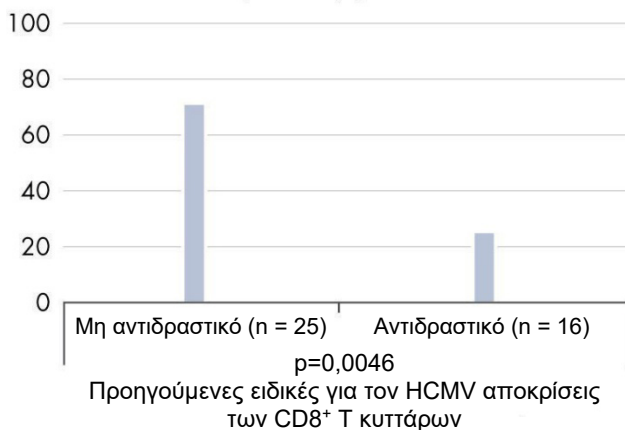
Επιπλέον, οι λήπτες μοσχευμάτων οροαρνητικοί για τον CMV, οι οποίοι έλαβαν όργανο από δότη οροθετικό για CMV (D+/R-) με αντιδραστικό αποτέλεσμα εξέτασης QF-CMV μετά την ολοκλήρωση της προφυλακτικής αγωγής, παρέμεναν ελεύθεροι νόσου CMV σε μεγαλύτερο ποσοστό και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, εύρημα που δείχνει ότι η QF-CMV μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναγνωριστούν οι ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν νόσο CMV όψιμης εκδήλωσης.

Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης ότι σε αυτή την ομάδα ασθενών που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση και οι οποίοι διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν νόσο CMV (D+/R-), ένα αντιδραστικό αποτέλεσμα οποιαδήποτε στιγμή μετά την προφυλακτική αγωγή σχετιζόταν με μεγαλύτερη πιθανότητα να παραμείνουν ελεύθεροι νόσου CMV.

Σε μια μελέτη με 37 λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (6), η αξιολόγηση της απάντησης των ειδικών για τον CMV CD8<sup>+</sup> T κυττάρων βάσει εξέτασης QF-CMV βοήθησε στην πρόβλεψη της αυτόματης κάθαρσης του ιού αντί της εξέλιξης της νόσου CMV μετά από αύξηση της αιμίας του CMV. Σε αυτή τη μελέτη, 24/26 ασθενείς (92,3%) με αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV (με χρήση ενός κατωφλίου εξέτασης IFN- $\gamma$   $\geq 0,2$  IU/ml) σημείωσαν αυτόματα κάθαρση του ιού CMV, ενώ μόνο 5/11 (45,5%) ασθενείς με μη αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV πέτυχαν το ίδιο αποτέλεσμα.

Μια μελέτη με 67 λήπτες μοσχεύματος πνεύμονα κατά την οποία αξιολογήθηκαν τα επεισόδια αιμίας CMV μετά τη μεταμόσχευση (7) έδειξε ότι 18/25 (72%) επεισόδια αιμίας CMV σημειώθηκαν μετά από μη αντιδραστικό αποτέλεσμα QF-CMV, έναντι 4/16 (25%) επεισοδίων που σημειώθηκαν μετά από μια αντιδραστική απάντηση QF-CMV (ακριβής έλεγχος Fisher,  $p = 0,0046$ , βλ. Εικόνα 6).

Επεισόδια DNAιμίας από HCMV με  
 ιικό φορτίο > 1000 αντίγραφα/ml (%)



Εικόνα 6. Στατιστική ανάλυση των απαντήσεων των ειδικών για τον CMV CD8<sup>+</sup> T κυττάρων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο QuantiFERON-CMV, και της ανάπτυξης ιαιμίας CMV (ακριβής έλεγχος Fisher,  $p = 0,0046$ ). Τα υποκείμενα στοιχεία ανευρίσκονται στην εργασία των Weseslindtner et al (7).

Μια μεγάλη πολυκεντρική προοπτική μελέτη που διενεργήθηκε σε 127 οροαρνητικούς για τον CMV λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων που έλαβαν όργανα από οροθετικούς για τον CMV δότες (8), οι οποίοι έλαβαν όλοι αντιική προφυλακτική αγωγή, έδειξε ότι οι ασθενείς με αντιδραστικό αποτέλεσμα στην εξέταση QF-CMV (με κατώφλιο εξέτασης 0,1 IU/ml) σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μετά την ολοκλήρωση της προφυλακτικής αγωγής κατά του CMV είχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης νόσου όψιμης εκδήλωσης στους 12 μήνες μετά τη μεταμόσχευση (6,4%), σε σύγκριση με τους ασθενείς που έδωσαν μη αντιδραστικό αποτέλεσμα (22,2%) και απροσδιόριστο αποτέλεσμα (58,3%,  $p < 0,001$ ) στην εξέταση QF-CMV. Όταν τα απροσδιόριστα αποτελέσματα συνδυάστηκαν με τα μη αντιδραστικά, η επίπτωση επακόλουθης νόσου CMV ήταν 6,4% έναντι 26,8%,  $p = 0,024$ . Οι αναφερόμενες θετικές και αρνητικές προβλεπτικές τιμές της εξέτασης QF-CMV ως προς την προστασία από τη νόσο CMV ήταν 0,90 (95% CI 0,74–0,98) και 0,27 (95% CI 0,18–0,37), αντίστοιχα. Αυτή η μελέτη βρήκε ότι η εξέταση QF-CMV είναι ενδεχομένως χρήσιμη στην πρόβλεψη χαμηλού, μέτριου ή υψηλού κινδύνου επακόλουθης ανάπτυξης νόσου CMV μετά από προφυλακτική αγωγή.

Σε μια προοπτική μελέτη με 55 λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων (8) στην οποία αναλύθηκε η σχέση μεταξύ των προμεταμοσχευτικών αποτελεσμάτων QF-CMV και των επεισοδίων πολλαπλασιασμού του CMV μετά τη μεταμόσχευση, βρέθηκε ότι η υψηλότερη επίπτωση επεισοδίων πολλαπλασιασμού του CMV μετά τη μεταμόσχευση παρατηρήθηκε σε οροθετικούς για CMV λήπτες με μη αντιδραστικό (με χρήση κατωφλίου εξέτασης 0,2 IU/ml) αποτέλεσμα QF-CMV πριν τη μεταμόσχευση (7/14 ή 50%), σε σύγκριση με τους οροθετικούς για CMV λήπτες που είχαν αντιδραστικό προμεταμοσχευτικό αποτέλεσμα QF-CMV (4/30 ή 13,3%,  $p = 0,021$ ).

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

Μια σειρά άλλων μελετών που διερεύνησαν την ανίχνευση ειδικών για τον CMV απαντήσεων των CD8<sup>+</sup> Τ κυττάρων μέσω QF-CMV σε μια ομάδα ληπτών μοσχευμάτων έχουν ήδη ολοκληρωθεί (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) ή βρίσκονται σήμερα σε εξέλιξη σε ολόκληρο τον κόσμο.

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

Η σημασία της παρακολούθησης της ειδικής για τον CMV ανοσίας είναι αναγνωρισμένη και έχει περιγραφεί στο έντυπο «*Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation*» (Ενημερωμένες διεθνείς ομόφωνες κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την αντιμετώπιση του κυτταρομεγαλοϊού στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων) (12). Αυτές οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, που συντάχθηκαν από μια επιτροπή ειδικών στον CMV και τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων η οποία συγκλήθηκε από το Τμήμα Λοιμωδών Νοσημάτων (The Infectious Diseases Section) της Διεθνούς Εταιρείας Μεταμοσχεύσεων (The Transplantation Society), εκφράζουν πειστήρια και ομόφωνες κατευθυντήριες οδηγίες βασισμένες σε γνώμες ειδικών πάνω στην αντιμετώπιση του CMV, σε θέματα όπως η διάγνωση, η ανοσολογία, η πρόληψη και η θεραπεία.

Αυτές οι κατευθυντήριες οδηγίες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι «η ανοσολογική παρακολούθηση των ειδικών για τον CMV απαντήσεων των T κυττάρων ίσως βοηθά στην αναγνώριση των ατόμων που διατρέχουν κίνδυνο νόσου CMV μετά τη μεταμόσχευση και ίσως είναι χρήσιμη στην καθοδήγηση της προφυλακτικής αγωγής και των προληπτικών θεραπειών» (12).

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

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

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

# Χαρακτηριστικά απόδοσης προσδιορισμού

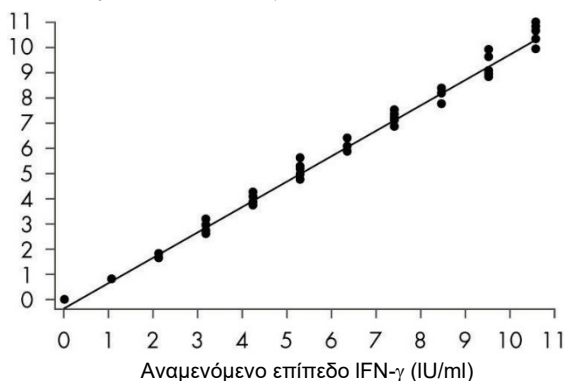
Η μέθοδος QF-CMV ELISA χρησιμοποιεί το πρότυπο ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IFN- $\gamma$ , το οποίο έχει αναλυθεί έναντι ενός παρασκευάσματος IFN- $\gamma$  αναφοράς (Αρ. αναφ. NIH: Gxg01-902-535). Τα αποτελέσματα για τα δείγματα της εξέτασης αναφέρονται σε διεθνείς μονάδες (International Units, IU) σε σχέση με μια πρότυπη καμπύλη, προετοιμασμένη μέσω εξέτασης της αραίωσης του δευτερεύοντος προτύπου που παρέχεται με το kit.

Τα ετερόφιλα αντισώματα (π.χ. ανθρώπινα αντισώματα έναντι των ποντικών) στον ορό ή το πλάσμα ορισμένων ατόμων είναι γνωστό ότι προκαλούν παρεμβολές στους ανοσοπροσδιορισμούς. Η επίδραση των ετερόφιλων αντισωμάτων στη μέθοδο QF-CMV ELISA ελαχιστοποιείται με την προσθήκη φυσιολογικού ορού ποντικού στο πράσινο αραιωτικό και με τη χρήση τμημάτων μονοκλωνικού αντισώματος F(ab')<sub>2</sub> ως δέσμευσης της IFN- $\gamma$  που επικαλύπτει τα βυθίσματα μικροπλάκας.

Το όριο ανίχνευσης του προσδιορισμού QFT-Plus ELISA είναι 0,065 IU/ml, ενώ ο προσδιορισμός δεν εμφανίζει στοιχεία φαινομένου προζώνης (υψηλών δόσεων) σε συγκεντρώσεις IFN- $\gamma$  έως και 10.000 IU/ml. Έχει καταδειχθεί ότι τα αντισώματα της μεθόδου QF-CMV ELISA δεν έχουν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με καμία από τις κυτοκίνες που αναλύονται, συμπεριλαμβανομένων των IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 και IL12.

Η γραμμικότητα της μεθόδου QF-CMV ELISA αποδείχθηκε με τυχαία τοποθέτηση πέντε επαναληπτικών δειγμάτων από 11 δεξαμενές πλάσματος με γνωστές συγκεντρώσεις IFN- $\gamma$  πάνω στην πλάκα ELISA. Η καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης έχει κλίση  $1,002 \pm 0,011$  και συντελεστή συσχέτισης 0,99 (Εικόνα 7).

Διαπιστωμένο επίπεδο IFN- $\gamma$



**Εικόνα 7.** Το προφίλ γραμμικότητας της μεθόδου QF-CMV ELISA, όπως προσδιορίστηκε με ανάλυση πέντε επαναλήψεων 11 δειγμάτων πλάσματος με γνωστή συγκέντρωση IFN- $\gamma$ .

Η αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης QF-CMV ELISA υπολογίστηκε με εξέταση 20 δειγμάτων πλάσματος με ποικίλες συγκεντρώσεις IFN- $\gamma$  σε τρεις επαναλήψεις, σε τρία διαφορετικά εργαστήρια, σε τρεις μη διαδοχικές ημέρες και από τρεις χειριστές. Συνεπώς κάθε δείγμα εξετάστηκε 27 φορές σε εννέα ανεξάρτητες σειρές αναλύσεων. Το ένα δείγμα ήταν δείγμα μηδενικού μάρτυρα και είχε υπολογιζόμενη συγκέντρωση IFN- $\gamma$  ίση με 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. Στα υπόλοιπα 19 δείγματα πλάσματος, η κλίμακα συγκεντρώσεων ήταν 0,33 (95% CI 0,31–0,34) έως 7,7 IU/ml (95% CI 7,48–7,92).

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

---

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



# Τεχνικές πληροφορίες

## Απροσδιόριστα αποτελέσματα

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

- Παρέλευση άνω των 16 ωρών μεταξύ της αιμοληψίας και της επώασης στους 37 °C
- Φύλαξη του αίματος εκτός του συνιστώμενου εύρους θερμοκρασίας (22 °C ± 5 °C).
- Ανεπαρκής ανάμειξη των σωληναρίων συλλογής αίματος
- Ατελής έκπλυση της πλάκας ELISA

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

## Θρομβωμένα δείγματα πλάσματος

Εάν σχηματιστούν θρόμβοι ινώδους κατά τη μακροχρόνια φύλαξη των δειγμάτων πλάσματος, φυγοκεντρίστε τα δείγματα ώστε να κατακρημνιστεί το θρομβωμένο υλικό και να διευκολυνθεί η αναρρόφηση του πλάσματος.

# Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, δείτε επίσης τις τεχνικές πληροφορίες που παρέχονται στον ιστότοπο **www.QuantiFERON.com**. Για πληροφορίες επικοινωνίας, δείτε το οπισθόφυλλο.

## Παρατηρήσεις και προτάσεις

### Χαμηλές μετρήσεις οπτικής πυκνότητας με τα πρότυπα

- |                                                                     |                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α) Σφάλμα αραίωσης προτύπου                                         | Βεβαιωθείτε ότι οι αραιώσεις του προτύπου του κιτ παρασκευάζονται σωστά, σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας QF-CMV ELISA.                                                                                                   |
| β) Σφάλμα διανομής με πιπέτα                                        | Βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες βαθμονομούνται και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.                                                                                                                   |
| γ) Πολύ χαμηλή θερμοκρασία επώασης                                  | Η επώαση της ELISA θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).                                                                                                        |
| δ) Πολύ μικρός χρόνος επώασης                                       | Η επώαση της πλάκας με το συζευγμένο μόριο, τα πρότυπα και τα δείγματα θα πρέπει να διαρκεί $120 \pm 5$ λεπτά. Το διάλυμα υποστρώματος ενζύμου επωάζεται στην πλάκα επί 30 λεπτά.                                         |
| ε) Δεν χρησιμοποιήθηκε το σωστό φίλτρο στη συσκευή ανάγνωσης πλακών | Η ανάγνωση της πλάκας θα πρέπει να γίνει στα 450 nm με φίλτρο αναφοράς μεταξύ 620 και 650 nm.                                                                                                                             |
| στ) Υπερβολικά ψυχρά αντιδραστήρια                                  | Όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x, πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού ξεκινήσει ο προσδιορισμός. Για να γίνει αυτό χρειάζεται περίπου 1 ώρα.                            |
| ζ) Το κιτ ή τα συστατικά του έχουν λήξει                            | Βεβαιωθείτε ότι το κιτ θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x θα χρησιμοποιηθούν εντός 3 μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης. |

### Μη ειδική ανάπτυξη χρώματος

- |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α) Ατελής έκπλυση της πλάκας                   | Εκπλύνετε την πλάκα τουλάχιστον έξι φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα. Πιθανόν να χρειαστούν περισσότεροι από έξι κύκλοι έκπλυσης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συσκευή πλύσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας 5 δευτερολέπτων τουλάχιστον μεταξύ των κύκλων. |
| β) Διασταυρούμενη μόλυνση των βυθισμάτων ELISA | Απαιτείται προσοχή κατά τη διανομή με πιπέτα και την ανάμειξη των δειγμάτων ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι.                                                                                                                                                                                    |

### Παρατηρήσεις και προτάσεις

- |    |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                            |
|----|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| γ) | Το κιτ ή τα συστατικά του έχουν λήξει                           | Βεβαιωθείτε ότι το κιτ θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το συμπτύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x θα χρησιμοποιηθούν εντός 3 μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης. |
| δ) | Το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου είναι ακάθαρτο                  | Απορρίψτε το υπόστρωμα εάν παρουσιάζει μπλε χρωματισμό. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιούνται καθαρά δοχεία αντιδραστηρίων.                                                                                                     |
| ε) | Ανάμιξη του πλάσματος στα σωληνάρια φυγοκέντρου πριν τη συλλογή | Φροντίστε να συλλεχθούν με προσοχή τα δείγματα πλάσματος πάνω από τη γέλη, χωρίς παλινδρόμηση του υγρού στην πιπέτα και χωρίς να διαταραχθεί το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.                              |

### Υψηλό υπόβαθρο

- |    |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α) | Ατελής έκπλυση της πλάκας                      | Εκπλύνετε την πλάκα τουλάχιστον έξι φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα. Πιθανόν να χρειαστούν περισσότεροι από έξι κύκλοι έκπλυσης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συσκευή πλύσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας 5 δευτερολέπτων τουλάχιστον μεταξύ των κύκλων. |
| β) | Πολύ υψηλή θερμοκρασία επώασης                 | Η επώαση του ELISA θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).                                                                                                                                                                                   |
| γ) | Το κιτ ή τα συστατικά του έχουν λήξει          | Βεβαιωθείτε ότι το κιτ θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το Συμπτύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x θα χρησιμοποιηθούν εντός 3 μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης.                                                                           |
| δ) | Το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου είναι ακάθαρτο | Απορρίψτε το υπόστρωμα εάν παρουσιάζει μπλε χρωματισμό. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιούνται καθαρά δοχεία αντιδραστηρίων.                                                                                                                                                                               |

### Μη γραμμική πρότυπη καμπύλη και μεταβλητότητα επαναλήψεων

- |    |                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α) | Ατελής έκπλυση της πλάκας                                                                    | Εκπλύνετε την πλάκα τουλάχιστον έξι φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα. Πιθανόν να χρειαστούν περισσότεροι από έξι κύκλοι έκπλυσης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συσκευή πλύσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας 5 δευτερολέπτων τουλάχιστον μεταξύ των κύκλων. |
| β) | Σφάλμα αραίωσης προτύπου                                                                     | Βεβαιωθείτε ότι οι αραιώσεις του προτύπου του κιτ παρασκευάζονται σωστά, σύμφωνα με αυτό το ένθετο συσκευασίας.                                                                                                                                                                                      |
| γ) | Κακή ανάμιξη                                                                                 | Αναμείξτε σχολαστικά τα αντιδραστήρια με αναστροφή ή μαλακή περιδίνηση προτού τα προσθέσετε στην πλάκα.                                                                                                                                                                                              |
| δ) | Ανομοιόμορφη τεχνική αναρρόφησης με πιπέτα ή διακοπή κατά την προετοιμασία του προσδιορισμού | Η προσθήκη δειγμάτων και προτύπων θα πρέπει να γίνεται με συνεχή τρόπο. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να παρασκευάζονται πριν από την έναρξη του προσδιορισμού.                                                                                                                                        |

Πληροφορίες προϊόντων και τεχνικοί οδηγοί διατίθενται δωρεάν από την QIAGEN, μέσω του αντιπροσώπου σας ή μέσω της διεύθυνσης **[www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)**.

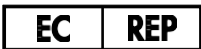
# Βιβλιογραφία

1. Manuel, O., et al. (2013) Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Am. J. Transplant.* 8, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* 9, 1214.
5. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* 82, 433.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8<sup>+</sup> T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

- 
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4<sup>+</sup> T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
  12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
  13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
  14. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 735.
  15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
  16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

# Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση:

| Σύμβολο                                                                                 | Ορισμός συμβόλων                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <br><N> | Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις |
|         | Ημερομηνία λήξης                                        |
|         | Σήμανση CE                                              |
|         | In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν            |
|         | Αριθμός καταλόγου                                       |
|         | Αριθμός παρτίδας                                        |
|         | Αριθμός υλικού                                          |
|         | Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας                        |
|        | Περιορισμός θερμοκρασίας                                |
|       | Μην επαναχρησιμοποιείτε                                 |
|       | Διατηρήστε το προϊόν μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία  |
|       | Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης                       |
|       | Κατασκευαστής                                           |
|       | Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα  |

---

## Στοιχεία επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το κέντρο τεχνικής υποστήριξης στον ιστότοπο **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, καλέστε στο 00800-22-44-6000 ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τον ιστότοπο **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Συνοπτική διαδικασία ανάλυσης ELISA

## Στάδιο 1: Επώαση αίματος

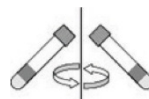
1. Συλλέξτε το αίμα του ασθενούς σε σωληνάρια συλλογής αίματος και αναμείξτε ανακινώντας τα δέκα (10) φορές, αρκετά καλά ώστε να βεβαιωθείτε ότι ολόκληρη η εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου έχει καλυφθεί με αίμα, προκειμένου να διαλυθούν τα αντιγόνα που βρίσκονται στα τοιχώματα του σωληναρίου, αλλά όχι εντονότερα από αυτό.



2. Επώαστε τα σωληνάρια σε κατακόρυφη θέση, στους  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , για 16 έως 24 ώρες.



3. Μετά την επώαση, φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια επί 15 λεπτά σε ταχύτητα 2.000 έως 3.000 RCF (g) για να διαχωρίσετε το πλάσμα από τα ερυθροκύτταρα.



4. Μετά τη φυγοκέντριση, αποφύγετε την παλινδρόμηση του υγρού κατά τη διανομή με πιπέτα και γενικά την ανάδευση του πλάσματος κατ' οποιοδήποτε τρόπο πριν από τη συλλογή. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.



## Στάδιο 2: ΑΝΑΛΥΣΗ ELISA ΓΙΑ ΤΗΝ IFN- $\gamma$

1. Αφήστε τα συστατικά της ELISA, εκτός του συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου  $100\times$ , να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου επί 60 λεπτά τουλάχιστον.





2. Ανασυστήστε το πρότυπο του kit σε συγκέντρωση 8,0 IU/ml με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Παρασκευάστε τέσσερις (4) τυπικές αραιώσεις.



3. Ανασυστήστε το λυόφιλο συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100× με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

4. Παρασκευάστε ένα διάλυμα εργασίας συζευγμένου μορίου σε Πράσινο αραιωτικό και προσθέστε 50 μl σε όλα τα βυθίσματα.



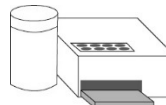
5. Προσθέστε 50 μl των εξεταζόμενων δειγμάτων πλάσματος και 50 μl προτύπων στα κατάλληλα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.



6. Επωάστε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



7. Πλύνετε τα βυθίσματα τουλάχιστον 6 φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ανά βύθισμα.



8. Προσθέστε 100 μl διαλύματος υποστρώματος ενζύμου στα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.



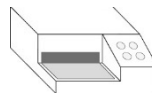
9. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



10. Προσθέστε 50  $\mu$ l διαλύματος διακοπής ενζυμικής αντίδρασης σε όλα τα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.



11. Διαβάστε τα αποτελέσματα στα 450 nm, με φίλτρο αναφοράς στα 620 έως 650 nm



12. Αναλύστε τα αποτελέσματα.



# Ιστορικό αναθεώρησης εγχειριδίου

| Έγγραφο      | Αλλαγές                                                                           | Ημερομηνία     |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| L1075110-R06 | Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται, προστέθηκαν καλύμματα πλακών, σελίδα 9 | Οκτώβριος 2019 |

---

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

---

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group), Excel®, Microsoft® (Microsoft), ProClim® (Rohm and Haas Co.), SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το QuantiFERON-CMV ELISA

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

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο σετ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε στοιχεία που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Ορισμένα από αυτά τα συμπληρωματικά πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες προϊόντων QIAGEN για χρήστες προϊόντων QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από τη QIAGEN. Η QIAGEN δεν παρέχει εγγυήσεις για αυτά και δεν παρέχει καμία διασφάλιση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.

2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το σετ ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.

3. Αυτό το σετ και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η επανепπεξεργασία, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.

4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.

5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του σετ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τυχόν ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιώνεται για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιαδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας σχετικής με το σετ ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας χρήσης, ανατρέξτε στον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2019 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

