

2019. október

QuantiFERON[®]-CMV ELISA kézikönyv



A humán citomegalovírus peptidantigénjeire adott gamma-interferon (IFN- γ) választ mérő teljesvér-teszt



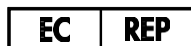
In vitro diagnosztikai használatra



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NÉMETORSZÁG

1075110 06. átdolg.



www.QuantiFERON.com

Tartalom

Alkalmazási terület	5
Összefoglaló és magyarázat	5
Az eljárás elve	6
Az assay elvégzéséhez szükséges idő	7
Szállított anyagok	8
A kit tartalma	8
Szükséges, de nem biztosított anyagok	9
Figyelmeztetések és óvintézkedések	9
Biztonsági információk	11
A reagensek tárolása és kezelése	12
Mintavétel és mintakezelés	13
Eljárás	15
1. fázis: A vér inkubálása és a plazma elválasztása	15
2. fázis: QuantiFERON-CMV ELISA humán IFN- γ teszt.....	16
Számítások és a teszt értelmezése	21
Standard görbe létrehozása (ha nem használják a QF-CMV elemzőszoftvert).....	21
A teszt minőség-ellenőrzése	22
Az eredmények értelmezése	23
Korlátozások.....	24
Várható értékek	24
Teljesítményjellemzők	27
Klinikai teljesítmény.....	27
Az assay küszöbértéke	28

Klinikai vizsgálatok	28
Specifititás	28
Érzékenység	29
A klinikai hasznosságot kiemelő tanulmányok	29
Szolid szervtranszplantáltak citomegalovírusos eseteinek kezelésére vonatkozó közös nemzetközi irányelvek.....	34
Az assay teljesítményjellemzői	35
Technikai tudnivalók	37
Nem eldönthető eredmények	37
Alvadt plazmaminták	37
Hibaelhárítási útmutató.....	38
Irodalomjegyzék	40
Szimbólumok.....	42
Kapcsolatfelvételi adatok.....	43
Rövidített ELISA teszteljárás	44
1. fázis: A vér inkubálása	44
2. fázis: IFN- γ ELISA	44
A kézikönyv átdolgozási előzményei	47

Alkalmazási terület

A QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) olyan in vitro assay, amely humán citomegalovírus (CMV) fehérjéket szimuláló peptidkeverékkel stimulálja a sejteket heparinizált teljes vérben. A gamma-interferon (IFN- γ) enzimkötött immunszorbens assay-vel (ELISA) végzett kimutatása a CMV-fertőzés által kiváltott immunválasz, azaz a peptidantigénekre adott in vitro válaszok mennyiségi kiértékelésére szolgál. Ennek az immunválasznak a hiánya CMV-megbetegedés kialakulását jelezheti. A QF-CMV a beteg CMV elleni immunitásának vizsgálatára szolgál.

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

Összefoglaló és magyarázat

A CMV olyan herpeszvírus, amely a felnőtt lakosság 50–85%-át megfertőzi. A főként transzplantációt követően alkalmazott immunszuppresszió gyakori szövődménye, és jelentősen hozzájárulhat a transzplantáltak morbiditásához és mortalitásához. A transzplantátum kilökődésének megakadályozására jelenleg alkalmazott immunszuppressziós eljárások hátrányosan hatnak a T-limfocitákra és a sejtmédiált (cell-mediated immune response, CMI) immunválaszra, ezzel fokozva a transzplantáltak vírusfertőzések iránti fogékonyságát. A T-sejteknek a CMV replikációját gátló hatását az teszi különösen fontossá, hogy a CD8⁺ CMV-specifikus citotoxikus T-limfociták (CTL) védelmet nyújthatnak a vírusos kórfejlődés ellen. Az immunszuppresszió átesett betegek CD8⁺ CMV-specifikus CTL-jeinek és IFN- γ -termelődésének mennyiségi elemzése alkalmas lehet a CMV-fertőzés kialakulási kockázatának előjelzésére. Az IFN- γ -termelődés vizsgálata helyettesítheti a CMV-specifikus CTL-ek azonosítását.

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

Az eljárás elve

A QF-CMV teszt két fázisú. Először teljes vért kell levenni a QF-CMV mindhárom vérévételi csővébe: a nullkontrollcsőbe, a CMV-antigéncsőbe és a mitogéncsőbe.

A mitogéncső a QF-CMV teszt pozitív kontrolljaként szolgál. Ennek különösen akkor lehet jelentősége, ha a beteg immunstátusza bizonytalan. A mitogéncső továbbá a helyes vérkezelés és inkubálás kontrolljára is alkalmas.

A csöveket a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérévételtől számított 16 órán belül inkubálni kell 37 °C-on. A 16–24 órás inkubálást a csövek centrifugálása és a plazma eltávolítása követi, ezután történik az IFN- γ (IU/ml) mennyiségének mérése a QF-CMV ELISA teszttel.

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

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

A teszt akkor tekinthető reaktívnek az IFN- γ -válasz szempontjából, ha a CMV-antigéncső által mért érték jelentősen meghaladja a nullkontroll IFN- γ IU/ml értékét. A mitogénstimulált plazmaminta minden egyes vizsgált minta esetén az IFN- γ pozitív kontrolljaként szolgál. A gyenge mitogénreakció nem eldönthető eredményt jelent, ha a vérminta CMV-antigénekre adott válasza nem reaktív. Ilyen eredményt akkor kaphatunk, ha elégtelen a limfociták száma, helytelen mintakezelés miatt gyenge a limfocitatevékenység, hibásan töltötték vagy keverték a mitogéncsövet, illetve ha a beteg limfocitái nem tudnak IFN- γ -t előállítani, például nemrégiben transzplantált betegek esetén. A nullminta a vérben jelenlévő háttérérték, illetve nem specifikus IFN- γ -érték kompenzálására szolgál. A nullcső IFN- γ -szintjét ki kell vonni a CMV-antigéncső és a mitogéncső IFN- γ -értékéből (a QF-CMV eredményének értelmezését a jelen kézikönyv 23. oldalán található „Az eredmények értelmezése” című rész ismerteti).

Az assay elvégzéséhez szükséges idő

A QF-CMV assay elvégzéséhez szükséges becsült idő, valamint a több minta egyidejű teszteléséhez szükséges idő alább látható:

A vért tartalmazó csövek inkubálása

37 °C-on:

16–24 óra

ELISA:

Egy ELISA-lemez esetén kb. 3 óra

1 munkaóránál kevesebb

Minden további lemezre újabb 10–15 percet kell számolni

Szállított anyagok

A kit tartalma

Vérvételi csövek (egy beteg számára)	
Katalógusszám	0192-0301
Elvégezhető preparálások száma	1
QuantIFERON nullkontroll (szürke kupak)	1 cső
QuantIFERON CMV antigén (kék kupak)	1 cső
QuantIFERON mitogénkontroll (lila kupak)	1 cső
QF-CMV vérvételi csövek terméktájékoztatója	1

QuantIFERON-CMV ELISA		2 lemezes ELISA kit
Katalógusszám		0350-0201
Mikrolemezcsíkok (12 × 8 cella) egér antihumán IFN-γ monoklonális antitesttel bevonva		2 készlet 12 × 8 cellás mikrolemezcsík
Humán IFN-γ standard, liofilizált; (tartalma: rekombináns humán IFN-γ, szarvasmarha-kazein, 0,01% [m/V] tiomerzál)		1 db üveg (8 IU/ml feloldás után)
Green Diluent (Zöld hígító) (tartalma: szarvasmarha kazein, normál egérszérum, 0,01% [m/V] tiomerzál)		1 × 30 ml
Konjugátum 100× koncentrátum, liofilizált (egér antihumán IFN-γ-HRP, 0,01% [m/V] tiomerzált tartalmaz)		1 × 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Mosópuffer 20× koncentrátum) (pH 7,2; 0,05% [V/V] ProClin® 300-at tartalmaz)		1 × 100 ml
Enzimszubsztrátoldat (tartalma: H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametil-benzidin)		1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimleállító oldat) (tartalma: 0,5 M H ₂ SO ₄)*		1 × 15 ml
QF-CMV ELISA terméktájékoztató		1

* Kénsavat tartalmaz. Az óvintézkedéseket lásd a 9. oldalon.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheet, SDS) tartalmaznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

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

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai használatra

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS) tartalmazzák. Ezek online elérhetők kényelmes és kompakt PDF formátumban a **www.qiagen.com/safety** oldalon, ahol minden QIAGEN® kit és a azok összetevőinek SDS-e megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható.

FIGYELEM

Az emberi vér kezelése fertőzésveszéllyel jár. Be kell tartani a vonatkozó vérmintakezelési előírásokat.

A QuantiFERON-CMV ELISA kit összetevőire az alábbi H (figyelmeztető) és P (óvintézkedésre vonatkozó) mondatok vonatkoznak.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Kénsavat tartalmaz. Vigyázat! Fémekre korrozív hatású lehet. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Vigyázat! Enyhén bőrirritáló hatású. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

QuantiFERON Green Diluent

Trinátrium 5-hidroxi-1-(4-szulfopenil)-4-(4-szulfopenilazo)pirazol-3-karboxilátot tartalmaz. Tartrazint tartalmaz. Vigyázat! Allergiás bőrreakciót válthat ki. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Tartalmazott anyag: ProClin 300. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz. Ne hagyja, hogy kijusson a környezetbe.

Biztonsági információk

További információk

- A QF-CMV terméktájékoztatótól való bármilyen eltérés hibás eredményt okozhat. Használat előtt figyelmesen olvassa el az utasításokat.
- Sérültnek tűnő vagy szivárgó reagenspalackot tartalmazó kitet nem szabad használni.
- **Fontos:** Használat előtt vizsgálja meg az üvegeket. Ne használja a konjugátumot vagy IFN- γ standardot tartalmazó üvegeket, ha azokon sérülés jeleit látja, vagy ha a gumi záróelemük sérült. Ne fogja meg a törött üvegeket. Tegye meg a megfelelő biztonsági óvintézkedéseket az üvegek biztonságos hulladékkezeléséhez.

Javaslat: A konjugátumot és IFN- γ standardot tartalmazó üvegek felbontásához használjon kupaknyitót a perforált fémkupak okozta sérülések kockázatának minimalizálása érdekében.

- Nem engedélyezett a különböző QF-CMV tételszámú kitekbe tartozó mikrolemezcsíkok, humán IFN- γ standardok, zöld hígítók, illetve konjugátum 100× koncentrátumok vegyes felhasználása, illetve összekeverése. A többi reagens (a mosópuffer 20× koncentrátum, enzimszubsztrátoldat és enzimleállító oldat) különböző kitekből vegyesen is használható a reagensek lejáratí idején belül, ha a sarzsszámokat feljegyzik.
- A fel nem használt reagensek és biológiai minták hulladékkezelését a helyi tagállami és uniós előírások szerint kell végezni.
- A QF-CMV vérvételi csöveket és QF-CMV ELISA kiteket nem szabad felhasználni a lejáratí időn túl.
- Gondoskodjon a laboratóriumi berendezések, például a lemezmosók és -olvasók kalibrálásáról és validálásáról.

A reagensek tárolása és kezelése

Vérvételi csövek

- A QF-CMV vérvételi csöveket 4–25 °C között kell tárolni.
- A vérvételkor a QF-CMV vérvételi csövek hőmérsékletének 17–25 °C között kell lennie.
- A QF-CMV vérvételi csövek eltarthatósági ideje 4–25 °C közötti tárolás esetén a gyártástól számított maximum 15 hónap.

Az ELISA kit reagensei

- Tárolás 2–8 °C között.
- Az enzimszubsztrátoldatot mindig napfénytől védett helyen kell tartani.

Feloldott és maradék reagensek

A reagensek feloldási útmutatójáért lásd „2. fázis: QuantiFERON-CMV ELISA humán IFN- γ teszt” (3. és 5. lépés a 16. és 18. oldalon).

- A feloldott humán IFN- γ standard 2–8 °C között tárolva legfeljebb 3 hónapig tárolható. Jegyezze fel a humán IFN- γ standard feloldásának dátumát.
- A maradék feloldott konjugátum 100× koncentrátumot vissza kell hűteni 2–8 °C-os tárolási hőmérsékletre, és 3 hónapon belül fel kell használni. Jegyezze fel a konjugátum feloldásának dátumát.
- A készre hígított konjugátumot elkészítése után 6 órán belül fel kell használni.
- A készre hígított mosópuffer szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C) legfeljebb 2 hétig tárolható.

Mintavétel és mintakezelés

A QF-CMV teszt az alábbi vérvételi csöveket alkalmazza:

- Nullkontroll (szürke kupak)
- CMV antigén (kék kupak)
- Mitogénkontroll (lila kupak)

Az antigének a vérvételi csövek belső falán, szárítva találhatók, ezért fontos, hogy a csövek tartalma teljesen összekeveredjen a vérrel. A csöveket a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül 37 °C-os inkubátorba kell helyezni.

Az optimális eredmények érdekében az alábbi eljárást kell követni:

1. Vegyen le alanyonként 1 ml vénás vért közvetlenül az egyes QF-CMV vérvételi csövekbe. Ezt az eljárást vérvételre kiképzett személynek kell végeznie.

A QF-CMV vérvételi csöveket 810 méteres tengerszint feletti magasságig lehet használni.

Ha a QF-CMV vérvételi csövek használata 810 méter feletti magasságon történik, illetve ha nem lehet elegendő vért levenni, fecskendővel is lehet végezni a vérvételt; ekkor a levett vérből 1 ml-t azonnal át kell helyezni a három cső mindegyikébe. Biztonsági okokból ennek legjobb módja, ha először eltávolítja a fecskendő tűjét, leveszi a három QF-CMV vérvételi cső kupakját, majd betölt a csövekbe 1-1 ml vért (a cső oldalán található fekete jelzésig). A csövek kupakját gondosan vissza kell zárni, majd az alábbi módon keverést kell végezni. Mivel az 1 ml-es csövek a vért viszonylag lassan veszik fel, a cső látszólagos telítődése után még 2-3 másodpercig tartsa a csövet a tűn, hogy biztosan meglegyen a megfelelő mennyiség.

Az 1 ml-es töltési mennyiséget a cső oldalán feltüntetett fekete jelzés mutatja. A QF-CMV vérvételi csövek névleges térfogattartománya 0,8–1,2 ml. Ha bármely csőben a vér nem közelíti meg a jelzést, új vérmintát kell venni.

Ha a vérvétel szárnyas tűvel történik, akkor a QF-CMV vérvételi csövek megtöltése előtt egy hajlékony cső előtöltése szükséges, hogy a levett vér mennyisége biztosan elegendő legyen.

A másik lehetőség, hogy a vért egy általános, antikoagulánsként lítium-heparint tartalmazó vérvételi csőbe veszik le, és innen töltik át a QF-CMV vérvételi csövekbe. Csak lítium-heparin használható a vérben antikoagulánsként, mivel más antikoagulánsok zavart okoznak az assay-ben. Töltsön fel egy vérvételi csövet (minimum 5 ml mennyiséggel), és a cső többszöri átfordításával oszlassa el benne a heparint. Ezt az eljárást vérvételre kiképzett személynek kell végeznie. A vért szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C-on) kell tárolni addig, amíg a QF-CMV vérvételi csövekbe nem töltik inkubálásra; az inkubálást feltétlenül meg kell kezdeni a vérvételt követő 16 órán belül.

2. Közvetlenül a QF-CMV vérvételi csövek megtöltése után rázza meg a csöveket 10 alkalommal elég erősen ahhoz, hogy a csövek teljes belső felszínére jusson vér, és így leoldja a csőfalon található antigéneket.

A vérvételi csöveknek feltöltéskor $17-25$ °C közötti hőmérsékletűnek kell lenniük.

A túlságosan erős rázás a gél felszakadását okozhatja, és helytelen eredményekhez vezethet.

Ha a vérvétel lítium-heparinos csőbe történt, a mintát a QF-CMV vérvételi csövekbe áttöltés előtt egyenletesen fel kell keverni. Közvetlenül az áttöltés előtt óvatos átfordításokkal gondoskodjon róla, hogy a csövekben a vér alaposan fel legyen keverve. Töltsön (QF-CMV vérvételi csőenként egy-egy) pontosan 1 ml-es mennyiséget a megfelelő null-, CMV-antigén és mitogéncsőbe. Ehhez aszeptikus technikát kell alkalmazni, a megfelelő biztonsági eljárásokat betartva. Távolítsa el mindhárom QF-CMV vérvételi cső kupakját, majd töltsön mindegyikbe 1 ml vért (a cső oldalán található fekete jelzésig). A csövek kupakját gondosan vissza kell zárni, majd a fenti módon fel kell keverni tartalmukat.

3. Feliratozza a csöveket a tartalmuknak megfelelően.

Gondoskodjon róla, hogy az egyes csövek (null, CMV-antigén, mitogén) a címkéjük alapján vagy más módon azonosíthatók legyenek.

4. A feltöltést, felrázást és címkézést követően a csöveket a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül 37 ± 1 °C-os inkubátorba kell helyezni. Az inkubálásig a csöveket szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C-on) kell tartani. A vérmintákat nem szabad hűteni vagy fagyasztani.

Eljárás

1. fázis: A vér inkubálása és a plazma elválasztása

1. A csöveket ÁLLÍTVA, 37 ± 1 °C hőmérsékleten kell inkubálni 16–24 órán keresztül. Inkubáláskor sem CO₂, sem párasítás nem szükséges.

Fontos: Ha a vért nem azonnal a levételt követően inkubálják, a csöveket az inkubálás előtt 10-szer átfordítva újra kell keverni.

Inkubálás után és centrifugálás előtt a vérévételi csövek 4–27 °C között legfeljebb 3 napig tárolhatók.

2. A 37 °C-on történő inkubálás után a csöveket a plazma elválasztása céljából 2000–3000 RCF (g) fordulatszámon 15 percig kell centrifugálni. A szeparátor gél elkülöníti a sejteket a plazmától. Ha ez nem történik meg, a csöveket újra kell centrifugálni.

A plazma centrifugálás nélkül is elválasztható, de ilyenkor fokozottan ügyelni kell arra, hogy közben a vérsejtek ne keveredjenek fel.

3. A centrifugálás és az elválasztás között el kell kerülni a plazma felkeverését a pipetta fel-le mozgásával vagy bármilyen más módon. A teljes eljárás során meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.

Fontos: A plazmát csak pipettával szabad elválasztani.

A plazmaminták közvetlenül áttölthetők a centrifugált vérévételi csövekből a QF-CMV ELISA lemezre, automatikus ELISA munkaállomás használata esetén is.

A plazmaminták a centrifugált QF-CMV vérévételi csövekben 2–8 °C között legfeljebb 28 napig, elválasztva –20 °C alatt (lehetőség szerint –70 °C alatt) hosszú ideig tárolhatók.

Megfelelő tesztmintát legalább 150 µl plazma elválasztásával lehet nyerni.

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

Az ELISA elvégzéséhez szükséges anyagokhoz lásd: „A kit tartalma” (8. oldal) és „Szükséges, de nem biztosított anyagok” (9. oldal).

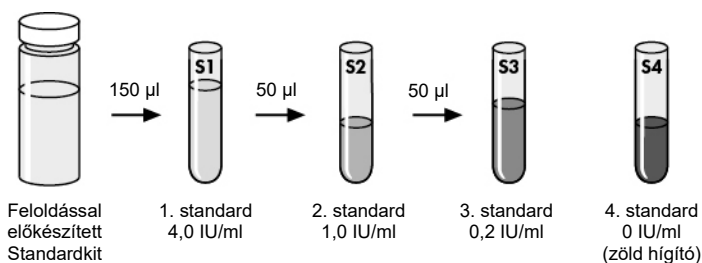
1. Felhasználás előtt minden plazmamintát és a konjugátum 100× koncentrátum kivételével minden reagenst szobahőmérsékletre (22 ± 5 °C-ra) kell hozni. Legalább 60 percet kell hagyni a hőkiegyenlítődéssre.
2. Vegye ki a keretből a nem szükséges ELISA lemezcsíkokat, ezeket zárja vissza a fóliatasakba, majd felhasználásig helyezze vissza a hűtött tárolóba.
Legalább egy csíkkal számoljon a QF-CMV ELISA standardokhoz, plusz a vizsgált betegek számának megfelelő számú csíkkal. Használat után a többi csík számára őrizze meg a keretet és a fedelet.
3. Oldja fel a Humán IFN- γ standardot az üveg címkéjén feltüntetett mennyiségű ioncserélt vagy desztillált vízzel. Óvatosan, minimális habképződéssel keverje fel a standardot, amíg teljesen fel nem oldódik. Az IFN- γ standard megadott térfogatra történő feloldása 8,0 IU/ml koncentrációjú oldatot képez.

Megjegyzés: A (kitben lévő) humán IFN- γ standard feloldási térfogata tételenként eltér.

A feloldott standard alkalmazásával készítsen zöld hígítóval (Green Diluent, GD) négy IFN- γ -koncentrációból álló hígítási sorozatot (1. ábra, következő oldal). Az S1 (1. standard) koncentrációja 4,0 IU/ml, az S2 (2. standard) koncentrációja 1,0 IU/ml, az S3 (3. standard) koncentrációja 0,25 IU/ml, az S4 (4. standard) koncentrációja pedig 0 IU/ml (csak GD). A standardokat legalább két párhuzamossal kell tesztelni. Minden ELISA munkamenethez friss hígítást kell készíteni a kitben lévő standardból.

Példa a két párhuzamossal mért standardoknál alkalmazott eljárásra

Példa a két párhuzamossal mért standardoknál alkalmazott eljárásra	
A	Címkézzzen fel négy csövet: S1, S2, S3, S4
B	Töltsön 150 µl GD-t az S1, S2, S3 és S4 csőbe
C	Töltsön 150 µl-t a kitben lévő standardból az S1 csőbe, és alaposan keverje össze
D	Töltsön át 50 µl-t az S1-ből az S2 csőbe, és alaposan keverje össze
E	Töltsön át 50 µl-t az S2-ből az S3 csőbe, és alaposan keverje össze
F	A GD szolgál magában nullstandardként (S4)



1. ábra. A standard görbe elkészítése hígítási sorozattal.

- Oldja fel a liofilizált konjugátum 100× koncentrátumot 0,3 ml ioncserélt vagy desztillált vízzel. Óvatosan, minimális habképződéssel keverje fel a konjugátumot, amíg teljesen fel nem oldódik.

A konjugátum készre hígításához hígítsa fel a kívánt mennyiségű feloldott konjugátum 100× koncentrátumot zöld hígítóval (lásd 1. táblázat, következő oldal).

Keverje fel alaposan, de óvatosan, hogy ne habosodjon fel.

Az esetleg megmaradó konjugátum 100× koncentrátumot azonnal vissza kell hűteni 2–8 °C-ra.

Csak zöld hígítót használjon.

1. táblázat. A konjugátum készre hígítása

Csík száma	Konjugátum 100× koncentrátum mennyisége	Zöld hígító mennyisége
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. A vérvételi csövekből elválasztott, majd lefagyasztott vagy az assay előtt 24 óránál hosszabb ideig tárolt plazmamintákat az ELISA lyukakba töltés előtt alaposan fel kell keverni.

Fontos: A közvetlenül a centrifugált QF-CMV vérvételi csövekből áttöltött plazmaminták esetén el kell kerülni a plazma felkeveredését. Mindig ügyeljen arra, hogy a gél felszínén lévő anyag ne sérüljön.

6. Ha kvantitatív eredményekre van szükség, a CMV- és mitogéncsőben lévő plazmát 1/10 arányban hígítsa zöld hígítóval (10 µl plazma + 90 µl GD). A nullplazmát nem kell hígítani.

Az alábbi mintákat párhuzamosan ajánlott tesztelni:

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

A QuantiFERON-CMV elemzőszoftver azonban az alábbi mintabeállításokat is támogatja:

Nullminta, CMV-antigén, mitogén

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

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

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

7. Többcsatornás pipetta segítségével mérjen be 50 µl frissen készre hígított konjugátumot a megfelelő ELISA cellákba.
8. Mérjen be 50 µl vizsgálandó plazmamintát a megfelelő cellákba. Végül mérjen be 50 µl-t 1-től 4-ig az összes standardból a megfelelő cellákba. A standardokat legalább két párhuzamossal kell tesztelni.
9. Fedje le az ELISA lemezt, és keverje össze alaposan a konjugátumot és a plazmamintákat/standardokat mikrolemezrázóval 1 percen át 500 és 1000 rpm között. Kerülje a minták kifröccsenését.
10. Fedje le az ELISA lemezt, és inkubálja szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C-on) 120 ± 5 percen át.

A lemezeket inkubálás alatt nem érheti közvetlen napfény. A megadott hőmérséklet-tartománytól való eltérés hibás eredményekhez vezethet.

11. Az inkubálás alatt hígítsa készre a mosópuffert. Ehhez hígítson egy rész mosópuffer $20\times$ koncentrátumot 19 rész ioncserélt vagy desztillált vízzel, és keverje fel alaposan.
A kit 2 liter készre hígított mosópuffer elkészítéséhez elegendő mosópuffer $20\times$ koncentrátumot tartalmaz.

12. Az ELISA lemez inkubálásának befejezése után mossa a cellákat 400 µl készre hígított mosópufferrel legalább hat cikluson keresztül. Automatikus lemezmosó használata ajánlott.

Fontos: Az assay megfelelő működéséhez nagyon fontos az alapos mosás. Ügyeljen arra, hogy minden cella színültig telítődjön a mosópufferrel minden mosási ciklusban. Ajánlott egy legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között.

A szennyvíztartályba normál laboratóriumi fertőtlenítőszert kell tölteni, és a potenciálisan fertőző anyagot a szabályos eljárások szerint fertőtleníteni kell.

13. A maradék mosópuffer eltávolításához a lemezeket lefordítva nedvszívó, szálintentes kendőre kell ütogetni. Mérjen be 100 µl enzimszubsztrátoldatot minden cellába, fedje le a lemezt, és végezzen alapos keverést mikrolemezrázóval 1 percen keresztül, 500 és 1000 rpm között.
14. Fedje le az összes lemezt, és inkubálja őket szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C-on) 30 percen át. A lemezeket inkubálás alatt nem érheti közvetlen napfény.

-
15. A 30 perces inkubálást követően adjon 50 µl enzimleállító oldatot mindegyik cellához ugyanabban a sorrendben, mint amilyenben a szubsztrátot hozzáadta, és végezzen alapos keverést mikrolemezrázóval, 500 és 1000 rpm között.
 16. A reakció leállítását követő 5 percen belül mérje meg az összes lyukban az optikai denzitás (OD) értékét egy 450 nm-es szűrőjű és 620–650 nm-es referenciaszűrőjű mikrolemezolvasóval. A teszteredményeket az OD-értékekből lehet kiszámolni.

Számítások és a teszt értelmezése

A nyers adatok elemzésére és az eredmények kiszámítására szolgáló QuantiFERON-CMV elemzőszoftver letölthető a QIAGEN webhelyéről: **www.QuantiFERON.com**. Ügyeljen rá, hogy mindig a QF-CMV elemzőszoftver legfrissebb verzióját használja.

A szoftver „Az eredmények értelmezése” című fejezetben (23. oldal) leírtak szerint elvégezni az assay minőségi felülvizsgálatát, létrehozza a standard görbét, és kiszámítja az egyes alanyok teszteredményét. A szoftver a QF-CMV ELISA teszt mérési tartományába eső eredményt adó legkisebb hígítást leletezi a hígítási arány figyelembevételével.

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

Standard görbe létrehozása (ha nem használják a QF-CMV elemzőszoftvert)

Határozza meg minden lemeznél a kitben található standardok párhuzamosainak átlag OD értékét.

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

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

Ezeket a számításokat a mikrolemez-olvasóhoz tartozó szoftvercsomagokkal, valamint hagyományos táblázatkezelő vagy statisztikai szoftverekkel (például Microsoft® Excel®) is el lehet végezni. Ajánlatos ezeket a csomagokat használni a regresszióanalízis, valamint a standardokra vonatkozó variációs koefficiens (%CV) és a standard görbe korrelációs együtthatójának (r) kiszámításához.

A leletezett eredmény alapjául a QF-CMV ELISA teszt mérési tartományába eső eredményt adó legalacsonyabb hígítást kell felhasználni, és szükség esetén ügyelni kell a hígítási arány figyelembevételére.

A teszt minőség-ellenőrzése

A teszteredmények pontossága a standard görbe pontosságától függ. Ezért a mintaeredmények értelmezését megelőzően ellenőrizni kell a standardokból származó eredményeket.

Az ELISA teszt érvényességének feltételei:

- Az 1. standardra vonatkozó OD átlagnak $\geq 0,600$ értékűnek kell lennie.
- Az 1. és 2. standard párhuzamosainak OD értékéhez tartozó %CV $< 15\%$ lehet.
- A 3. és 4. standard párhuzamosainak OD értéke nem mutathat 0,040 optikai denzitási egységnél nagyobb szórást az átlagértéktől.
- A standardok átlagos abszorpciós értékéből számított korrelációs együtthatónak (r) $\geq 0,98$ értékűnek kell lennie.

A QF-CMV elemzőszoftver kiszámítja ezeket a minőség-ellenőrzési paramétereket, és jelentést készít róluk. Ha a fenti követelmények nem teljesülnek, akkor a teszt érvénytelen, és meg kell ismételni.

A nullstandardhoz (zöld hígító) tartozó átlag OD-érték $\leq 0,150$ lehet. Ha az átlag OD érték $> 0,150$, akkor a lemezmosási munkafolyamatot felül kell vizsgálni.

Az eredmények értelmezése

A QuantiFERON-CMV eredményeinek értelmezését a 2. táblázat szereplő kritériumok határozzák meg.

2. táblázat. A QuantiFERON-CMV eredmények értelmezése

Nullérték (IU/ml)	CMV mínusz nullminta (IU/ml)	Mitogen mínusz nullérték (IU/ml)*	QF-CMV eredmény	Jelentés/értelmezés
≤ 8,0	≥ 0,20 és legalább a nullérték 25%-a	Bármilyen	Reaktív [†]	CMV elleni immunitás észlelhető
	< 0,20 VAGY ≥ 0,20 és kisebb a nullérték 25%-ánál	≥ 0,5	Nem reaktív	CMV elleni immunitás NEM észlelhető
		< 0,5	Nem eldönthető [‡]	Az eredmények alapján a CMV-reakció jelenléte nem állapítható meg
> 8,0 [§]	Bármilyen	Bármilyen	Nem eldönthető [‡]	Az eredmények alapján a CMV-reakció jelenléte nem állapítható meg

* A mitogén pozitív kontrollra kapott értékek gyakran (és a CMV antigénnél időnként) meghaladják a mikrolemez-olvasó mérési tartományát. Ez a teszteredményeket nem befolyásolja.

[†] Ha nem áll fenn citomegalovírus fertőzés gyanúja, az először kapott pozitív eredményeket meg lehet erősíteni az eredeti plazmaminták két párhuzamosának a QF-CMV ELISA teszttel végzett ismételt vizsgálatával. A vizsgált személyt akkor lehet reaktívnak tekinteni, ha az ismételt teszteléskor legalább az egyik párhuzamos pozitív.

[‡] A lehetséges okokért lásd: „Hibaelhárítási útmutató” (38. oldal).

Klinikai vizsgálatok (1) során a szolid szervtranszplantáltaknál klinikailag relevánsnak mutatkozott a nem eldönthető eredmény, amelyben a donor CMV-reaktív, de a mitogénkontroll 0,5 IU/ml alatt van. Ezeknél a betegeknél a legnagyobb a CMV kialakulásának kockázata.

[§] A klinikai vizsgálatokban az alanyoknak kevesebb mint 0,25%-ánál volt a nullérték > 8,0 IU/ml IFN-γ.

Megjegyzés: A mért IFN-γ szintet a klinikai tünetekkel, körelőzménnyel és más diagnosztikai értékelésekkel együtt kell használni a CMV-antigénekre adott immunválasz felméréséhez. A QF-CMV nem a CMV-fertőzés megállapítására szolgáló teszt, és nem szabad a CMV-fertőzés kizárására használni.

Korlátozások

A QuantiFERON-CMV teszt eredményeit az alanyok epidemiológiai kórtörténetét, aktuális egészségi állapotát és az egyéb diagnosztikai értékeléseket figyelembe véve kell felhasználni.

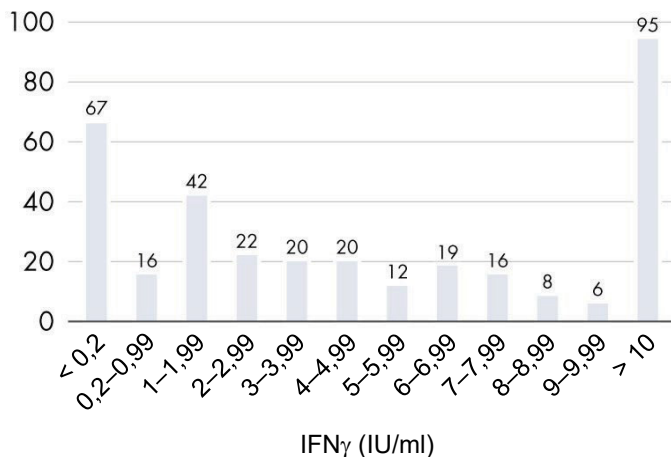
Megbízhatatlan vagy nem eldönthető eredményt okozhatnak a következők:

- A QuantiFERON-CMV ELISA terméktájékoztató által ismertetett eljárástól való eltérés
- Túl magas IFN- γ -érték a kontrollcsőben
- 16 óránál hosszabb idő a vérvétel és a 37 °C-os inkubálás között.

Várható értékek

A QuantiFERON-CMV alkalmazásával várható IFN- γ -értékek meghatározása 591 egészséges alanytól származó minta vizsgálatával történt. 343 minta lett a CMV IgG-re szeropozitív, és 248 minta lett szeronegatív. A CMV-szerológiai állapot a QF-CMV-tesztelés időpontjában ismeretlen volt. A CMV-szeronegatív alanyok 248 mintájából a vizsgált minták 100%-a (248/248) nem reaktív volt a QF-CMV ELISA teszttel vizsgálva, azaz az IFN- γ -válaszok értéke $< 0,2$ IU/ml volt a CMV-antigéncsőben (a nullértéket kivonva). A 343 CMV-szeropozitív alany CMV-antigéncsőben mért IFN- γ -válaszainak eloszlása (nullértékkel kisebbitve) a 2. ábra látható.

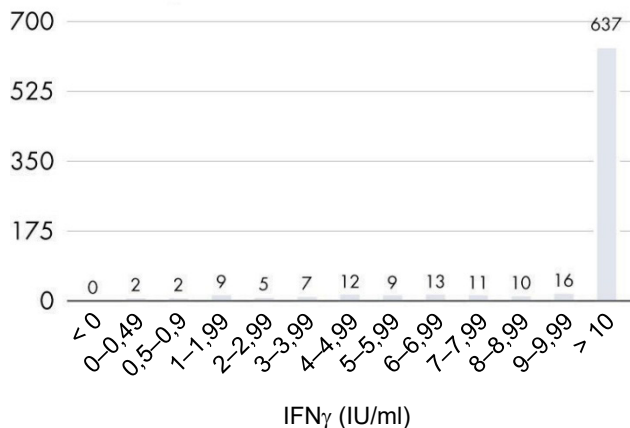
Mintas szám



2. ábra. A QF-CMV IFN- γ -válaszok eloszlása (nullértéket kivonva) szeropozitív egészséges alanyokban (n = 343).

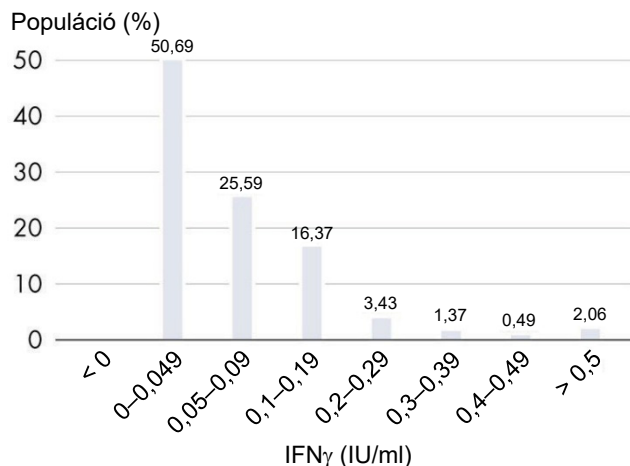
A mitogénre adott IFN- γ -válaszok eloszlását (nullértéket kivonva) 733 egészséges felnőtt alany mintája alapján állapították meg a QF-CMV ELISA használatával, a CMV IgG szerológia figyelmen kívül hagyásával (3. ábra). A 0,5 IU/ml alatti mitogéneredmény (nullértékkel kisebbítve) sikertelen tesztre vagy károsodott immunrendszerű alanyra utal. Az egészséges népességben 733 eredményből csak 2 esett ebbe a kategóriába.

Mintaszám



3. ábra. A mitogénre adott IFN- γ -válaszok eloszlása (nullértéket kivonva) egészséges alanyokban (n = 733).

A nullcsövekben mért IFN- γ -válaszok eloszlását 1020 egészséges alany plazmamintája alapján állapították meg a QF-CMV ELISA használatával, a CMV IgG szerológia figyelmen kívül hagyásával (4. ábra).



4. ábra. A null IFN- γ -válaszok eloszlása egészséges alanyokban (n = 1020), a populáció százalékában kifejezve.

Teljesítményjellemzők

Klinikai teljesítmény

A korábbi CMV-expozíció QF-CMV tesztnél alkalmazható kimutatási küszöbértékének meghatározásához egy egészséges alanyokból álló csoport (n = 223) eredményeit elemezték úgy, hogy a QF-CMV eredményeket összevetették a CMV IgG szerológiai eredményekkel. Az ROC-elemzés kimutatta, hogy a tesztnél a 0,04 IU/ml küszöbérték (a nullérték kivonása után) optimális pozitív és negatív érték-előjelzést adott a QF-CMV vonatkozásában (görbe alatti terület = 0,9679 [95%-os CI: 0,9442–0,9915, p < 0,0001]), ezáltal olyan küszöbértéket képvisel, amely mellett egészséges populációban az assay a leghatékonyabban felelt meg tervezett felhasználásának.

A QF-CMV assay teljesítményét a SeraQuest™ CMV IgG-szerológiai teszttel (Quest International) vetették össze. A QF-CMV assay 95%-os (294/310 egyén) egyezést mutatott a CMV IgG szerológiai teszttel egészséges alanyoknál, és a 149 szeronegatív donor közül egy sem mutatott reaktív eredményt a QF-CMV assay-vel. A 161 szeropozitív donor közül 145 mutatott reaktív QF-CMV-választ. Az összesített pozitív egyezés 90%, míg a negatív egyezési érték 100% volt. A 3. táblázat a QF-CMV-válaszok és a CMV IgG-szerológiai állapota közötti egyezések mértékét tartalmazza egészséges alanyokra.

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

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

Az assay küszöbértéke

A jelen assay ajánlott klinikai küszöbértéke 0,2 IU/ml a CMV-antigéncsőben (nullértéket kivonva), de különféle klinikai környezetekben ettől eltérő küszöbérték is validálható.

Klinikai vizsgálatok

Mivel a citomegalovírus-fertőzés diagnózisának megerősítésére vagy kizárására nincs általánosan elfogadott módszer, a QF-CMV szenzitivitásának és specificitásának meghatározására nincs gyakorlati eljárás. A QF-CMV specificitásának és szenzitivitásának értékelésére ezért egészséges alanyoknál a QF-CMV-válaszok és a CMV IgG szerológiai állapot közötti egyezés mértéke szolgált.

A QF-CMV specificitásának értékelésére az álpozitív eredmények (reaktív QF-CMV-válaszok) arányának értékelése szolgált korábbi ismert CMV-expozíció nélküli egészséges donoroknál (CMV IgG szeronegatív egyének). A szenzitivitás értékelésére korábban ismerten CMV-expozíción átesett (CMV IgG szeropozitív) egyének egészséges donormintáiban a QF-CMV-reakciókészség értékelése szolgált. A QF-CMV különböző CMV-fehérjékből nagyszámú CMV-specifikus epitópot használ, ezáltal a populáció széles körű lefedettségét biztosítja a különféle HLA I. osztályú haplotípusok esetében (a populáció kb. 98%-át lefedi). Mivel a CMV szerológiai vizsgálatban részt vevő alanyok HLA haplotípusa nem ismeretes, a szeropozitív minták egy kis százalékánál várható volt, hogy nem reagálnak majd a QF-CMV vérvételi csövekre.

Specificitás

Egy egészséges alanyoktól vett, 591 mintát felölelő vizsgálatban CMV IgG-re szeronegatívként tesztelt egyének esetében nem észleltek álpozitív QF-CMV-eredményt. A minták közül a teszt során 248/248 bizonyult nem reaktívnek a QF-CMV ELISA teszttel és negatívnak a CMV IgG szerológiai teszttel. Ezáltal a QF-CMV- és a CMV IgG-szerológiai teszttel kapott eredmények 100%-os konkordanciát mutattak.

A szolid szervtranszplantáltak (1–8.), a haemopoeticus őssejttranszplantáltak (9, 10) és a HIV-fertőzöttek (11) esetében végzett összes többi specifikitási értékelésnél a QF-CMV és CMV IgG szerológia közötti egyezés szintén 100% volt.

Érzékenység

CMV IgG-re szeropozitívnak tesztelt egészséges alanyoktól származó 343 minta alapján végzett vizsgálatban a QF-CMV-válaszok és a CMV IgG szerológiai eredmények közötti egyezés mértéke 80,5% volt. A 343-ból 276 minta volt reaktív a QF-CMV teszttel és pozitív a CMV IgG szerológiai teszttel. Az észlelt disszonancia oka a hamis pozitív CMV-szerológia, illetve a válaszképes HLA-típusok hiánya lehet a tesztelt egyénekben.

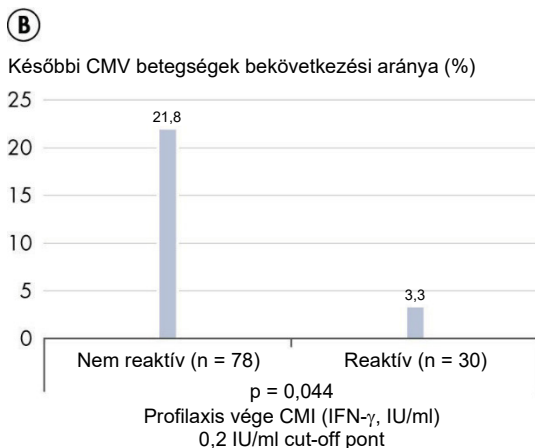
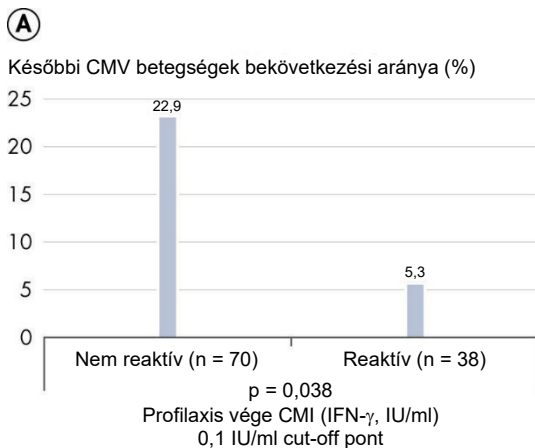
A szolid szervtranszplantáltak (1–8.), a haemopoeticus őssejttranszplantáltak (9, 10) és a HIV-fertőzöttek (11) esetében végzett szenzitivitási vizsgálatoknál az egyezés mértéke alacsonyabb volt. Ennek oka az álpozitív CMV-szerológia, a reakcióképes HLA-típusok hiánya a tesztelt egyénekben, illetve a reaktív T-sejtek immunszuppresszió miatti hiánya lehet.

A klinikai hasznosságot kiemelő tanulmányok

Alkalmazási területe szerint mind a CMV IgG szerológiai teszt, mind a QF-CMV teszt a CMV-immunitás kimutatására szolgál. Transzplantáció alkalmával a CMV-szerológiát széles körben alkalmazzák átültetés előtt a poszttranszplantációs CMV-komplikációk kockázatának felmérésére, de az átültetést követően kevés haszna van. A QF-CMV alternatívaként szolgálhat a transzplantáltak esetén a CMV-immunitás szintjének felmérésében olyan betegek esetén, akik immunszuppresszió miatt ki vannak téve a tünetekkel járó CMV-fertőzésnek és/vagy -megbetegedésnek (12–15.).

A QuantiFERON-CMV hasznosságát számos publikált klinikai vizsgálat igazolta a transzplantáltak különféle csoportjaira vonatkozóan (1–11., 15, 16).

Egy széles körű, 108 szolid szervtranszplantálton végzett vizsgálat (4) eredménye szerint a CMV elleni profilaxis elvégzésekor reaktív QF-CMV eredményű betegek körében jelentősen alacsonyabb a későbbi CMV-megbetegedések aránya (3,3% vagy 1/30; 0,2 IU/ml küszöbértékkel), mint a nem reaktív QF-CMV eredményű betegeknél (21,8% vagy 17/78, $p = 0,044$) (5. ábra).



5. ábra. A profilaxis végeztével a QuantiFERON-CMV teszttel reaktív és a QuantiFERON-CMV teszttel nem reaktív betegek későbbi CMV megbetegedési hányadának összevetése. Kumar és mtsai. által közölt adatok alapján (4).

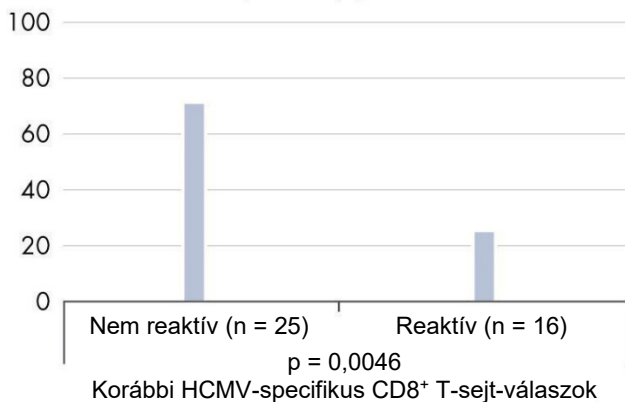
Továbbá azon CMV-szeronegatív, de CMV-pozitív donortól származó szervet kapó (D+/B-) szervátültetett betegek gyakrabban és hosszabb ideig kerültek el a CMV-megbetegedést, akiknek a profilaxis végeztével a QF-CMV-eredménye reaktív volt. Ez azt jelzi, hogy a QF-CMV segítségével azonosítani lehet azokat, akiknél fennáll a későbbi CMV-megbetegedés kockázata.

Ez a vizsgálat arra is rámutatott, hogy ebben a szervátültetett betegeket tartalmazó csoportban, amelyben a betegek esetében a CMV-betegség (D+/R-) kialakulása a legmagasabb volt, a profilaxist követően bármikor kapott reaktív eredmény azt jelentette, hogy nagyobb eséllyel kerülük el a CMV-betegséget.

Egy 37 szervátültetetten (6) végzett vizsgálat szerint a CMV-specifikus CD8⁺ T-sejt-válaszainak QF-CMV-vel végzett vizsgálata a CMV-virémia növekedését követően segített előrejelezni a spontán vírusürítést a CMV betegség kialakulásával szemben. Ebben a vizsgálatban 24/26 (92,3%) QF-CMV szerint „reaktív” páciens (IFN- γ $\geq$ 0,2 IU/ml küszöbérték mellett) spontán ürítette a CMV vírust, míg ugyanez mindössze 5/11 (45,5%) QF-CMV szerint „nem reaktív” páciens esetén történt meg.

Egy 67 tüdőátültetettre kiterjedő, poszttranszplantációs CMV-virémiás epizódokat (7) értékelő vizsgálat szerint a CMV-virémiás epizódok 18/25 (72%) részét nem reaktív QF-CMV-eredmény előzte meg, ugyanakkor 4/16 (25%) arányban előzte meg reaktív QF-CMV-eredmény (Fisher-féle egzakt teszt, $p = 0,0046$, 6. ábra).

HCMV DNAemia epizódok százalékos aránya > 1000 kópia/ml vírusterheléssel (%)



6. ábra. A QuantiFERON-CMV által kimutatott CMV-specifikus CD8⁺ T-sejt-válaszok és a CMV-virémia kialakulásának statisztikai elemzése (Fisher-féle egzakt teszt, p = 0,0046). Weseslindtner és mtsai. (7) által közölt adatok alapján.

Egy széles körű, 127 CMV-szeronegatív, de CMV-szeropozitív donortól származó szolid szerv átültetésben részesült betegen végzett, több központú prospektív vizsgálatban (8), ahol minden beteg antivirális profilaxisban részesült, kimutatták, hogy a CMV elleni profilaxis befejezése után tetszőleges időpontban elvégzett QF-CMV teszt szerint (0,1 IU/ml küszöbérték mellett) reaktív eredménnyel rendelkező betegek esetében jelentősen kisebb arányban fordult elő későbbi megbetegedés az átültetést követő 12 hónap alatt (6,4%), mint a nem reaktív (22,2%) és a nem eldönthető (58,3%, p < 0,001) QF-CMV-eredménnyel rendelkező betegeknél. Ha a határozatlan eredményt is „nem reaktív” eredménynek vesszük, akkor a későbbi CMV betegségek bekövetkezési arányai: 6,4% vs. 26,8%, p = 0,024 esetén. A QF-CMV eredmény CMV-betegség elleni védelemre vonatkozó pozitív és negatív prediktív értéke 0,90 (95%-os CI: 0,74–0,98) és 0,27 (95%-os CI: 0,18–0,37) volt. A vizsgálati eredmények szerint a profilaxis utáni QF-CMV teszt alkalmas annak előrejelzésére, hogy a beteg kis, közepes vagy nagy kockázatnak van kitéve a későbbi CMV-megbetegedés szempontjából.

Egy 55 szolid szervtranszplantálton végzett, a transzplantáció előtti QF-CMV-eredmény és az átültetést követő CMV-replikációs esetek közötti összefüggést elemző prospektív vizsgálat (8) megállapította, hogy gyakrabban fordult elő transzplantáció utáni CMV-replikáció azoknál a CMV-szeropozitív transzplantáltaknál, akiknél az átültetés előtti QF-CMV-eredmény (0,2 IU/ml küszöbértékkel) nem reaktív volt (7/14 vagy 50%), mint azoknál a CMV-szeropozitív transzplantáltaknál, akiknél az átültetés előtti QF-CMV-eredmény reaktív volt (4/30 vagy 13,3%, $p = 0,021$).

Ez a vizsgálat megállapította, hogy a CMV-replikáció kockázata tízszerese volt azon átültetés előtt nem reaktív QF-CMV-eredményű implantáltaknál, akik CMV-szeropozitív donortól kaptak szervet azokhoz az implantáltakhoz képest, akiknek átültetés előtti QF-CMV-válasza reaktív volt (korrigált OR 10,49, 95%-os CI 1,88–58,46). Ezáltal egy átültetés előtt végzett QF-CMV assay hasznos lehet az átültetés utáni CMV-replikáció kockázatának előrejelzésében, és így módon lehetővé teheti a CMV-fertőzés szervátültetést követő egyéni kezelését.

Számos más, már elvégzett (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) vagy jelenleg folyamatban lévő vizsgálat irányul világszerte a transzplantáltak körében végzett QF-CMV által kimutatott CMV-specifikus CD8⁺ T-sejt-válaszok értékelésére.

Szolid szervtranszplantáltak citomegalovírusos eseteinek kezelésére vonatkozó közös nemzetközi irányelvek

A CMV-specifikus immunvizsgálat fontosságát az *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Szolid szervtranszplantáltak citomegalovírusos eseteinek kezelésére vonatkozó átdolgozott közös nemzetközi irányelvek) című kiadványban ismerték el és publikálták (12). Ezek a The Transplantation Society (transzplantációs társaság) The Infectious Diseases Section (fertőző betegségek szekciója) által összeállított szakértői testület által létrehozott, a CMV-re és a szervátültetésre vonatkozó nemzetközi irányelvek bizonyítékokon és szakértői véleményeken alapuló közös irányelvekkel szolgálnak a CMV-intézkedésekkel kapcsolatosan: diagnózis, immunológia, megelőzés és kezelés.

Az irányelvek leszögezik, hogy „a CMV-specifikus T-sejt-válaszok immunvizsgálata alkalmas a szervátültetést követő CMV-kockázat előrejelzésére, és alkalmas lehet a profilaxis és a megelőző terápiák irányának kijelölésére” (12).

Emellett az irányelvek az ideális immunvizsgálati assay tulajdonságaira vonatkozó ajánlásokat is tartalmaznak, amelyek szerint az ilyen teszt:

- Képesség a transzplantált személy $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejtjeinek mennyiségének és funkciójának felmérésére
- Képes mérni az $IFN-\gamma$ értékét
- Egyszerűen elvégezhető, költséghatékony és reprodukálható
- Rövid időn belül elvégezhető
- Lehetővé teszi a minták egyszerű szállítását specializált referencialaboratóriumokba

A QF-CMV lényegében az irányelvekben meghatározott összes követelménynek megfelel, és az egyetlen standardizált, $IFN-\gamma$ kimutatására alkalmas, CMV-specifikus immunvizsgálati assay.

Az assay teljesítményjellemzői

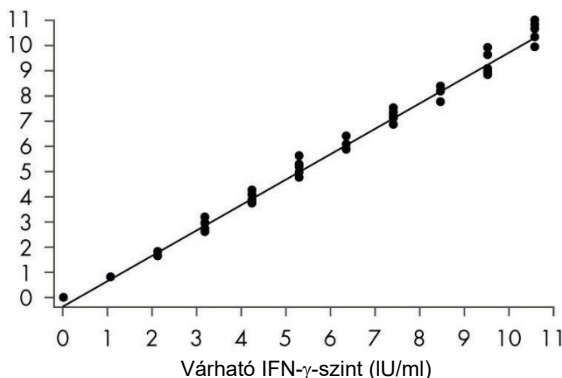
A QF-CMV ELISA rekombináns humán IFN- γ standardot használ, amelyet referencia IFN- γ készítményhez képest vizsgáltak (NIH ref.: Gxg01-902-535). A tesztminták eredményeinek leletezése nemzetközi egységben (IU) történik, a kithoz biztosított másodlagos standard hígításának tesztelésével készített standard görbéhez képest.

Bizonyos egyének szérumában vagy plazmájában található heterofil (pl. humán egérellenes) antitestekről ismert, hogy befolyásolják az immunológiai assay-eket. A heterofil antitestek QF-CMV ELISA tesztre gyakorolt hatását a zöld hígítóhoz adott normál egérszérum és a mikrolemezek celláit bevonó, IFN- γ -befogó antitestként alkalmazott F(ab')₂ monoklonális antitest-fragmentumok minimalizálják.

A QF-CMV ELISA kimutatási határa 0,065 IU/ml, és semmi sem utal kioltási effektusra, még akár 10 000 IU/ml IFN- γ -koncentráció mellett sem. A QF-CMV ELISA antitestekről kimutatták, hogy nem lépnek keresztreakcióba a vizsgált citokinekkal, beleértve a következőket: IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 és IL12.

A QF-CMV ELISA linearitását úgy bizonyították, hogy 11 ismert IFN- γ -koncentrációjú plazmapool öt párhuzamosát helyezték véletlenszerűen az ELISA lemezre. A lineáris regressziós egyenes meredeksége $1,002 \pm 0,011$, korrelációs együtthatója 0,99 volt (7. ábra).

IFN- γ meghatározott szintje



7. ábra. A QF-CMV ELISA linearitási profilja 11 ismert IFN- γ -koncentrációjú plazmaminta öt párhuzamosának tesztelése alapján.

A QF-CMV ELISA teszt reprodukálhatóságát 20 különböző IFN- γ -koncentrációjú plazmaminta alapján értékelték; a mérés három párhuzamossal, három laboratóriumban, három nem egymást követő napon, három kezelővel történt. Ennek megfelelően minden mintát kilenc független assay-futtatásban, összesen 27 alkalommal teszteltek. Az egyik minta 0,08 (95%-os CI: 0,07–0,09) IU/ml számított IFN- γ -koncentrációjú nullkontroll volt. A másik 19 plazmaminta koncentrációjának értéktartománya 0,33 (95%-os CI: 0,31–0,34) és 7,7 IU/ml (95%-os CI: 7,48–7,92) között volt.

A futtatáson belüli és az assay-n belüli pontatlanság közelítő értékét az egyes lemezek futtatása esetén ($n = 9$) az IFN- γ -tartalmú tesztplazmák %-os CV-értékeinek átlagolásával kapták meg; az értékek a 4,1–9,1% CV tartományba estek. A futtatáson belüli átlagos %CV ($\pm$ 95%-os CI) értéke $6,6 \pm 0,6\%$ volt. A nulla IFN- γ -tartalmú plazma átlaga 14,1 %CV volt.

Az összesített és az assay-k közötti pontatlanságot plazmamintánként a 27 különféle számított IFN- γ -koncentráció összevetésével határozták meg; az értékek a 6,6–12,3 %CV tartományba estek. Az összesített átlagos %CV ($\pm$ 95%-os CI) értéke $8,7 \pm 0,7\%$ volt. A nulla IFN- γ -tartalmú plazma 26,1 %CV értéket adott. Ez egy várható szintű ingadozás, mert a számított IFN- γ -koncentráció alacsony értékű, és az alacsony értékű becsült koncentrációk ingadozása mindig nagyobb, mint a magasabb koncentrációké.

Technikai tudnivalók

Nem eldönthető eredmények

A nem eldönthető eredményt a tesztalany immunállapota vagy számos technikai tényező is okozhatja:

- 16 óránál hosszabb idő a vérvétel és a 37 °C-os inkubálás között
- A vér előírt tartományon (22 ± 5 °C) kívül eső hőmérsékleten tárolása
- A vérvételi csövek nem megfelelő keverése
- Az ELISA lemez nem megfelelő mosása

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

Alvadt plazmaminták

A plazmaminták hosszú időn át való tárolásakor fibrinalvadékok kialakulása esetén centrifugálja a mintát a vérrögök ülepitéséhez és a plazma pipettázásának megkönnyítéséhez.

Hibaelhárítási útmutató

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

Megjegyzések és javaslatok

Alacsony optikai denzitási értékek a standardoknál

- | | |
|--|--|
| a) Standardhígítási hiba | Ellenőrizze, hogy a QF-CMV ELISA kézikönyvben foglaltak szerint történt-e a készletben lévő standard hígítása. |
| b) Pipetázási hiba | A pipettákat mindig a gyártói utasítások betartásával kell kalibrálni és alkalmazni. |
| c) Túl alacsony inkubációs hőmérséklet | Az ELISA inkubálását szobahőmérsékleten ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) kell végezni. |
| d) Túl rövid inkubációs idő | A konjugátumot, a standardokat és a mintákat tartalmazó lemezt 120 ± 5 percen át kell inkubálni. Az enzimszubsztrátoldatot 30 percen át kell a lemezen inkubálni. |
| e) Nem megfelelő szűrő a lemez leolvasásánál | A lemezbeolvasásnak 450 nm-en kell történnie 620–650 nm-es szűrővel. |
| f) Túl hideg reagensek | A konjugátum $100\times$ koncentrátum kivételével minden reagenst szobahőmérsékletre kell hozni az assay megkezdését megelőzően. Ehhez körülbelül 1 óra szükséges. |
| g) A kit vagy összetevői lejártak | Ügyeljen rá, hogy a kitet a lejáratási időn belül használja fel. A feloldott standardot és konjugátum $100\times$ koncentrátumot a feloldás dátumát követő 3 hónapon belül fel kell használni. |

Nem specifikus szín kialakulása

- | | |
|--|--|
| a) A lemez nem megfelelő mosása | A lemezt legalább hat alkalommal kell mosni, cellánként 400 μl mosópufferrel. Az alkalmazott mosóberendezéstől függően hatnál több mosási ciklusra is szükség lehet. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között. |
| b) Az ELISA lemez tesztlyukai közötti keresztzennyeződés | A kockázat minimalizálása érdekében ügyeljen a minták pipetázásakor és keverésekor. |
| c) A kit vagy összetevői lejártak | Ügyeljen rá, hogy a kitet a lejáratási időn belül használja fel. A feloldott standardot és konjugátum $100\times$ koncentrátumot a feloldás dátumát követő 3 hónapon belül fel kell használni. |

Megjegyzések és javaslatok

- | | | |
|----|--|--|
| d) | Az enzimszubsztrátoldat szennyezett | Kékes elszíneződés esetén a szubsztrátot ártalmatlanítani kell. Ügyeljen a reagenstartályok tisztaságára. |
| e) | Elválasztás előtt felkeveredik a plazma a centrifugált csövekben | A plazmamintákat mindig óvatosan kell leválasztani a gél feletről, fel-le pipettázás nélkül, végig gondosan megőrizve a gélfelület sértetlenségét. |

Magas háttérérték

- | | | |
|----|-------------------------------------|---|
| a) | A lemez nem megfelelő mosása | A lemezt legalább hat alkalommal kell mosni, cellánként 400 µl mosópufferrel. Az alkalmazott mosóberendezéstől függően hatnál több mosási ciklusra is szükség lehet. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között. |
| b) | Túl magas inkubációs hőmérséklet | Az ELISA inkubálását szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C) kell végezni. |
| c) | A kit vagy összetevői lejártak | Ügyeljen rá, hogy a kitet a lejáratási időn belül használja fel. A feloldott standardot és konjugátum 100× koncentrátumot a feloldás dátumát követő 3 hónapon belül fel kell használni. |
| d) | Az enzimszubsztrátoldat szennyezett | Kékes elszíneződés esetén a szubsztrátot ártalmatlanítani kell. Ügyeljen a reagenstartályok tisztaságára. |

Nem lineáris standard görbe és a párhuzamosok közti variabilitás

- | | | |
|----|--|---|
| a) | A lemez nem megfelelő mosása | A lemezt legalább hat alkalommal kell mosni, cellánként 400 µl mosópufferrel. Az alkalmazott mosóberendezéstől függően hatnál több mosási ciklusra is szükség lehet. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között. |
| b) | Standardhígítási hiba | Ügyeljen rá, hogy a jelen terméktájékoztatóban foglaltak szerint történjen a kit standardjának hígítása. |
| c) | Elégtelen keverés | A reagenseket a lemezre mérésük előtt alaposan fel kell keverni átfordítással vagy óvatos vortexeléssel. |
| d) | Nem egyenletes pipettázás vagy az assay előkészítésének megszakítása | A minták és a standardok bemérését folyamatosan kell végezni. Minden reagenst elő kell készíteni az assay megkezdése előtt. |

A termékekre vonatkozó tájékoztatók és technikai útmutatók ingyenesen beszerezhetők a QIAGEN vállalatától, a területileg illetékes forgalmazótól, illetve a **www.QuantiFERON.com** weboldalról.

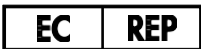
Irodalomjegyzék

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

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

Szimbólumok

A csomagoláson és a címkén a következő szimbólumok szerepelhetnek:

Szimbólum	Szimbólum meghatározása
 <N>	<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz
	Lejárat dátum
	CE-jelölés
	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Katalógusszám
	Tételszám
	Anyagszám
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)
	Hőmérsékleti korlátozás
	Tilos újrafelhasználni
	Napfénytől védve tartandó
	Olvassa el a használati útmutatót
	Gyártó
	Hivatalos képviselő az Európai Közösségben

Kapcsolatfelvételi adatok

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért tekintse meg műszaki támogatásunk weblapját a **www.qiagen.com/Support** címen, hívja a 00800-22-44-6000 telefonszámot, vagy forduljon a QIAGEN valamelyik műszaki szervizosztályához vagy a területileg illetékes forgalmazóhoz (lásd a hátsó borítón vagy a **www.qiagen.com** webhelyen).

Rövidített ELISA teszteljárás

1. fázis: A vér inkubálása

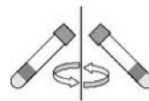
1. Vegye le a betegtől a vért a vérvételi csövekbe, és rázza fel a csöveket tíz (10) alkalommal kellő erővel ahhoz, hogy a csövek teljes belső felszínére jusson vér, és így leoldja a csőfalon található antigéneket.



2. A csöveket álló helyzetben inkubálja 37 ± 1 °C-on 16–24 órán keresztül.



3. Inkubálás után centrifugálja a csöveket 15 percig 2000–3000 RCF (*g*) fordulatszámon, hogy a plazma és a vörösvértestek elváljanak.



4. A centrifugálás és az elválasztás között kerülni kell a plazma felkeverését a pipetta fel-le mozgatásával vagy bármilyen más módon. A teljes eljárás során meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.



2. fázis: IFN- γ ELISA

1. Legalább 60 percen keresztül engedje, hogy az ELISA összetevői a konjugátum 100× koncentrátum kivételével felvegyék a szobahőmérsékletet.



2. Oldja fel a készletben lévő standardot 8,0 IU/ml mennyiségre desztillált vagy ioncserélt vízzel. Készítsen négy (4) hígítást a standardból.



3. Rehidratálja a liofilizált konjugátum 100× koncentrátumot desztillált vagy ioncserélt vízzel.

4. Hígítsa készre a konjugátumot a zöld hígítóval, majd mérjen belőle 50 µl mennyiséget minden tesztlyukba.



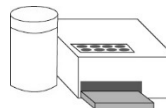
5. Mérjen 50 µl plazmamintát és 50 µl standardot a megfelelő cellákba. Keverje fel rázógéppel.



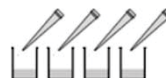
6. Inkubálja 120 percig szobahőmérsékleten.



7. Mossa a tesztlyukakat legalább 6 alkalommal, tesztlyukanként 400 µl mosópufferrel.



8. Töltsön 100 µl enzimszubsztrátoldatot a lyukakba. Keverje fel rázógéppel.



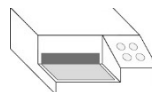
9. Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.



10. Töltsön 50 μ l enzimleállító oldatot a lyukakba. Keverje fel rázógéppel.



11. Olvassa be az eredményeket 450 nm-en 620–650 nm-es referenciaszűrővel.



12. Elemezze az eredményeket.



A kézikönyv átdolgozási előzményei

Dokumentum	Módosítások	Dátum
L1075110-R06	Szükséges, de nem biztosított anyagok, lemezfedelek hozzáadva, 9. oldal	2019. október

Ezt az oldalt szándékosan hagytuk üresen

Ezt az oldalt szándékosan hagytuk üresen

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Csoport); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.); SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

A QuantiFERON-CMV ELISA korlátozott licencszerződése

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a panelhez tartozó komponensekkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a panelhez tartozó összetevőket a termékhez mellékelte protokollokban, a jelen kézikönyvben és a www.qiagen.com webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a panelhez tartozó összetevőkbe beépítsék vagy azokkal együtt használják. E kiegészítő protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsátották rendelkezésre a QIAGEN felhasználói számára. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal jótállást ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sértik harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licenceken kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a panel és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A panel és összetevőinek licence csak egyszeri használatra jogosít; újrafelhasználása, felújítása vagy újraértékesítése tilos.
4. A QIAGEN egyértelműen elutasít minden más (kifejezett vagy hallgatólágosan beleértett) licencet, amelyet külön nem nyilvánított ki.
5. A panel vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresettili érvényesítésére és a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a panellel és/vagy összetevőivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárással kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve az ügyvédi költségeket is.

A frissített licencc feltételekért lásd: www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, minden jog fenntartva.

