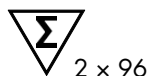


Oktober 2019

Indlægsseddel til QuantiFERON[®]-CMV ELISA



IFN- γ -test i fuldblod til måling af responser på humane
cytomegalovirus-peptidantigener



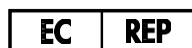
Til in vitro-diagnostisk brug



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND

1075110 Rev. 06



www.QuantiFERON.com

Indhold

Tilsigtet anvendelse	5
Oversigt og forklaring	5
Funktionsprincip	6
Tid, som kræves til at udføre analysen	7
Leverede materialer.....	8
Kittets indhold	8
Påkrævede materialer, der ikke medfølger.....	9
Advarsler og forholdsregler.....	9
Sikkerhedsinformation	11
Opbevaring og håndtering af reagenser	12
Prøveindsamling og -håndtering	13
Procedure	15
Stadie 1: Inkubering af blod og opsamling af plasma.....	15
Stadie 2: QuantiFERON-CMV ELISA for humant IFN- γ	16
Beregninger og testfortolkning	21
Generering af standardkurve (hvis QF-CMV-analysesoftwaren ikke anvendes)	21
Kvalitetskontrol af testen	22
Fortolkning af resultater	23
Begrænsninger	24
Forventede værdier	24
Ydeevnekarakteristik	27
Klinisk ydeevne	27

Analysetærskel	28
Kliniske undersøgelser	28
Specificitet	28
Sensitivitet	29
Studier, der fremhæver klinisk nytteværdi	29
Internationale konsensusretningslinjer for håndtering af cytomegalovirus ved transplantation af hele organer	34
Analysens ydelseskarakteristika	35
Teknisk information	37
Ubestemmelige resultater	37
Koagulerede plasmaprøver	37
Fejlfindingsvejledning	38
Litteraturhenvisninger	40
Symboler	42
Kontaktoplysninger	43
Forkortet ELISA-testprocedure	44
Stadie 1: Inkubering af blod	44
Stadie 2: IFN- γ ELISA	44
Revisionshistorik for håndbogen	47

Tilsigtet anvendelse

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) er en in vitro-analyse, der benytter en peptidcocktail, som simulerer humane cytomegalovirus (cytomegalovirus, CMV)-proteiner, til stimulering af celler i hepariniseret fuldblod. Påvisning af interferon-gamma (IFN γ) vha. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) anvendes til at kvantificere in vitro-responser på de peptidantigener, der er associeret med immunkontrol af CMV-infektion. Tab af denne immunfunktion kan være associeret med udvikling af CMV-sygdom. Den tilsigtede brug af QF-CMV er at monitorere en patients niveau af anti-CMV-immunitet.

QF-CMV er ikke en test til påvisning af CMV-infektion og bør ikke anvendes til at udelukke CMV-infektion.

Oversigt og forklaring

CMV er et herpesvirus, som findes hos 50-85 % af de voksne i befolkningen. Det er en hyppigt forekommende komplikation til immunsuppression, navnlig efter transplantation, og kan bidrage væsentligt til morbiditet og mortalitet hos transplantatmodtagere. De aktuelt benyttede immunsuppressive behandlinger til forebyggelse af afstødning af et transplanteret organ har skadelig indvirkning på T-lymfocytter og cellemedierede immun (cell-mediated immune, CMI)-respons, hvilket fører til øget modtagelighed for virusinfektioner efter transplantation. Vigtigheden af T-cellefunktion for suppression af CMV-replikation understreges også af det faktum, at CD8⁺ CMV-specifikke cytotoksiske T-lymfocytter (CTL'er) kan beskytte mod virus-associeret patogenese. Optælling af CD8⁺ CMV-specifikke CTL'er hos immunsupprimerede patienter og produktionen af IFN- γ kan være prædiktive for risikoen for udvikling af CMV-sygdom. IFN- γ -produktion kan være et funktionelt surrogat for identifikation af CMV-specifikke CTL'er.

QF-CMV er en analyse for CMI-responser på peptidantigener, der simulerer CMV-proteiner. CMV-peptiderne er udformet til målsøgning af CD8⁺ T-celler, herunder HLA-klasse I-haplotype A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 og Cw6 (A30, B13), der dækker > 98 % af den menneskelige befolkning. Personer, som er smittet med CMV, har sædvanligvis CD8⁺-lymfocytter i deres blod, som genkender disse antigener. Denne genkendelsesproces involverer dannelse og udskillelse af cytokin IFN- γ . Påvisningen og den efterfølgende kvantificering af IFN- γ danner grundlag for denne test.

Funktionsprincip

QF-CMV-testen udføres i to stadier. Først opsamles fuldblod i hvert af QF-CMV-blodprøvetagningsrørene, som omfatter et Nil Control (Negativ kontrol)-rør, et CMV Antigen (CMV-antigen)-rør og et Mitogen-rør.

Mitogen-røret anvendes som positiv kontrol i QF-CMV-testen. Dette kan især være berettiget, når der er tvivl om personens immunstatus. Mitogen-røret kan også anvendes som en kontrol for korrekt blodhåndtering og -inkubering.

Rørene bør inkuberes ved 37 °C så hurtigt som muligt og inden for 16 timer efter prøvetagning. Efter en 16 til 24-timers inkuberingsperiode centrifugeres rørene, plasmaet fjernes, og mængden af IFN- γ (IE/mL) målt vha. QF-CMV ELISA.

Mængden af IFN- γ i plasmaprøver fra CMV Antigen- og Mitogen-rør kan ofte være over de øvre grænser for de fleste ELISA-læsere, selv for moderat immunsupprimerede personer. Til opnåelse af kvalitative resultater anvendes værdierne beregnet for ufortyndet plasma. Til opnåelse af kvantitative resultater, hvor faktiske IE/mL-værdier er påkrævet, bør plasmaprøverne fortyndes 1/10 i grøn diluent og analyseres vha. ELISA sammen med ufortyndet plasma.

Bemærk: For prøver, som er inden for intervallet for QF-CMV ELISA (dvs. op til 10 IE/mL), bør resultatet opnået med den ufortyndede plasmaprøve benyttes. For sådanne IFN- γ -koncentrationer kan værdier opnået ved brug af 1/10-fortyndingen af plasmaprøverne være unøjagtig.

En test anses for reaktiv for et IFN- γ respons, når aflæsningsværdien for CMV Antigen-røret er væsentligt over Nil-IFN- γ IE/mL-værdien. Den mitogenstimulerede plasmaprøve fungerer som en IFN- γ -positiv kontrol for hver testet prøve. Et lavt respons på mitogen indikerer et ubestemmeligt resultat, når en blodprøve også har et ikke-reaktivt respons på CMV-antigenerne. Dette mønster kan forekomme ved et utilstrækkeligt antal lymfocytter, nedsat lymfocytaktivitet grundet ukorrekt prøvehåndtering, ukorrekt fyldning/blanding af Mitogen-røret eller manglende evne hos patientens lymfocytter til at danne IFN- γ , såsom hos nyligt transplanterede patienter. Nil-prøven justerer for baggrund eller ikke-specifikt IFN- γ i blodprøverne. IFN- γ -niveauet for Nil-røret trækkes fra IFN- γ -niveauet for CMV Antigen-røret og Mitogen-røret (se "Fortolkning af resultater" på side 23 i denne indlægsseddel for en beskrivelse af, hvordan QF-CMV-resultater fortolkes).

Tid, som kræves til at udføre analysen

Den tid, som skal anvendes til udførelse af QF-CMV-analysen, er estimeret nedenfor; tiden til test af flere prøver, når de er samlede i batch, er også angivet:

Inkubering af blodrør ved 37 °C:	16 til 24 timer
ELISA:	Ca. 3 timer for én ELISA-plade
	Mindre end 1 times arbejde
	Tilføj 10 til 15 minutter for hver ekstra plade

Leverede materialer

Kittets indhold

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Blodprøvetagningsrør (pakke til én patient))	
Katalognr.	0192-0301
Antal klargøringer	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON Negativ kontrol) (grå hætte)	1 rør
QuantiFERON CMV Antigen (QuantiFERON CMV-antigen) (blå hætte)	1 rør
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON Mitogen-kontrol) (lilla hætte)	1 rør
Indlægsseddel til QF-CMV-blodprøvetagningsrør	1

QuantiFERON-CMV ELISA	2 Plade-kit ELISA
Katalognr.	0350-0201
Mikropladestrips (12 x 8 brønde) dækket med murint anti-humant IFN- γ -monoklonalt antistof	2 sæt mikropladestrips med 12 x 8 brønde
Human IFN- γ Standard (Humant IFN- γ -standard), lyofiliseret (indeholder rekombinant humant IFN- γ , komælkskasein, 0,01 % w/v Thimerosal)	1 x hætteglas (8 IE/mL efter rekonstituering)
Green Diluent (Grøn diluent) (indeholder komælkskasein, normalt museserum, 0,01 % w/v Thimerosal)	1 x 30 mL
Konjugat 100x koncentrat, lyofiliseret (murint anti-humant IFN- γ -HRP, indeholder 0,01 % w/v Thimerosal)	1 x 0,3 mL
Wash Buffer 20x Concentrate (Vaskebuffer 20x koncentrat) (pH 7,2, indeholder 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 x 100 mL
Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratopløsning) (indeholder H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' tetramethylbenzidin)	1 x 30 mL
Enzyme Stopping Solution (Enzymstandsningsopløsning) (indeholder 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 mL
Indlægsseddel til QF-CMV ELISA	1

* Indeholder svovlsyre. Se side 9 angående forholdsregler.

Påkrævede materialer, der ikke medfølger

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

- 37 °C inkubator; CO₂ ikke påkrævet
- Kalibrerede pipetter med variabelt volumen til tilførsel af 10 µL til 1000 µL med engangsspidser
- Kalibreret flerkanalspipette, som kan tilføre 50 µL og 100 µL med engangsspidser
- Mikropladeryster
- Deioniseret eller destilleret vand, 2 liter
- Mikropladevasker (automatiseret vasker anbefales)
- Mikropladelæser forsynet med 450 nm filter og 620 nm til 650 nm referencefilter
- Pladelåg

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Se de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere oplysninger. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN®-kit og tilhørende komponenter.

FORSIGTIG



Håndter humant blod som potentielt infektiøst. Overhold relevante retningslinjer for håndtering af blod.

Følgende farer og forholdsregler gælder for komponenterne i QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Indeholder svovlsyre. Advarsel! Kan være metalætsende. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Advarsel! Forårsager let hudirritation. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

QuantiFERON Green Diluent



Indeholder: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulfofenyl)-4-(4-sulfofenylazo) pyrazol-3-carboxylat. Indeholder: tartrazin. Advarsel! Kan forårsage allergisk hudreaktion. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Indeholder: ProClin 300. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Undgå udledning til miljøet.

Sikkerhedsinformation

Yderligere information

- Afvigelse fra indlægssedlen til QF-CMV kan forårsage fejlagtige resultater. Læs instruktionerne grundigt inden brug.
- Kittet må ikke anvendes, hvis en eller flere af reagensflaskerne viser tegn på beskadigelse eller lækage inden brug.
- Vigtigt: Inspicer hætteglassene før brug. Konjugat- eller IFN- γ Standard-hætteglas må ikke bruges, hvis der er tegn på skader, eller hvis gummiforseglingen er i stykker. Beskadigede hætteglas må ikke bruges. Træf de fornødne forholdsregler for at bortskaffe dem sikkert. Anbefaling: Brug en decrimper-tang til hætteglas til at åbne konjugat- eller IFN- γ Standard-hætteglas for at minimere risikoen for personskade pga. metalforseglingen.
- Mikropladestrips, Human IFN- γ Standard (Humant IFN- γ -standard), Green Diluent (Grøn diluent) eller Conjugate 100x Concentrate (Konjugat 100x koncentrat) fra andre QF-CMV-kitbatches må ikke blandes eller anvendes. Andre reagenser (Wash Buffer 20x Concentrate, Enzyme Substrate Solution og Enzyme Stopping Solution) kan udskiftes mellem kits, hvis reagenserne er inden for deres udløbsperioder, og lotdetaljerne er registreret.
- Bortskaf ubrugte reagenser og biologiske prøver i henhold til lokale, regionale og nationale bestemmelser.
- Hverken QF-CMV-blodprøvetagningsrør eller QF-CMV ELISA-kits må anvendes efter udløbsdatoen.
- Sørg for, at laboratorieudstyr, f.eks. pladevaskere og -læsere, er kalibreret/valideret til brug.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Blodprøvetagningsrør

- QF-CMV-blodprøvetagningsrør opbevares ved 4 °C til 25 °C.
- QF-CMV-blodprøvetagningsrør skal have en temperatur på mellem 17 og 25 °C, når blodet fyldes i dem.
- QF-CMV-blodprøvetagningsrørenes holdbarhed er maksimalt 15 måneder fra fremstillingsdatoen, når de opbevares ved 4 °C til 25 °C.

ELISA-kittets reagenser

- Opbevar kits ved 2-8 °C.
- Enzymsubstratopløsning skal altid beskyttes mod direkte sollys.

Rekonstituerede og ubrugte reagenser

Se instruktioner i rekonstituering af reagenserne under "Stadie 2: QuantiFERON-CMV ELISA til human IFN- γ " (trin 3 og 5 på siderne 16 og 20).

- Det rekonstituerede humane IFN- γ Standard kan holde i op til 3 måneder ved opbevaring ved 2-8 °C. Bemærk datoen for, hvornår den humane IFN- γ Standard blev rekonstitueret.
- Efter rekonstituering skal ubrugt konjugat 100x koncentrat igen opbevares ved 2 °C til 8°C og anvendes inden for 3 måneder.

Notér den dato, hvor konjugatet blev rekonstitueret.

- Konjugat med brugsstyrke skal anvendes inden for 6 timer efter fremstilling.
- Vaskebuffer med brugsstyrke kan opbevares ved stuetemperatur (22 °C $\pm$ 5 °C) i op til 2 uger.

Prøveindsamling og -håndtering

Der anvendes følgende blodprøvetagningsrør til QF-CMV:

- Nil Control (Negativ kontrol) (grå hætte)
- CMV Antigen (CMV-antigen) (blå hætte)
- Mitogen Control (Mitogen-kontrol) (lilla hætte)

Der er fasttørret antigener på blodprøvetagningsrørenes inderside, så det er væsentligt, at rørenes indhold blandes grundigt med blodet. Rørene skal overføres til en 37 °C inkubator så hurtigt som muligt og inden for 16 timer efter prøvetagning.

Følgende procedurer bør følges for at opnå optimale resultater:

1. For hver person opsamles 1 mL blod ved venepunktur direkte i hvert af QF-CMV-blodprøvetagningsrørene. Denne procedure skal udføres af en uddannet bioanalytiker.

QF-CMV-blodprøvetagningsrør kan anvendes i højder op til 810 meter.

Hvis der anvendes QF-CMV-blodprøvetagningsrør i højder over 810 meter, eller hvis der aftappes for lidt blod, kan der udtages blod ved hjælp af en sprøjte, og straks overføres 1 mL til hvert af de 3 rør. Af sikkerhedsmæssige årsager gøres dette bedst ved at fjerne sprøjtekanylen under overholdelse af passende sikkerhedsprocedurer, fjerne hætteerne fra de tre QF-CMV-rør og tilsætte 1 mL blod til hvert af dem (op til det sorte mærke på siden med røretiketten). Sæt hætteerne godt fast på rørene igen, og bland som beskrevet nedenfor. Eftersom 1 mL rør aftapper blod relativt langsomt, skal røret beholdes på kanylen i 2-3 sekunder, når røret ser ud til at være helt fyldt, for at sikre, at der udtrækkes det korrekte volumen.

Det sorte mærke på siden af rørene angiver 1 mL fyldningsvolumenet. QF-CMV-blodprøvetagningsrør er godkendt til volumener i intervallet fra 0,8 til 1,2 mL. Hvis blodniveauet i et eller flere af rørene ikke er tæt på området for indikatormærket, skal der tages en ny blodprøve.

Hvis der anvendes en sommerfuglekanyle til udtagning af blod, bør der anvendes et "gennemskylningsrør" for at sikre, at slangen fyldes med blod inden brug af QF-CMV-blodprøvetagningsrørene.

Alternativt kan blod opsamles i et enkelt generisk blodprøvetagningsrør, der indeholder lithium-heparin som antikoagulant og derefter overføres til QF-CMV-rør. Brug kun lithium-heparin som antikoagulant til blod, da andre antikoagulanter kan påvirke analysen. Fyld et blodprøvetagningsrør (mindst 5 ml volumen), og bland forsigtigt ved at vende røret flere gange for at opløse heparinen. Denne procedure skal udføres af en uddannet bioanalytiker. Blod skal opbevares ved stuetemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), før det overføres til QF-CMV-rør til inkubering, hvilket skal påbegyndes inden for 16 timer fra blodprøvetagningen.

2. Straks efter påfyldning af QF-CMV-rørene skal de rystes 10 gange lige akkurat kraftigt nok til at sikre, at hele indersiden af hvert rør er dækket af blod, så antigenerne på indersiden af røret opløses.

Rørene skal holdes på mellem $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, når blodet fyldes i dem.

For kraftig rystning af rørene kan skabe gel-forstyrrelser og forårsage afvigende resultater.

Hvis blodet er blevet opsamlet i et lithium-heparin-rør, skal prøverne blandes jævnt, før de dispenseres i QF-CMV-rør. Sørg for, at blodet er grundigt blandet ved at vende det forsigtigt umiddelbart før dispensering. Dispensér i mængder på 1 ml alikvot (én for hvert QF-CMV-rør) i et passende Nil-, CMV Antigen- og Mitogen-rør. Dette skal udføres aseptisk ved at sikre passende sikkerhedsprocedurer, fjern hættekapslerne fra de tre QF-CMV-rør og føj 1 ml blod til hvert (til det sorte mærke på siden af røretiketterne). Sæt hættekapslerne godt fast på rørene igen, og bland som beskrevet ovenfor.

3. Mærk rørene korrekt.

Sørg for, at hvert rør (Nil, CMV Antigen, Mitogen) kan identificeres via mærkningen eller på anden måde.

4. Efter fyldning, rystning og mærkning skal rørene overføres til en $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubator så hurtigt som muligt og inden for 16 timer efter prøvetagning. Før inkubering skal rørene opbevares ved stuetemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Blodprøverne må ikke nedkøles eller fryses.

Procedure

Stadie 1: Inkubering af blod og opsamling af plasma

1. Inkuber rørene STÅENDE ved $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 16 til -24 timer. Inkubatoren kræver ikke CO_2 eller fugt.

Vigtigt: Hvis blodet ikke inkuberes straks efter prøvetagningen, skal man gentage blandingen af rørene ved at vende dem på hovedet og op igen 10 gange før inkubering. Efter inkubering kan blodprøvetagningsrørene opbevares ved 4 °C til 27 °C i op til 3 dage før centrifugering.

2. Efter inkubering af rørene ved 37 °C opsamles plasmaet nemmere ved at centrifugere rørene i 15 minutter ved 2000 til 3000 RCF (g). Gelproppen skiller cellerne fra plasmaet. Hvis dette ikke sker, skal rørene centrifugeres igen.

Det er muligt at opsamle plasmaet uden centrifugering, men der kræves større forsigtighed for at fjerne plasmaet uden at hvirvle cellerne op.

3. Efter centrifugering skal det undgås at pipettere op og ned eller på nogen måde blande plasmaet inden opsamling. Pas til enhver tid på ikke at hvirvle materialet på gelens overflade op.

Vigtigt: Plasmaprøver bør kun opsamles ved brug af en pipette.

Plasmaprøverne kan overføres direkte fra centrifugerede blodprøvetagningsrør til QF-CMV ELISA-pladen, også når der anvendes automatiserede ELISA-arbejdsstationer.

Plasmaprøver kan opbevares i centrifugerede QF-CMV-blodprøvetagningsrør i op til 28 dage ved $2-8\text{ °C}$ eller, hvis de er opsamlet, under -20 °C (helst under -70 °C) i længere perioder.

For at opnå tilstrækkelige prøver skal der opsamles mindst $150\text{ }\mu\text{L}$ plasma.

Stadie 2: QuantiFERON-CMV ELISA for humant IFN- γ

Se "Kitindhold", side 8 og "Nødvendige materialer, som ikke medfølger", side 9, for at få oplysninger om de påkrævede materialer til udførelse af ELISA.

1. Alle plasmaprøver og reagenser, bortset fra konjugat 100x koncentrat, skal bringes til stuetemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) inden brug. Afsæt mindst 60 minutter til temperaturudligning.

2. Fjern de ELISA-pladestrips, der ikke er påkrævet, fra rammen, genforsegl dem i folieposen, og opbevar dem i køleskabet, indtil de skal bruges.

Anvend mindst én strip til QF-CMV ELISA-standarderne og et tilstrækkeligt antal strips i forhold til det antal patienter, der skal testes. Gem rammen og låget efter brug med henblik på brug sammen med de resterende strips.

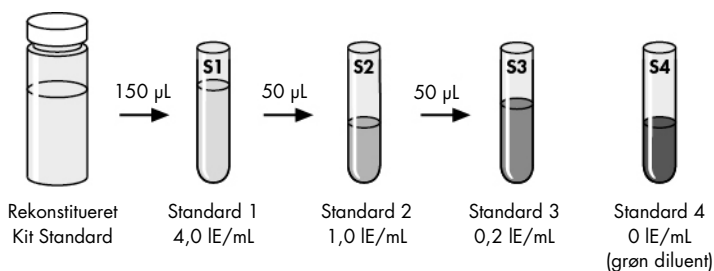
3. Rekonstituer human IFN- γ Standard med det volumen deioniseret eller destilleret vand, som er angivet på etiketten på hætteglasset. Bland forsigtigt for at minimere skumdannelse og sikre fuldstændig genopløsning. Rekonstituering af IFN- γ Standard til det angivne volumen vil give en opløsning med en koncentration på 8,0 IE/mL.

Bemærk: Rekonstitueringsvolumen af humant IFN- γ Standard (kitstandard) afviger i de forskellige batches.

Brug den rekonstituerede standard til at fremstille en fortyndingsserie på fire IFN- γ koncentrationer i grøn diluent (Green Diluent, GD) (figur 1, næste side). S1 (Standard 1) indeholder 4,0 IE/mL, S2 (Standard 2) indeholder 1,0 IE/mL, S3 (Standard 3) indeholder 0,25 IE/mL og S4 (Standard 4) indeholder 0 IE/mL (GD alene). Standarderne skal som minimum analyseres med dobbeltbestemmelse. Fremstil friske fortyndinger af kitstandarderne til hver ELISA-session.

Eksempel på procedure for standarder med dobbeltbestemmelse

Eksempel på procedure for standarder med dobbeltbestemmelse	
A	Etiketter fire rør: S1, S2, S3, S4
B	Tilsæt 150 µL GD i S1, S2, S3, S4
C	Tilsæt 150 µL af kitstandarden i S1, og bland grundigt
D	Overfør 50 µL fra S1 til S2, og bland grundigt
E	Overfør 50 µL fra S2 til S3, og bland grundigt
F	GD alene fungerer som nulstandard (S4)



Figur 1. Forberedelse af standardkurve via seriel fortynding.

- Rekonstituer frysetørret Conjugate 100x Concentrate (Konjugat 100x koncentrat) med 0,3 ml deioniseret eller destilleret vand. Bland forsigtigt for at minimere skumdannelse og sikre fuldstændig opløsning af konjugatet.

Konjugat med brugsstyrke fremstilles ved at fortynde den påkrævede mængde rekonstitueret konjugat 100x koncentrat i grøn diluent (se tabel 1, næste side).

Bland grundigt, men forsigtigt for at undgå skumdannelse.

Sæt ubrugt konjugat 100x koncentrat på køl igen ved 2–8 °C straks efter brug.

Brug kun grøn diluent.

Tabel 1. Forberedelse af konjugat med brugsstyrke

Antal strips	Volumen af konjugat 100x koncentrat	Volumen af grøn diluent
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

- Plasmaprøver, der er opsamlet fra blodprøvetagningsrør og efterfølgende nedfrosset eller opbevaret i mere end 24 timer før en analyse, skal blandes grundigt, før de tilsættes i ELISA-brønden.

Vigtigt: Hvis plasmaprøver skal tilføjes direkte fra de centrifugerede QF-CMV-blodprøvetagningsrør, skal eventuel blanding af plasmaet undgås. Pas til enhver tid på ikke at hvirvle materialet på gelens overflade op.

- Hvis der kræves kvantitative resultater, skal man fortynde CMV- og Mitogen-plasma 1/10 i grøn diluent (10 µL plasma + 90 µL GD). Nil (Negativ kontrol)-plasma bør ikke fortyndes.

Det anbefales at teste følgende prøver parallelt:

Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)

Følgende patientprøvemuligheder understøttes imidlertid også af QuantiFERON-CMV-analysesoftwaren:

Nil, CMV Antigen, Mitogen

Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)

Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10)

Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen

7. Tilsæt 50 µL friskfremstillet konjugat med brugsstyrke til de påkrævede ELISA-brønde ved brug af en flerkanalspipette.
8. Tilsæt 50 µL testplasmaprøver til de relevante brønde. Tilsæt til sidst 50 µL af hver af Standard 1 til 4 til de relevante brønde. Standarderne skal som minimum analyseres med dobbeltbestemmelse.
9. Dæk ELISA-pladen, og bland konjugatet og plasmaprøver/standarder grundigt ved brug af en mikropladeryster i 1 minut ved 500 til 1000 omdr./min. Undgå sprøjt.
10. Dæk ELISA-pladen, og inkuber ved stuetemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) i 120 ± 5 minutter.

Pladerne bør ikke udsættes for direkte sollys under inkuberingen. Afvigelse fra det angivne temperaturområde kan medføre fejlagtige resultater.
11. Klargør vaskebuffer med brugsstyrke under inkuberingen. Fortynd én del vaskebuffer 20x koncentrat med 19 dele deioniseret eller destilleret vand, og bland grundigt.

Der er leveret tilstrækkeligt vaskebuffer 20x koncentrat til fremstilling af 2 liter vaskebuffer med brugsstyrke.
12. Når inkuberingen af ELISA-pladen er færdig, skal brøndene vaskes med 400 µL vaskebuffer med brugsstyrke i mindst seks cyklusser. Det anbefales at benytte en automatiseret pladevasker.

Vigtigt: Grundig vask er meget vigtig for analysens ydeevne. Sørg for at fylde alle brønde helt op til kanten med vaskebuffer i hver eneste vaskecyklus. En iblødsætningsperiode på mindst 5 sekunder mellem hver cyklus anbefales.

Der bør tilsættes laboratoriedesinfektionsmiddel af standardtype til spildevandsreservoiret, og fastlagte procedurer for dekontaminering af potentielt infektiøst materiale bør følges.
13. Bank pladerne let med oversiden nedad mod absorberende, fnugfrit klæde for at fjerne resterende vaskebuffer. Tilsæt 100 µL Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratopløsning) til hver brønd, dæk hver plade, og bland grundigt ved brug af en mikropladeryster i mindst 1 minut ved 500 til 1000 omdr./min.

-
14. Dæk hver plade, og inkuber dem ved stuetemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) i 30 minutter. Pladerne bør ikke udsættes for direkte sollys under inkuberingen.
 15. Efter inkuberingen i 30 minutter tilsættes 50 μL Enzyme Stopping Solution (Enzymstandsningsopløsning) til hver brønd i samme rækkefølge, som substratet blev tilsat i, og der blandes grundigt ved 500 til 1000 omdr./min. ved brug af en mikropladeryster.
 16. Mål Optical Density (OD, Optisk densitet) for hver brønd inden for 5 minutter efter standsning af reaktionen ved brug af en mikropladelæser forsynet med et 450 nm filter og et 620 nm til 650 nm referencefilter. OD-værdier anvendes til beregning af resultater.

Beregninger og testfortolkning

QuantiFERON-CMV-analysesoftware til analyse af rådata og beregning af resultater kan fås fra QIAGEN på www.QuantiFERON.com. Sørg for at anvende den seneste version af QF-CMV-analysesoftwaren.

Softwaren udfører en kvalitetskontrolvurdering af analysen, genererer en standardkurve og leverer et testresultat for hver patient, som beskrevet i "Fortolkning af resultater" på side 23. Softwaren rapporterer den laveste fortynding, der genererer et resultat inden for området for QF-CMV ELISA, hvor der tages højde for fortyndingsfaktoren.

Som alternativ til brug af QF-CMV-analysesoftwaren kan resultaterne bestemmes med følgende metode.

Generering af standardkurve (hvis QF-CMV-analysesoftwaren ikke anvendes)

Bestem de gennemsnitlige OD-værdier for Kit Standard (Kitstandard)-replikaterne på hver plade.

Konstruer en $\log_{10}$ - $\log_{10}$ -standardkurve ved at afbilde $\log_{10}$ af den gennemsnitlige OD (y-akse) mod $\log_{10}$ af IFN- γ -koncentrationen i standarderne i IE/mL (x-akse), idet nulstandardens udelades fra disse beregninger. Beregn den bedste tilpasningslinje for standardkurven ved hjælp af regressionsanalyse.

Benyt standardkurven til at bestemme IFN- γ -koncentrationen (IE/mL) for hver af testplasmaprøverne ved hjælp af OD-værdien for hver prøve.

Disse beregninger kan udføres ved brug af de softwarepakker, der følger med mikropladelæsere og standardregnearks- eller statistiksoftware (såsom Microsoft® Excel®). Det anbefales, at disse pakker anvendes til at beregne regressionsanalysen, variationskoefficienten (coefficient of variation, %CV) for standarderne og korrelationskoefficienten (r) for standardkurven.

Det rapporterede resultat skal tages fra den laveste fortynding, som genererer et resultat inden for området for QF-CMV ELISA. Husk at tage højde for fortyndingsfaktoren, hvor det er relevant.

Kvalitetskontrol af testen

Testresultaternes nøjagtighed afhænger af generering af en nøjagtig standardkurve. Derfor skal resultater for standarderne undersøges, inden testprøveresultaterne kan fortolkes.

Følgende er nødvendigt, for at ELISA er gyldig:

- Den gennemsnitlige OD-værdi for Standard 1 skal være $\geq 0,600$.
- %CV for replikat-OD-værdierne for Standard 1 og Standard 2 skal være $< 15\%$.
- Replikat-OD-værdierne for Standard 3 og 4 må ikke variere med mere end 0,040 OD-enheder i forhold til deres gennemsnit.
- Den ud fra de gennemsnitlige absorbansværdier for standarderne beregnede korrelationskoefficient (r) skal være $\geq 0,98$.

QF-CMV-analysesoftwaren beregner og rapporterer disse kvalitetskontrolparametre. Hvis ovennævnte kriterier ikke er opfyldt, er kørslen ugyldig og skal gentages.

Den gennemsnitlige OD-værdi for nulstandard (grøn diluent) bør være $\leq 0,150$. Hvis den gennemsnitlige OD-værdi er $> 0,150$, bør pladevaskeproceduren undersøges nærmere.

Fortolkning af resultater

QuantiFERON-CMV-resultater fortolkes ved brug af kriterierne i tabel 2.

Tabel 2. Fortolkning af QuantiFERON-CMV-resultater

Nil (IE/mL)	CMV minus Nil (IE/ml)	Mitogen minus Nil (IE/mL)*	QF-CMV-resultat	Rapport/fortolkning
≤ 8,0	≥0,20 og ≥25 % af Nil	Alle	Reaktiv†	Anti-CMV-immunitet påvist
	<0,20 ELLER ≥0,20 og <25 % af Nil	≥ 0,5	Ikke-reaktiv	Anti-CMV-immunitet IKKE påvist
		<0,5	Ubestemmeligt‡	Resultater ubestemmelige med hensyn til CMV-følsomhed
>8,0§	Alle	Alle	Ubestemmeligt‡	Resultater ubestemmelige med hensyn til CMV-følsomhed

* Responser på den Mitogen-positive kontrol (og fra tid til anden CMV-antigener) kan ofte være uden for mikropladelæserens område. Dette har ingen betydning for testresultater.

† Hvis der ikke er mistanke om cytomegalovirusinfektion, kan reaktive resultater bekræftes ved at teste de originale plasmaprøver med dobbeltbestemmelse i QF-CMV ELISA. Hvis gentagne test af én eller begge replikater er positive, skal testen vurderes som reaktiv.

‡ Henvi til "Fejlfindingsvejledning" (side 38) for mulige årsager.

I kliniske undersøgelser (1) har et ubestemmeligt resultat blandt modtagere af hele organtransplantater, hvor en donor er reaktiv for CMV, men Mitogen-kontrollen var under 0,5 IE/ml, vist sig at være klinisk relevant. Sådanne patienter har den største risiko for at udvikle CMV.

§ I kliniske forsøg havde under 0,25 % af patienterne IFN-γ-niveauer på >8,0 IE/mL for Nil-værdi.

Bemærk: Det målte IFN-γ-niveau skal bruges sammen med den kliniske præsentation, sygehistorien og andre diagnostiske vurderinger ved fastlæggelse af en patients immunrespons over for CMV-antigener. QF-CMV er ikke en test til påvisning af CMV-infektion og bør ikke anvendes til at udelukke CMV-infektion.

Begrænsninger

Resultaterne af QuantiFERON-CMV-test skal anvendes i sammenhæng med hver enkelt persons epidemiologiske anamnese, aktuelle helbredstilstand, og andre diagnostiske vurderinger.

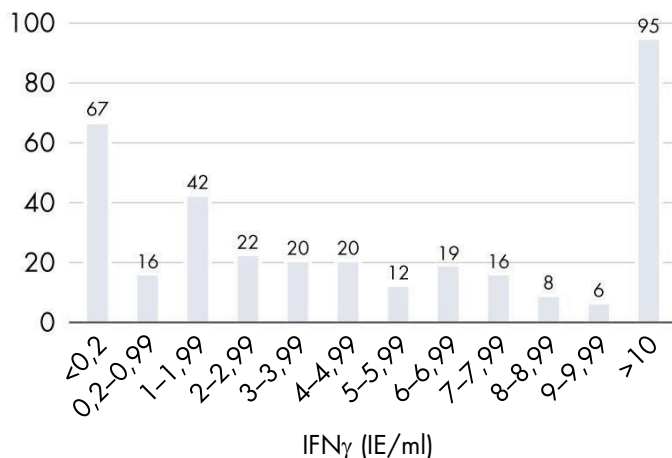
Upålidelige eller ubestemmelige resultater kan forekomme som følge af:

- Afvigelser fra den procedure, der er beskrevet i indlægssedlen til QuantiFERON-TB-CMV ELISA
- For høje niveauer af IFN- γ i kontrolrøret
- Mere end 16 timer mellem blodprøvetagningen og inkuberingen ved 37 °C.

Forventede værdier

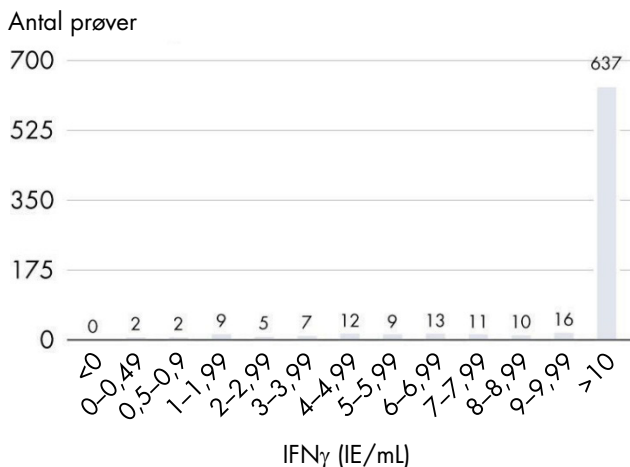
Forventede IFN- γ -værdier ved brug af QuantiFERON-CMV blev opnået ved at teste 591 prøver fra raske personer. 343 prøver blev testet seropositive og 248 prøver blev testet seronegative over CMV IgG. CMV-serologistatussen var ukendt på tidspunktet for QF-CMV-testen. I de 248 prøver fra CMV-seronegative personer blev 100 % (248/248) af prøverne testet ikke-reaktive via QF-CMV ELISA, der producerer IFN- γ -respons på <0,2 IE/mL til CMV Antigen-røret (Nil fratrasket). Fordelingen af IFN- γ -respons på CMV Antigen-røret (Nil fratrasket) for de 343 CMV-seropositive personer er vist (figur 2).

Antal prøver



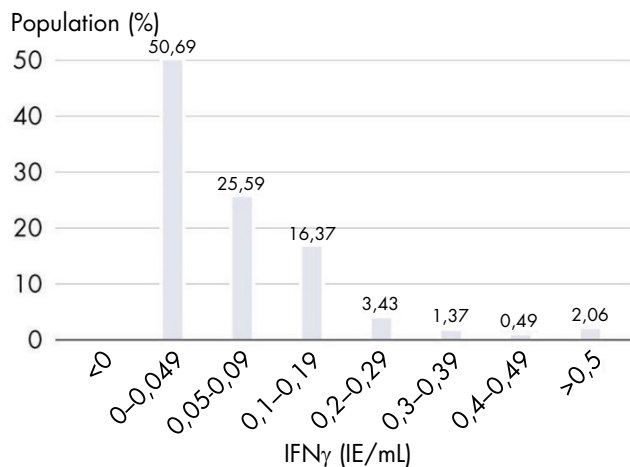
Figur 2. Fordelingen af QF-CMV IFN- γ -respons (Nil fratrucket) hos seropositive raske personer (n = 343).

Fordelingen af IFN- γ -respons på Mitogen (Nil fratrucket) blev bestemt ved hjælp af 733 prøver fra raske voksne personer ved hjælp af QF-CMV ELISA, uanset CMV IgG-serologien (figur 3). Et Mitogen-resultat (Nil fratrucket) på under 0,5 IE/ml angiver enten en testfejl, eller at personen er i immunkompromitteret tilstand. I en rask population faldt kun 2/733 resultater i denne kategori.



Figur 3. Fordelingen af Mitogen-IFN- γ -respons (Nil fratrukket) hos raske personer (n = 733).

Fordelingen af IFN- γ -respons på Nil-rør blev bestemt ved hjælp af 1020 plasmaprøver fra raske personer ved hjælp af QF-CMV ELISA, uanset CMV IgG-serologien (figur 4).



Figur 4. Fordeling Nil IFN- γ -respons hos raske personer (n = 1020) vist som en procentdel af populationen.

Ydeevnekarakteristik

Klinisk ydeevne

En testtærskel for påvisning af tidligere CMV-eksponering ved brug af QF-CMV blev fastlagt efter analyse af resultater for en gruppe raske personer (n = 223), hvor QF-CMV-resultater blev sammenlignet med CMV IgG-serologieresultater. En ROC-analyse påviste, at en testtærskel på 0,04 IE/ml (Nil fratrukket) gav de optimale positive og negative prædiktive værdier for QF-CMV (areal under kurven = 0,9679 [95 % CI: 0,9442-0,9915, p<0,0001]), og dermed repræsenterede den grænse, som denne analyse blev udført på, mest effektivt sin tilsigtede anvendelse i en rask population.

Ydeevnen i QF-CMV-analysen blev sammenlignet med SeraQuest™ CMV IgG-serologitesten (Quest International). QF-CMV-analysen udviste 95 % (294/310 personer) overensstemmelse med CMV IgG-serologitesten hos raske personer, idet ingen af de 149 seronegative donorer udviste reaktivitet ved QF-CMV. 145 ud af 161 seropositive donorer udviste et reaktivt QF-CMV-respons. Den samlede positive overensstemmelse var 90 %, og den negative overensstemmelsesværdi var 100 %. Overensstemmelsesniveauet blandt raske personer mellem QFCMV-responser og CMV IgG-serologistatussen er vist i tabel 3.

Tabel 3. Overensstemmelse mellem QuantiFERON-CMV og CMV-IgG-serologitest hos raske personer

		CMV-serologi		I alt
		Positiv	Negativ	
QuantiFERON-CMV	Reaktivt	145	0	145 (46,8 %)
	Ikke-reaktiv	16	149	165 (53,2 %)
	I alt	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Analysetærskel

Den anbefalede kliniske testtærskel for denne analyse er 0,2 IE/mL i CMV Antigen-røret (Nil fratrukket), omend der kan godkendes forskellige tærskler til forskellige kliniske miljøer.

Kliniske undersøgelser

Da der ikke findes en endelig standard for bekræftelse eller udelukkelse af diagnosen cytomegalovirus-infektion, kan et estimat af følsomheden og specificiteten for QF-CMV ikke vurderes i praksis. Tilnærmet specificitet og følsomhed i QF-CMV blev bestemt ved at vurdere niveauet af overensstemmelsen mellem QF-CMV-responser og CMV IgG-serologistatussen hos raske personer.

Tilnærmet specificitet i QF-CMV blev bestemt ved at vurdere falsk-positive rater (reaktivt QF-CMV-respons) hos raske donorer uden tegn på tidligere CMV-eksponering (CMV IgG-seronegative personer). Tilnærmet følsomhed blev bestemt ved at vurdere QF-CMV-responset hos raske donorer med tegn på tidligere CMV-eksponering (CMV IgG-seropositive personer). QF-CMV benytter et stort antal CMV-specifikke epitoper fra forskellige CMV-proteiner og er dermed en bred dækning af populationen med forskellige HLA-klasse I-haplotyper (ca. 98 % af populationen). Eftersom HLA-haplotyperne hos personer testet i forhold til CMV-serologi var ukendt, var det forventet, at der for en lille procentdel af de serologipositive personer ikke ville være reaktion på QF-CMV-blodprøvetagningsrørene.

Specificitet

I en undersøgelse af 591 prøver fra raske personer blev ingen falsk-positive QF-CMV-resultater påvist hos personer, der blev testet seronegative for CMV IgG med 248/248 prøver testet ikke-reaktive for QF-CMV ELISA og negative for CMV IgG-serologitest. De resultater, der blev opnået ved hjælp af QF-CMV og CMV IgG-serologitesten, viste derfor 100 % overensstemmelse.

I alle andre specificitetsevalueringer udført hos modtagere af hele organtransplantater (1-8), modtagere af hæmatopoietiske stamcelletransplantater (9,10) og HIV-smittede patienter (11) har overensstemmelsen mellem QF-CMV og CMV IgG-serologien også vist sig at være 100 %.

Sensitivitet

I en undersøgelse af 343 prøver fra raske personer, der blev testet seropositive for CMV IgG, var overensstemmelsesniveauet mellem QF-CMV-responser og CMV IgG-serologiretultater 80,5 % med 276/343 prøver testet reaktive for QF-CMV og positive for CMV IgG-serologitesten. Den observerede uoverensstemmelse kan skyldes falsk positiv CMV-serologi eller fraværet af responsive HLA-typer hos de testede individer.

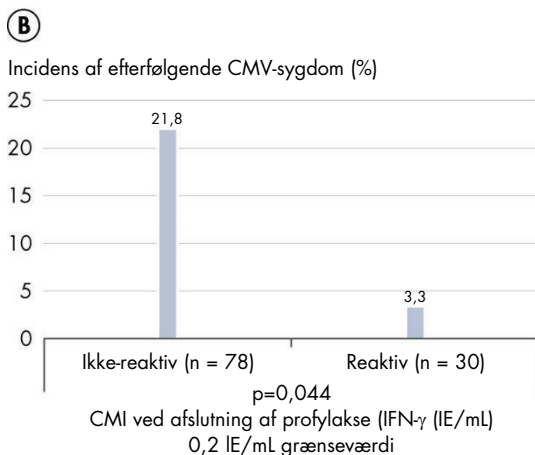
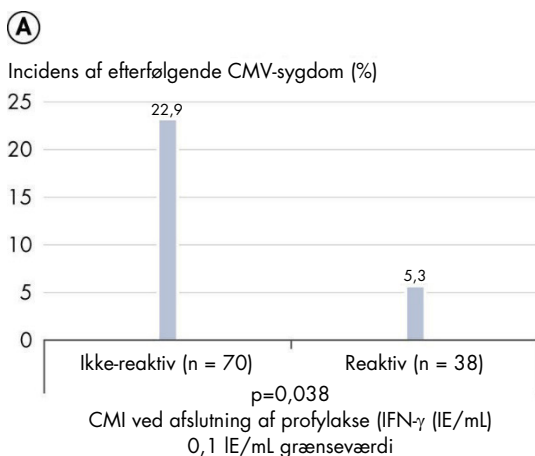
Overensstemmelsesniveauerne i følsomhedsvurderinger udført hos modtagere af hele organtransplantater (1-8), modtagere af hæmatopoietiske stamcelletransplantater (9, 10) og HIV-smittede patienter (11) har vist sig at være lavere og kan skyldes falsk-positiv CMV-serologi, fraværet af responsive HLA-typer hos de testede personer eller fraværet af reaktive T-celler hos disse patienter som følge af deres immunsuppression.

Studier, der fremhæver klinisk nytteværdi

For både CMV IgG-serologi og QF-CMV er den tilsigtede brug beskrevet som muliggørelse af påvisning af immunitet over for CMV. I et transplantationsmiljø anvendes CMV-serologi hyppigt før transplantation for at fastlægge risikoen for, at der opstår CMV-komplicationer hos modtageren efter transplantation, men testmetoden har begrænset værdi efter transplantation. Alternativt kan QF-CMV anvendes hos transplantatmodtagere til vurdering af niveauet af CMV-immunitet hos de patienter, som har risiko for at udvikle symptomatisk CMV-infektion og/eller -sygdom som følge af immunsuppression (12-15).

En række offentliggjorte kliniske undersøgelser for flere forskellige transplantatkohorter har påvist anvendeligheden af QuantiFERON-CMV (1-11, 15, 16).

I en stor undersøgelse med 108 modtagere af hele organtransplantater (4) havde patienter med et reaktivt QF-CMV-resultat ved afslutningen af anti-CMV profylaksen en væsentlig lavere rate af efterfølgende CMV-sygdom (3,3 % eller 1/30 ved en tærskel på 0,2 IE/ml) sammenlignet med patienter, der havde et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat (21,8 % eller 17/78, $p = 0,044$) (figur 5).



Figur 5. Rater af sent debuterende CMV-sygdom hos patienter med et reaktivt QuantiFERON-CMV-resultat i forhold til et ikke-reaktivt QuantiFERON-CMV-resultat ved afslutningen af profylakse. Underliggende data fundet i Kumar et al. (4).

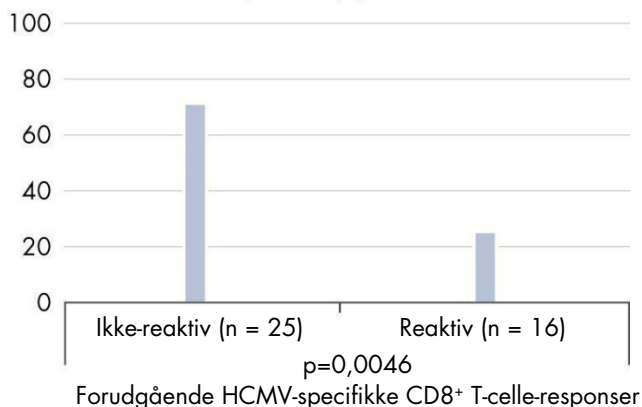
CMV-seronegative transplantatmodtagere, som modtog et organ fra en CMV-positiv donor (D+R-) med et reaktivt QF-CMV-resultat efter afslutningen af profylakse, forblev desuden fri for CMV-sygdom oftere og i længere tid, hvilket indikerer, at QF-CMV kan anvendes til at identificere dem, der har risiko for at udvikle sent debuterende CMV-sygdom.

Denne undersøgelse fremhævede også, at i kohorten med transplantationspatienter med den højeste risiko for udvikling af CMV-sygdom (D+/R-) var et reaktivt resultat til enhver tid efter profylakse associeret med en højere chance for at forblive fri for CMV-sygdom.

I en undersøgelse med 37 modtagere af hele organtransplantater (6) bidrog vurderingen af CMV-specifikke CD8⁺ T-celleresponser med QF-CMV til forudsigelse af spontan viral clearance i forhold til CMV-sygdomsprogression efter forhøjelser i CMV-viræmi. I denne undersøgelse opstod der spontan clearance af CMV-virus hos 24/26 patienter (92,3 %) med et reaktivt QF-CMV-resultat (ved brug af en testtærskel for IFN- γ på $\geq 0,2$ IE/mL), mens samme udfald kun forekom hos 5/11 (45,5 %) patienter med et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat.

I en undersøgelse med 67 lungetransplantatmodtagere til vurdering af episoder af CMV-viræmi efter transplantation (7) blev det observeret, at 18/25 (72 %) episoder af CMV-viræmi forekom efter et ikke-reaktivt QFCMV-resultat, mens der forekom 4/16 (25 %) episoder efter et reaktivt QFCMV-resultat (Fishers nøjagtige test, $p = 0,0046$; figur 6).

HCMV-DNAæmi-episoder med en viral belastning på >1000 kopier/mL (%)



Figur 6. Statistisk analyse af CMV-specifikke CD8⁺ T-celleresponser som påvist med QuantiFERON-CMV og udviklingen af CMV-viræmi (Fishers eksakte test, p=0,0046). Underliggende data fundet i Weseslindtner et al (7).

En stor prospektiv multicenterundersøgelse med 127 CMV-seronegative modtagere af hele organtransplantater from CMV-seropositive donorer (8), som alle modtog antiviral profylakse, viste, at patienter med et reaktivt QF-CMV-resultat (ved brug af en 0,1 IE/mL testtærskel) til enhver tid efter afslutningen af anti-CMV-profylakse havde en væsentligt lavere rate af sent debuterende sygdom 12 måneder efter transplantation (6,4 %), i forhold til dem med et ikke-reaktivt QFCMV-resultat (22,2 %) og et ubestemmeligt resultat (58,3 %, p <0,001). Ved klassificering af ubestemmelige resultater som også værende "ikke-reaktive" var incidensen af efterfølgende CMV-sygdom 6,4 % i forhold til 26,8 %, p = 0,024. De positive og negative prædiktive værdier fra QF-CMV for beskyttelse mod CMV-sygdom blev rapporteret som værende henholdsvis 0,90 (95 % CI 0,74-0,98) og 0,27 (95 % CI 0,18-0,37). I denne undersøgelse blev det påvist, at QF-CMV kan være brugbar til at forudsige, om patienter har lav, mellemhøj eller høj risiko for at udvikle CMV-sygdom efter profylakse.

I en prospektiv undersøgelse med 55 modtagere af hele organtransplantater (8), hvor forholdet mellem QF-CMV-resultater fundet før transplantation og CMV-replikationsepisoder opstået efter transplantation blev analyseret, viste det sig, at der blev observeret en højere

incidens af CMV-replikation efter transplantation hos CMV-seropositive modtagere med et ikke-reaktivt (ved brug af en 0,2 IE/ml testtærskel) QF-CMV-resultat før transplantation (7/14 eller 50 %), sammenlignet med de CMV-seropositive modtagere med et reaktivt QF-CMV-resultat før transplantation (4/30 eller 13,3 %, $p = 0,021$).

I denne undersøgelse blev det påvist, at modtagere med en ikke-reaktiv QFCMV-respons før transplantation, og som modtog et organ fra en CMV-seropositiv donor, havde en ti gange større risiko for CMV-replikation sammenlignet med de modtagere, som havde en reaktiv QFCMV-respons før transplantation (justeret OR 10,49, 95 % CI 1,88-58,46). Derfor kan en QFCMV-analyse før transplantationen være nyttig til at forudsige risikoen for CMV-replikation efter transplantation og dermed muliggøre individuel CMV-infektionsbehandling efter transplantation af et helt organ.

En række andre undersøgelser vedrørende påvisning af CMV-specifikke CD8⁺ T-celleresponser med QF-CMV i en kohorte af transplantatmodtagere, er gennemført (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) eller under udførelse verden over.

Internationale konsensusretningslinjer for håndtering af cytomegalovirus ved transplantation af hele organer

Vigtigheden af CMV-specifik immunmonitorering er anerkendt og offentliggjort i *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (12). Disse internationale retningslinjer, som er udarbejdet af et panel af eksperter i CMV og transplantation af hele organer nedsat af The Infectious Diseases Section under The Transplantation Society, udgør konsensusretningslinjer, som er baseret på evidens og ekspertudtalelser, om CMV-håndtering inklusive: diagnostik, immunologi, forebyggelse og behandling.

I disse retningslinjer er det konkluderet, at immunmonitorering af CMV-specifikke T-celleresponser kan føre til forudsigelse af, hvilke individer, der har risiko for CMV-sygdom efter transplantation, og kan være brugbar til styring af profylakse og forebyggende behandlinger (12).

Retningslinjerne giver endvidere også anbefalinger vedrørende karakteristika for den ideelle immunmonitoreringsanalyse, som omfatter følgende:

- Evne til at vurdere mængden og funktionen af en transplantationsmodtagers CD4⁺ og CD8⁺ T-celler
- Evne til at måle IFN- γ
- Simpel at udføre, omkostningseffektiv og reproducerbar
- Har en kort analysetid
- Giver mulighed for nem forsendelse af prøver til specialiserede henvisningslaboratorier

QF-CMV opfylder praktisk talt alle kriterierne ifølge disse retningslinjer og udgør den eneste standardiserede immunmonitoreringsanalyse, som kan påvise IFN- γ , og som er specifik for CMV.

Analysens ydelseskarakteristika

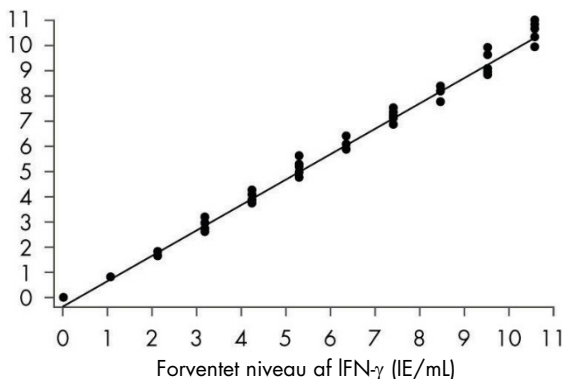
QF-CMV ELISA bruger en rekombinant human IFN- γ -standard, der er blevet analyseret med en IFN- γ -forberedelse som reference (NIH-ref: Gxg01-902-535). Resultaterne for testprøverne afrapporteres i internationale enheder (IE) ift. en standardkurve, der er klargjort ved test af fortynding af den sekundære standard, som blev leveres med kittet.

Heterofile (f.eks. humane anti-mus) antistoffer i serum eller plasma for bestemte personer har vist sig at kunne forårsager interferens med immunanalyser. Påvirkningen fra heterofile antistoffer i QF-CMV ELISA minimeres ved at tilføjelse af normal museserum til grøn diluent og brugen af F(ab')₂-monoklonale antistoffragmenter som IFN- γ -antistoffopfangning dækket af mikropodebrøndene.

Påvisningsgrænsen for QF-CMV ELISA er 0,065 IE/mL, og der er ikke noget tegn på en prozoneeffekt ("højdosiskrogeffekt") for koncentrationer af IFN- γ på op til 10.000 IE/mL. QF-CMV ELISA-antistofferne har vist sig ikke at have krydsreaktivitet med de testede cytokiner, herunder IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 og IL12.

QF-CMV ELISA har vist sig at være lineær ved at placere 5 replikater af 11 plasmapools med kendte IFN- γ -koncentrationer tilfældigt på ELISA-pladen. Den lineære regressionslinje har en hældning på $1,002 \pm 0,011$ og en korrelationskoefficient på 0,99 (figur 7).

Bestemt niveau af IFN- γ



Figur 7. Linearitetsprofil for QF-CMV ELISA bestemt ud fra test af 5 replikater af 11 plasmaprøver med kendte IFN- γ -koncentrationer.

Reproducerbarheden af QF-CMV ELISA blev vurderet ved at teste 20 plasmaprøver med varierende IFN- γ -koncentrationer med tredobbelt bestemmelse, på tre laboratorier, på 3 ikke-fortløbende dage og udført af 3 operatører. Hver prøve blev således testet 27 gange og i 9 uafhængige analysekørsler. Den ene prøve var en negativ kontrol og havde en beregnet IFN- γ -koncentration på 0,08 (95 % CI 0,07-0,09) IE/mL. For de resterende 19 plasmaprøver var koncentrationsintervallet 0,33 (95 % CI 0,31-0,34) til 7,7 IE/mL (95 % CI 7,48-7,92).

Unøjagtigheden inden for en kørsel eller analyse blev estimeret ved at beregne gennemsnittet af %CV-værdierne for hver testplasma med IFN- γ fra hver pladekørsel ($n = 9$), som lå fra 4,1 til 9,1 % CV. Inden for en kørsel var %CV-gennemsnittet ($\pm$ 95 % CI) 6,6 % $\pm$ 0,6 %. Nul IFN- γ plasma havde et gennemsnit på 14,1 % CV.

Upræcisheden samlet set eller mellem analyser blev bestemt ved at sammenligne de 27 beregnede koncentrationer af IFN- γ for hver plasmaprøve, og den lå fra 6,6 til 12,3 % CV. Samlet set var %CV-gennemsnittet ($\pm$ 95 % CI) 8,7 % $\pm$ 0,7 %. Nul IFN- γ Plasma viste en CV på 26,1%. Dette variationsniveau er forventeligt, fordi den beregnede koncentration af IFN- γ er lav, og variationen omkring et lavt koncentrationsestimat vil være større end den for højere koncentrationer.

Teknisk information

Ubestemmelige resultater

Ubestemmelige resultater kan være relateret til immunstatus hos den person, som testes, men kan også skyldes en række tekniske faktorer:

- Mere end 16 timer fra blodprøvetagning til inkubering ved 37 °C
- Opbevaring af blod uden for det anbefalede temperaturområde (22 °C ± 5 °C)
- Utilstrækkelig blanding af blodprøvetagningsrør
- Ufuldstændig vask af ELISA-pladen

Hvis der er mistanke om tekniske problemer med indsamling eller håndtering af blodprøverne, gentages hele QF-CMV-testen med nye blodprøver. Gentagelse af ELISA-testen af stimulerede plasmaprøver kan udføres, hvis der er mistanke om proceduremæssig afvigelse i forbindelse med ELISA-testen. Ubestemmelige resultater (som følge af lave Mitogen-værdier) forventes ikke at ændre sig ved gentagelse, medmindre der skete en fejl ved ELISA-testen.

Koagulerede plasmaprøver

Hvis der opstår fibrinkoagulater ved længere opbevaring af plasmaprøver, skal prøverne centrifugeres til bundfældet koaguleret materiale og lette pipetteringen af plasma.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til Technical Information (Teknisk information) på www.QuantiFERON.com. Se kontaktoplysninger på bagsiden.

Kommentarer og forslag

Lave aflæsningsværdier for optisk densitet for standarder

- | | |
|---|--|
| a) Fejl ved fortynding af standard | Sørg for, at fortyndingerne af Kit Standard (Kitstandard) fremstilles korrekt i henhold til indlægssedlen til QF-CMV ELISA. |
| b) Pipetteringsfejl | Sørg for, at pipetterne kalibreres og anvendes i henhold til producentens instruktioner. |
| c) For lav inkuberingsstemperatur | Inkubering af ELISA bør ske ved stuetemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| d) For kort inkuberingsstid | Inkubering af pladen med konjugatet, standarderne og prøverne bør ske i 120 ± 5 minutter. Enzymsubstratopløsning inkuberes på pladen i 30 minutter. |
| e) Brug af forkert pladelæsefilter | Pladen bør aflæses ved 450 nm med et referencefilter mellem 620 og 650 nm. |
| f) For kolde reagenser | Alle reagenser, med undtagelse af konjugat 100x koncentrat, skal bringes til stuetemperatur inden påbegyndelse af analysen. Dette tager ca. 1 time. |
| g) Kittets/komponenternes udløbsdato er overskredet | Sørg for, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Sørg for, at rekonstitueret standard og konjugat 100x koncentrat anvendes inden for 3 måneder efter rekonstitueringsdatoen. |

Uspecifik farveudvikling

- | | |
|---|--|
| a) Ufuldstændig vask af pladen | Vask pladen mindst seks gange med 400 µL vaskebuffer pr. brønd. Alt efter hvilken vasker der anvendes, kan der være behov for mere end 6 vaskecyklusser. Der bør være en iblødsætningsperiode på mindst 5 sekunder mellem hver cyklus. |
| b) Krydskontaminering af ELISA-brønde | Vær forsigtig ved pipettering og blanding af prøver for at minimere risici. |
| c) Kittets/komponenternes udløbsdato er overskredet | Sørg for, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Sørg for, at rekonstitueret standard og konjugat 100x koncentrat anvendes inden for 3 måneder efter rekonstitueringsdatoen. |

Kommentarer og forslag

- | | | |
|----|--|--|
| d) | Kontamineret
enzymsubstratopløsning | Bortskaf substratet, hvis der er blåfarvning. Sørg for, at der anvendes rene reagensreservoirer. |
| e) | Blanding af plasma i
centrifugerør inden
opsamling | Sørg for, at plasmaprøver opsamles forsigtigt oven over gelen uden at pipettere op og ned. Pas på ikke at hvirvle materialet på gelens overflade op. |

Højt baggrund

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Ufuldstændig vask af pladen | Vask pladen mindst seks gange med 400 µL vaskebuffer pr. brønd. Alt efter hvilken vasker der anvendes, kan der være behov for mere end 6 vaskecyklusser. Der bør være en iblødsætningsperiode på mindst 5 sekunder mellem hver cyklus. |
| b) | For høj
inkuberingstemperatur | Inkubering af ELISA bør ske ved stuetemperatur (22 °C ± 5 °C). |
| c) | Kittets/komponenternes
udløbsdato er overskredet | Sørg for, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Sørg for, at rekonstitueret standard og konjugat 100x koncentrat anvendes inden for 3 måneder efter rekonstitueringsdatoen. |
| d) | Kontamineret
enzymsubstratopløsning | Bortskaf substratet, hvis der er blåfarvning. Sørg for, at der anvendes rene reagensreservoirer. |

Ikke-lineær standardkurve og variabilitet i dobbeltbestemmelse

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Ufuldstændig vask af pladen | Vask pladen mindst seks gange med 400 µL vaskebuffer pr. brønd. Alt efter hvilken vasker der anvendes, kan der være behov for mere end 6 vaskecyklusser. Der bør være en iblødsætningsperiode på mindst 5 sekunder mellem hver cyklus. |
| b) | Fejl ved fortynding af
standard | Sørg for, at fortyndinger af kitstandarden klargøres korrekt i henhold til denne indlægsseddel. |
| c) | Dårlig blanding | Bland reagenserne grundigt ved at vende dem eller forsigtigt vortexe dem, før de tilsættes pladen. |
| d) | Inkonsekvent
pipetteringsteknik eller
afbrydelse under
opsætningen af analysen | Prøven og standardtilsætningen skal udføres kontinuerligt. Alle reagenser skal forberedes, før analysen påbegyndes. |

Produktoplysninger og tekniske vejledninger kan fås hos QIAGEN via din forhandler eller ved at besøge www.QuantiFERON.com.

Litteraturhenvisninger

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.

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
 <N>	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Holdbarhedsdato
	CE-mærke
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer
	Globalt handelsvarenummer
	Temperaturbegrænsning
	Må ikke genbruges
	Opbevares uden for sollys
	Læs brugervejledningen
	Producent
	Autoriseret repræsentant i EU

Kontaktoplysninger

For teknisk bistand og yderligere information kan du gå ind på vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringe på 00800-22-44-6000 eller kontakte QIAGEN Teknisk Service eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Forkortet ELISA-testprocedure

Stadie 1: Inkubering af blod

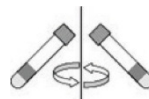
1. Udtag patientblod i blodprøvetagningsrør, og bland ved at ryste dem ti (10) gange lige akkurat kraftigt nok til at sikre, at hele indersiden af hvert rør er dækket af blod, så antigenerne på indersiden af røret opløses.



2. Inkuber rørene stående ved $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ i 16 til 24 timer.



3. Efter inkubering centrifugeres rørene i 15 minutter ved 2000 til 3000 RCF (g) for at skille plasmaet og de røde celler.



4. Efter centrifugering skal det undgås at pipettere op og ned eller på nogen måde blande plasmaet inden opsamling. Pas til enhver tid på ikke at hvirvle materialet på gelens overflade op.



Stadie 2: IFN- γ ELISA

1. Lad ELISA-komponenterne, med undtagelse af konjugat 100x koncentrat, temperaturudligne til stuetemperatur. Det tager mindst 60 minutter.



2. Rekonstituer kitstandarden til 8,0 IE/ml med destilleret eller deioniseret vand. Fremstil fire (4) standardfortyndinger.



3. Rekonstituer frysetørret konjugat 100x koncentrat med destilleret eller deioniseret vand.

4. Fremstil konjugat med brugsstyrke i grøn diluent, og tilsæt 50 μ L til alle brønde.



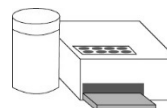
5. Tilsæt 50 μ L testplasmaoprøver og 50 μ L standarder til de relevante brønde. Bland ved hjælp af en ryster.



6. Inkuber i 120 minutter ved stuetemperatur.



7. Vask brøndene mindst 6 gange med 400 μ L vaskebuffer pr. brønd.



8. Tilsæt 100 μ L enzymsubstratopløsning til brøndene. Bland ved hjælp af en ryster.



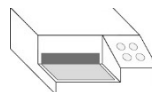
9. Inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur.



10. Tilsæt 50 μL enzymstandsningsoopløsning til alle brønde. Bland ved hjælp af en ryster.



11. Aflæs resultater ved 450 nm med et 620 til 650 nm referencefilter



12. Analysér resultaterne.



Revisionshistorik for håndbogen

Dokument	Ændringer	Dato
L1075110-R06	Nødvendige materialer, der ikke medleveres, tilføjede pladelæg, side 9	Oktober 2019

Denne side er tom med vilje

Denne side er tom med vilje

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

Begrænset licensaftale for QuantiFERON-CMV ELISA

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i panelet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette panel med komponenter, der ikke er inkluderet i dette panel, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette panel, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette panel og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af panelet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og sagsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med panelet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

