

Lokakuu 2019

QuantiFERON[®]-CMV ELISA -pakkauseloste



Kokoveren IFN- γ -testi ihmisen sytomegalovirus-peptidien
antigeenivasteen mittaamiseen



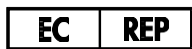
In vitro -diagnostiseen käyttöön



0350-0201



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

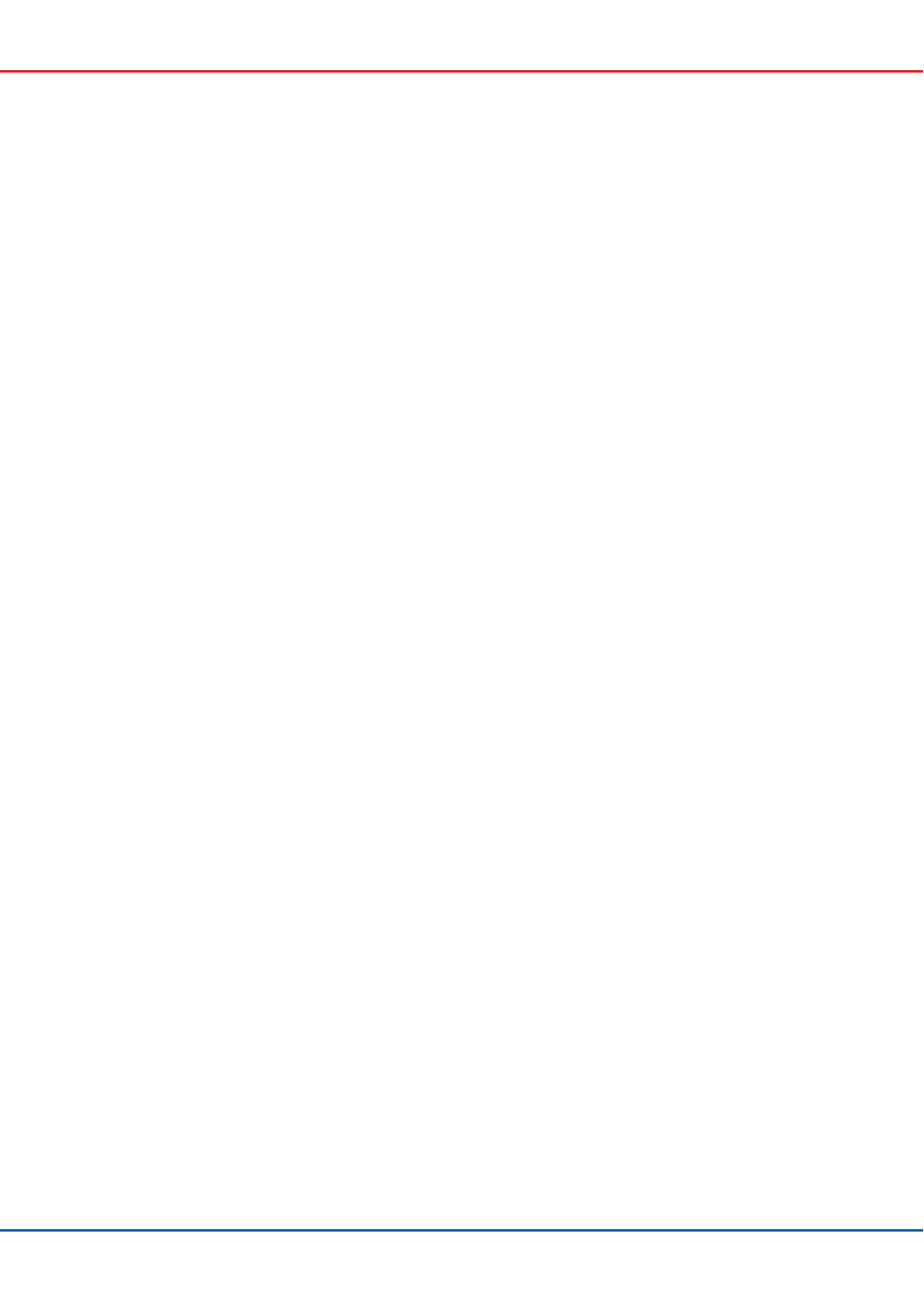


QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
SAKSA

1075110 Versio 06



www.QuantiFERON.com



Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Yhteenveto ja kuvaus.....	5
Menetelmän toimintaperiaate.....	6
Määrittämisen suorittamiseen tarvittava aika.....	7
Toimitetut materiaalit.....	8
Sarjan sisältö.....	8
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	9
Varoitukset ja varotoimet.....	9
Turvallisuustiedot.....	11
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	12
Näytteen ottaminen ja käsittely.....	13
Menetelmä.....	16
Vaihe 1: Veren inkubointi ja plasman kerääminen.....	16
Vaihe 2: QuantiFERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN- γ	17
Laskennat ja testien tulkinta.....	22
Standardikäyrän laatiminen (jos QF-CMV-analyysiohjelmistoa ei käytetä).....	22
Testin laadunvarmistus.....	23
Tulosten tulkinta.....	24
Rajoitukset.....	25
Odotusarvot.....	25
Suorituskykyominaisuudet.....	28
Kliininen suorituskyky.....	28

Määrittämisen kynnysarvot	29
Kliiniset tutkimukset	29
Spesifisyys	29
Herkkyyks	30
Kliinistä hyötyä korostavat tutkimukset	30
Kansainväliset ohjeet elinsiirtopotilaiden sytomegaloviruksen hoidosta	35
Määrittämisen suorituskykyominaisuudet	36
Teknisiä tietoja	38
Määrittämättömät tulokset	38
Hyytyneet plasmanäytteet	38
Vianmäärittäminen	39
Lähdeviitteet	41
Symbolit	43
Yhteystiedot	44
ELISA-testimenetelmä lyhyesti	45
Vaihe 1: Verin inkubointi	45
Vaihe 2: IFN- γ ELISA	45
Käsikirjan muutoshistoria	48

Käyttötarkoitus

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) on in vitro -määritys, joka käyttää ihmisen sytomegaloviruksen (cytomegalovirus, CMV) proteiinia simuloivaa peptidisekoitusta, joka stimuloi soluja heparinoidussa kokoveressä. Interferoni-gamman (interferon-gamma, IFN- γ) tunnistamiseen käytetään entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) kvantifioimaan in vitro -vasteita peptidiantigeeneihin, jotka liittyvät CMV-infektion immuunikontrolliin. Tämän immuunifunktion puuttuminen voi liittyä CMV-taudin kehittymiseen. QF-CMV on tarkoitettu seuraamaan potilaan anti-CMV-immuunitasoa.

QF-CMV ei ole CMV-infektiota selvittävä testi, eikä sitä saa käyttää CMV-infektion poissulkemiseen.

Yhteenvedo ja kuvaus

CMV on herpesvirus, jonka saa 50–85 % aikuisväestöstä. Se on usein esiintyvä, erityisesti kudossiirteisiin liittyvä immunosuppression komplikaatio, joka voi vaikuttaa merkittävästi siirteen vastaanottajien sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen. Nykyiset immunosuppressiohoidot, joita käytetään estämään siirteen hylkimistä, vaikuttavat haitallisesti T-lymfosyytteihin ja CMI-vasteeseen, mikä lisää alttiutta virusinfektioihin kudossiirron jälkeen. T-solujen toiminnan merkitys CMV-monistuvuuden hillitsemisessä korostuu entisestään siksi, että CD8⁺ CMV-spesifit sytotoksiset T-lymfosyytit (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) voivat suojata virusperäisiltä patogeeneiltä. CD8⁺ CMV-spesifisten CTL-lymfosyyttien lisääntyminen immunosuppressiopotilailla ja IFN- γ -tuotanto voivat ennakoita CMV-taudin kehittymisen riskiä. IFN- γ -tuotanto voi olla tekijä CMV-spesifisten CTL-lymfosyyttien tunnistamisessa.

QF-CMV:lla testataan CMI-vastetta peptidiantigeeneille, jotka simuloivat CMV-proteiineja. CMV-peptidit kohdistetaan CD8⁺ -T-soluihin, mukaan lukien A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 ja Cw6 (A30, B13) HLA Luokan I haplotyyppit, jotka kattavat > 98 % maailman väestöstä. CMV:n saaneilla on yleensä veressään CD8⁺ -lymfosyyttejä, jotka tunnistavat nämä antigeenit. Tämä tunnistusprosessi koostuu sytokiinin, gammainterferonin (IFN- γ), muodostumisesta ja eritymisestä. Gammainterferonin (IFN- γ) havaitseminen ja sitä seuraava kvantifiointi muodostaa testin perustan.

Menetelmän toimintaperiaate

QF-CMV-testi on kaksivaiheinen. Ensinnä otetaan kokoverinäyte QF-CMV-näyteputkiin, joita ovat Nolla-kontrolliputki, CMV-antigeeniputki ja mitogeeniputki.

Mitogeeniputkea käytetään QF-CMV-testissä positiiviseen kontrolliin. Sitä suositellaan erityisesti, jos potilaan immunistatuksesta ei ole varmuutta. Mitogeeniputken avulla voidaan myös valvoa veren asianmukaista käsittelyä ja inkubointia.

Putket on inkuboitava 37 °C:n lämpötilassa mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä verinäytteen ottamisesta. 16–24 tunnin inkubointijakson jälkeen putket lingotaan sentrifugissa, plasma erotetaan ja gammainterferonin (IFN- γ) (IU/ml) määrä mitataan QF-CMV ELISA -menetelmällä.

CMV-antigeeni- ja mitogeeniputkista saadun plasmanäytteen IFN- γ -määrä voi usein olla ylärajan yläpuolella useimmissa ELISA-lukijoissa, vaikka potilaan immunosuppressio olisikin vain vähäinen. Kvalitatiiviset tulokset saadaan käyttämällä arvoja, jotka on laskettu laimentamattomasta plasmasta. Kvantitatiivisia tuloksia varten, joissa tarvitaan todellisia IU/ml-arvoja, plasmanäytteet on laimennettava suhteeseen 1/10 vihreällä laimennusaineella, ja määrittäminen on tehtävä ELISassa yhdessä laimentamattoman plasman kanssa.

Huomautus: Näytteissä, jotka ovat QF-CMV ELISA:n alueella (eli enintään 10 IU/ml), on käytettävä tuloksia, jotka on saatu käyttämällä laimentamatonta plasmaa. Tällaisten IFN- γ -pitoisuuksien kohdalla arvot, jotka on saatu plasmanäytteiden laimennussuhteella 1/10, saattavat olla epätarkkoja.

Testi katsotaan reaktiiviseksi IFN- γ -vastauksen suhteen, kun CMV-antigeeniputken lukema on merkittävästi suurempi kuin Nil IFN- γ :n IU/ml-arvo. Mitogeenisimuloitu plasmanäyte toimii IFN- γ -positiivisena kontrollina jokaiselle testatulle näytteelle. Alhainen mitogeenivaste merkitsee epävarmaa tulosta, kun verinäytteen vaste on ollut ei-reaktiivinen CMV-antigeneille. Tämä tilanne saattaa tulla esiin lymfosyyttien määrän ollessa riittämätön tai kun niiden aktiivisuus on laskenut virheellisen näytteen käsittelyn vuoksi, mitogeeniputken väärän täyttämisen tai sekoittamisen takia tai jos potilaan lymfosyytit eivät kykene muodostamaan IFN- γ :a, kuten on asia kudossiirtopotilailla. Nolla-näyte säätty taustakorjauksen mukaan tai ei-spesifisesti IFN- γ :n mukaan verinäytteissä. IFN- γ -taso nolla-putkessa saadaan IFN- γ -tasosta CMV-antigeeniputkelle ja mitogeeniputkelle (lue kohta "Tulosten tulkinta" tämän pakkauselosteen sivulta 24, jossa kerrotaan, kuinka QF-CMV-tuloksi tulkitaan).

Määrityksen suorittamiseen tarvittava aika

QF-CMV-määrityksen suorittamiseen vaadittava aika on arvioitu alla. Useamman näytteen testaus eräkohtaisesti on myös arvioitu:

Verinäyteputkien inkubaatio 37 °C:ssa:	16–24 tuntia
ELISA:	Noin kolme tuntia yhdelle ELISA-levylle
	Alle tunnin työ
	Kutakin levyä kohti lisätään 10–15 minuuttia

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Verinäyteputket, potilaskohtainen pakkaus)	
Tuotenumero	0192-0301
Preparaatioiden määrä	1
QuantIFERON Nil Control (QuantIFERON-nollakontrolli, harmaa korkki)	1 putki
QuantIFERON CMV Antigen (QuantIFERON-CMV-antigeeni, sininen korkki)	1 putki
QuantIFERON Mitogen Control (QuantIFERON-mitogeenikontrolli, punainen korkki)	1 putki
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (QF-CMV-verinäyteputkien pakkausseloste)	1

QuantIFERON-CMV ELISA	2 ELISA-levyn sarja
Tuotenumero	0350-0201
Microplate strips (12 x 8 wells) coated with murine anti-human IFN- γ monoclonal antibody (Hiiren monoklonalisella anti-ihmis-IFN- γ -vastaaineella päällystetyt mikrolevyliuskat [12 x 8 kuoppaa])	2 sarjaa 12 x 8 kuopan mikrolevyliuskoja
Human IFN- γ Standard (ihmisen IFN- γ -standardi), kylmäkuivattu (sisältää ihmisen rekombinantti-IFN- γ :aa, naudan kaseiinia, 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x pullo (8 IU/ml käyttövalmiiksi sekoitettuna)
Green Diluent (vihreä laimennusaine) (sisältää naudan kaseiinia, normaalia hiiriseerumia, 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (konjugaatin 100x-konsentraatti, kylmäkuivattu) (hiiren anti-ihmis-IFN- γ -HRP, sisältää 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (pesupuskurin 20x-konsentraatti) (pH 7,2; sisältää 0,05 % v/v ProClin® 300:a)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (entsyymin substraattiliuos) (sisältää H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' -tetrametyylibensidiiniä)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (entsyyminpysäytysliuos), (sisältää 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (QF-CMV ELISA -pakkausseloste)	1

* Sisältää rikkihappoa. Katso varotoimet sivulta 9.

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvatiedoissa (Safety Data Sheet, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

- 37 °C:n inkubaattori, CO₂:a ei tarvita
- Kalibroidut, muuttuvan tilavuuden pipetit 10 – 1 000 µl, kertakäyttökärjet
- Kalibroituja monikanavaisia pipettejä, joilla voidaan annostella 50 µl ja 100 µl, kertakäyttöiset kärjet
- Mikrolevyravistin
- Deionisoitu tai tislattu vesi, 2 litraa
- Mikrolevyn pesin (suosittelemme automaattista pesintä)
- Mikrolevyn lukulaite, johon on kiinnitetty 450 nm:n suodatin ja 620–650 nm:n referenssisuodatin.
- Levyn kansi

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiseen käyttöön

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisää tietoa on käyttöturvallisuustiedoissa (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina osoitteessa www.qiagen.com/safety, josta voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjojen ja niiden osien käyttöturvallisuustiedotteet.

HUOMIO



Käsittele ihmisverta mahdollisesti tartuntavaarallisena. Noudata asianmukaisia verenkäsittelyohjeita.

Seuraavat varoitukset ja varotoimet koskevat QuantiFERON-CMV ELISA -komponentteja.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sisältää rikkihappoa. Varoitus! Voi syövyttää metalleja. Aiheuttaa ihoärsytystä. Aiheuttaa vakavaa silmien ärsytystä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvonsuojainta.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Varoitus! Aiheuttaa vähäistä ihoärsytystä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvonsuojainta.

QuantiFERON Green Diluent



Sisältää trinitrium-5-hydroksi-1-(4-sulfofenyyli)-4-(4-sulfofenyyliatso)pyratsoli-3-karbolyksaattia. Sisältää tartratsiinia. Varoitus! Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvonsuojainta.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Sisältää seuraavaa: ProClin 300. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia vaikutuksia. Vältettävä päästämistä ympäristöön.

Turvallisuustiedot

Lisätietoja

- QF-CMV-pakkauselosteen ohjeista poikkeaminen voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Lue ohjeet huolellisesti ennen käyttöä.
- Älä käytä sarjaa, jos yhdessäkin reagenssipullossa on merkkejä vaurioista tai vuodosta ennen käyttöä.
- Tärkeää: Tarkista pullo ennen käyttöä. Älä käytä konjugaattia tai IFN- γ -standardin pulloja, joissa on havaittavissa vaurioita tai joiden kumitiiviste näyttää vaurioituneelta. Älä käsittele rikkoutuneita pulloja. Hävitä pullo turvallisesti asianmukaisia varotoimia noudattaen.
Suositus: Vähennä metallikorkin avaamiseen liittyviä loukkaantumisriskejä käyttämällä konjugaatin tai IFN- γ -standardin pullojen avaamiseen pullonavauspihtejä.
- Älä sekoita tai käytä eri QF-CMV-sarjaeristä peräisin olevia mikrolevyliuskoja, ihmisen gammainterferonistandardia (IFN- γ), vihreää laimennusainetta tai konjugaatin 100x -konsentraattia. Muita eri sarjaeristä peräisin olevia reagensseja (pesupuskuri 20x konsentraatti, entsyymien substraattiliuos ja entsyyminpysäytysliuos) voidaan käyttää yhdessä edellyttäen, että reagenssien viimeinen käyttöpäivämäärä ei ole umpeutunut ja että erän tiedot on merkitty muistiin.
- Hävitä käyttämättömät reagenssit ja biologiset näytteet paikallisten viranomaismääräysten mukaisesti.
- Älä käytä QF-CMV-verinäyteputkia tai QF-CMV ELISA -sarjoja niiden viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
- Varmista, että laboratoriovälineet, kuten levyn pesimet ja levyn lukulaitteet on kalibroitu/hyväksytty käyttöön.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Verinäyteputket

- Säilytä QF-CMV-verinäyteputkia 4–25 °C:n lämpötilassa.
- QF-CMV-verinäyteputkien lämpötilan on oltava täytön aikana 17–25 °C.
- QF-CMV-verinäyteputkien käyttöaika on enintään 15 kuukautta valmistuspäivästä säilytettynä 4–25 °C:n lämpötilassa.

ELISA-reagenssisarjat

- Säilytä sarjaa 2–8 °C:n lämpötilassa.
- Suojaa entsyymiin substraattiliuos suoralta auringonvalolta.

Käyttövalmiit ja käytetyt reagenssit

Katso reagenssien uudelleenliuottamista koskevat ohjeet kohdasta Vaihe 2: QuantiFERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN- γ :lle (vaiheet 3 ja 5 sivuilla 17 ja 19).

- Valmiiksi saatettuna ihmisen IFN- γ -standardia voidaan säilyttää enintään kolme kuukautta, jos säilytys tapahtuu 2–8 °C:n lämpötilassa. Merkitse valmiiksi saattamisen päivämäärä ihmisen IFN- γ -standardiin.
- Uudelleenliuotuksen jälkeen käyttämätön konjugaatin 100 \times -konsentraatti on säilytettävä 2–8 °C:n lämpötilassa ja käytettävä kolmen kuukauden kuluessa.
Merkitse konjugaatin käyttövalmiiksi saattamispäivä muistiin.
- Käyttöpitoinen konjugaatti on käytettävä kuuden tunnin kuluessa sen valmistuksesta.
- Käyttövahvuinen pesupuskuri voidaan varastoida huoneenlämpöön (22 \pm 5 °C) enintään 2 viikoksi.

Näytteen ottaminen ja käsittely

QF-CMV käyttää seuraavia verinäyteputkia:

- Nil Control (nollakontrolli) (harmaa korkki)
- CMV Antigen (CMV-antigeeni) (sininen korkki)
- Mitogen Control (mitogeenikontrolli) (punainen korkki)

Antigenit on kuivattu verinäyteputkien sisäseinälle, joten on ehdottoman tärkeää, että putkien sisältö sekoitetaan vereen huolellisesti. Putket on siirrettävä inkubaattoriin 37 °C:n lämpötilaan mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä näytteen keräämisestä.

Seuraavia toimenpideohjeita on noudatettava optimaalisten tulosten saavuttamiseksi:

1. Ota kultakin potilaalta 1 ml verta laskimopunktiolla suoraan jokaiseen QF-CMV-verinäyteputkeen. tämä toimenpide on annettava flebotomiaan erikoistuneen pätevän henkilön suoritettavaksi.

QF-CMV-verinäyteputkia voidaan käyttää korkeintaan 810 metrin korkeudella merenpinnasta.

Jos QF-CMV-verinäyteputkia käytetään yli 810 metrin korkeudessa tai jos otettu verinäyte on liian pieni, käyttäjä voi ottaa verta ruiskulla ja siirtää sitä välittömästi 1 ml kuhunkin kolmeen putkeen. Turvallisuussyistä se tapahtuu parhaiten poistamalla ruiskun neula ja varmistamalla, että käytössä ovat asianmukaiset turvatoimet, irrottamalla korkit kolmesta QF-CMV-verinäyteputkesta ja lisäämällä 1 ml verta jokaiseen niistä (putken sivulla olevaan mustaan merkkiin asti). Kiinnitä putkien korkit kunnolla ja sekoita alla annettujen ohjeiden mukaan. Koska veren ottaminen 1 ml:n putkella käy suhteellisen hitaasti, pidä putkea neulalla 2 - 3 sekuntia, kun putki näyttää olevan täynnä. Näin varmistat, että putkeen saadaan oikea määrä verta.

Putken sivulla oleva musta merkki osoittaa 1 ml:n täyttömäärän. QF-CMV-verinäyteputket on validoitu 0,8–1,2 ml:n määriille. Jos verimäärä missä tahansa putkessa ei ole lähellä merkkiä, on otettava uusi verinäyte.

Jos näytteen ottoon käytetään siipineulaa, on käytettävä ”tyhjennysputkea” sen varmistamiseksi, että putki on täytetty verellä ennen QF-CMV-verinäyteputkien käyttöä.

Verinäyte voidaan ottaa vaihtoehtoisesti myös yksittäisellä geneerisellä verinäyteputkella, joka sisältää antikoagulanttina litiumhepariinia, ja siirtää se sitten QF-CMV-verinäyteputkiin. Käytä veren hyytymisen estoaaineena ainoastaan litiumhepariinia, sillä muut antikoagulantit aiheuttavat testissä häiriöitä. Täytä verinäytteen keräysputki (vähimmäistilavuus 5 ml) ja sekoita varovasti kääntelemällä putkea useita kertoja, jotta hepariini liukenee. Tämä toimenpide on annettava flebotomiaan erikoistuneen pätevän henkilön suoritettavaksi. Verinäytettä on säilytettävä huoneenlämpötilassa (22 ± 5 °C) ennen sen siirtämistä QF-CMV-verinäyteputkiin, mikä on aloitettava 16 tunnin kuluessa verinäytteen ottamisesta.

2. QF-CMV-verinäyteputkia sekoitetaan heti täytön jälkeen kymmenen (10) kertaa juuri niin voimakkaasti, että voidaan varmistaa, että putken koko sisäpinta on peittynyt verellä. Näin putken seinämien antigeenit liukenevat vereen.

Putkien on oltava 17–25 °C:n lämpötilassa täytön aikana.

Liian voimakas sekoittaminen saattaa aiheuttaa geelin vaurioitumisen ja johtaa poikkeaviin tuloksiin.

Jos verinäyte on otettu litiumhepariiniputkeen, näytteet on sekoitettava tasaisesti ennen niiden siirtämistä QF-CMV-verinäyteputkiin. Varmista juuri ennen siirtoa varovasti kääntelemällä, että veri on sekoittunut hyvin. Annostele 1 ml alikvoottia (yksi jokaista QF-CMV-verinäyteputkea kohti) asianmukaiseen nollavertailu-, CMV-antigeeni- ja mitogeeniputkeen. Tämä on parasta suorittaa aseptisesti varmistaen, että noudatetaan asianmukaisia turvatoimenpiteitä. Poista korkit kolmesta QF-CMV-verinäyteputkesta ja lisää 1 ml verta jokaiseen putkeen (putken etiketin sivulla olevaan mustaan merkkiin saakka). Kiinnitä putkien korkit tiukasti paikalleen ja sekoita edellä kuvatulla tavalla.

3. Putket on merkittävä asianmukaisesti.

Varmista, että jokainen putki (nollavertailu-, CMV-antigeeni- ja mitogeeniputki) tunnistetaan etiketistä tai muulla tavoin.

4. Täytön, ravistelun ja merkitsemisen jälkeen putket on siirrettävä inkubaattoriin 37 ± 1 °C:n lämpötilaan mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä näytteen ottamisesta. Pidä putkia huoneenlämpötilassa ennen inkubointia (22 ± 5 °C). Verinäytteitä ei saa viedä jääkaappiin tai pakastaa.

Menetelmä

Vaihe 1: Veren inkubointi ja plasman kerääminen

1. Inkuboi putkia PYSTYASENNOSSA $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilassa 16–24 tuntia. Inkubointilaitte ei vaadi CO₂:ta tai kosteuttamista.

Tärkeää: Jos verta ei inkuboida välittömästi näytteen ottamisen jälkeen, putket on sekoitettava kääntämällä ne kymmenen kertaa ylösalaisin ennen inkubointia.

Kun inkubointi on suoritettu, verinäyteputkia voidaan säilyttää enintään kolme vuorokautta $4\text{--}27\text{ °C}$:n lämpötilassa ennen linkousta sentrifugissa

2. Kun putkia on inkuboitu 37 °C :n lämpötilassa, plasman keräämistä edistetään linkoamalla putkia 15 minuutin ajan 2 000–3 000 RCF:n (g) voimalla. Geelitulppa erottelee solut plasmasta. Jos niin ei tapahdu, putket on sentrifugoitava uudelleen.

Plasman talteenotto on mahdollista ilman linkoamista, mutta tällöin plasman keräämisessä on oltava erityisen huolellinen, etteivät solut rikkoudu.

3. Kun sentrifugointi on tehty, varo pipetin ylös ja alas suuntautuvaa liikettä tai plasman sekoittumista millään tavoin ennen sen talteenottoa. Varo aina rikkomasta geelin pinnalla olevaa materiaalia.

Tärkeää: Plasmanäytteitä voidaan kerätä ainoastaan pipetin avulla.

Plasmanäytteet voidaan ladata suoraan lingotuista näyteputkista QF-CMV ELISA -levylle, myös silloin, kun käytössä on automaattinen ELISA-työasema.

Plasmanäytteitä voidaan säilyttää sentrifugissa lingotuissa QF-CMV-verinäyteputkissa enintään 28 vuorokautta $2\text{--}8\text{ °C}$:n lämpötilassa, tai keräämisen jälkeen pitkiä aikoja alle -20 °C :n (mieluummin korkeintaan -70 °C :n) lämpötilassa.

Jotta testinäytteet ovat riittävät, kerää vähintään 150 µl plasmaa.

Vaihe 2: QuantiFERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN- γ

Katso ELISA-määrityksen suorittamiseen tarvittavat materiaalit kohdista Sarjan sisältö, sivulla 8 ja Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen, sivulla 9.

1. Kaikki plasmanäytteet ja reagenssit, paitsi konjugaatin 100x-konsentraatti, on tuotava huoneenlämpötilaan (22 ± 5 °C) ennen käyttöä. Tasaantumiselle on jätettävä aikaa vähintään 60 minuuttia.
2. Irrota ylimääräiset ELISA-levyn liuskat kehuksesta, sulje ne takaisin foliopussiin ja vie jääkaappiin myöhempää tarvetta varten.

Varaa ainakin yksi liuska jokaiselle QF-CMV ELISA -standardille ja riittävästi liuskoja testattaville potilaille. Palauta kehys ja kansi käytön jälkeen jäljellä olevien liuskojen käyttöön.

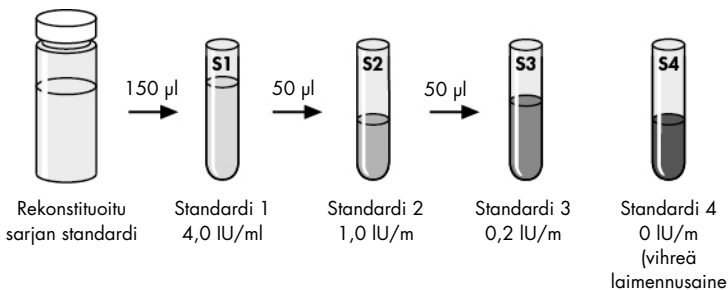
3. Saata ihmisen IFN- γ -standardi käyttökuntoon laimentamalla sitä pulloon merkityllä määrällä deionisoitua tai tislattua vettä. Sekoita varovasti vaahtoaminen minimoiden ja varmista täydellinen liukeneminen. IFN- γ -standardin liuottaminen uudelleen merkittyyn tilavuuteen saa aikaan liuoksen, jonka pitoisuus on 8,0 IU/ml.

Huomautus: Ihmisen gammainterferonin IFN- γ -standardisarjan valmiiksi saatettu tilavuus vaihtelee erän mukaan.

Käytä valmiiksi saatettua standardia ja valmistele liuotussarja neljälle IFN- γ -konsentraatille vihreään laimennusaineeseen (Green Diluent, GD) (Kuva 1, seuraava sivu) S1 (standardi 1) sisältää 4,0 IU/ml, S2 (standardi 2) sisältää 1,0 IU/ml, S3 (standardi 3) sisältää 0,25 IU/ml ja S4 (standardi 4) sisältää 0 IU/ml (vain vihreää liuotusainetta). Standardit on testattava vähintään kahtena otoksena. Valmistele kutakin ELISA-testiä varten sarjan standardista vastalaimennetut laimennukset.

Esimerkki toistotestisarjan toimintatavasta

Esimerkki toistotestisarjan toimintatavasta	
A	Merkitään neljä putkea: S1, S2, S3, S4.
B	Lisätään 150 µl vihreää laimennusainetta putkiin S1, S2, S3 ja S4.
C	Lisätään 150 µl standardisarjaa putkeen S1 ja sekoitetaan huolellisesti.
D	Siirretään 50 µl putkesta S1 putkeen S2 ja sekoitetaan huolellisesti.
E	Siirretään 50 µl putkesta S2 putkeen S3 ja sekoitetaan huolellisesti.
F	Pelkkä vihreä laimennusliuos toimii nollastandardina (S4).



Kuva 1. Standardikäyrän valmistelu laimennussarjalla.

4. Sekoita kylmäkuivattua konjugaatin 100x -konsentraattia 0,3 millilitraan deionisoitua tai tislattua vettä. Voit minimoida vaahtoamisen ja varmistaa konjugaatin täydellisen liukenemisen sekoittamalla varovasti.

Työskentelyvahvuinen konjugaatti valmistetaan laimentamalla riittävä määrä käyttövalmiiksi saatettua konjugaatin 100x -konsentraattia vihreällä laimennusaineella (katso Taulukko 1 seuraavalla sivulla)

Sekoita huolellisesti, varo vaahtoamista.

Palauta käyttämätön konjugaatin 100x-konsentraatti välittömästi käytön jälkeen 2–8 °C:n lämpötilaan.

Käytä vain vihreää laimennusainetta.

Taulukko 1. Käyttövahvuisen konjugaatin valmistaminen

Liuskosten määrä	Konjugaatin 100x-konsentraatin määrä	Vihreän laimennusaineen määrä
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. Verinäyteputkista kootut plasmanäytteet, jotka on myöhemmin pakastettu tai joita on säilytetty yli 24 tuntia ennen testiä, on sekoitettava huolellisesti ennen niiden lisäämistä ELISA-kuoppaan.

Tärkeää: Jos plasmanäytteet lisätään suoraan sentrifugissa lingotuista QF-CMV-verinäyteputkista, plasman sekoittumista on vältettävä. Varo aina rikkomasta geelin pinnalla olevaa materiaalia.

6. Laimenna myös CMV- ja mitogeeniplasmat vihreään laimennusaineeseen suhteessa 1/10 (10 µl plasmaa ja 90 µl GD), jos kvantitatiivisia tuloksia edellytetään. Nolla-plasmaa ei saa laimentaa.

Suosittellemme testaamaan seuraavat näytteet rinnakkain:

Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni (1/10)

QuantiFERON-CMV-analysiohjelmisto tukee kuitenkin myös seuraavia potilasnäytteitä:

Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni

Nolla, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni (1/10)

Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni, CMV-antigeeni (1/10)

Nolla, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni

7. Lisää 50 µl juuri valmistettua, työskentelyvahvuista konjugaattia ELISA-kuoppiin käyttämällä monikanavapipettiä.
8. Lisää 50 µl testiplasmanäytteitä asianmukaisiin kuoppiin. Lisää lopuksi 50 µl standardeista 1–4 asianmukaisiin kuoppiin. Standardit on testattava vähintään kahtena otoksena.
9. Peitä ELISA-levy ja sekoita konjugaattia sekä plasmanäytteitä/standardeja huolellisesti 1 minuutin ajan nopeudella 500–1000 rpm mikrolevyravistimessa. Vältä läikyttämistä.
10. Peitä levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa (22 ± 5 °C) 120 ± 5 minuutin ajan.
Levyt eivät saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana. Suositelluista lämpötiloista poikkeaminen voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia.
11. Valmistele inkuboinnin aikana työskentelyvahvuinen pesupuskuri. Laimenna yksi osa pesupuskurin 20x-konsentraattia 19 osaan deionisoitua tai tislattua vettä ja sekoita huolellisesti.
Pesupuskurin 20x-konsentraattia on toimitettu riittävä määrä, jotta voidaan valmistaa kaksi litraa työskentelyvahvuista pesupuskuria.
12. Kun ELISA-levyn inkubointi on valmis, pese kuopat 400 µl:lla työskentelyvahvuista pesupuskuria vähintään kuudesti. Suosittelemme automaattista levyn pesintä.
Tärkeää: Huolellinen peseminen on erittäin tärkeää määrittelyn onnistumisen kannalta. Varmista, että jokainen kuoppa täytetään kokonaan pesupuskurilla kuopan yläreunaan saakka kunkin pesujakson aikana. Suosittelemme vähintään 5 sekunnin liotusta jaksojen välissä.
Jätevesisäiliöön on lisättävä laboratoriodesinfiointiainetta, ja vakiintuneita käytäntöjä on noudatettava mahdollisesti infektoivan materiaalin dekontaminaatiossa.
13. Taputa levyjä alaspäin imukykyisellä nukkaamattomalla liinalla pesupuskurijäämien poistamiseksi. Lisää 100 µl entsyymin substraattiliuosta kuhunkin kuoppaan, peitä levy ja sekoita huolellisesti 1 minuutin ajan 500 – 1 000 rpm:n nopeudella mikrolevyravistimessa.
14. Peitä jokainen levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa (22 ± 5 °C) 30 minuutin ajan. Levyt eivät saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana.

-
15. Lisää 30 minuuttia kestäneen inkuboinnin jälkeen 50 µl entsyymipysäytysliuosta jokaiseen kuoppaan samassa järjestyksessä kuin substraattia lisättiin. Sekoita huolellisesti 500 – 1 000 rpm:n nopeudella mikrolevyravistimessa.
16. Mittaa kunkin kuopan optinen tiheys (OD) 5 minuutin kuluessa reaktion pysäytyksestä mikrolevyn lukulaitteella, johon on asennettu 450 nm:n suodatin ja 620–650 nm:n referenssuodatin. Optisen tiheyden arvoja käytetään tulosten laskennassa.

Laskennat ja testien tulkinta

QuantiFERON-CMV-analyysiohjelmisto raakadatan analysointiin ja tulosten laskentaan on saatavilla QIAGENin verkkosivuilta osoitteesta www.QuantiFERON.com. Varmista, että käytössä on QF-CMV-analyysiohjelmiston uusin versio.

Ohjelmisto suorittaa määrittelyn laadunvarmistusarvion, luo standardikäyrän ja luo kullekin tutkittavalle testituloksen Tulosten tulkinta -luvussa sivulla 24 kuvatulla tavalla. Ohjelmisto raportoi miedoimman liuksen, jolla on saatu aikaan QF-CMV ELISA -määrittelyn sallitulla alueella oleva tulos ottaen huomioon laimennussuhteen.

QF-CMV-analyysiohjelmistolla tehtävän analyysin lisäksi tulokset voidaan määrittää seuraavan menetelmän mukaisesti.

Standardikäyrän laatiminen (jos QF-CMV-analyysiohjelmistoa ei käytetä)

Määrittele standardien OD-arvojen keskiarvo jokaiselta levyltä.

Laadi $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardikäyrä muodostamalla keskiarvoisen optisen tiheyden (y-akseli) $\log_{(e)}$ -suhteessa standardien IFN- γ -konsentraation $\log_{(e)}$ -arvoihin (x-akseli) IU/ml:ina jättäen nollastandardi pois näistä laskelmista. Laske standardikäyrään parhaiten sopiva suora regressioanalyysillä.

Standardikäyrää käytetään määritettäessä IFN- γ -pitoisuus (IU/ml) kussakin testiplasmanäytteessä käyttämällä apuna kunkin näytteen optisen tiheyden arvoa.

Nämä laskelmat voidaan tehdä mikrolevyn lukulaitteiden mukana toimitettavilla ohjelmistoilla tai esimerkiksi standarditaulukkolaskennalla tai tilastointiohjelmistolla (esim. Microsoft® Excel®). Suosituksena on, että näitä ohjelmistoja käytetään regressioanalyysin, standardien variaatiokerrointen (coefficient of variation, %CV) ja standardikäyrän korrelaatiokerroimen (r) laskentaan.

Raportoitava tulos on otettava miedoimmasta liuoksesta, jolla on saatu aikaan QF-CMV ELISA -testin sallitulla alueella oleva tulos ottaen huomioon laimennussuhteen.

Testin laadunvarmistus

Testitulosten tarkkuus riippuu standardikäyrän tarkkuudesta. Tästä syystä standardeista saadut tulokset on tarkastettava, ennen kuin testituloksia voidaan tulkita.

ELISAa koskee seuraava:

- Standardin 1 keskimääräisen optisen tiheyden on oltava $\geq 0,600$.
- Standardin 1 ja 2 toistettujen optisten tiheyksien arvojen %CV-arvon on oltava $< 15 \%$.
- Toistettavat OD-arvot standardeille 3 ja 4 eivät saa poiketa enempää kuin 0,040 optista tiheysyksikköä keskiarvosta.
- Keskimääräisistä imeytymisarvoista laskettujen korrelaatiokerrointen (r) on oltava $\geq 0,98$.

QF-CMV-analyysiohjelmisto laskee ja raportoi nämä laadunvalvontaparametrit. Jos yllä mainitut kriteerit eivät täyty, ajo on virheellinen ja testi on tehtävä uudelleen.

Nollastandardin (vihreä laimennusaine) keskimääräisen optisen tiheyden on oltava $\leq 0,150$. Jos keskimääräinen optisen tiheyden arvo on $> 0,150$ levyjen pesuprosessi on tarkastettava.

Tulosten tulkinta

QuantiFERON-CMV-tulokset tulkitaan Taulukko 2 esitettyjen kriteerien avulla.

Taulukko 2. QuantiFERON-CMV-tulosten tulkinta

Nil (IU/ml)	CMV miinus nolla (IU/ml)	Mitogen miinus Nil (IU/ml)*	QF-CMV-tulos	Raportti/tulkinta
≤ 8,0	≥ 0,20 ja ≥ 25 % Nil-arvosta	Mikä tahansa	Reaktiivinen [†]	Anti-CMV-immuneetti havaittu
	< 0,20 TAI ≥ 0,20 ja < 25 prosenttia nolla-arvosta	≥ 0,5	Ei-reaktiivinen	Anti-CMV-immuneettia EI havaittu
> 8,0 [§]	Mikä tahansa	< 0,5	Määrittämätön [†]	CMV-vasteen tuloksia ei voida määrittellä
		Mikä tahansa	Määrittämätön [†]	CMV-vasteen tuloksia ei voida määrittellä

* Vasteet mitogeenin positiiviseen kontrolliin (ja toisinaan myös CMV-antigeneihin) ovat usein mikrolevyn lukulaitteen alueen ulkopuolella. Tällä ei ole vaikutusta testituloksiin.

[†] Silloin, kun sytomegalovirusinfektiota ei epäillä, alustavat positiiviset tulokset voidaan vahvistaa testaamalla alkuperäiset plasmanäytteet uudelleen toisintoina QF-CMV ELISA -menetelmällä. Jos toistetun testin yksi tai molemmat toisinnot ovat positiivisia, henkilön testitulos on katsottava reaktiiviseksi.

[‡] Katso mahdolliset syyt kohdasta Vianmääritys (sivu 39).

Kliinisissä tutkimuksissa (1) epävarma tulos on todettu kliinisesti merkittäväksi elinsiirtopotilailla, joiden luovuttaja on CMV-reaktiivinen, mutta mitogeenikontrolli on alle 0,5 IU/ml. Näillä potilailla on suurin riski CMV:n kehittymiseen.

[§] Kliinisissä tutkimuksissa alle 0,25 prosentilla potilaista oli > 8,0 IU/ml IFN- γ -tasoja Nil-kontrollissa.

Huomautus: Mitattua IFN- γ -tasoa on käytettävä yhdessä kliinisen tilanteen, aikaisempien sairauksien ja muun diagnostisten arvioinnin kanssa arvioitaessa potilaan immunologista vastetta CMV-antigeneille. QF-CMV ei ole CMV-infektiota selvittävä testi, eikä sitä saa käyttää CMV-infektion poissulkemiseen.

Rajoitukset

QuantiFERON-CMV-testin tulosten on oltava samansuuntaisia kunkin potilaan epidemiologisen historian, nykyisen lääketieteellisen statuksen ja muiden diagnostisten arvioiden kanssa.

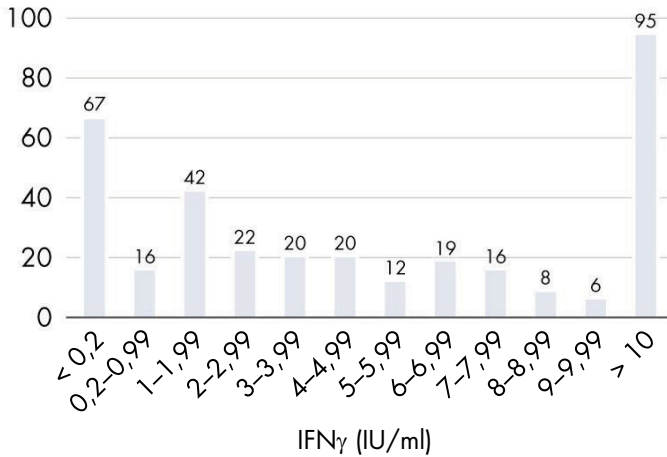
Epäluotettavat tai epäselvät tulokset voivat johtua seuraavasta:

- Poikkeaminen QuantiFERON-CMV ELISA -pakkauselosteessa kuvatusta toimenpiteestä
- Liian suuri IFN- γ -taso kontrolliputkessa.
- Verinäytteen ottamisen ja 37 °C:n lämpötilassa inkuboinnin välillä on kulunut yli 16 tuntia.

Odotusarvot

Odotetut IFN- γ -arvot QuantiFERON-CMV-testille määritettiin terveiltä tutkittavilta otettujen 591 näytteen testeistä. 343 näytteistä oli seroposiitivisia ja 248 näytteistä oli seronegatiivisia CMV IgG:lle. CMV-serologinen status oli tuntematon QF-CMV-testin suoritushetkellä. CMV-seronegatiivisilta tutkittavilta otetusta 248 testatusta näytteestä 100 % (248/248) oli ei-reaktiivisia, ja QF-CMV ELISA tuotti IFN- γ -vasteen, joka oli < 0,2 IU/ml CMV-antigeeniputkessa (nolla-arvo vähennettynä). IFN- γ -vasteet CMV-antigeeniputkelle (nolla-arvo vähennettynä) 343 CMV-seroposiitiviselle potilaalle on esitetty kuvassa (Kuva 2).

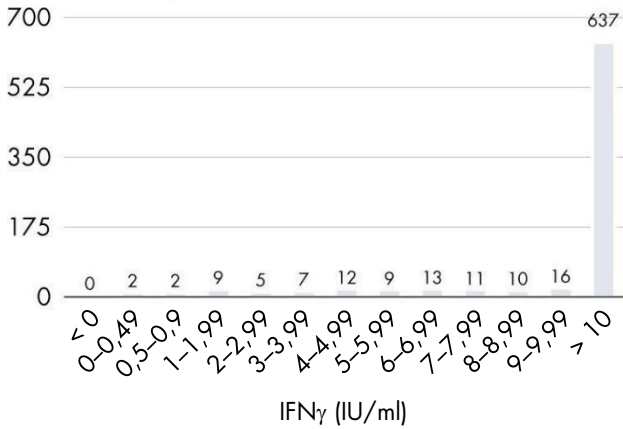
Näytteiden määrä



Kuva 2. QF-CMV IFN- γ -vasteiden jakauma (nolla-arvo vähennettynä) terveillä seropositiivisilla tutkittavilla (n = 343).

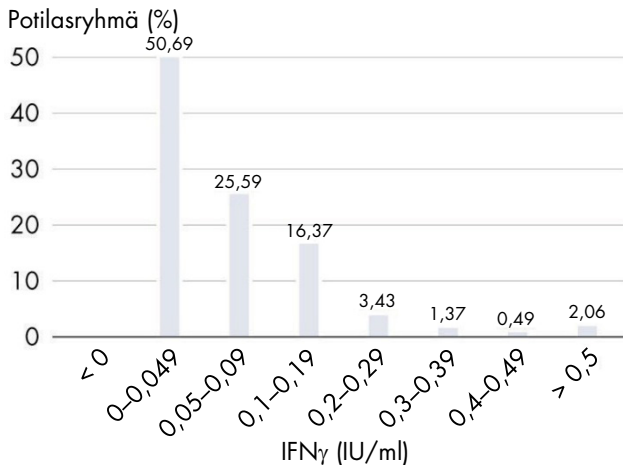
Mitogeenin IFN- γ -vasteiden jakauma (nolla-arvo vähennettynä) määritettiin terveiltä tutkittavilla otetun 733 näytteen avulla QF-CMV ELISA -testiä käyttäen riippumatta CMV IgG -serologiasta (Kuva 3). Mitogeenin (nolla-arvo vähennettynä) tulos, joka on alle 0,5 IU/ml osoittaa joko testin epäonnistuneen tai potilaan olevan immuunipuutteinen. Terveessä väestössä vain 2 tulosta 733:n joukosta osuu tähän luokkaan.

Näytteiden määrä



Kuva 3. Mitogeneeni-IFN- γ -vasteiden jakauma (nolla-arvo vähennettynä) terveillä tutkittavilla (n = 733).

Nollavertailuputkien IFN- γ -vasteiden jakauma määritettiin terveiltä tutkittavilta otetun 1 020 plasmanäytteen avulla QF-CMV ELISA -testiä käyttäen riippumatta CMV IgG -serologiasta (Kuva 4).



Kuva 4. Nolla-arvojen IFN- γ -vasteiden jakauma terveillä tutkittavilla (n = 1 020) ilmaistuna prosentuaalisena osuutena potilasryhmästä.

Suorituskykyominaisuudet

Kliininen suorituskyky

Testikynnys ennen CMV-altistusta QF-CMV-testiä käyttämällä on määritelty seuraavan tulosanalyysin perusteella terveiden potilaiden ryhmästä (n = 223), jossa QF-CMV-tuloksia verrattiin CMV IgG -serologisiin tuloksiin. A ROC -analyysi määrittä testin raja-arvoksi 0,04 IU/ml (nolla-arvo vähennettynä), asetti optimaaliset positiiviset ja negatiiviset ennustearvot QF-CMV:ille (käyrän alapuolinen alue = 0,9679 [95 %:n CI: 0,9442–0,9915, p < 0,0001]), ja näin esitti raja-arvon, jolla tämä määrittä toimi käyttötarkoituksensa mukaisesti kaikkein tehokkaimmin tervettä populaatiota testatessa.

QF-CMV-määrittäksen suoritusasoa verrattiin SeraQuest™ CMV IgG -serologiatestiin (Quest International). QF-CMV-määrittä osoitti 95 %:n (294/310 henkilön) yhtäpitävyyden CMV IgG -serologiatestiin terveillä potilailta, joista kukaan 149 seronegatiivisesta luovuttajasta ei osoittanut mitään reaktiivisuutta QF-CMV-määrittäksessä. 145 seropositiivista luovuttajaa 161 luovuttajan joukosta antoi reaktiivisen QF-CMV-vasteen. Yleisesti ottaen positiivinen yhtäpitävyys oli 90 % negatiivisen yhtäpitävyyden arvon ollessa 100 %. Yhtäpitävyytaso terveillä potilailta QF-CMV-vasteiden ja CMV IgG -serologisen statusken välillä on esitetty Taulukko 3.

Taulukko 3. Yhtäpitävyys QuantiFERON-CMV- ja CMV IgG-serologiatestien välillä terveillä tutkittavilla

		CMV-serologia		Yhteensä
		Positive (Positiivinen)	Negative (Negatiivinen)	
QuantiFERON-CMV	Reaktiivinen	145	0	145 (46,8 %)
	Ei-reaktiivinen	16	149	165 (53,2 %)
	Yhteensä	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Määrityksen kynnyсарvot

Suosittelun kliininen testiarvo tälle määritykselle on 0,2 IU/ml CMV-antigeeniputkessa (nolla-arvo vähennettynä), vaikka eri kynnyksiä voidaan validoida eri kliinisiin ympäristöihin.

Kliiniset tutkimukset

Koska sytomegalovirusinfektion vahvistamisesta tai poissulkemisesta ei ole olemassa tarkkaa standardia, QF-CMV-herkkyyttä ja spesifisyyttä ei voida käytännössä arvioida. QF-CMV-määrityksen herkkyyttä ja spesifisyyttä likimääräistettiin arvioimalla yhtäpitävyyttä terveillä potilailla mitatun QF-CMV-vasteen ja CMV IgG -serologisen statuksen välillä.

QF-CMV-testin spesifisyys likimääräistettiin arvioimalla virheellisten positiivisten määrää (QF-CMV-testin reaktiivinen vaste) terveillä potilailla, joilla ei ole todettu aiempaa CMV-altistusta (CMV IgG -seronegatiiviset potilaat). Herkkyys likimääräistettiin arvioimalla QF-CMV-vastetta terveillä potilailla, joiden kohdalla oli todisteita aiemmasta CMV-altistuksesta (CMV IgG -seropositiiviset henkilöt). QF-CMV hyödyntää suurta CMV-spesifisten epitooppien määrää eri CMV-proteiineista ja tarjoaa näin laajan kattavuuden potilasryhmästä, joilla on erilaisia HLA-luokan I haplotyyppisiä (noin 98 % potilasryhmästä). Koska CMV-serologiatestattujen HLA-haplotyyppisiä ei ollut tiedossa, pienen prosentin seropositiivisista henkilöistä odotetaan jäävän ilman vastetta QF-CMV-verinäyteputkissa.

Spesifisyys

Tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin terveiltä tutkittavilta otettua 591 näytettä, QF-CMV-testissä ei ilmennyt virheellisiä positiivisia tuloksia tutkittavilla, jotka oli todettu CMV IgG -seropositiivisiksi tarkasteltaessa 248/248 näytettä, jotka oli todettu ei-reaktiivisiksi QF-CMV ELISA -testissä ja negatiivisiksi CMV IgG -serologiatestissä. Tästä syystä QF-CMV-testissä saatujen tulosten ja CMV IgG -serologiatestissä saatujen tulosten yhdenmukaisuus oli 100 %.

Kaikissa muissa spesifisyyssarvioissa, jotka tehtiin elinsiirtopotilailla (1–8), hematopoeettisen kantasolusiirron saaneilla potilailla (9,10) ja HIV-potilailla (11), yhteneväisyys QF-CMV-testillä ja CMV IgG -testillä saatujen tulosten välillä oli myös 100 %.

Herkkyyys

Tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin 343 näytettä, jotka oli otettu CMV IgG -seroposiitiviksi todetuilta terveiltä tutkittavilta, tarkasteltaessa yhteneväisyyttä QF-CMV-testissä ja CMV IgG -serologiatestissä saatujen vasteiden välillä tuloksena oli 80,5 %, 276/343 näytteestä osoittautui QF-CMV-testissä reaktiiviseksi ja CMV IgG -serologiatestissä positiiviseksi. Havaittu eroavaisuus saattaa johtua virheellisestä positiivisesta CMV-serologiasta tai siitä, että testattavalla henkilöllä ei ole vastetta HLA-tyypeille.

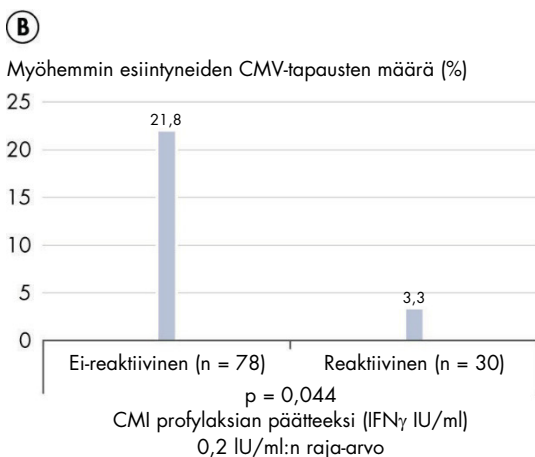
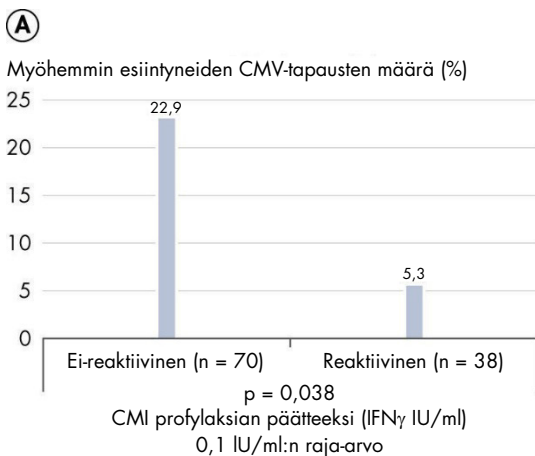
Herkkyyden yhtäpitävyyden arviointi tehtiin elinsiirtopotilailla (1–8), hematopoeettisen kantasolusiirron saaneilla potilailla (9, 10) ja HIV-positiivisilla potilailla (11). Havaittu eroavaisuus saattaa johtua virheellisesti positiivisesta CMV-serologiasta, tai siitä, että henkilöllä ei havaittu vastetta HLA-tyypeille tai reaktiivisten T-solujen puuttumisesta näillä potilailla heidän immuunivajeensa vuoksi.

Kliinistä hyötyä korostavat tutkimukset

Sekä CMV IgG -serologia että QF-CMV ilmoittavat käyttötarkoituksensa olevan CMV-immuniteetin havaitseminen. Kudossiirroissa CMV-serologia on laajalti käytetty ennen siirtoa kartoitettaessa potilaan CMV-komplikaatioiden riskiä siirron jälkeen, mutta sen arvo on rajallinen kudossiirtojen jälkeen. QF-CMV:lla voidaan testata myös kudossiirtojen saajat arvioitaessa CMV-immuunitasoa potilailla, jotka ovat vaarassa saada oireellisen CMV-infektion ja/tai taudin immuunivajeensa vuoksi (12–15).

QuantiFERON-CMV:n teho on osoitettu useissa eri ikäluokkia koskevissa kliinisissä tutkimuksissa (1–11, 15, 16).

Laajassa tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin 108 elinsiirtopotilasta (4), havaittiin, että niiden potilaiden, joiden kohdalla QF-CMV-tulos oli reaktiivinen anti-CMV-profylaksian päätteeksi, myöhemmin esiintyneiden CMV-tapausten määrä oli merkittävästi pienempi (3,3 % tai 1/30; käytettäessä kynnyisarvoa 0,2 IU/ml) verrattuna henkilöihin, joiden QF-CMV-tulos oli ei-reaktiivinen (21,8 % tai 17/78, $p = 0,044$) (Kuva 5).



Kuva 5. Myöhemmin ilmenneiden CMV-tapausten määrä potilailla, joiden QuantiFERON-CMV-tulos oli reaktiivinen vs. ei-reaktiiviset QuantiFERON-CMV-tulokset profylaksian päätteeksi. Taustatiedot teoksessa Kumar et al. (4).

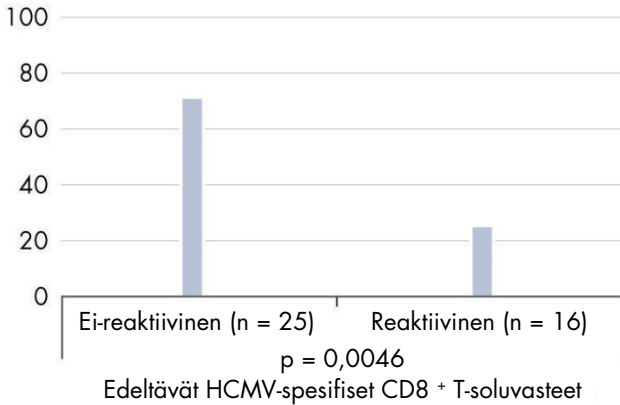
Lisäksi CMV-seronegatiiviselta luovuttajalta (eli D+/R-) siirteen saaneilla potilailla, joiden QF-CMV-tulos oli reaktiivinen profylaksian päätteeksi, jäivät ilman CMV-tautia useammin ja pidempään. Tämä osoittaa, että QF-CMV soveltuu myös niiden potilaiden tunnistamiseen, jotka ovat vaarassa saada CMV-taudin myöhemmin.

Tämä tutkimus osoitti myös, että suurimmassa CMV-taudin riskiryhmässä (D+/R-) siirrennäispotilaiden kohortissa koska tahansa profylaksian jälkeen saatuun reaktiiviseen tulokseen liittyi suurempi mahdollisuus olla saamatta CMV-tautia.

Tutkimuksessa, joka kattoi 37 elinsiirtopotilasta (6), arvio CMV-spesifisistä CD8⁺ T-soluvasteista QF-CMV-testissä auttoi spontaanin virusten poistumisen ennustamista verrattuna CMV-taudin etenemiseen, kun CMV-virusten määrä veressä oli suurentunut. Tässä tutkimuksessa 24/26 potilaalla (92,3 %), joiden QF-CMV-tulos oli reaktiivinen (käytössä IFN- γ :n $\geq 0,2$ IU/ml:n testiraja), CMV-virukset poistuivat, ja vain 5/11 (45,5 %) potilaista, joiden QF-CMV-tulos oli ei-reaktiivinen, saivat saman tuloksen.

Tutkimus, jossa 67 keuhkosiirrepotilaalla arvioitiin CMV-virustartuntojen määrää siirteen jälkeen (7), havaittiin että 18/25 (72 %) CMV-virustartuntaa edelsi ei-reaktiivinen QF-CMV-tulos vs. 4/16 (25 %) tapausta, joita edelsi reaktiivinen QF-CMV-vaste (Fisherin eksakti testi, $p = 0,0046$, katso Kuva 6).

HCMV DNAemia -tartunnoista, joihin liittyi virusmäärä > 1 000 kopiota/ml (%)



Kuva 6. Tilastollinen CMV-spesifinen CD8⁺ T-soluvasteen analyysi QuantiFERON-CMV:n tunnistamana ja CMV-viruskannan kehitys (Fisherin eksakti testi, p = 0,0046). Taustatiedot teoksessa Weseslindtner et al (7).

Laajassa monikeskustutkimuksessa, jonka otanta oli 127 CMV-seropositiivisilta luovuttajilta elinsiirtoja saanutta CMV-seronegatiivista elinsiirtopotilasta (8), joista kaikki saivat viruksentorjuntahoitoa, potilailla, joiden QF-CMV-tulos oli reaktiivinen (käyttämällä 0,1 IU/ml:n testikynnysarvoa) jokaisessa aikapisteessä CMV-viruksentorjuntahoidon jälkeen, myöhemmin esiintyneiden tautien määrä oli merkittävästi pienempi 12 kuukautta siirteen jälkeen (6,4 %) verrattuna niihin, joiden QF-CMV-tulos oli ei-reaktiivinen (22,2 %) tai määrittelemätön (58,3 %, p < 0,001). Luokiteltaessa määrittämättömiä vasteita, jotka myös katsottiin "ei-reaktiivisiksi", myöhemmin esiintyneiden CMV-tapausten määrä oli 6,4 % vs. 26,8 %, p = 0,024. Positiiviset ja negatiiviset QF-CMV-ennustearvot, jotka suojasivat CMV-taudilta, olivat 0,90 (95 % CI 0,74–0,98) ja 0,27 (95 % CI 0,18–0,37). Tämä tutkimus osoitti, että QF-CMV saattaa olla hyödyllinen ennustettaessa potilaan alhaista, keskimääräistä tai suurta riskiä saada CMV-tauti profylaksian jälkeen.

Ennakoivassa tutkimuksessa otanta oli 55 elinsiirtopotilasta (8), jossa suhde ennen siirrettä saatujen QF-CMV-tulosten ja siirteen jälkeen todettujen CMV-tapausten välillä analysoitiin, todettiin, että suurempi CMV-esiintyvyys havaittiin CMV-seropositiivisilla potilailla, joiden ennen siirtoa antama QF-CMV-vaste (7/14 tai 50 %) oli ei-reaktiivinen (käytettäessä kynnysarvoa 0,2 IU/ml) verrattuna niihin CMV-seropositiivisiin potilaisiin, joiden QF-CMV-vaste ennen siirtoa oli reaktiivinen (4/30 tai 13,3 %, $p = 0,021$).

Tutkimuksessa havaittiin, että potilaat, joilla ennen siirrettä QF-CMV-vaste oli ei-reaktiivinen ja jotka olivat saaneet elimen CMV-seropositiiviselta luovuttajalta, oli kymmenkertainen riski saada CMV-tauti verrattuna potilaisiin, joiden QF-CMV-vaste oli ennen siirtoa reaktiivinen (mukautettu TAI 10,49, 95 % CI 1,88–58,46). Näin ollen ennen siirtoa tehty QF-CMV-määritys saattaa olla hyödyllinen ennustettaessa riskiä saada CMV-infektio siirron jälkeen, mikä mahdollistaa CMV-infektion hallinnan elinsiirron jälkeen.

Monia muita tutkimuksia CMV-spesifisen CD8⁺ T -soluvasteen tunnistamisesta QF-CMV:lla elinsiirtopotilaiden ryhmässä on tehty (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) tai niitä ollaan tekemässä eri puolilla maailmaa.

Kansainväliset ohjeet elinsiirtopotilaiden sytomegaloviruksen hoidosta

CMV-spesifisen immuunivalvonnan merkitys on tunnistettu, ja aiheesta on annettu julkaisu *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Päivitetyt kansainväliset ohjeet elinsiirtopotilaiden sytomegaloviruksen hoidosta) (12). Nämä kansainväliset ohjeet, jotka ovat CMV- ja elinsiirtoasiantuntijaryhmän Infectious Diseases Section of The Transplantation Society -yhdistyksen valvonnan alaisuudessa laatimat, edustavat asiantuntijamielipiteiden pohjalta laadittuja yhteisiä ohjeita CMV-valvonnassa diagnostiikka, immunologia, ehkäisy ja hoito mukaan lukien.

Ohjeissa todetaan, että "immunitietin valvonta CMV-spesifisen T-soluvasteen osalta saattaa ennustaa CMV-riskiryhmät elinsiirron jälkeen, ja se saattaa olla hyödyllinen työkalu profylaksian ja ennakoivan hoidon kohdalla" (12).

Lisäksi ohjeissa annetaan suosituksia immuunivasteen testauksesta, johon kuuluu:

- Kyky arvioida elinsiirtopotilaan CD4⁺ ja CD8⁺ T -solujen määrää ja toimintaa
- Kyky mitata IFN- γ -arvoa
- Yksinkertainen suorittaa, edullinen ja toistettava
- Nopea vastaus
- Näytteiden lähettäminen erikoislaboratorioihin on helppoa

QF-CMV vastaa käytännössä kaikkia ohjeissa määriteltyjä kriteereitä, ja se on ainoa standardoitu immunitietin valvontamääritys, joka pystyy tunnistamaan IFN- γ :n, joka viittaa erityisesti CMV:hen.

Määrittelyn suorituskykyominaisuudet

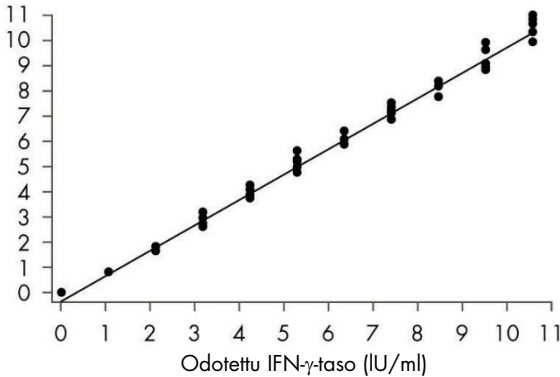
QF-CMV ELISA -määrittelyssä käytetään ihmisen rekombinanttigamma-interferonistandardia (IFN- γ -standardi), jonka määrittely on tehty referenssi IFN- γ -valmistetta vasten (NIH Ref: Gxg01-902-535). Testinäytteitä koskevat tulokset on raportoitu kansainvälisinä yksiköinä (International Units, IU) suhteessa testisarjan mukana toimitetusta sekundaarisesta standardista valmistetun testiliuoksen avulla laadittuun standardikäyrään.

Heterofiilisten vasta-aineiden (esim. neutraloivien vasta-aineiden) esiintymisen seerumissa tai plasmassa tiedetään tietyillä yksilöillä aiheuttavan häiriöitä immunomäärittelyssä. Heterofiilisten vasta-aineiden vaikutus QF-CMV ELISA -testissä voidaan minimoida lisäämällä vihreään laimennusaineeseen normaalia hiiriseerumia ja käyttämällä F(ab')₂ -monoklonaalista vasta-ainevalmistetta IFN- γ -vasta-aineena, jolla mikrolevyn kuopat päällystetään.

QF-CMV ELISA-määrittelyn havaitsemisraja on 0,065 IU/ml, eikä määrittely ole osoittanut merkkejä suurten annosten (protsooni) vaikutuksesta IFN- γ -pitoisuuteen 10 000 IU/millilitraan asti. Tutkimuksissa on osoitettu, että QF-CMV ELISA -vasta-aineet eivät reagoi ristiin testattujen sytokiiniin kanssa (kuten IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 ja IL12).

QF-CMV ELISA:n lineaarisuus on todistettu asettamalla ELISA-levylle sattumanvaraisesti viisi toisintoa 11 plasmapoolista, joiden IFN- γ -pitoisuus tunnetaan. Linearisessa regressiolinjassa on $1,002 \pm 0,011$ pudotus, ja korrelaatiokerroin on 0,99 (Kuva 7).

Määritetty IFN- γ -taso



Kuva 7. QF-CMV ELISA:n lineaarisuusprofiili määriteltiin testaamalla viisi plasmanäytettä 11 joukosta, joiden IFN- γ -pitoisuus oli tiedossa.

QF-CMV ELISA -testin uusittavuus arvioitiin testaamalla 20 plasmanäytettä, joiden IFN- γ -pitoisuus vaihteli (kolme näytettä, kolme laboratoriota, kolme ei-peräkkäistä päivää ja kolme tekijää). Jokainen näyte testattiin 27 kertaa yhdeksässä riippumattomassa testiajossa. Eräs näytteistä oli nollakontrolli, ja sen laskennallinen IFN- γ -pitoisuus oli 0,08 (95 % CI 0,07–0,09) IU/ml. Muiden 19 plasmanäytteen pitoisuudet olivat välillä 0,33 (95 %:n CI 0,31–0,34) – 7,7 IU/ml (95 %:n CI 7,48–7,92).

Eräkohtaisessa tai sisäisessä toistettavuudessa arvioitiin jokaisen testiplasman %CV-keskiarvoksi, joka sisälsi IFN- γ :n, jokaiselta levyerältä ($n = 9$) välillä 4,1–9,1 %CV. Erän keskiarvo %CV (± 95 % CI) oli $6,6 \pm 0,6$ %. Nolla IFN- γ -plasman keskiarvo oli 14,1 %CV.

Kokonais- tai määritysten välinen toistettavuus määriteltiin vertaamalla 27 laskettua IFN- γ -pitoisuutta jokaisesta plasmanäytteestä välillä 6,6–12,3 %CV. Kokonaiskeskiarvo %CV (± 95 % CI) oli $8,7$ % $\pm 0,7$ %. Nolla IFN- γ -plasman keskiarvo oli 26,1 %CV. Tätä vaihtelutasoa voidaan odottaa, koska laskettu IFN- γ -pitoisuus on pieni ja vaihtelu pienen pitoisuusarvion ympärillä on suurempi kuin suuremmissa pitoisuuksissa.

Teknisiä tietoja

Määrittämättömät tulokset

Määrittelemättömät tulokset saattavat liittyä testattavan henkilön immunitaattitilastukseen, mutta se voi johtua myös teknisistä tekijöistä:

- Inkubointi 37 °C:ssa on tapahtunut myöhemmin kuin 16 tuntia näytteenotosta
- Verinäytteen säilyttäminen suositusalueen (22 ± 5 °C) ulkopuolella
- Verinäyteputkien sekoittaminen on riittämätöntä
- ELISA-levyä ei ole pesty kyllin huolellisesti.

Jos verinäytteen ottamisessa tai käsittelyssä epäillään teknisiä ongelmia, tee koko QF-CMV-testi uudestaan uusilla näytteillä. Stimuloitujen plasmojen ELISA-testin toistaminen voidaan tehdä aina, jos epäillään toimenpidepoikkeamaa ELISA-testissä. Määrittämätön tulos (alhaisesta mitogeeniarvosta) ei todennäköisesti muutu toiston jälkeen, ellei ELISA-testin aikana tapahtunut virhettä.

Hyytyneet plasmanäytteet

Jos plasmanäytteitä kauan säilytettäessä syntyy fibriinihiyytymiä, näytteet on käsiteltävä sentrifugissa hyytyneen aineksen saostamiseksi ja plasman pipetoinnin helpottamiseksi.

Vianmääritys

Tämä vianmääritysohje voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on myös seuraavassa osoitteessa olevissa teknisissä tiedoissa: www.QuantiFERON.com. Katso yhteystiedot takakannesta.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Standardien lukemien alhainen optinen tiheys

- | | |
|--|--|
| a) Standardin laimennusvirhe | Varmista, että standardisarjan liuokset valmistetaan oikein QF-CMV ELISA -pakkauselosteen mukaisesti. |
| b) Pipetointivirhe | Varmista, että pipetit on kalibroitu ja niitä käytetään valmistajan ohjeiden mukaan. |
| c) Inkubointilämpötila on liian matala | ELISA-testin inkubointi on suoritettava huoneenlämpötilassa (22 ± 5 °C). |
| d) Inkubointiaika on liian lyhyt | Konjugaatin, standardit ja näytteet sisältävän levyn inkubointiajan on oltava 120 ± 5 minuuttia. Entsyymin substraattiliuosta inkuboidaan levyssä 30 minuutin ajan. |
| e) On käytetty virheellistä levyn lukulaitteen suodatinta | Levy on luettava 450 nm:n suodattimella, ja referenssisuodattimen on oltava 620–650 nm. |
| f) Reagenssit ovat liian kylmiä | Kaikki reagenssit lukuun ottamatta konjugaatin 100x-konsentraattia on tuotava huoneenlämpöön ennen määrittämisen aloittamista. Se vie noin 1 tunnin. |
| g) Sarjan/komponenttien viimeinen käyttöpäivämäärä on umpeutunut | Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaatin 100x -konsentraatti käytetään 3 kuukauden kuluessa käyttövalmiiksi saattamisen päivämäärästä. |

Epämääräinen värin kehittyminen

- | | |
|--|--|
| a) Levy ei ole täysin pesty | Pese levy pesupuskurilla 400 pl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Käytettävän pesimen mukaan saatetaan tarvita enemmän kuin 6 pesujaksoa. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liotusjakso. |
| b) ELISA-kuoppien ristikontaminaatio | Pipetoinnissa ja näytteen sekoituksessa on oltava huolellinen riskin vähentämiseksi minimiin. |
| c) Sarjan/komponenttien viimeinen käyttöpäivämäärä on umpeutunut | Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaatin 100x -konsentraatti käytetään 3 kuukauden kuluessa käyttövalmiiksi saattamisen päivämäärästä. |

Huomautuksia ja ehdotuksia

- | | |
|--|--|
| d) Entsyymien substraattiliuos on kontaminoitunut. | Heitä substraatti pois, jos sinistä väriä on havaittavissa. Varmista, että käytössä olevat reagenssisäiliöt ovat puhtaat. |
| e) Plasma on sekoittunut sentrifugiputkissa ennen keräämistä | Varmista, että plasmanäytteet kerätään huolellisesti yllä olevasta geelistä ilman pipetin ylös ja alas suuntautuvaa liikettä, ja huolehdi siitä, että et koske geelin pinnalla olevaan materiaaliin. |

Paljon taustahäiriöitä

- | | |
|--|--|
| a) Levy ei ole täysin pesty | Pese levy pesupuskurilla 400 pl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Käytettävän pesimen mukaan saatetaan tarvita enemmän kuin 6 pesujaksoa. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liotusjakso. |
| b) Inkubointilämpötila on liian korkea | ELISA-testin inkubointi on suoritettava huoneenlämpötilassa (22 °C ± 5 °C). |
| c) Sarjan/komponenttien viimeinen käyttöpäivämäärä on umpeutunut | Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaattiin 100x-konsentraatti käytetään 3 kuukauden kuluessa käyttövalmiiksi saattamisen päivämäärästä. |
| d) Entsyymien substraattiliuos on kontaminoitunut. | Heitä substraatti pois, jos sinistä väriä on havaittavissa. Varmista, että käytössä olevat reagenssisäiliöt ovat puhtaat. |

Epälineaarinen standardikäyrä ja rinnakkaisotoksen vaihtelu

- | | |
|---|--|
| a) Levy ei ole täysin pesty | Pese levy pesupuskurilla 400 pl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Käytettävän pesimen mukaan saatetaan tarvita enemmän kuin 6 pesujaksoa. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liotusjakso. |
| b) Standardin laimennusvirhe | Varmista, että sarjan standardin laimennukset on tehty oikein tämän pakkauselosteen ohjeiden mukaan. |
| c) Huono sekoitus | Sekoita reagenssit huolellisesti kääntelemällä putkia tai pyöräyttämällä niitä kevyesti ennen niiden lisäämistä levyille. |
| d) Epäjohdonmukainen pipetointiteknikka tai keskeytys määrittelyn suorituksessa | Näytteen ja standardin lisääminen on suoritettava yhtäjaksoisesti. Kaikki reagenssit on valmistettava ennen määrittelyn aloittamista. |

Tuotetiedot ja tekniset oppaat ovat saatavilla veloitusetta QIAGEN-yhtiöltä jälleenmyyjän välityksellä tai vierailemalla osoitteessa www.QuantiFERON.com.















Lähdeviitteet

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.

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Selitys
	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöajankohta
	CE-merkintä
	In vitro -diagnostinen lääketieteellinen laite
	Tuotenumero
	Eränumero
	materiaalinumero
	GTIN-numero
	Lämpötilarajoitus
	Ei saa käyttää uudelleen
	Säilytettävä auringonvalolta suojattuna
	Katso käyttöohjeet
	Valmistaja
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tuen sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support, soita ilmaisnumeroon 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon tai paikalliseen jälleenmyyjään (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

ELISA-testimenetelmä lyhyesti

Vaihe 1: Veren inkubointi

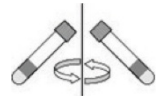
1. Ota potilaalta verinäyte ja ravista putkia välittömästi niiden täytön jälkeen kymmenen (10) kertaa juuri sen verran, että putken koko sisäpinta on veren peitossa niin, että putken seinämällä olevat antigeenit pääsevät liukenemaan vereen.



2. Inkuboi putkia pystyasennossa $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilassa 16–24 tuntia.



3. Inkuboinnin jälkeen putkia lingotaan 15 minuuttia 2 000 – 3 000 RCF (g) plasman erottamiseksi punasoluista.



4. Kun sentrifugointi on tehty, varo pipetin ylös ja alas suuntautuvaa liikettä tai plasman sekoittumista millään tavoin ennen sen talteenottoa. Varo aina rikkomasta geelin pinnalla olevaa materiaalia.



Vaihe 2: IFN- γ ELISA

1. Anna ELISA-komponenttien Conjugate 100 \times Concentrate (konjugaatin 100 \times -konsentraattia) lukuun ottamatta tasaantua huoneenlämpöön vähintään 60 minuuttia.

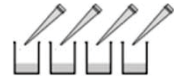


2. Liuota standardisarja uudelleen 8,0 IU/ml:n vahvuuteen tislattulla tai deionisoidulla vedellä. Valmista neljä (4) laimennettua standardia.



3. Sekoita kylmäkuivattu konjugaatin 100x -konsentraatti sekä tislattu tai deionisoitu vesi.

4. Valmista työskentelyvahvuinen liuos konjugaattia vihreään laimennusaineeseen ja lisää sitä 50 µl kaikkiin kuoppiin.



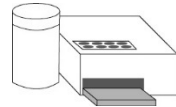
5. Lisää 50 µl testiplasmanäytettä ja 50 µl standardia asianomaisiin kuoppiin. Sekoita käyttämällä ravistinta.



6. Inkuboi huoneenlämpötilassa 120 minuuttia.



7. Pese kuopat pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään 6 kertaa.



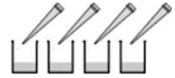
8. Lisää 100 µl entsyymiin substraattiliuosta kuoppiin. Sekoita käyttämällä ravistinta.



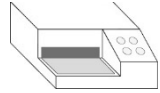
9. Inkuboi huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.



10. Lisää 50 µl entsyyminpysäytysliuosta kaikkiin kuoppiin. Sekoita käyttämällä ravistinta.



11. Lue tulokset 450 nm:n suodattimella ja 620–650 nm:n referenssuodattimella.



12. Analysoi tulokset.



Käsikirjan muutoshistoria

Asiakirja	Muutokset	Päivämäärä
L1075110-R06	Tarvitavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen, levyjen kannet lisätty, sivu 9	Lokakuu 2019

Tämä sivu on tarkoituksella jätetty tyhjäksi.

Tämä sivu on tarkoituksella jätetty tyhjäksi.

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

QuantiFERON-CMV ELISA -tuotteen rajoitettu lisenssisopimus.

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa, että ostaja tai tuotteen käyttäjä hyväksyy seuraavat ehdot:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaaliomaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osan lisäprotokollista ovat laatineet QIAGEN-käyttäjät toisille QIAGEN-käyttäjille. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseisiä protokollia. QIAGEN ei anna niille takuuta eikä takaa, etteivät ne loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti on kiellettyä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut, mukaan lukien asianajajan palkkiot, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneelin ja/tai sen osien osalta.

Päivitetyt lisenssiehdot ovat osoitteessa www.qiagen.com.

© 2019, QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

