

2018 m. vasaris

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Informacinis lapelis



Gama interferono (IFN- γ) gryno kraujo tyrimas reakcijai į žmogaus citomegalo viruso peptidų antigenus nustatyti

IVD Skirtas „in vitro“ diagnostikai



REF 0350-0201



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

EC **REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
VOKIETIJA

1075110LT, 05 leid.



www.QuantiFERON.com



Turinys

| | |
|--|----|
| Numatytoji paskirtis | 5 |
| Santrauka ir paaiškinimas..... | 5 |
| Procedūros principas..... | 6 |
| Tyrimo trukmė | 7 |
| Pateiktos medžiagos | 8 |
| Rinkinio turinys..... | 8 |
| Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos..... | 9 |
| Įspėjimai ir atsargumo priemonės | 9 |
| Saugos informacija..... | 11 |
| Reagentų laikymas ir naudojimas | 12 |
| Mėginių paėmimas ir apdorojimas | 13 |
| Procedūra | 16 |
| 1 etapas. Kraujo mėginio inkubavimas ir plazmos paėmimas | 16 |
| 2 etapas. „QuantiFERON-CMV ELISA“, skirtas žmogaus IFN- γ | 17 |
| Skaičiavimas ir rezultatų aiškinimas | 22 |
| Standarto kreivės generavimas (jei nenaudojama QF-CMV analizės programinė įranga)..... | 22 |
| Tyrimo kokybės patikrinimas | 23 |
| Rezultatų aiškinimas..... | 24 |
| Apribojimai | 25 |
| Tikėtinos reikšmės | 25 |
| Veikimo charakteristikos | 28 |

| | |
|---|----|
| Klinikinis efektyvumas | 28 |
| Tyrimo slenkstis | 29 |
| Klinikiniai tyrimai..... | 29 |
| Specifiškumas | 29 |
| Jautrumas | 30 |
| Tyrimai, pabrėžiantys klinikinę naudą | 30 |
| Tarptautinės gairės dėl citomegalo viruso valdymo vientiso organo transplantantuose | 35 |
| Tyrimo atlikimo charakteristikos | 36 |
| Techninė informacija | 38 |
| Neaiškūs rezultatai..... | 38 |
| Sukrešę plazmos mėginiai..... | 38 |
| Trikčių šalinimo vadovas..... | 39 |
| Literatūra | 41 |
| Simboliai | 43 |
| Kontaktinė informacija..... | 44 |
| Trumpas ELISA tyrimo procedūros aprašas..... | 45 |
| 1 etapas. Kraujo inkubavimas..... | 45 |
| 2 etapas. IFN- γ ELISA..... | 45 |
| Vadovo peržiūros istorija..... | 48 |

Numatytoji paskirtis

„QuantiFERON-CMV ELISA“ (QF-CMV) – „in vitro“ diagnostinis tyrimas, kurį sudaro peptidų kokteilis, simuliuojantis žmogaus citomegalo viruso (cytomegalovirus, CMV) proteinus, kad būtų stimuliuojamos ląstelės gryname heparinizuotame kraujyje. Gama interferono (interferon-gamma, IFN γ) nustatymas imunofermentinės analizės (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) metodu naudojamas nustatant „in vitro“ reakcijų į šiuos peptidų antigenus, kurie siejami su CMV infekcijos imunine kontrole, kiekį. Šios imuninės funkcijos praradimas gali būti siejamas su CMV ligos vystymusi. Numatyta, kad QF-CMV naudojamas siekiant stebėti paciento CMV antigenų lygį.

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

Santrauka ir paaiškinimas

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

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

Procedūros principas

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

Mitogeno mėgintuvėlis QF-CMV tiriant naudojamas kaip teigiama kontrolė. Tai gali būti ypač pateisinama, jei asmens imuninės sistemos būseną nėra aiški. Mitogeno mėgintuvėlis gali būti panaudotas kaip kontrolė siekiant tinkamai apdoroti ir inkubuoti kraują.

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

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

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

Tyrimas yra laikomas teigiamu IFN- γ reakcijai į CMV antigeno mėgintuvėlį, jei ši reikšmė yra gerokai virš nulinės kontrolės IFN- γ IU/ml reikšmės. Mitogeną stimuliuojantis plazmos mėginys veikia kaip IFN- γ teigiama kontrolė kiekvienam patikrintam mėginiui. Silpna reakcija į mitogeną vertinama kaip neaiškus rezultatas, kai kraujo mėginys parodo neigiamą reakciją ir į CMV antigenus. Toks modelis gali būti taikomas esant nepakankamam limfocitų skaičiui, esant sumažėjusiam limfocitų aktyvumui dėl netinkamo elgesio su mėginiais, netinkamo mitogeno mėgintuvėlio užpildymo arba jo maišymo arba tada, kai paciento limfocitai negali gaminti IFN- γ , pvz., neseniai organų persodinimą patyrusių asmenų. Nulinis mėginys koreguoja fono reakcijas ar nespecifinį IFN- γ kraujo mėginiuose. Nulinio mėgintuvėlio IFN- γ reikšmė atimama iš CMV antigeno mėgintuvėlio ir mitogeno mėgintuvėlio IFN- γ reikšmės (žr. šio informacinio lapelio 24 puslapio skyrių „Rezultatų aiškinimas“ ir sužinokite, kaip interpretuojami QF-CMV tyrimo rezultatai).

Tyrimo trukmė

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

Kraujo mėgintuvėlių inkubavimas 37 °C temperatūroje:

16–24 val.

ELISA:

apie 3 val. vienai ELISA plokštelei

mažiau nei 1 val. darbo laiko

pridedama 10–15 min. kiekvienai papildomai plokštelei

Pateiktos medžiagos

Rinkinio turinys

| Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) | |
|---|------------------|
| Katalogo Nr. | 0192-0301 |
| Paruošimų skaičius | 1 |
| QuantiFERON Nil Control („QuantiFERON“ nulinės kontrolės mėgintuvėlis; pilkas dangtelis) | 1 mėgintuvėlis |
| QuantiFERON CMV Antigen („QuantiFERON CMV“ antigeno mėgintuvėlis; mėlynas dangtelis) | 1 mėgintuvėlis |
| QuantiFERON Mitogen Control („QuantiFERON“ mitogeno kontrolinis mėgintuvėlis; violetinis dangtelis) | 1 mėgintuvėlis |
| QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių pakuotės informacinis lapelis) | 1 |

| QuantiFERON-CMV ELISA | 2 plokštelių kompleksas ELISA |
|--|--|
| Katalogo Nr. | 0350-0201 |
| Mikroplokštelės juostelės (12 × 8 duobutės), padengtos ne žmogaus IFN- γ monokloniniu antikūnu (pelių) | Mikroplokštelės juostelės (12 × 8 duobutės), 2 rinkiniai |
| Human IFN- γ Standard, lyophilized (žmogaus IFN- γ standartas, liofilizuotas; sudėtyje yra rekombinantinio žmogaus IFN, galvijų kazeino, 0,01 % w/v timerosalio) | 1 buteliukas (8 IU/ml po atkūrimo) |
| Green Diluent (žalias skiediklis; sudėtyje yra galvijų kazeino, normalaus pelių serumo, 0,01 % w/v timerosalio) | 1 × 30 ml |
| Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (konjugatas 100x koncentratas, liofilizuotas; ne žmogaus IFN- γ (pelių) HRP; sudėtyje yra 0,01 % w/v timerosalio) | 1 × 0,3 ml |
| Wash Buffer 20x Concentrate (plovimo buferio 20x koncentratas; pH 7,2; sudėtyje yra 0,05 % v/v „ProClin® 300“) | 1 × 100 ml |
| Enzyme Substrate Solution (fermento substrato tirpalas; sudėtyje yra H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' tetrametilbenzidino) | 1 × 30 ml |
| Enzyme Stopping Solution (fermento stabdymo tirpalas; sudėtyje yra 0,5 M H ₂ SO ₄)* | 1 × 15 ml |
| QF-CMV ELISA Package Insert (QF-CMV ELISA pakuotės informacinis lapelis) | 1 |

* Sudėtyje yra sieros rūgšties. Atsargumo priemonės žr. 9 psl.

Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

- 37 °C inkubatorius; CO₂ nebūtinai
- Kalibruotos reguliuojamojo 10–1 000 µl tūrio pipetės su vienkartiniais antgaliais
- Kalibruota daugiakanalė nustatomo 50 µl ir 100 µl tūrio pipetė su vienkartiniais antgaliais
- Mikroplokštelių kratytuvas
- Dejonizuotas arba distiliuotas vanduo (2 litrai)
- Mikroplokštelių plovimo aparatas (rekomenduojamas automatizuotas plovimo aparatas)
- Skaitymo įrenginys mikroplokštelėms su 450 nm filtru ir 620–650 nm referencijos filtru

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta „in vitro“ diagnostikai

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Juos patogiu ir kompaktišku PDF formatu rasite interneto svetainėje www.qiagen.com/safety. Čia galite rasti, perskaityti ir išsispausdinti kiekvieno QIAGEN® rinkinio ir rinkinio komponento SDS.

ISPĖJIMAS



Žmogaus kraujo mėginius visada laikykite potencialiai infekuojančiais. Laikykitės esminių elgsenos su krauju nurodymų.

„QuantiFERON-CMV ELISA“ komponentams taikomos toliau išvardytos pavojingumo ir atsargumo frazės.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sudėtyje yra: sulfuric acid. Atsargiai! Gali ėsdinti metalus. Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones..

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Atsargiai! Nestipriai dirgina odą. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

QuantiFERON Green Diluent



Sudėtyje yra: trinitrio 5-hidroksi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo)pirazolio-3-karboksilat. Sudėtyje yra: tartrazine. Atsargiai! Gali sukelti alerginę odos reakciją. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Sudėtyje yra: ProClin 300. Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Saugoti, kad nepatektų į aplinką.

Saugos informacija

Daugiau informacijos

- Nesilaikant QF-CMV informacinio lapelio nurodymų, galima gauti klaidingus rezultatus. Prieš naudodami atidžiai perskaitykite instrukcijas.
- Nenaudokite komplekto, jei kuris nors reagento buteliukas yra pažeistas ar ištekėjęs.
- **Svarbu.** Prieš naudodami patikrinkite buteliukus. Nenaudokite, jei ant konjugato ar IFN- γ standarto buteliuko arba guminio sandariklio matomi pažeidimo požymiai. Nenaudokite pažeistų buteliukų. Saugiai išmeskite buteliukus, laikydamiesi tinkamų atsargumo priemonių. **Rekomendacija:** konjugato arba IFN- γ standarto buteliukams atidaryti naudokite užvalcuotų buteliukų dangtelių atidarytuvą, kad sumažintumėte riziką susižeisti užvalcuojamu metaliniu dangteliu.
- Nenaudokite ir nemišykite mikroplokštelių juostelių, žmogaus IFN- γ standarto, žalio skiediklio ar konjugato (100 \times koncentrato), paimtų iš skirtingų QF-CMV komplektų siuntų. Kitus reagentus (plovimo buferį (20 \times koncentratą), fermento substrato tirpalą, fermento stabdymo tirpalą) galima imti iš skirtingų komplektų, jei reagentų galiojimo laikas yra tinkamas ir įrašoma partijos informacija.
- Nepanaudotus reagentus ir biologinius mėginius išmeskite laikydamiesi vietinių ir šalies įstatymų.
- Nenaudokite QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių ar QF-CMV ELISA komplektų, jei pasibaigusi jų galiojimo data.
- Prieš naudodami patikrinkite, ar visi laboratorijos prietaisai, pavyzdžiui, plokštelių plovimo automatas ir skaitymo įrenginys, skirtas mikroplokštelėms, buvo kalibruoti / atitinkamai patikrinti.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Kraujo surinkimo mėgintuvėliai

- QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlius laikykite 4–25 °C temperatūroje.
- Surenkant kraują QFM-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėliai turi būti 17–25 °C temperatūros.
- QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių laikymo laikas yra ne ilgesnis nei 15 mėnesių nuo surinkimo datos, jei laikymo temperatūra yra 4–25 °C.

ELISA komplekto reagentai

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

Atkurti ir nepanaudoti reagentai

Nurodymus, kaip atkurti reagentus, rasite skyriuje „2 etapas. „QuantiFERON-CMV ELISA“, skirtas žmogaus IFN- γ “ (3 ir 5 veiksmi, 17 ir 19 psl.).

- Laikant 2–8 °C temperatūroje, atkurtas žmogaus IFN- γ standartas gali būti laikomas iki 3 mėnesių.
Užsirašykite žmogaus IFN- γ standarto atkūrimo datą.
- Nepanaudotas konjugatas (100 \times koncentratas) po atkūrimo turi būti vėl sandėliuojamas 2–8 °C temperatūroje ir sunaudojamas per 3 mėnesius.
Užrašykite konjugato atkūrimo datą.
- Naudoti paruoštas konjugatas turi būti sunaudojamas per 6 valandas nuo paruošimo.
- Naudoti paruoštą plovimo buferį kambario temperatūroje (22 \pm 5 °C) galima laikyti ne ilgiau nei 2 savaites.

Mėginių paėmimas ir apdorojimas

QF-CMV tyrimo metu naudojami šie kraujo surinkimo mėgintuvėliai:

- nulinis kontrolinis mėgintuvėlis (pilkas dangtelis);
- CMV antigeno mėgintuvėlis (mėlynas dangtelis);
- mitogeno kontrolinis mėgintuvėlis (violetinis dangtelis).

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

Optimalūs rezultatai pasiekiami laikantis toliau nurodytų procedūrų.

1. Iš kiekvieno tiriamojo paimkite po 1 ml veninio kraujo tiesiai į kiekvieną QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlį. Šią procedūrą privalo atlikti išmokytas specialistas.

QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlius galima naudoti iki 810 m aukštyje virš jūros lygio.

Jei QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėliai naudojami didesniame nei 810 m aukštyje virš jūros lygio arba surenkami per maži kraujo kiekiai, kraujas gali būti paimamas ir švirkštu; tada į kiekvieną iš trijų mėgintuvėlių įpilama po 1 ml kraujo. Saugumo sumetimais nuimama švirkšto adata. Tai darydami laikykitės įprastų atsargumo priemonių. Nuimkite šių trijų QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių dangtelius ir kiekvieną mėgintuvėlį papildykite 1 ml kraujo (iki juodos žymos ant šoninės etiketės). Uždenkite mėgintuvėlių dangtelius ir maišykite, kaip nurodyta toliau. Kadangi 1 ml mėgintuvėliai kraują įtraukia palyginti lėtai, kai atrodo, kad pasiektas reikiamas užpildymo lygis, mėgintuvėlį palikite ant adatos dar 2–3 sekundes.

Juoda žymė ant mėgintuvėlio šono reiškia 1 ml užpildymo tūrį. QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėliams patvirtintas 0,8–1,2 ml tūris. Jei kraujo lygis kuriame nors mėgintuvėlyje stipriai nesutampa su indikatoriaus žyma, reikia imti naują kraujo mėginį. Jei kraujui surinkti naudojama „drugelio“ tipo adata, prieš uždedant QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlį, naudojant papildomą mėgintuvėlį reikia įsitikinti, kad jungiamasis vamzdelis pripildytas kraujo.

Antra vertus, kraują galima surinkti naudojant vieną įprastą kraujo surinkimo mėgintuvėlį, pripildytą ličio heparino, kuris veikia kaip antikoaguliantas, tada perpilti į QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlius. Kaip kraujo antikoaguliantą naudokite tik ličio hepariną, nes kiti antikoaguliantai trukdo tyrimui. Užpildykite kraujo surinkimo mėgintuvėlį (min. 5 ml tūrio) ir atsargiai sumaišykite pavartydami jį kelis kartus, kad heparinas ištirptų. Šią procedūrą privalo atlikti išmokytas specialistas. Kraujas turi būti laikomas kambario temperatūroje (22 ± 5 °C) prieš perkeliant jį į QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlius, kad būtų galima inkubuoti. Tai turi būti pradėta per 16 valandų nuo kraujo surinkimo.

2. Pripildę QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlius, pakratykite juos 10 kartų, kad visas vidinis mėgintuvėlio paviršius būtų padengtas krauju ir ištirptų ant mėgintuvėlio sienelių esantys antigenai.

Surenkant kraują mėgintuvėliai turi būti 17–25 °C temperatūros.

Per stipriai pakračius gali būti suardytas gelis ir taip iškreipti rezultatai.

Jei kraujas surenkamas ličio heparino mėgintuvėlyje, prieš paskirstant kraują QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėliuose, mėginiai turi būti tolygiai sumaišyti. Prieš pat kraujo paskirstymą atidžiai sumaišykite kraujo mėginius atsargiai juos pavartydami. Atskieskite 1 ml alikvoto (po vieną kiekviename QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlyje) kiekviename nuliniame CMV antigenų ir mitogeno mėgintuvėlyje. Tai reikia atlikti steriliai, imantis įprastų atsargumo priemonių. Nuimkite šių trijų QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių dangtelius ir kiekvieną mėgintuvėlį papildykite 1 ml kraujo (iki juodos žymos ant šoninės etiketės). Uždenkite mėgintuvėlių dangtelius ir maišykite, kaip nurodyta anksčiau.

3. Pažymėkite mėgintuvėlius tinkamomis etiketėmis.

Įsitikinkite, kad kiekvieną mėgintuvėlį (nulinį, CMV antigenų, mitogeno) galima atpažinti pagal etiketę arba naudojant kitas priemones.

4. Užpildžius, pakračius mėgintuvėlius ir užklėjavus tinkamą etiketę, mėgintuvėliai kuo greičiau (ne vėliau kaip per 16 valandų nuo kraujo surinkimo) perkeliama į inkubatorių (37 ± 1 °C). Prieš inkubavimą mėgintuvėlius laikykite kambario temperatūroje (22 ± 5 °C). Kraujo mėginių nelaikykite šaldytuve ar šaldymo kameroje.

Procedūra

1 etapas. Kraujo mėginio inkubavimas ir plazmos paėmimas

1. Inkubuokite mėgintuvėlius VERTIKALIOJE padėtyje 16–24 val. esant 37 ± 1 °C temperatūrai. CO₂ arba drėkinimas inkubuojant nereikalingas.

Svarbu. Jeigu mėgintuvėliai neinkubuojami iš karto po surinkimo, prieš inkubavimą mėgintuvėlių turinį reikia pakartotinai sumaišyti vartant 10 kartų.

Po inkubavimo ir prieš centrifuguojant kraujo surinkimo mėgintuvėlius galima laikyti 4–27 °C temperatūroje ne ilgiau nei 3 dienas.

2. Po mėgintuvėlių inkubavimo 37 °C temperatūroje plazma paimama mėgintuvėlius 15 minučių centrifuguojant 2 000–3 000 RCF (*g*). Susidarant gelio kamščiui ląstelės atsiskiria nuo plazmos. Jeigu tai neįvyksta, mėgintuvėlius reikėtų centrifuguoti dar kartą.

Plazmą galima paimti ir be centrifugavimo, tačiau tai reikia daryti labai atsargiai, kad paimant plazmos nebūtų sujudintos ląstelės.

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

Svarbu. Plazmos mėginį visada imkite naudodami pipetę.

Plazmos mėginiai iš centrifuguotų kraujo paėmimo mėgintuvėlių gali būti perkelti tiesiai į QF-CMV ELISA plokštelę. Tai galioja ir tais atvejais, kai naudojami ELISA automatai.

Plazmos mėginius centrifuguotuose QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėliuose 2–8 °C temperatūroje galima laikyti iki 28 dienų arba, paėmus plazmą, ją galima laikyti dar ilgiau –20 °C temperatūroje (pageidautina žemesnėje nei –70 °C).

Norėdami gauti adekvačius rezultatus, surinkite bent 150 µl plazmos.

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

ELISA tyrimui atlikti reikalingas medžiagas rasite „Rinkinio turinys“ 8 psl. ir „Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos“ 9 psl.

1. Visi plazmos mėginiai ir reagentai, išskyrus konjugato 100 \times koncentratą, prieš naudojimą turi pasiekti kambario temperatūrą (22 ± 5 °C). Temperatūrai išlyginti skirkite ne mažiau nei 60 minučių.
2. Nereikalingas ELISA plokštelės juosteles išimkite iš rėmelio, įdėkite jas atgal į folijos pakuotę ir iki naudojimo laikykite šaldytuve.

Mažiausiai vieną juostelę paskirkite QF-CMV ELISA standartams ir paimkite dar pakankamą juostelių skaičių tiriamiems pacientams. Panaudoję rėmelį ir dangtelį palikite kitam kartui su likusiomis juostelėmis.

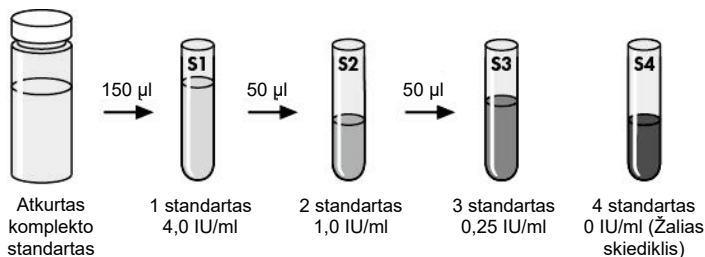
3. Atkurkite žmogaus IFN- γ standartą su ant buteliuko etiketės nurodytu dejonizuotu arba distiliuotu vandens kiekiu. Atsargiai maišykite buteliuko turinį (saugodami, kad nesusidarytų putų) ir įsitinkinkite, kad turinys visiškai ištirpęs. Atkūrus IFN- γ standartą iki tinkamo tūrio, gaunamas tirpalas, kurio koncentracija yra 8,0 IU/ml.

Pastaba. Atkurto žmogaus IFN- γ standarto (komplekto standarto) tūris partijose bus skirtingas.

Naudodami atkurtą standartą, paruoškite keturių IFN- γ koncentracijų skiedimo seriją su žaliu skiedikliu (ŽS) (1 kitame psl.). S1 (1 standarto) sudėtyje yra 4,0 IU/ml, S2 (2 standarto) sudėtyje yra 1,0 IU/ml, S3 (3 standarto) sudėtyje yra 0,25 IU/ml, o S4 (4 standarto) sudėtyje yra 0 IU/ml (tik ŽS). Standartai turėtų būti ištirti mažiausiai du kartus. Kiekvienam ELISA seansui paruoškite naujus komplekto standarto skiedinius.

Dvigubo standarto procedūros pavyzdys

| Dvigubo standarto procedūros pavyzdys | |
|---------------------------------------|--|
| A | Keturių mėgintuvėlių etiketės: S1, S2, S3, S4 |
| B | Įpilkite po 150 µl ŽS į S1, S2, S3, S4 |
| C | Įpilkite 150 µl komplekto standarto į S1 ir kruopščiai sumaišykite |
| D | Perkelkite 50 µl iš S1 į S2 ir kruopščiai sumaišykite |
| E | Perkelkite 50 µl iš S2 į S3 ir kruopščiai sumaišykite |
| F | Tik ŽS veikia kaip nulinis standartas (S4) |



1 pav. Standarto kreivės paruošimas nuosekliai skiedžiant.

4. Atkurkite liofilizuotą konjugatą 100× koncentratą su 0,3 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens. Atsargiai sumaišykite buteliuko turinį (saugodami, kad nesusidarytų putų) ir įsitikinkite, kad konjugatas visiškai ištirpo.

Naudoti tinkamą konjugatą pagaminsite skiesdami reikiamą atkurto konjugato 100× koncentrato kiekį žaliu skiedikliu (žr. 1 kitame psl.).

Krupščiai, tačiau atsargiai išmaišykite saugodami, kad nesusidarytų putų.

Nesunaudotą konjugato 100× koncentratą nedelsdami gražinkite į 2–8 °C temperatūrą.

Skiesdami naudokite tik žalią skiediklį.

1 lentelė. Naudoti tinkamo konjugato paruošimas

| Juostelių skaičius | Konjugato 100× koncentrato kiekis | Žalio skiediklio kiekis |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 2 | 10 µl | 1,0 ml |
| 3 | 15 µl | 1,5 ml |
| 4 | 20 µl | 2,0 ml |
| 5 | 25 µl | 2,5 ml |
| 6 | 30 µl | 3,0 ml |
| 7 | 35 µl | 3,5 ml |
| 8 | 40 µl | 4,0 ml |
| 9 | 45 µl | 4,5 ml |
| 10 | 50 µl | 5,0 ml |
| 11 | 55 µl | 5,5 ml |
| 12 | 60 µl | 6,0 ml |

5. Plazmos mėginiai, kurie buvo surinkti iš kraujo surinkimo mėgintuvėlių ir prieš tyrimą buvo užšaldyti arba ilgiau nei 24 valandas sandėliuojami, prieš įdedant į ELISA duobutę turi būti kruopščiai sumaišyti.

Svarbu. Jei plazmos mėginiai bus dedami tiesiai iš centrifuguotų QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėlių, plazmos maišyti nereikėtų. Visuomet dirbkite kruopščiai, kad nesujudintumėte medžiagos prie gelio paviršiaus.

6. Jei reikia kiekybinių rezultatų, CMV ir mitogeno plazmą atskieskite žaliame skiediklyje santykiu 1/10 (10 µl plazmos + 90 µl ŽS). Nulinės plazmos skiesti nereikia.

Rekomenduojama šiuos mėginius ištirti lygiagrečiai:

nulinį, CMV antigenų, mitogeno, CMV antigenų (1/10), mitogeno (1/10).

Tačiau QuantiFERON-CMV analizės programinė įranga taip pat palaiko šias paciento mėginių parinktis:

nulinį, CMV antigenų, mitogeno;

nulinį, CMV antigenų (1/10), mitogeno (1/10);

nulinį, CMV antigenų, mitogeno, CMV antigenų (1/10);

nulinį, CMV antigenų (1/10), mitogeno.

7. Į atitinkamas ELISA duobutes daugiakanale pipete įpilkite po 50 µl šviežiai naudoti paruošto konjugato.
8. Į atitinkamas duobutes įpilkite po 50 µl plazmos mėginio. Galiausiai į atitinkamas duobutes įpilkite po 50 µl kiekvieno iš standartų nuo 1 iki 4. Standartai turėtų būti iširti bent du kartus.
9. Uždenkite ELISA plokštelę ir kruopščiai maišykite konjugatą ir plazmos mėginius / standartus 1 minutę mikroplokštelių kratytuvu 500–1 000 aps./min. greičiu. Stenkitės, kad netikštų.
10. Uždenkite ELISA plokštelę ir inkubuokite 120 ± 5 minutes kambario temperatūroje (22 ± 5 °C).
Inkubuodami plokšteles saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių. Nukrypus nuo nurodyto temperatūros diapazono galima gauti klaidingus rezultatus.
11. Kol inkubuojate, paruoškite naudoti tinkamą plovimo buferį. Praskieskite vieną dalį plovimo buferio 20x koncentrato su 19 dalių dejonizuoto ar distiliuoto vandens ir kruopščiai išmaišykite. Iš pateikto plovimo buferio 20x koncentrato galima pagaminti 2 litrus naudoti tinkamo plovimo buferio.
12. Baigę inkubuoti ELISA plokštelę, mažiausiai šešis kartus išplaukite duobutes 400 µl naudoti tinkamo plovimo buferio. Rekomenduojame naudotis mikroplokštelių plovimo automatu.
Svarbu. Siekiant tikslių tyrimo rezultatų labai svarbu kruopščiai išplauti. Kiekvieno plovimo ciklo metu patikrinkite, ar visos duobutės yra iki viršaus užpildytos plovimo buferiu. Rekomenduotina tarp plovimo ciklų mažiausiai 5 sekundes pamirkyti.
Į atliekamų skysčių talpyklą turėtų būti įpilta laboratorijose įprastai naudojamos dezinfekcinės priemonės. Taip pat laikykitės taisyklių, kaip potencialiai infekuojančią medžiagą padaryti nekenksmingą.
13. Pastuksenkite plokštelę duobutėmis į apačią ant nepūkuoto rankšluosčio, kad būtų pašalintas likęs plovimo buferis. Į kiekvieną duobutę įpilkite po 100 µl fermento substrato tirpalo, plokštelę uždenkite ir kruopščiai maišykite mikroplokštelių kratytuve 1 minutę 500–1 000 aps./min. greičiu.

14. Uždenkite visas plokšteles ir inkubuokite 30 minučių kambario temperatūroje ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).

Inkubuodami plokšteles saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.

15. Po 30 minučių inkubavimo įpilkite po 50 μl fermento stabdymo tirpalo į kiekvieną duobutę ta pačia tvarka, kokia pylėte substratą, ir kruopščiai išmaišykite mikroplokštelių kratytuve 500–1 000 aps./min. greičiu.

16. Išmatuokite optinį tankį (OT) kiekvienoje duobutėje 5 minučių intervalu nuo to laiko, kai įpilate stabdymo tirpalo. Naudokite skaitymo įrenginį, skirtą mikroplokštelėms, kuriame yra 450 nm filtras ir 620–650 nm referencijos filtras. OT reikšmės reikalingos skaičiuojant rezultatus.

Skaičiavimas ir rezultatų aiškinimas

„QuantiFERON-CMV“ analizės programinę įrangą, skirtą neapdorotų duomenų analizei atlikti ir rezultatams skaičiuoti, galite gauti iš QIAGEN svetainėje **www.QuantiFERON.com**. Būtinai naudokite naujausią QF-CMV analizės programinės įrangos versiją.

Naudojant programinę įrangą atliekamas tyrimo kokybės kontrolės vertinimas, sudaroma standarto kreivė ir pateikiamas kiekvieno tyrimo rezultatas, kaip išsamiai aprašyta skyriuje „Rezultatų aiškinimas“ 24 psl. Programinė įranga pateikia mažiausią atskiedimo koeficientą, pagal kurį, atsižvelgiant į atskiedimo koeficientą, sugeneruojamas į QF-CMV ELISA diapazoną patenkantis rezultatas.

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

Standarto kreivės generavimas (jei nenaudojama QF-CMV analizės programinė įranga)

Nustatykite komplekto standarto pakartojimų vidutines OT reikšmes ant kiekvienos plokštelės.

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

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

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

Pateiktas rezultatas turi būti paimtas iš mažiausio atskiedimo koeficiento skiedinio, pagal kurį sugeneruojamas į QF-CMV ELISA diapazoną patenkantis rezultatas. Įsitikinkite, kad atsižvelgiama į atskiedimo koeficientą, jei toks yra.

Tyrimo kokybės patikrinimas

Tyrimo rezultatų teisingumas priklauso nuo tikslios standarto kreivės sudarymo. Todėl, prieš pradėdant aiškinti tyrimo rezultatus, turi būti patikrinti iš standartų išvesti rezultatai.

ELISA galioja, kai:

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

QF-CMV analizės programinė įranga skaičiuoja ir pateikia šiuos kokybės kontrolės parametrus. Jeigu šie kriterijai neatitinkami, tyrimas negalioja ir turi būti pakartotas.

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

Rezultatų aiškinimas

„QuantiFERON-CMV“ tyrimo rezultatai turi būti interpretuojami pagal 2 kriterijus.

2 lentelė. „QuantiFERON-CMV“ rezultatų aiškinimas

| Nulinis (IU/ml) | CMV minus nulinis (IU/ml) | Mitogeno minus nulinis (IU/ml)* | QF-CMV rezultatas | Ataskaita / aiškinimas |
|--------------------|--|---------------------------------|------------------------|--|
| ≤ 8,0 | ≥ 0,20 ir ≥ 25 % nulinės kontrolės reikšmės | Bet koks | Teigiamas [†] | Anti-CMV imunitetas aptiktas |
| | < 0,20 ARBA ≥ 0,20 ir < 25 % nulinės kontrolės vertės | ≥ 0,5 | Neigiamas | Anti-CMV imunitetas NEAPTIKTAS |
| | | < 0,5 | Neaiškus [‡] | Rezultatai CMV antigeno reakcijai neaiškūs |
| > 8,0 [§] | Bet koks | Bet koks | Neaiškus [‡] | Rezultatai CMV antigeno reakcijai neaiškūs |

* Mitogeno teigiamos kontrolės (ir kartais CMV antigenų) reakcijos dažnai yra už mikroplokštelių skaitymo aparato matavimo ribų. Tai neturi įtakos tyrimo kokybei.

[†] Tais atvejais, kai citomegalovirusinė infekcija nėra įtariama, pradžioje gauti teigiami tyrimo rezultatai gali būti patvirtinti antrą kartą tiriant pradinius plazmos mėginius QF-CMV ELISA tyrimu. Jeigu pakartojus tyrimą su pirmu arba antru mėginiu vėl gaunamas teigiamas rezultatas, tyrimo rezultatas turi būti laikomas teigiamu.

[‡] Galimų priežasčių ieškokite skyriuje „Trikčių šalinimo vadovas“ (39 psl.).

Klinikinių tyrimų metu (1) neaiškus rezultatas pacientų, kuriems buvo persodintas vientisas organas, kai donoro CMV reakcija buvo teigiama, tačiau mitogeno kontrolinio mėgino reikšmė buvo mažesnė nei 0,5 IU/ml, pasirodė kliniškai reikšmingas. Tokiems pacientams CMV išsivystymo rizika yra didžiausia.

[§] Klinikinių tyrimų metu mažiau negu 0,25 % asmenų turėjo > 8,0 IU/ml IFN- γ koncentraciją nulinės kontrolės atžvilgiu.

Pastaba. Nustatant imuninį atsaką į CMV antigenus, išmatuotą IFN- γ lygį reikia naudoti kartu atsižvelgiant į klinikinius simptomus, medicininę istoriją ir kitus klinikinius tyrimus. QF-CMV tyrimas nėra skirtas CMV infekcijai nustatyti ir neturėtų būti naudojamas CMV infekcijai išskirti.

Apribojimai

„QuantiFERON-CMV“ tyrimo rezultatai turi būti naudojami atsižvelgiant į kiekvieno tiriamojo epidemiologinę istoriją, esamą būklę ir kitus diagnostinius vertinimus.

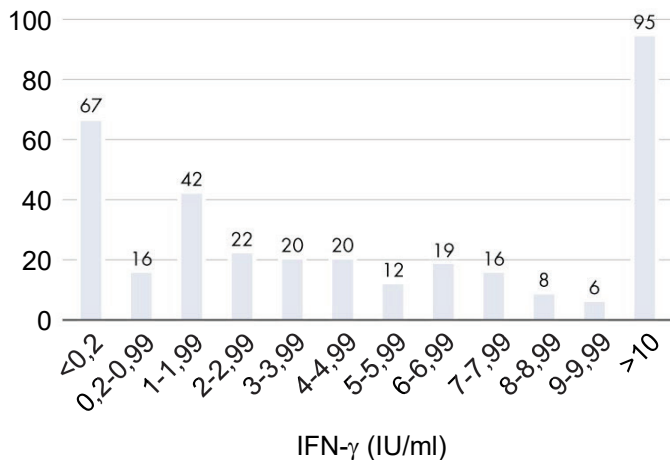
Nepatikimus ar neaiškius rezultatus galite gauti, nes:

- nesilaikoma QuantiFERON-CMV ELISA informaciniame lapelyje aprašytos procedūros;
- per didelis IFN- γ lygis nulinės kontrolės mėgintuvėlyje;
- ilgesnis nei 16 val. kraujo mėginio laikymas iki inkubavimo 37 °C temperatūroje.

Tikėtinos reikšmės

Lauktos IFN- γ reikšmės naudojant „QuantiFERON-CMV“ buvo gautos tiriant 591 sveiką subjektą. 343 tirti mėginiai buvo serologiškai teigiami ir 248 tirti mėginiai serologiškai neigiami CMV IgG. QF-CMV tyrimo metu CMV serologinė būseną buvo nežinoma. Ištyrus 248 mėginius, gautus iš CMV serologiškai neigiamų tiriamųjų, 100 % (248 iš 248) mėginių nereagavo atliekant QF-CMV ELISA tyrimą ir pateikė < 0,2 IU/ml IFN- γ reakcijas į CMV antigeno mėgintuvėlį (nulinis atimamas). 343 CMV serologiškai teigiamų tiriamųjų IFN- γ reakcijų į CMV antigeno mėgintuvėlį (nulinis atimamas) pasiskirstymas (2 pav.).

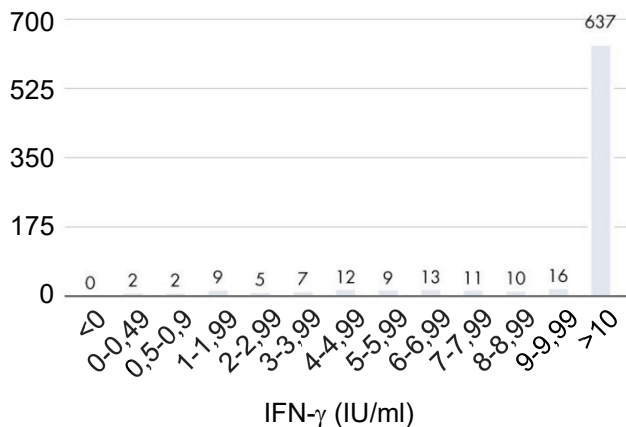
Mėginių skaičius



2 pav. QF-CMV IFN- γ reakcijų (nulinis atimamas) pasiskirstymas serologiškai teigiamuose tiriamuosiuose (n = 343).

IFN- γ reakcijų į mitogeną (nulinis atimamas) pasiskirstymas buvo nustatytas naudojant 733 mėginius, gautus iš sveikų suaugusių tiriamųjų naudojant QF-CMV ELISA, neatsižvelgiant į CMV IgG serologiją (3 pav.). Mažesnis nei 0,5 IU/ml mitogeno rezultatas (nulinis atimamas) rodo, kad tyrimas nepavyko arba tiriamojo imunitetas yra slopinamas. Tiriant sveikus asmenis, į šią kategoriją patenka 2 iš 733.

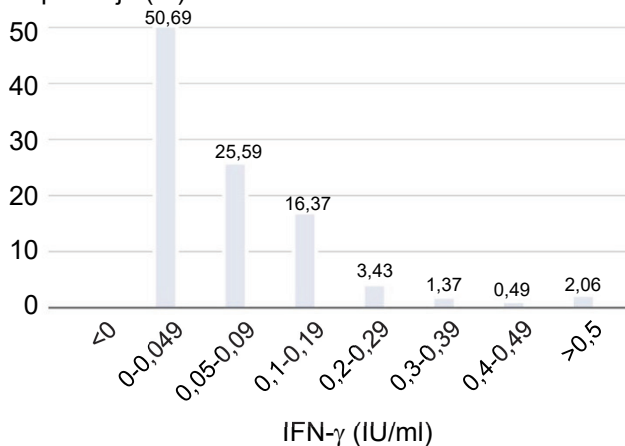
Mėginių skaičius



3 pav. Mitogeno IFN- γ reakcijų (nulinis atimamas) pasiskirstymas sveikuose tiriamuosiuose (n = 733).

IFN- γ reakcijų į nulinius mėgintuvėlius pasiskirstymas buvo nustatytas naudojant 1 020 plazmos mėginių, gautų iš sveikų tiriamųjų naudojant QF-CMV ELISA, neatsižvelgiant į CMV IgG serologiją (4).

Populiacija (%)



4 pav. Nulinių IFN- γ reakcijų sveikuose tiriamuosiuose (n = 1 020) pasiskirstymas, išreikštas populiacijos procentais.

Veikimo charakteristikos

Klinikinis efektyvumas

Aptikimo tyrimo slenkstis (prieš susergant CMV) naudojant QF-CMV sukurtas remiantis rezultaty, gautų iš sveikų tiriamųjų grupės (n = 223), kurios QF-CMV rezultatai buvo palyginti su CMV IgG serologiniais rezultatais, analize. ROC analizės metu nustatyta, kad 0,04 IU/ml tyrimo slenkstis (atėmus nulinius) pateikė optimalias teigiamas ir neigiamas QF-CMV prognozuojamas reikšmes (plotas po kreive = 0,9679 [95 % CI: 0,9442–0,9915, $p < 0,0001$]), todėl yra slenkstis, kurį taikant šis tyrimas veikė efektyviausiai pagal paskirtį, tiriant sveikus asmenis.

QF-CMV tyrimo našumas buvo palygintas su „SeraQuest™“ CMV IgG serologinio tyrimo našumu („Quest International“). QF-CMV tyrimas parodė, kad 95 % mėginių, paimtų iš sveikų tiriamųjų (294 iš 310), yra suderinami su CMV IgG serologiniu tyrimu, nė vienas iš 149 serologiškai neigiamų donorų neturėjo teigiamo QF-CMV rezultato. 145 iš 161 serologiškai teigiamo donoro turėjo teigiamą QF-CMV reakciją. Bendras teigiamų reakcijų suderinamumas buvo 90 %, o neigiama suderinamumo reikšmė buvo 100 %. Sveikų tiriamųjų QF-CMV reakcijų ir CMV IgG serologinės būsenos suderinamumo lygis parodytas 3.

3 lentelė. „QuantiFERON-CMV“ tyrimo ir CMV IgG serologinio tyrimo suderinamumas, tyrimus atliekant su sveikaisiais

| | | CMV serologinis tyrimas | | Iš viso |
|-----------------|-----------|-------------------------|--------------|--------------|
| | | Teigiamas | Neigiamas | |
| QuantiFERON-CMV | Teigiamas | 145 | 0 | 145 (46,8 %) |
| | Neigiamas | 16 | 149 | 165 (53,2 %) |
| | Iš viso | 161 (51,9 %) | 149 (48,1 %) | 310 (100 %) |

Tyrimo slenkstis

Šio tyrimo rekomenduojamas klinikinio tyrimo slenkstis yra 0,2 IU/ml CMV antigeno mėgintuvėlyje (nulinis atimamas), tačiau kitiems klinikiniams parametrams gali būti patvirtinti kiti slenksčiai.

Klinikiniai tyrimai

Nėra apibrėžto citomegalo viruso infekcijos patvirtinimo ar atmetimo standarto, todėl negalima praktiškai įvertinti QF-CMV jautrumo ir tikslumo. QF-CMV tikslumas ir jautrumas apytiksliai nustatytas vertinant sveikų tiriamųjų QF-CMV reakcijų ir CMV IgG serologinės būsenos suderinamumo lygį.

QF-CMV tikslumas apytiksliai nustatytas vertinant klaidingai teigiamus rodiklius (QF-CMV teigiamas reakcijas) sveikų donorų mėginiuose, kuriuose nebuvo ankstesnės CMV infekcijos buvimo įrodymų (CMV IgG serologiškai neigiami asmenys). Jautrumas buvo apytiksliai nustatytas vertinant sveikų donorų mėginių, kuriuose buvo ankstesnės CMV infekcijos buvimo įrodymų (CMV IgG serologiškai teigiami asmenys), QF-CMV reakcijas. QF-CMV tyrime naudojama daug CMV būdingų epitopų iš skirtingų CMV proteinų, todėl plačiai apimama populiacija su įvairiais HLA I klasės haplotipais (maždaug 98 % populiacijos). Tiriamųjų HLA haplotipai, tiriant juos pagal CMV serologinį tyrimą, nebuvo žinomi, todėl tikimasi, kad nedidelė serologiškai teigiamų asmenų procentinė dalis turės neigiamą reakciją QF-CMV kraujo surinkimo mėgintuvėliuose.

Specifiškumas

Tiriant 591 sveiko tiriamojo mėginius, serologiškai neigiamų asmenų mėginiuose neaptikta klaidingai teigiamų QF-CMV rezultatų, atliekant CMV IgG tyrimą; 248 iš 248 mėginių nerodė reakcijos atliekant QF-CMV ELISA tyrimą ir buvo neigiami atliekant CMV IgG serologinį tyrimą. Taigi rezultatai, gauti naudojant QF-CMV ir CMV IgG serologinį tyrimą, parodė 100 % suderinamumą.

Atliekant visus kitus tikslumo įvertinimus, tiriant asmenis, kuriems buvo persodinti vientisi organai (1–8), asmenis, kuriems buvo persodintos kraujodaros kamieninės ląstelės (9,10), ir ŽIV infekuotus pacientus (11), QF-CMV ir CMV IgG serologinio tyrimo suderinamumas taip pat buvo 100 %.

Jautrumas

Ištyrus 343 mėginius, gautus iš sveikų tiriamųjų, kurie buvo serologiškai teigiami CMV IgG atžvilgiu, suderinamumo tarp QF-CMV reakcijų ir CMV IgG serologinių rezultatų lygis buvo 80,5 % – 276 iš 343 mėginių reagavo į QF-CMV ir buvo teigiami atlikus CMV IgG serologinį tyrimą. Stebėtas nesuderinamumas galėjo atsirasti dėl klaidingai teigiamų CMV serologinių rezultatų arba iširtų asmenų reaguojančių HLA tipų trūkumo.

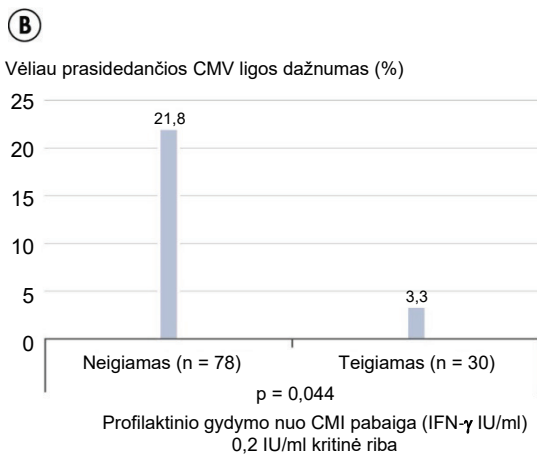
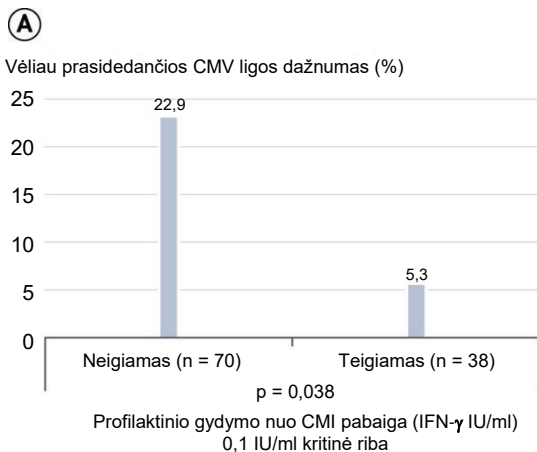
Vertinant jautrumą ištyrus asmenis, kuriems buvo persodinti vientisi organai (1–8), asmenis, kuriems buvo persodintos kraujodaros kamieninės ląstelės (9, 10), ir ŽIV infekuotus pacientus (11), suderinamumo lygiai buvo mažesni. Taip galėjo būti dėl klaidingai teigiamų CMV serologinių rezultatų, iširtų asmenų reaguojančių HLA tipų trūkumo arba šių pacientų reaguojančių T ląstelių trūkumo dėl imuniteto slopinimo.

Tyrimai, pabrėžiantys klinikinę naudą

Numatyta, kad tiek CMV IgG serologinis tyrimas, tiek QF-CMV leidžia aptikti imunitetą CMV infekcijai. Ruošiantis organo persodinimui, serologinis tyrimas plačiai naudojamas etape prieš transplantaciją siekiant nustatyti CMV komplikacijų recipientui po organo persodinimo riziką. Antra vertus, QF-CMV gali būti naudojamas vertinant organo recipiento imunitetą CMV infekcijai tiems pacientams, kurie rizikuoja užsikrėsti simptomine CMV infekcija ir (arba) susirgti CMV dėl imuniteto slopinimo (12–15).

„QuantiFERON-CMV“ tyrimo nauda aprašyta keliose išleistose įvairių organų persodinimo grupių klinikinėse studijose (1–11, 15, 16).

Atlikus didelį 108 asmenų, kuriems buvo persodinti vientisi organai (4), tyrimą, pacientai, kurių QF-CMV rezultatai buvo teigiami, užbaigus anti-CMV profilaktinį gydymą, vėliau daug rečiau sirgo CMV (3,3 % arba 1 iš 30; naudojant 0,2 IU/ml slenkstį), palyginti su pacientais, kurių QF-CMV rezultatas buvo neigiamas (21,8 % arba 17 iš 78, $p = 0,044$) (5).



5 pav. Vėliau prasidėjusios CMV ligos lygis po profilaktinio gydymo pacientams, turintiems teigiamą ir neigiamą „QuantIFERON-CMV“ rezultatą. Pagrindiniai duomenys iš Kumar et al. (4).

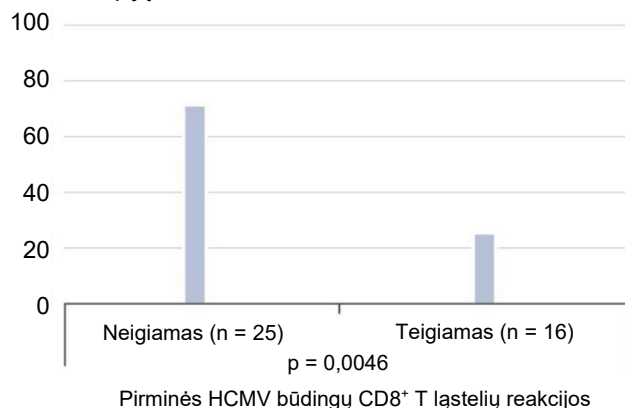
Be to, CMV serologiškai neigiami organo recipientai, kurie gavo organą iš CMV teigiamo donoro (D+R-), kurio QF-CMV rezultatas teigiamas, užbaigę profilaktinį gydymą, dažniau ir ilgiau nesusirgo CMV liga. Tai rodo, kad QF-CMV galima naudoti norint nustatyti tuos, kuriems kyla vėlesnio CMV ligos išsivystymo rizika.

Atliekant šį tyrimą taip pat nustatyta, kad organų persodinimo pacientų, turinčių aukščiausią užsikrėtimo CMV liga (D+/R-) rizikos lygį, grupės teigiamas rezultatas rodo, kad yra didesnė tikimybė, kad pacientas nesusirgs CMV po profilaktinio gydymo.

Tyrimo, kuriame ištirti 37 pacientai su persodintais vientisais organais (6), nustatant CMV būdingų CD8⁺ T ląstelių reakcijas (pasitelkus QF-CMV) ir stebint CMV viruso projekcijas kraujyje, prognozuojama, kad virusas savaime išnyks, o ne progresuos. Šiame tyrime 24 iš 26 pacientų (92,3 %), kurių QF-CMV rezultatas buvo teigiamas (naudojant IFN- γ \geq 0,2 IU/ml tyrimo slenkstį), CMV virusas išnyko savaime ir tik 5 iš 11 (45,5 %) pacientų, kurių QF-CMV rezultatas buvo neigiamas, virusas taip pat išnyko savaime.

Tiriant 67 pacientus su persodintais plaučiais ir vertinant CMV viremijos epizodus laikotarpiu po transplantacijos (7), pastebėta, kad 18 iš 25 (72 %) CMV viremijos epizodų gauti tiriant pacientus, kurių QF-CMV rezultatas buvo neigiamas, palyginti su 4 iš 16 (25 %) viremijos epizodų, gautų tiriant pacientus, kurių QF-CMV rezultatas buvo teigiamas (Fisher tyrimas, $p = 0,0046$, 6).

% HCMV DNR epizodų su viruso kiekiu
> 1000 kopijų/ml



6 pav. CMV būdingų CD8⁺ T ląstelių reakcijų, nustatytų pagal „QuantIFERON-CMV“ ir CMV viremijos vystymąsi, statistinė analizė (Fisher tyrimas, p = 0,0046). Pagrindiniai duomenys iš Weseslindtner et al (7).

Atlikus didelį kelis centrus apėmusį perspektyvųjį tyrimą, kuriame buvo tiriami 127 CMV serologiškai neigiami pacientai su persodintais vientisais organais, gautais iš CMV serologiškai teigiamų donorų (8), ir visiems pacientams gavus antivirusinį profilaktinį gydymą, nustatyta, kad praėjus 12 mėnesių nuo persodinimo pacientai, kurių QF-CMV tyrimo (naudojant 0,1 IU/ml slenkstį) rezultatas buvo teigiamas, daug rečiau sirgo vėliau prasidėjusia liga (6,4 %), palyginti su tais, kurių QF-CMV tyrimo rezultatas buvo neigiamas (22,2 %) ir neaiškus (58,3 %, $p < 0,001$). Neaiškius rezultatus klasifikuojant kaip neigiamus, vėliau prasidedančios CMV ligos dažnumas buvo 6,4 % ir 26,8 %, $p = 0,024$. Teigiamos ir neigiamos prognozuojamos QF-CMV tyrimo, skirto apsaugoti nuo CMV ligos, reikšmės atitinkamai buvo 0,90 (95 % CI 0,74–0,98) ir 0,27 (95 % CI 0,18–0,37). Šiuo tyrimu nustatyta, kad QF-CMV gali būti naudingas prognozuojant, ar paciento rizika susirgti CMV profilaktiškai gydant yra maža, vidutinė ar didelė.

Perspektyviajame tyrime, kuriame ištirti 55 vientiso organo recipientai (8) ir išanalizuotas paciento prieš transplantaciją buvusių QF-CMV rezultatų ir paciento po transplantacijos CMV replikacijos epizodų ryšys, nustatyta, kad dažniau CMV replikaciją po transplantacijos patirdavo CMV serologiškai teigiami recipientai, kurių QF-CMV rezultatas prieš persodinimą buvo neigiamas (naudojant 0,2 IU/ml tyrimo slenkstį) (7 iš 14 arba 50 %), palyginti su tais CMV serologiškai teigiamais recipientais, kurių QF-CMV rezultatas prieš persodinimą buvo teigiamas (4 iš 30 arba 13,3 %, $p = 0,021$).

Šiame tyrime nustatyta, kad recipientų, kurių QF-CMV rezultatas prieš persodinimą buvo neigiamas ir kurie gavo organą iš CMV serologiškai teigiamo donoro, CMV replikacijos rizika buvo dešimt kartų didesnė, palyginti su tais recipientais, kurių QF-CMV rezultatas prieš persodinimą buvo teigiamas (koreguotas galimybių santykis ARBA 10,49, 95 % CI 1,88–58,46). Todėl prieš persodinimą atliekamas QF-CMV tyrimas gali būti naudingas prognozuojant CMV replikacijos riziką ir suteikti galimybę individualiai pritaikyti CMV infekcijos valdymą po vientiso organo persodinimo.

Šiuo metu visame pasaulyje yra atlikti arba atliekami keli kiti tyrimai su recipientais dėl CMV būdingų CD8⁺ T ląstelių reakcijų aptikimo pasitelkus QF-CMV (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16).

Tarptautinės gairės dėl citomegalo viruso valdymo vientiso organo transplantantuose

CMV būdingo imuniteto stebėjimo svarba pripažinta ir aprašyta dokumente „*Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation*“ (12). Šiose tarptautinėse gairėse, kurias sukūrė CMV ir vientiso organo transplantacijos specialistai, o surinko Transplantacijos draugijos Infekcinių ligų skyrius, pateikiami įrodymai ir specialistų žiniomis pagrįstos gairės apie CMV valdymą, įskaitant diagnostiką, imunologiją, prevenciją ir gydymą.

Šiose gairėse yra dokumentas „CMV būdingų T ląstelių reakcijų stebėjimas gali padėti prognozuoti recipiento CMV ligos riziką laikotarpiu po transplantacijos, padėti vykdyti profilaktinį gydymą ir išankstinę terapiją“ (12).

Be to, gairėse taip pat pateikiamos rekomendacijos, kaip vykdyti idealų imuniteto stebėjimo tyrimą, kuris apima:

- galimybę įvertinti persodinto organo recipiento CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelių kiekį ir funkciją;
- galimybę išmatuoti IFN- γ ;
- paprastą, nebrangų atlikimą ir atkuriamumą;
- trumpą apdorojimo laiką;
- galimybę paprastai išsiųsti mėginius į atitinkamas specializuotas laboratorijas.

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

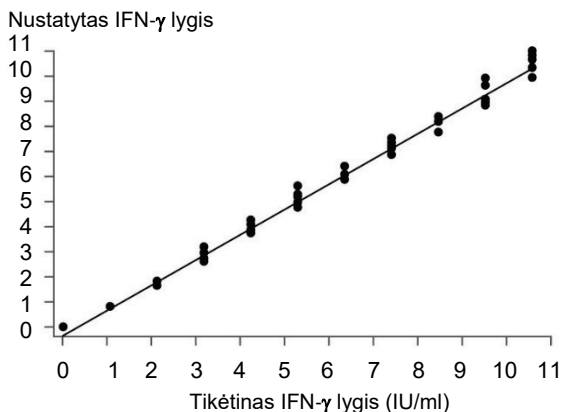
Tyrimo atlikimo charakteristikos

QF-CMV ELISA naudojamas žmogaus IFN- γ standartas, kuris tiriamas lyginant su nuorodiniu IFN- γ paruošimu (NIH nuorod.: Gxg01-902-535). Tyrimo mėginių rezultatai pateikiami tarptautiniais vienetais (International Units, IU), atitinkančiais standarto kreivę, paruoštą tiriant su rinkiniu pateikto antrinio standarto skiedinį.

Tam tikrų asmenų serume arba plazmoje esantys heterofiliniai (pvz., žmogaus antipelės) antikūnai žinomi kaip imunologinių tyrimų trukdžiai. Heterofilinių antikūnų poveikis QF-CMV ELISA tyrimui sumažinamas, į žalią skiediklį pridedant įprasto pelės serumo ir naudojant F(ab')₂ monokloninių antikūnų fragmentus kaip IFN- γ fiksavimo antikūnus, dengiančius mikroplokštelės šulinėlius.

QF-CMV ELISA tyrimo aptikimo riba yra 0,065 IU/ml ir nepateikiama jokių prozono efekto įrodymų, kai IFN- γ koncentracija yra iki 10 000 IU/ml. Nevyko QF-CMV ELISA antikūnų kryžminės reakcijos su jokiais ištirtais citokinais, įskaitant IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 ir IL12.

QF-CMV ELISA tyrimo linijškumas įrodytas, žinomos IFN- γ koncentracijos 11 plazmos telkinių penkis pakartojimus padėjus atsitiktine tvarka ELISA plokštelėje. Tiesinė regresinė linija turi $1,002 \pm 0,011$ nuožulnų kilimą ir 0,99 koreliacijos koeficientą (7 pav.).



7 pav. QF-CMV ELISA tiesinis profilis nustatytas ištyrus 11 žinomos IFN- γ koncentracijos plazmos mėginių (penkis dublikatus).

QF-CMV ELISA tyrimo atgaminamumas buvo apskaičiuotas tiriant 20 plazmos mėginių, esant įvairioms IFN- γ trijų pakartojimų koncentracijoms, trims operatoriams tyrimą atliekant trijose laboratorijose per tris ne paeiliui einančias dienas. Taigi kiekvienas mėginys buvo tirtas 27 kartus vykdant devynis nepriklausomus tyrimo seansus. Vienas mėginys buvo nulinė kontrolė, o IFN- γ koncentracija buvo 0,08 (95 % CI 0,07–0,09) IU/ml. Likusiuose 19 plazmos mėginių koncentracija svyravo nuo 0,33 (95 % CI 0,31–0,34) iki 7,7 IU/ml (95 % CI 7,48–7,92).

Tyrimo arba vidinis tyrimo netikslumas apskaičiuotas išvedus %VK vidurkį kiekvienam plazmos mėginiui su IFN- γ (mėginį imant iš kiekvienos plokštelės ($n = 9$), o netikslumo %VK svyravo nuo 4,1 iki 9,1. Vykdymo %VK vidurkis (± 95 % CI) buvo $6,6\% \pm 0,6\%$. Nulinio mėgintuvėlio IFN- γ plazmos vidurkis buvo 14,1 %VK.

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

Techninė informacija

Neaiškūs rezultatai

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

- ilgesniu nei 16 val. kraujo mėginio laikymu iki inkubavimo 37 °C temperatūroje;
- kraujo mėginių laikymu kitoje temperatūroje nei rekomenduojama (22 ± 5 °C);
- nepakankamu kraujo surinkimo mėgintuvėlių turinio maišymu;
- nepakankamai švariai išplauta ELISA plokštele.

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

Sukrešėję plazmos mėginiai

Jeigu plazmos mėginius laikant ilgesnį laiką susidaro fibrino krešuliai, mėginius reikia centrifuguoti, kol susidarys nuosėdos; tai palengvina plazmos lašinimą pipete.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Jei reikia daugiau informacijos, žr. techninę informaciją, pateiktą www.QuantiFERON.com. Kontaktinę informaciją rasite galiniame viršelyje.

Pastabos ir pasiūlymai

Žema standartų optinio tankio reikšmė

- | | |
|---|---|
| a) Klaida, susijusi su standarto skiedimu | Komplekto standarto skiedinius paruoškite tiksliai laikydamiesi QF-CMV ELISA pakuotės informacinio lapelio nurodymų. |
| b) Klaida naudojantis pipete | Patikrinkite, ar pipetės yra kalibruotos ir naudojamos tiksliai pagal gamintojo nurodymus. |
| c) Per žema inkubacijos temperatūra | ELISA inkubavimas turėtų vykti kambario temperatūroje (22 ± 5 °C). |
| d) Per trumpas inkubavimo laikas | Plokštelės su konjugatu, standartais ir mėginiais inkubavimo trukmė turėtų būti 120 ± 5 min. Fermento substrato tirpalas ant plokštelės inkubuojamas 30 minučių. |
| e) Naudojamas netinkamas plokštelių skaitytuvo filtras | Plokštelės rezultatai turėtų būti skaitomi esant 450 nm, naudojant 620–650 nm referencijos filtrą. |
| f) Per šalti reagentai | Visi reagentai (neįskaitant konjugato 100× koncentrato) prieš pradėdant tyrimą turi būti kambario temperatūros. Tam reikia maždaug 1 valandos. |
| g) Pasibaigęs komplekto / sudedamųjų dalių galiojimo laikas | Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100× koncentratas buvo naudoti 3 mėnesių laikotarpiu nuo atkūrimo. |

Nespecifinės spalvos atsiradimas

- | | |
|---|---|
| a) Nepakankamai švariai išplautos plokštelės | Plokštelę plaukite mažiausiai šešis kartus po 400 µl plovimo buferio į duobutę. Atsižvelgiant į naudojamą plovimo aparatą, gali prireikti daugiau nei šešių plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų bent 5 sekundes pamirkyti. |
| b) Kryžminis ELISA duobučių užteršimas | Norėdami sumažinti riziką iki minimumo, atsargiai lašinkite pipete ir maišykite mėginį. |
| c) Pasibaigęs komplekto / sudedamųjų dalių galiojimo laikas | Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100× koncentratas buvo naudoti 3 mėnesių laikotarpiu nuo atkūrimo. |
| d) Fermento substrato tirpalas užterštas | Išmeskite substratą, jeigu nusidažo mėlynai. Įsitinkinkite, kad naudojamos švarios reagentų talpyklos. |

Pastabos ir pasiūlymai

- e) Plazmos maišymas centrifugos mėgintuvėliuose prieš paimant plazmos mėginį
- Užtikrinkite, kad plazma virš gelio dangtelio būtų paimta atsargiai (pipete netraukinėjant aukštyn ir žemyn ir nepažeidžiant medžiagos ant gelio paviršiaus).

Didelis fonas

- a) Nepakankamai švariai išplautos plokštelės
- Plokštelę plaukite mažiausiai šešis kartus po 400 µl plovimo buferio į duobutę. Atsižvelgiant į naudojamą plovimo aparatą, gali prireikti daugiau nei šešių plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų bent 5 sekundes pamirkyti.
- b) Per aukšta inkubacijos temperatūra
- ELISA inkubavimas turėtų vykti kambario temperatūroje (22 ± 5 °C).
- c) Pasibaigęs komplekto / sudedamųjų dalių galiojimo laikas
- Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100× koncentratas buvo naudoti 3 mėnesių laikotarpiu nuo atkūrimo.
- d) Fermento substrato tirpalas užterštas
- Išmeskite substratą, jeigu nusidažo mėlynai. Įsitikinkite, kad naudojamos švrios reagentų talpyklos.

Nelinijinė standarto kreivė ir dvigubas kintamumas

- a) Nepakankamai švariai išplautos plokštelės
- Plokštelę plaukite mažiausiai šešis kartus po 400 µl plovimo buferio į duobutę. Atsižvelgiant į naudojamą plovimo aparatą, gali prireikti daugiau nei šešių plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų bent 5 sekundes pamirkyti.
- b) Standarto skiedinio ruošimo klaida
- Komplekto standarto skiedinius paruoškite tiksliai laikydamiesi pakuotės informaciniame lapelyje pateiktų nurodymų.
- c) Nepakankamas išmaišymas
- Prieš pildami duobutes kruopščiai sumaišykite reagentus apversdami arba lengvai pasukiodami.
- d) Netolygus lašinimas pipete arba pertraukimas pasirengiant tyrimui
- Mėginių ir standartų pylimas turėtų vykti nenutrūkstamai. Visi reagentai turi būti paruošti prieš pradėdant tyrimą.

Produkto informaciją ir technines nuorodas gausite nemokamai iš QIAGEN, per platintoją arba apsilankę www.QuantiFERON.com.















Literatūra

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.

Simboliai

Ant pakuotės ir etikečių gali būti pateikti šie simboliai:

| Simbolis | Simbolio apibrėžimas |
|--|--|
|  | Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti |
|  | Tinka naudoti iki |
|  | CE ženklas |
|  | „In vitro“ diagnostinis medicinos prietaisas |
|  | Katalogo numeris |
|  | Partijos numeris |
|  | Medžiagos numeris |
|  | Visuotinis prekės numeris |
|  | Temperatūros apribojimai |
|  | Nenaudoti pakartotinai |
|  | Saugoti nuo saulės šviesos |
|  | Žr. naudojimo instrukcijas |
|  | Gamintojas |
|  | Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje |

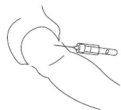
Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu **www.qiagen.com/Support**, skambinkite tel. 00800-22-44-6000 arba kreipkitės į vieną iš mūsų QIAGEN techninės priežiūros skyrių ar vietinių pardavėjų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite **www.qiagen.com**).

Trumpas ELISA tyrimo procedūros aprašas

1 etapas. Kraujo inkubavimas

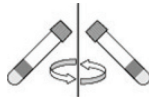
1. Kraujo surinkimo mėgintuvėliu iš paciento paimkite kraujo mėginį ir 10 kartų stipriai pakratydami kruopščiai sumaišykite turinį, kad mėgintuvėlio sienelių vidinė pusė būtų visiškai padengta krauju, su kuriuo susimaišytų antigenai, esantys ant mėgintuvėlio vidinių sienelių.



2. Inkubuokite mėgintuvėlius vertikaliaje padėtyje 16–24 val. 37 °C ± 1 °C temperatūroje.



3. Po inkubavimo mėgintuvėlius 15 minučių centrifuguokite 2 000–3 000 RCF (g), kad plazma atsiskirtų nuo raudonųjų kraujo kūnelių.



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



2 etapas. IFN- γ ELISA

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



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



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



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

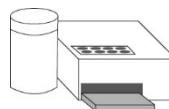


5. Į atitinkamas duobutes įpilkite po 50 µl plazmos mėginio ir 50 µl standartų. Išmaišykite naudodami kratytuvą.

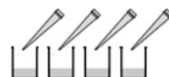


6. 120 minučių inkubuokite kambario temperatūroje.

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



8. Į duobutes įpilkite po 100 µl fermento substrato tirpalo. Išmaišykite naudodami kratytuvą.



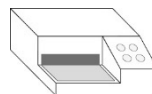
9. 30 minučių inkubuokite kambario temperatūroje.



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



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



12. Analizuokite rezultatus.



Vadovo peržiūros istorija

| Dokumentas | Keitimai | Data |
|-------------------|---|-----------------|
| L1075110-R5 | Saugos informacijos dėl sudužusių buteliukų įtraukimas 2 lentelės „QF-CMV rezultatų aiškinimas“ 24 psl. naujinimai | 2018 m. vasaris |
| L1075110-R5 | Atnaujinta GHS informacija, 10 psl. | 2018 m. vasaris |

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Prekių ženklai: QIAGEN®; „Sample to Insight®“, „QuantIFERON®“ („QIAGEN Group“); „Excel®“, „Microsoft®“ („Microsoft“); „ProClin®“ („Rohm and Haas Co.“); „SeraQuest™“ („Quest International, Inc.“).

„QuantIFERON-CMV ELISA“ komplekto ribotoji licencinė sutartis

Naudodamas šį produktą pirkėjas ar naudotojas sutinka su toliau nurodytomis sąlygomis.

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

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

2018 m. vasaris © QIAGEN, 2018. Visos teisės saugomos.

Užsakymas www.qiagen.com/shop | Techninė pagalba support.qiagen.com | Svetainė www.qiagen.com