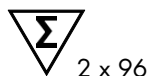


Oktober 2019

Pakningsvedlegg for QuantiFERON[®]-CMV ELISA



Fullblodstest med interferon-gamma (IFN- γ) som måler responsen til peptidantigenene til det humane cytomegaloviruset



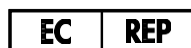
Til in vitro-diagnostikk



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

Innhold

Bruksområde	5
Oppsummering og forklaring	5
Prinsippene for prosedyren	6
Tid som kreves for å utføre analysen	7
Materialer som medfølger	8
Settets innhold	8
Materialer som er nødvendige, men ikke følger med	9
Advarsler og forsiktighetsregler	9
Sikkerhetsinformasjon	11
Håndtering og oppbevaring av reagenser	12
Prøvetaking og -klargjøring	13
Prosedyre	16
Trinn 1: Inkubasjon av blod og innhenting av plasma	16
Trinn 2: QuantiFERON-CMV ELISA for humant IFN- γ	17
Beregninger og tolkning av tester	22
Generering av standardkurve (hvis analyseprogrammet QF-CMV ikke brukes)	22
Kvalitetskontroll av testen	23
Tolkning av resultater	24
Begrensninger	25
Forventede verdier	25
Ytelsesegenskaper	28
Klinisk ytelse	28

Analyseterskelverdi	29
Kliniske studier	29
Spesifisitet	29
Sensitivitet	30
Studier som fremhever klinisk nytteverdi	30
Internasjonale retningslinjer for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer.....	35
Analysens ytelsesegenskaper	36
Teknisk informasjon.....	38
Ubestemte resultater.....	38
Koagulerte plasmaprøver	38
Feilsøkningsveiledning	39
Referanser	41
Symboler	43
Kontaktinformasjon	44
Forkortet ELISA testprosedyre.....	45
Trinn 1: Blodinkubasjon	45
Trinn 2: IFN- γ ELISA	45
Endringshistorikk for håndbok	48

Bruksområde

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) er en in vitro-analyse som benytter en peptidblanding som simulerer humant cytomegalovirus-proteiner (CMV-proteiner) for å stimulere celler i heparinisert fullblod. Påvisning av interferon-gamma (IFN- γ) ved hjelp av enzymbundet immunsorbensanalyse (ELISA) brukes til å kvantifisere in vitro-responser på peptidantigenene assosiert med immunkontroll av CMV-infeksjon. Tap av denne immunfunksjonen kan være forbundet med utvikling av CMV-sykdom. Den tiltenkte bruken av QF-CMV er overvåking av en pasients anti-CMV-immunitetsnivå.

QF-CMV er ikke en test for bestemmelse av CMV-infeksjon og skal ikke benyttes til å utelukke CMV-infeksjon.

Oppsummering og forklaring

CMV er et herpesvirus som smitter mellom 50–85 % av den voksne populasjonen. Det er en hyppig forekommende komplikasjon av immunsuppresjon, spesielt etter transplantasjon, og kan i betydelig grad bidra til morbiditet og dødelighet hos transplantatresipienter. Aktuelle immunsuppressive behandlinger som brukes til å forebygge avstøting av et transplantert organ, har skadelige effekter på T-lymfocytene og cellemedierte immunresponser (CMI-responser), noe som resulterer i økt mottakelighet for virusinfeksjoner etter transplantasjonen. Betydningen av T-cellefunksjonen ved undertrykkelse av CMV-replikasjon er også fremtredende ved at CD8⁺ CMV-spesifikke cytotoksiske T-lymfocytter (CTL-er) kan beskytte mot virusassosiert patogenese. Opptelling av CD8⁺ CMV-spesifikke CTL-er hos immunsupprimerte pasienter og produksjon av IFN- γ kan være prediktivt for risikoen for å utvikle CMV-sykdom. IFN- γ -produksjon kan være et funksjonelt surrogat for identifisering av CMV-spesifikke CTL-er.

QF-CMV er en analyse for CMI-responser på peptidantigener som simulerer CMV-proteiner. CMV-peptidene er utformet for å målrette CD8⁺ T-celler, inkludert HLA-klasse I-haplotypene: A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 og Cw6 (A30, B13), som dekker >98 % av befolkningen. Personer smittet med CMV har vanligvis CD8⁺-lymfocytter i blodet som gjenkjenner disse antigenene. Denne gjenkjennelesprosessen omfatter generering og sekresjon av cytokinet IFN- γ . Påvisning og etterfølgende kvantifisering av IFN- γ danner grunnlaget for denne testen.

Prinsippene for prosedyren

QF-CMV-testen utføres i to trinn. Først samles fullblod inn i hvert QF-CMV-blodprøvetakingsrør, som inkluderer et Nil-kontrollrør, et CMV-antigenrør og et mitogenrør.

Mitogenrøret brukes i QF-CMV-testen som en positiv kontroll. Dette kan være spesielt berettiget i tilfeller der det er tvil om pasientens immunstatus. Mitogen-røret kan også brukes som en kontroll for riktig blodhåndtering og -inkubasjon.

Rørene må inkuberes ved 37 °C så snart som mulig, innen 16 timer etter innsamling. Etter en 16–24-timers inkubasjonsperiode sentrifugeres rørene, plasmaet fjernes, og mengden av IFN- γ (IE/ml) måles ved hjelp av QF-CMV ELISA-metoden.

Mengden IFN- γ i plasmaprøver fra CMV-antigenrør og mitogenrør kan ofte være over de øvre grensene for de fleste ELISA-avlesningsenhetene, selv når personene er moderat immunsupprimert. For kvalitative resultater bruker du verdiene som beregnes for ufortynnet plasma. For kvantitative resultater der faktiske IE/ml-verdier er nødvendig, må plasma fortynnes 1/10 i den grønne fortynningsløsningen og analyseres i ELISA sammen med ufortynnet plasma.

Merk: For prøver som er innenfor området til QF-CMV ELISA (dvs. opptil 10 IE/ml), må man bruke resultatet som oppnås med den ufortynnede plasmaprøven. For slike IFN- γ -konsentrasjoner kan verdiene som innhentes ved bruk av 1/10-fortynning av plasmaprøvene, være unøyaktige.

En test betraktes som reaktiv for en IFN- γ -respons når CMV-antigenrøravlesningen ligger betydelig over Nil IFN- γ IE/ml-verdien. Den mitogenstimulerte plasmaprøven tjener som en positiv IFN- γ -kontroll for hver prøve som testes. En lav respons på mitogen indikerer et ubestemt resultat når en blodprøve også har en ikke-reaktiv respons på CMV-antigener. Dette mønsteret kan oppstå ved utilstrekkelig mengde lymfocytter, redusert lymfocytaktivitet på grunn av feil prøvehåndtering, feil påfylling/blanding av mitogenrør eller når pasientens lymfocytter mangler evnen til å produsere IFN- γ – slik som hos pasienter som nylig har fått transplantater. Nil-prøven benyttes til justering av bakgrunn eller ikke-spesifikk IFN- γ i blodprøver. IFN- γ -nivået i Nil-røret trekkes fra IFN- γ -nivået for CMV-antigenrøret og mitogenrøret (se «Tolkning av resultater» på side 24 i dette pakningsvedlegget for en oversikt over hvordan QF-CMV-resultatene tolkes).

Tid som kreves for å utføre analysen

Tiden som er nødvendig for å utføre QF-CMV-analysen, er anslått nedenfor. Tiden som er nødvendig for testing av flere prøver når de er i batcher, angis også:

37 °C-inkubasjon av blodrør:	16–24 timer
ELISA:	Cirka 3 timer for én ELISA-plate
	Mindre enn 1 times arbeid
	Legg til 10–15 minutter for hver ekstra plate

Materialer som medfølger

Settets innhold

Blodprøvetakingsrør (enkelt pasientpakke)	
Katalognr.	0192-0301
Antall klargjøringer	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON Nil-kontroll (grå hette))	1 rør
QuantiFERON CMV Antigen (QuantiFERON CMV-antigen (blå hette))	1 rør
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogenkontroll (lilla hette))	1 rør
Pakningsvedlegg for QF-CMV blodprøverør	1

QuantiFERON-CMV ELISA		Sett med 2 ELISA-plater
Katalognr.		0350-0201
Mikroplateremser (12 x 8 brønner) belagt med murint anti-human IFN- γ -monoklonalt antistoff	2 sett mikroplateremser med 12 x 8 brønner	
Humant IFN- γ Standard, lyofilisert (inneholder rekombinant humant IFN- γ , bovint kasein, 0,01 % vekt/volum timerosal)	1 x flaske	(8 IE/ml etter rekonstituering)
Green Diluent (grønn fortynningsløsning) (inneholder bovint kasein, normalt murint serum, 0,01 % vekt/volum timerosal)	1 x 30 ml	
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Konjugatkonsentrat 100x, lyofilisert; murin anti-human IFN- γ -HRP, inneholder 0,01 % vekt/volum timerosal)	1 x 0,3 ml	
Wash Buffer 20x Concentrate (20x vaskebufferkonsentrat) (pH 7,2, inneholder 0,05 % volum/volum ProClin® 300)	1 x 100 ml	
Enzymsubstratløsning (inneholder H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)	1 x 30 ml	
Enzyme Stopping Solution (enzymstoppløsning) (inneholder 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml	
Pakningsvedlegg for QF-CMV ELISA	1	

* Inneholder svovelsyre. Se side 9 for forholdsregler.

Materialer som er nødvendige, men ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller under arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

- 37 °C-inkubator; CO₂ ikke nødvendig
- Kalibrerte pipetter med variabelt volum for tilsetning av 10–1000 µl med engangsspisser
- Kalibrert pipette med flere kanaler som kan tilsette 50 µl og 100 µl med engangsspisser
- Mikroplaterister
- Deionisert eller destillert vann, 2 liter
- Oppvaskmaskin for mikroplater (automatisert oppvaskmaskin anbefales)
- Mikroplateleser med 450 nm-filter og 620 nm- til 650 nm-referansefilter
- Platelokk

Advarsler og forsiktighetsregler

Til in vitro-diagnostikk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller under arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS, «Safety Data Sheet») hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i et praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety. Her kan du se, vise og skrive ut SDS for hvert QIAGEN®-sett og hver settkomponent.

FORSIKTIG



Håndter humant blod som potensielt smittefarlig. Følg relevante retningslinjer for blodhåndtering.

Følgende fare- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Inneholder: svovelsyre. Advarsel! Kan være etsende for metaller. Irriterer huden. Forårsaker alvorlig øyeirritasjon. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

QuantiFERON Green Diluent



Inneholder: trinatrium-5-hydrokxy-1-(4-sulfofenyl)-4-(4-sulfofenylazo)-pyrazol-3-karboksylat. Inneholder: tartrazin. Advarsel! Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Inneholder: ProClin 300. Skadelig, med langtidsvirkning, for vannlevende organismer. Unngå utslipp til miljøet.

Sikkerhetsinformasjon

Mer informasjon

- Avvik fra pakningsvedlegget for QF-CMV kan gi feilaktige resultater. Det er viktig at du leser anvisningene nøye før bruk.
- Ikke bruk settet hvis noen av reagensflaskene viser tegn til skade eller lekkasje før bruk.
- Viktig: Inspiser flasker før bruk. Flasker med konjugat eller IFN- γ standardflasker skal ikke brukes dersom flaskene har tegn til skader eller gummiforseglingen er åpnet. Knuste flasker skal ikke håndteres. Kast flaskene i tråd med egnede sikkerhetsforholdsregler. Anbefaling: Bruk en «flaskedekrimper» til å åpne konjugat- eller IFN- γ Standard-flaskene for å begrense risiko for skade fra metallkrympelokket.
- Mikroplateremser, human IFN- γ -standard, grønn fortynner og konjugatkonsentrat 100 $\times$ fra ulike QF-CMV-sett må ikke blandes og brukes. Andre reagenser (vaskebufferkonsentrat 20 $\times$, enzymsubstratløsning og enzymstoppløsning) kan byttes mellom sett, forutsatt at partiinformasjon er registrert og reagensene ikke er utløpt på dato.
- Kast ubrukte reagenser og biologiske prøver i samsvar med lokale og statlige forskrifter.
- Ikke bruk QF-CMV blodprøvetakingsrør eller QF-CMV ELISA-sett etter utløpsdatoen.
- Se til at laboratorieutstyr som platevaskere og -lesere er kalibrert/godkjent for bruk.

Håndtering og oppbevaring av reagenser

Blodprøvetakingsrør

- Oppbevar QF-CMV blodprøvetakingsrør ved 4–25 °C.
- QF-CMV blodprøvetakingsrør bør holde en temperatur på 17–25 °C under fyllingen.
- Oppbevaringstiden til QF-CMV blodprøvetakingsrør er maksimalt 15 måneder fra produksjonsdato, ved oppbevaring ved 4–25 °C.

ELISA-settreagenser

- Oppbevar settet ved 2–8 °C.
- Enzymsubstratløsning må alltid beskyttes mot direkte sollys.

Rekonstituerte og ubrukte reagenser

Du finner instruksjoner om hvordan du kan rekonstituere reagensene, se «Trinn 2: QuantiFERON-CMV ELISA for humant IFN- γ » (trinn 3 og 5 på sidene) 17 og 19).

- Rekonstituert humane IFN- γ Standard kan oppbevares i opptil 3 måneder ved oppbevaring ved 2–8 °C. Merk datoen for bruk av human IFN- γ Standarden ble rekonstituert.
- Etter rekonstituering må konjugatkonsentratet 100x returneres til oppbevaring ved 2–8 °C og må brukes innen 3 måneder.
Skriv ned datoen for rekonstituering av konjugatet.
- Konjugat med arbeidsstyrke må brukes innen 6 timer etter klargjøring.
- Vaskebuffer med arbeidsstyrke kan oppbevares ved romtemperatur (22 ± 5 °C) i opptil 2 uker.

Prøvetaking og -klargjøring

QF-CMV benytter følgende blodprøvetakingsrør:

- Nil-kontroll (grå hette)
- CMV-antigen (blå hette)
- Mitogenkontroll (lilla hette)

Antigener er tørket på innsiden av blodprøvetakingsrørene, så det er viktig at innholdet i rørene blandes godt med blodet. Rørene må overføres til en inkubator som holder 37 °C så snart som mulig og innen 16 timer etter prøvetaking.

Følgende prosedyrer må følges for optimale resultater:

1. Fyll 1 ml blod via venepunksjon direkte inn i et QF-CMV blodprøvetakingsrør. Denne prosedyren må utføres av en fagperson som har fått opplæring i blodprøvetaking.

QF-CMV blodprøvetakingsrør kan brukes i en høyde på opptil 810 moh.

Hvis QF-CMV blodprøvetakingsrør brukes over 810 meter over havet, eller ved mindre prøvevolum, kan en sprøyte benyttes til blodprøvetaking, og 1 ml overføres deretter umiddelbart til hvert av de tre rørene. Av sikkerhetsmessige grunner er det best å utføre dette ved å fjerne sprøytenålen mens du sørger for å overholde hensiktsmessige sikkerhetsprosedyrer, fjerne hettene fra de tre QF-CMV blodprøvetakingsrørene og tilsette 1 ml blod i hvert av disse (til det svarte merket på siden av røretiketten). Sett rørhettene godt på igjen, og bland som beskrevet nedenfor. Da 1 ml rør trekker blod forholdsvis langsomt, holder du røret på nålen i 2–3 sekunder når røret virker å ha fullført fylling, for å sikre at korrekt volum trekkes.

Det svarte merket på siden av rørene angir 1 ml fyllvolum. QF-CMV blodprøvetakingsrør er godkjent til volumer fra 0,8 til 1,2 ml. Hvis blodnivået i et rør ikke er nær det angitte området, skal det tas en ny blodprøve.

Hvis en butterflynål brukes til å ta blodprøver, må et «tømmingsrør» brukes for å sikre at slangen fylles med blod før bruk av QF-CMV blodprøvetakingsrør.

Alternativt kan blodprøver tas i et enkelt generelt blodprøverør med litiumheparin som antikoagulant, og deretter overføres til QFT-Plus blodprøvetakingsrør. Bare litiumheparin skal brukes som blodantikoagulant, siden andre antikoagulanter vil påvirke analysen. Fyll et blodprøverør (minstevolum på 5 ml), og bland forsiktig ved å snu røret opp og ned flere ganger for å løse opp heparinen. Denne prosedyren må utføres av en fagperson som har fått opplæring i blodprøvetaking. Blodet bør holde romtemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) før det overføres til et QFT-Plus blodprøvetakingsrør for inkubering, noe som må startes opp innen 16 timer etter blodprøven er tatt.

2. Umiddelbart etter at QF-CMV blodprøvetakingsrørene er fylt, skal de ristes 10 ganger, såpass kraftig at hele innsiden av røret dekkes av blod, for å løse opp antigenmateriale på veggene i røret.

Rørene skal holde $17\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ når de fylles med blod.

For kraftig risting kan føre til gelforstyrrelse og feil resultater.

Hvis blodet er tatt i et litiumheparinrør, må prøvene blandes godt før dispensering i QF-CMV blodprøvetakingsrørene. Se til at blod er grundig blandet med lett vending av rørene umiddelbart før dispensering. Dispenser 1 ml alikvoter (én per QF-CMV blodprøverør) i et passende Nil-, CMV-antigen- og mitogenrør. Dette bør gjøres med aseptisk teknikk i tråd med egnede sikkerhetsprosedyrer. Ta av hettene på de tre QF-CMV blodprøvetakingsrørene, og tilsett 1 ml blod i hvert rør (til det svarte merket på siden av etiketten). Sett hettene godt på rørene igjen, og bland slik det er beskrevet over.

3. Merk rørene riktig.

Kontroller at alle rørene (Nil, CMV-antigen, Mitogen) har identifiserbar etikett eller kan identifiseres på annen måte.

-
4. Etter påfylling, risting og merking, må rørene overføres til en inkubator som holder $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ så snart som mulig, og innen 16 timer etter prøvetaking. Før inkubasjon må rørene holde romtemperatur ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Blodprøvene må ikke settes i kjøleskap eller fryses.

Prosedyre

Trinn 1: Inkubasjon av blod og innhenting av plasma

1. Inkuber rørene STÅENDE ved $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 16–24 timer. Inkubatoren krever ikke CO_2 eller fukting.

Viktig: Hvis blodet ikke inkuberes umiddelbart etter prøvetaking, må rørene blandes igjen ved å vendes opp og ned 10 ganger før inkubering.

Etter inkubering kan blodprøverørene oppbevares ved $4\text{--}27\text{ °C}$ i opptil 3 dager før sentrifugering.

2. Etter at rørene er inkubert ved 37 °C , kan plasma innhentes ved å sentrifugere rørene i 15 minutter ved 2000–3000 RCF (g). Gelpluggen vil skille cellene fra plasma. Hvis dette ikke skjer, bør rørene sentrifugeres på nytt.

Det er mulig å høste plasma uten sentrifugering, men man må være ekstra forsiktig slik at man fjerner plasmaet uten å forstyrre cellene.

3. Etter sentrifugering må du unngå å pipettere opp og ned eller blande plasma på noen måte før høsting. Du må til enhver tid passe på ikke å forstyrre materialet på geloverflaten.

Viktig: Plasmaprøver må bare samles inn ved hjelp av en pipette.

Plasmaprøver kan overføres direkte fra sentrifugerte blodprøvetakingsrør og inn i QF-CMV ELISA-platen, også ved bruk av automatiserte ELISA-arbeidsstasjoner.

Plasmaprøver kan oppbevares i sentrifugerte QF-CMV-blodprøvetakingsrør i 28 dager ved $2\text{--}8\text{ °C}$ eller, ved innsamling, under -20 °C (helst under -70 °C) i lengre perioder.

Minst 150 µl plasma bør innhentes for å ha nok til en prøve.

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

Se «Settets innhold», side 8 og «Materialer som er nødvendige, men ikke følger med», side 9, for materialer som kreves for å utføre ELISA.

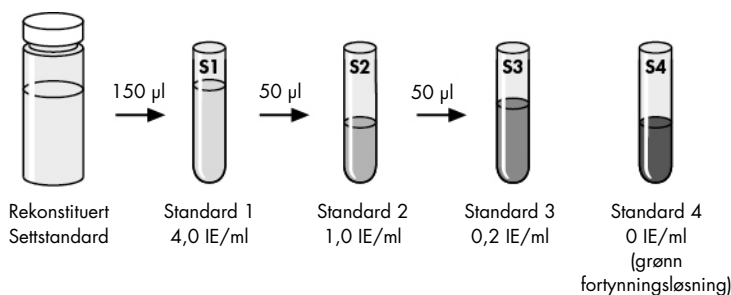
1. Alle plasmaprøver og reagenser, unntatt konjugat 100x-konsentrat, må oppnå romtemperatur (22 ± 5 °C) før bruk. Beregn minst 60 minutter for at komponentene skal nå romtemperatur.
2. ELISA-plateremser som ikke er nødvendige, skal fjernes fra rammen, forsegles i folieposen og settes tilbake i kjøleskapet for oppbevaring frem til det er behov for dem.
Sett av minst én remse til QF-CMV ELISA-standarder og tilstrekkelig med remser for det antallet pasienter som testes. Etter bruk beholder du rammen og lokket for bruk med gjenværende remser.
3. Rekonstituer human IFN- γ Standard med volumet med deionisert eller destillert vann angitt på etiketten til flasken. Bland forsiktig for å redusere skumming og sikre fullstendig resolubilisering. Rekonstituering av IFN- γ Standard til riktig volum vil gi en løsning med en konsentrasjon på 8,0 IE/ml.

Merk: Det rekonstituerte volumet av human IFN- γ Standard (standardsettet) vil variere fra parti til parti.

Bruk den rekonstituerte standarden, og klargjør en fortynningsserie på fire konsentrasjoner av IFN- γ i den grønne fortynningsløsningen (GD) (Figur 1, neste side). S1 (Standard 1) inneholder 4,0 IE/ml, S2 (Standard 2) inneholder 1,0 IE/ml, S3 (Standard 3) inneholder 0,25 IEU/ml og S4 (Standard 4) inneholder 0 IE/ml (kun GD). Standardene bør analyseres minst to ganger. Klargjør ferske fortynninger av settstandarden for hver ELISA-økt.

Eksempel på prosedyre for doble standarder

Eksempel på prosedyre for doble standarder	
A	Etikett fire rør: S1, S2, S3, S4
B	Tilsett 150 µl GD i S1, S2, S3, S4
C	Tilsett 150 µl av settstandarden i S1, og bland godt
D	Overfør 50 µl fra S1 til S2, og bland godt
E	Overfør 50 µl fra S2 til S3, og bland godt
F	GD alene fungerer som null-standard (S4)



Figur 1. Klargjøring av standardkurve ved seriefortynning.

4. Rekonstruer lyofilisert konjugat 100x-konsentrat med 0,3 ml deionisert eller destillert vann. Bland forsiktig for å hindre skumming, og sørg for at det løser seg fullstendig opp. Konjugat med arbeidsstyrke klargjøres ved å fortynne den nødvendige mengden av 100x-konsentrat av rekonstituert konjugat i den grønne fortynningsløsningen (se Tabell 1, neste side).

Bland grundig, men forsiktig for å unngå skumming.

Ubrukt 100x-konjugatkonsentrat skal umiddelbart etter bruk settes tilbake i en temperatur på 2–8 °C.

Bruk kun grønn fortynningsløsning.

Tabell 1. Klargjøring av konjugat med arbeidsstyrke

Antall remser	Volum 100x-konjugatkonsentrat	Volum grønn fortynningsløsning
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. Plasmaprøver som er innhentet fra blodprøverør og deretter fryses eller oppbevares i mer enn 24 timer før analyse, må blandes godt før tilsetning i ELISA-brønner.

Viktig: Hvis plasmaprøver skal tilsettes direkte fra de sentrifugerte QF-CMV blodprøvetakingsrørene, må enhver form for blanding av plasma unngås. Du må alltid passe på å ikke å forstyrre materialet på geloverflaten.

6. Hvis det er nødvendig med kvantitative resultater, fortynnes også CMV og mitogenplasma 1/10 i den grønne fortynningsløsningen (10 µl plasma + 90 µl GD). Nil-plasma skal ikke fortynnes.

Det anbefales at følgende prøver testes parallelt:

Nil, CMV-antigen, mitogen, CMV-antigen (1/10), mitogen (1/10)

Følgende pasientprøvealternativer støttes imidlertid også av analyseprogrammet QuantiFERON-CMV:

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. Tilsett 50 µl fersk konjugat med arbeidsstyrke til de aktuelle ELISA-brønnene ved hjelp av en pipette for flere kanaler.
8. Tilsett 50 µl testplasmaprøver til riktige brønner. Tilsett til slutt 50 µl hver til standard 1–4 i de aktuelle brønnene. Standardene skal analyseres minst to ganger.
9. Dekk hver ELISA-plate, og bland konjugat og plasmaprøver/standarder grundig ved hjelp av en mikroplaterister i 1 minutt ved 500 til 1000 o/min. Unngå sprut.
10. Dekk til ELISA-platen, og inkuber ved romtemperatur (22 ± 5 °C) i 120 ± 5 minutter.

Platene må ikke utsettes for direkte sollys under inkubasjon. Avvik fra det angitte temperaturområdet kan føre til feilaktige resultater.

11. Klargjør vaskebuffer med arbeidsstyrke under inkubasjonen. Én del 20x vaskebufferkonsentrat skal fortynnes med 19 deler deionisert eller destillert vann og blandes grundig.

Tilstrekkelig mengde 20x vaskebufferkonsentrat følger med for klargjøring av 2 liter vaskebuffer med arbeidsstyrke.

12. Når en ELISA plateinkubasjon er fullført, skal du vaske brønner med 400 µl vaskebuffer med arbeidsstyrke i minst seks sykluser. En automatisert oppvaskmaskin for plater anbefales.

Viktig: Grundig vask er svært viktig for analyseytelsen. Se til at hver brønn er helt fylt med vaskebuffer øverst i brønnen for hver vaskesyklus. En bløtleggingsperiode på minst 5 sekunder mellom hver syklus anbefales.

Standard laboratoriedesinfeksjonsmiddel må tilsettes avløpsvannreservoaret, og etablerte prosedyrer for dekontaminering av potensielt smittefarlig materiale må følges.

13. Vend platene med oversiden ned på et absorberende, lofritt håndkle for å fjerne overflødig vaskebuffer. Tilsett 100 µl enzymsubstratløsning i hver brønn, og dekk hver plate med lokk. Bland grundig ved hjelp av en mikroplaterister i 1 minutt ved 500 til 1000 o/min ved hjelp av en mikroplaterister.

-
14. Dekk til hver plate, og inkuber ved romtemperatur (22 ± 5 °C) i 30 minutter. Platene må ikke utsettes for direkte sollys under inkubasjon.
 15. Etter 30 minutters inkubasjon skal du tilsette 50 µl enzymstoppløsning i hver brønn i samme rekkefølge som substratet ble lagt til, og blande grundig ved 500 til 1000 o/min ved hjelp av en mikrolaterister.
 16. Mål den optiske tettheten (OD) for hver brønn innen 5 minutter etter at reaksjonen er stoppet ved å bruke en mikrolateleser montert med et 450 nm-filter og et 620 nm- til 650 nm-referansefilter. OD-verdier brukes til å beregne resultatene.

Beregninger og tolkning av tester

Analyseprogrammet QuantiFERON-CMV for analyse av rådata og beregning av resultater er tilgjengelig fra QIAGEN på www.QuantiFERON.com. Pass på at den nyeste versjonen av analyseprogrammet QF-CMV benyttes.

Programvaren utfører en kvalitetskontrollvurdering av analysen, genererer en standardkurve og avgir et testresultat for hver person, slik det er gitt nærmere informasjon om i avsnittet «Tolkning av resultater» på side 24. Programvaren rapporterer den laveste fortynningen som genererer et resultat innenfor QF-CMV ELISA-området, iberegnet fortynningsfaktoren.

Som et alternativ til å bruke analyseprogrammet QF-CMV, kan resultater bestemmes i henhold til følgende metode.

Generering av standardkurve (hvis analyseprogrammet QF-CMV ikke brukes)

Bestem gjennomsnittlige OD-verdier for settstandardreplikatene på hver plate.

Lag en standard $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -kurve ved å plote $\log_{(e)}$ for gjennomsnittlig OD (y-akse) mot $\log_{(e)}$ for IFN- γ -konsentrasjonen til standardene i IE/ml (x-akse). Nullstandarden tas ikke med i disse beregningene. Beregn den beste tilpasningslinjen for standardkurven ved hjelp av regresjonsanalyse.

Bruk standardkurven for å bestemme IFN- γ -konsentrasjonen (IE/ml) til hver av testplasma prøvene ved å bruke OD-verdien for hver prøve.

Disse beregningene kan utføres ved hjelp av programvarepakker som er tilgjengelige med mikroplateleserne, samt standard regneark eller statistisk programvare (f.eks. Microsoft® Excel®). Det anbefales at disse pakkene brukes til å beregne regresjonsanalysen, variasjonskoeffisienten (Coefficient of Variation, %CV) for standardene og korrelasjonskoeffisienten (r) til standardkurven.

Det rapporterte resultatet skal hentes fra den laveste fortynningen som genererer et resultat innenfor QF-CMV ELISA-området, iberegnet fortynningsfaktoren hvis det er relevant.

Kvalitetskontroll av testen

Nøyaktigheten til testresultatene er avhengig av at standardkurven som genereres, er nøyaktig. Derfor må resultatene som utledes fra standardene, undersøkes før testprøveresultatene kan tolkes.

For at ELISA skal være gyldig må:

- Gjennomsnittlig OD-verdi for standard 1 må være $\geq 0,600$.
- %CV for standard 1 og standard 2s replikat OD-verdier må være $< 15\%$.
- Replikat-OD-verdier for standard 3 og 4 må ikke avvike fra gjennomsnittet med mer enn 0,040 enheter for optisk tetthet.
- Korrelasjonskoeffisienten (r) beregnet fra gjennomsnittlige absorbansverdier for standardene må være $\geq 0,98$.

Analyseprogrammet QF-CMV beregner og rapporterer disse kvalitetskontrollparameterne. Hvis de ovennevnte kriteriene ikke oppfylles, er kjøringen ugyldig og må gjentas.

Gjennomsnittlig OD-verdi for nullstandarden (grønn fortynningsløsning) skal være $\leq 0,150$. Hvis gjennomsnittlig OD-verdi er $> 0,150$, bør vaskeprosedyren av plater undersøkes nærmere.

Tolkning av resultater

QuantifERON-CMV-resultatene tolkes i henhold til kriteriene i Tabell 2.

Tabell 2. Tolkning av QuantifERON-CMV-resultater

Nil (IE/ml)	CMV minus Nil (IE/ml)	Mitogen minus Nil (IE/ml)*	QF-CMV-resultat	Rapport/tolkning
≤ 8,0	≥0,20 og ≥25 % av Nil	Hvilket som helst resultat	Reaktiv [†]	Anti-CMV-immunitet påvist
	<0,20 ELLER ≥0,20 og <25 % av Nil	≥ 0,5	Ikke-reaktiv	Anti-CMV-immunitet IKKE påvist
		<0,5	Ubestemt [‡]	Resultatene er ubestemmelige for CMV-reaksjonsevne
> 8,0 [§]	Hvilket som helst resultat	Hvilket som helst resultat	Ubestemt [‡]	Resultatene er ubestemmelige for CMV-reaksjonsevne

* Reaksjoner på mitogenpositiv kontroll (og innimellom CMV-antigener) kan være vanlig utenfor området til mikroplateleseren. Dette har ingen påvirkning på testresultatene.

[†] Hvis det ikke er mistanke om cytomegalovirusinfeksjon, kan initielt reaktive resultater bekreftes ved å teste de originale plasmaprøvene på nytt to ganger i QF-CMV ELISA. Hvis gjentatt testing av en eller begge replikatene gir et positivt resultat, bør testen betraktes som reaktiv.

[‡] Se «Feilsøkningsveiledning» (side 39) for mulige årsaker.

I kliniske studier (1) er et ubestemt resultat blant pasienter med et solid organtransplantat, der en donor er reaktiv for CMV, men mitogenkontrollen var under 0,5 IE/ml, vurdert som klinisk relevant. Slike pasienter har høyest risiko for å utvikle CMV.

[§] I kliniske studier hadde mindre enn 0,25 % av deltakerne IFN-γ-nivåer på >8,0 IU/ml for Nil-verdien.

Merk: Det målte IFN-γ-nivået skal brukes sammen med den kliniske presentasjonen, medisinsk historikk og andre diagnostiske evalueringer ved etablering av immunresponsen på CMV-antigener. QF-CMV er ikke en test for bestemmelse av CMV-infeksjon og skal ikke benyttes til å utelukke CMV-infeksjon.

Begrensninger

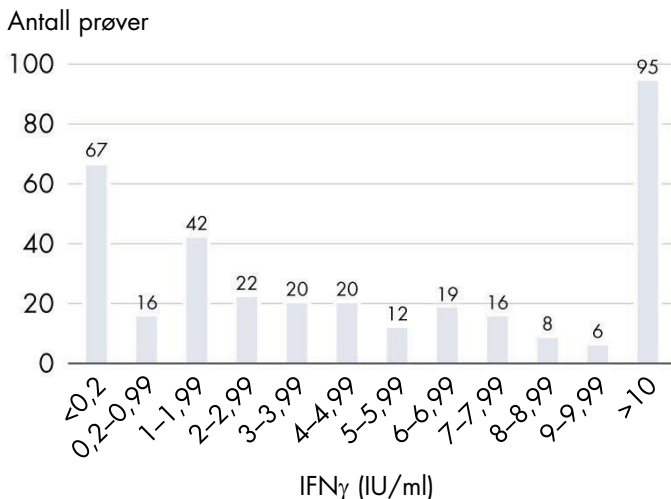
QuantiFERON-CMV-testresultatene må brukes i forbindelse med hver pasients epidemiologiske historie, nåværende medisinske status og andre diagnostiske evalueringer.

Upålitelige eller ubestemte resultater kan oppstå på grunn av:

- Avvik fra prosedyren beskrevet i pakningsvedlegg for QuantiFERON-CMV ELISA
- For høye nivåer av IFN- γ i kontrollrøret
- Mer enn 16 timer fra blodprøvetaking til inkubering ved 37 °C.

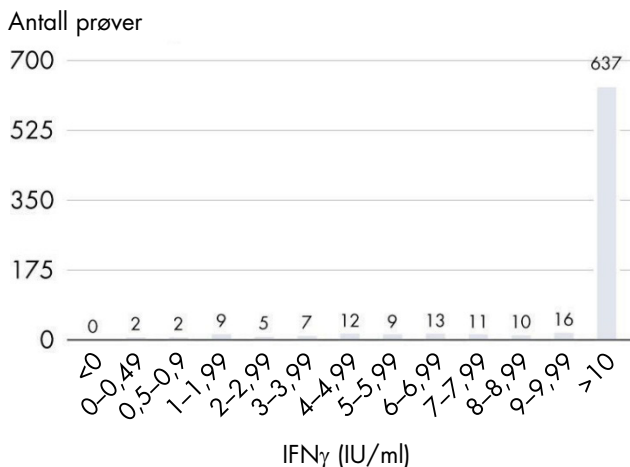
Forventede verdier

Forventede IFN- γ -verdier som bruker QuantiFERON-CMV, ble oppnådd fra testing av 591 prøver fra friske personer. 343 prøver testet seropositive, og 248 prøver testet seronegative for CMV IgG. CMV-serologistatus var ukjent på tidspunktet for QF-CMV-testing. I de 248 prøvene fra CMV-seronegative personer var 100 % (248/248) av de testede prøvene ikke-reaktive for QF-CMV ELISA, noe som ga IFN- γ -responser på <0,2 IE/ml på CMV-antigenrøret (Nil subtrahert). Distribusjonen av IFN- γ -responser på CMV-antigenrøret (Nil subtrahert) for de 343 CMV-seropositive forsøkspersonene vises (Figur 2).



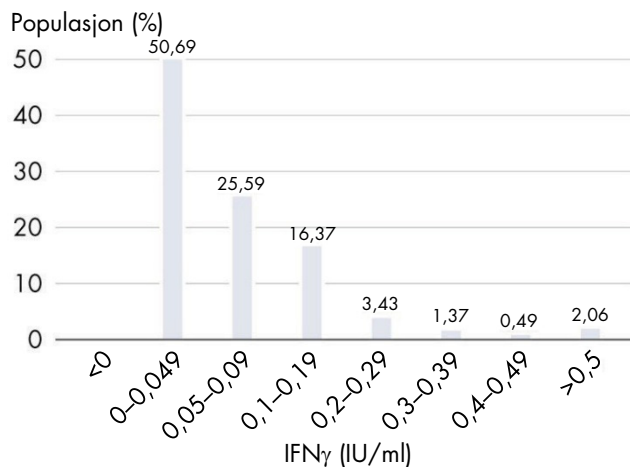
Figur 2. Distribusjon av QF-CMV IFN γ -responser (Nil subtrahert) hos seropositive friske personer (n = 343).

Distribusjonen av IFN- γ -responser på Mitogen (Nil subtrahert) ble bestemt ved bruk av 733 prøver fra friske voksne personer ved bruk av QF-CMV ELISA, uavhengig av CMV IgG-serologi (Figur 3). Et Mitogen-resultat (Nil subtrahert) på mindre enn 0,5 IE/ml indikerer enten at testen ble mislykket, eller at personen er i en immunkompromittert tilstand. I en frisk populasjon kom bare 2 av 733 resultater i denne kategorien.



Figur 3. Distribusjon for Mitogen-IFN- γ -respons (Nil subtrahert) hos friske personer (n = 733).

Distribusjonen av IFN- γ -respons på Nil-rør ble bestemt ved hjelp av 1020 plasmaprøver fra friske personer ved bruk av QF-CMV ELISA, uavhengig av CMV IgG-serologi (Figur 4).



Figur 4. Distribusjon av Nil IFN- γ -respons hos friske personer (n = 1020) uttrykt som en prosentandel av populasjonen.

Ytelsesegenskaper

Klinisk ytelse

En testterskelverdi for påvisning før CMV-eksponering ved bruk av QF-CMV ble etablert ved å følge analysen av resultatene fra en gruppe friske personer (n = 223) hvor QF-CMV-resultatene ble sammenlignet med serologiske CMV IgG-resultater. En ROC-analyse fant at en testterskel på 0,04 IE/ml (etter Nil-subtraksjon) ga optimale positive og negative prediktive verdier for QF-CMV (område under kurven = 0,9679 [95 % CI: 0,9442–0,9915, p<0,0001]), og representerte således terskelen som denne analysen utførte sitt tiltenkte formål mest effektivt på, i en frisk populasjon.

QF-CMV-analysens ytelse ble sammenlignet med SeraQuest™ CMV IgG-serologitesten (Quest International). QF-CMV-analysen viste 95 % (294/310 personer) samsvar med CMV IgG-serologitesten hos friske personer, der ingen av de 149 seronegative donorene utviste reaktivitet ved QF-CMV. 145 av 161 seropositive donorer viste en QF-CMV-reaktiv respons. Det generelle positive samsvaret var på 90 % med en negativ samsvarsverdi på 100 %. Graden av samsvar hos friske forsøkspersoner mellom QF-CMV-responser og CMV IgG-serologistatusen vises i Tabell 3.

Tabell 3. Samsvar mellom QuantiFERON-CMV og CMV IgG-serologitesten hos friske personer

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

Analyseterskelverdi

Anbefalt klinisk testterskelverdi for denne analysen er 0,2 IE/ml i CMV-antigenrøret (Nil subtrahert), men ulike terskelverdier kan være validert for ulike kliniske settinger.

Kliniske studier

Ettersom det ikke finnes noen definitiv standard for bekreftelse eller eksklusjon av diagnosen cytomegalovirusinfeksjon, kan et estimat på sensitivitet og spesifisitet for QF-CMV ikke evalueres praktisk. Spesifisiteten og sensitiviteten til QF-CMV ble anslått ved å evaluere graden av samsvar mellom QF-CMV-responser og CMV IgG-serologistatus hos friske personer.

Spesifisiteten til QF-CMV ble anslått ved å evaluere frekvensen av falskt positive resultater (QF-CMV-reaktiv respons) hos friske donorprøver uten tegn til tidligere CMV-eksponering (CMV IgG-seronegative personer). Sensitivitet ble anslått ved å evaluere QF-CMV-respons i friske donorprøver med tegn til tidligere CMV-eksponering (CMV IgG-seropositive personer). QF-CMV benytter et stort antall CMV-spesifikke epitoper fra forskjellige CMV-proteiner og har dermed bred dekning av populasjonen med ulike HLA klasse I-haplotyper (ca. 98 % av populasjonen). Da HLA-haplotypene til personene som ble testet mot CMV-serologi var ukjent, ble en liten prosentandel av serologipositive personer forventet å være ikke-responsive til QF-CMV-blodprøvetakingsrørene.

Spesifisitet

I en studie av 591 prøver fra friske personer ble det påvist ingen falskt positive QF-CMV-resultater hos personer som testet seronegativt for CMV IgG, der 248/248 prøver testet ikke-reaktivt for QF-CMV ELISA og negativt for CMV IgG-serologitesten. Resultatene oppnådd med QF-CMV og CMV IgG-serologitesten viste derfor 100 % samsvar.

I alle andre spesifisitetsevalueringer utført for resipienter av et solid organtransplantat (1–8), resipienter av hematopoietiske stamcelletransplantater (9,10) og HIV-smittede pasienter (11) har graden av samsvar mellom QF-CMV- og CMV IgG-serologi også blitt vist å være 100 %.

Sensitivitet

I en studie utført på 343 prøver fra friske personer som testet seropositivt for CMV IgG, var graden av samsvar mellom QF-CMV-responser og CMV IgG-serologieresultater 80,5 %, der 276/343 prøver testet reaktivt for QF-CMV og positivt for CMV IgG-serologitesten. Det observerte avviket kan skyldes falsk positiv CMV-serologi, eller fravær av responsive HLA-typer hos de testede individene.

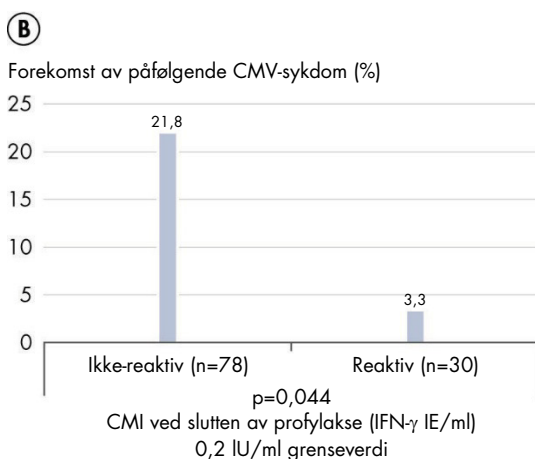
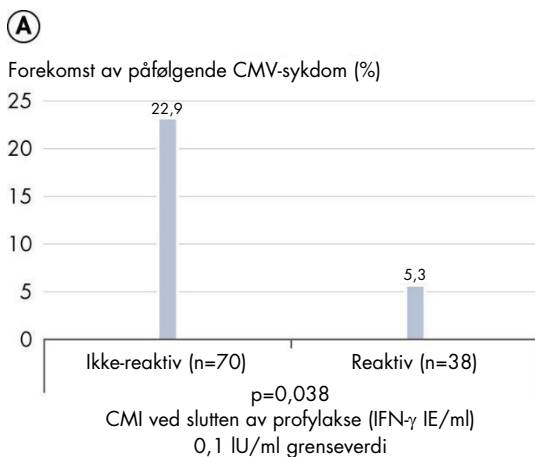
Graden av samsvar ved sensitivitetsevalueringer utført for resipienter av solid organtransplantat (1–8), resipienter av hematopoietiske stamcelletransplantater (9, 10) og HIV-smittede pasienter (11) ble vist å være noe lavere og kan skyldes falskt positiv CMV-serologi, fravær av responsive HLA-typer hos de testede personene eller fravær av reaktive T-celler hos disse pasientene på grunn av deres immunsuppresjon.

Studier som fremhever klinisk nytteverdi

Både CMV IgG-serologi og QF-CMV beskriver den tiltenkte bruken som påvisning av immunitet mot CMV. Innenfor transplantasjonssettinger er CMV-serologi mye brukt før transplantasjonen for å bestemme risiko for oppståelse av CMV-komplikasjoner hos resipienten etter transplantasjonen, men etter transplantasjonen har den begrenset verdi i seg selv. Alternativt kan QF-CMV brukes hos resipienter av transplantater for å vurdere nivået av CMV-immunitet hos pasienter som har en risiko for å utvikle symptomatisk CMV-infeksjon og/eller -sykdom på grunn av immunsuppresjon (12–15).

Flere publiserte kliniske studier for en rekke transplantasjonskohorter har vist nytten til QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

I en stor studie av 108 resipienter av solid organtransplantat (4) ble det funnet at pasienter med et QF-CMV-reaktivt resultat ved avslutningen av anti-CMV-profylakse hadde en betydelig lavere frekvens av etterfølgende CMV-sykdom (3,3 % eller 1/30, med en 0,2 IE/ml terskel) sammenlignet med pasienter som hadde et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat (21,8 % eller 17/78; $p = 0,044$) (Figur 5).



Figur 5. Utbredelsen av CMV-sykdom med sen debut hos pasienter med et QuantiFERON-CMV-reaktivt resultat vs. Et ikke-reaktivt QuantiFERON-CMV resultat på slutten av profylaksen. Underliggende data funnet i Kumar et al. (4).

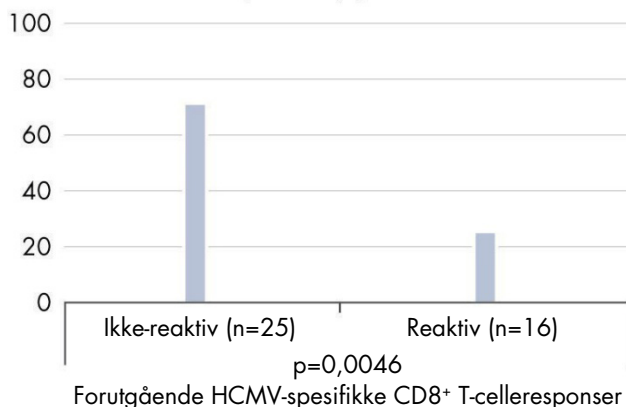
CMV-seronegative transplantasjonspasienter som mottok et organ fra en CMV-positiv donor (D+R-) med et QF-CMV-reaktivt resultat ved fullføring av profylakse, forble videre friske fra CMV-sykdom oftere og lenger, noe som indikerer at QF-CMV kan anvendes for å identifisere personer med risiko for utvikling av CMV-sykdom med sen debut.

Denne studien fremhevet også at i denne kohorten med transplantasjonspasienter med høyest risiko for utvikling av CMV-sykdom (D+/R-) var et reaktivt resultat når som helst etter profylakse assosiert med en høyere sannsynlighet for å forbli frisk fra CMV-sykdom.

I en studie bestående av 37 pasienter med solid organtransplantat (6), ble vurdering av CMV-spesifikke CD8⁺ Tcelleresponser ved QF-CMV brukt som assistanse ved prediksjon av spontan viral clearance sammenlignet med CMV-sykdomsprogresjon etter økning i CMV-viremi. I denne studien ble 24 av 26 pasienter (92,3 %) med et QF-CMV-reaktivt resultat (ved bruk av en IFN- γ $\geq 0,2$ IU/ml testgrense) spontant kvitt CMV-viruset, mens bare 5 av 11 (45,5 %) pasienter med et QF-CMV-ikke-reaktivt resultat hadde samme utfall.

En studie av 67 lungetransplantatresipienter som vurderte CMV-viremiepisoder etter transplantasjonen (7), observerte at 18/25 (72 %) CMV-viremiepisoder ble innledet av et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat mot 4/16 (25 %) episoder som ble innledet av en QF-CMV-reaktiv respons (Fishers eksakte test, $p=0,0046$, se Figur 6).

% av HCMV DNAemia-episodene med en viral belastning på >1000 kopier/ml



Figur 6. Statistisk analyse av CMV-spesifikke CD8⁺ T-celleresponser påvist av QuantiFERON-CMV, og utviklingen av CMV-viremi (Fishers eksakte test, p=0,0046). Underliggende data funnet i Weseslindtner et al (7).

I en stor prospektiv multisenterstudie av 127 donor-CMV-seropositive, resipient-CMV-seronegative pasienter med solid organtransplantat (8) som alle fikk antiviral profylakse, ble det funnet at pasienter med et QF-CMV-reaktivt resultat (ved bruk av en testterskelverdi på 0,1 IE/ml) på et hvilket som helst tidspunkt etter gjennomføring av anti-CMV-profylakse, hadde en signifikant lavere forekomst av sykdom med sen debut 12 måneder etter transplantasjonen (6,4 %) sammenlignet med de som hadde et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat (22,2 %) og et ubestemt resultat (58,3 %, p <0,001). Ved klassifisering av ubestemte resultater som «ikke-reaktive» også, var forekomsten av påfølgende CMV-sykdom 6,4 % vs. 26,8 %, p=0,024. De positive og negative prediktive verdiene for QF-CMV for beskyttelse mot CMV-sykdom ble rapportert å være henholdsvis 0,90 (95 % CI 0,74–0,98) og 0,27 (95 % CI 0,18–0,37). Denne studien fant at bruk av QF-CMV kan være nyttig til å forutsi om pasienter har lav, middels eller høy risiko for utvikling av påfølgende CMV-sykdom etter profylakse.

I en prospektiv studie av 55 resipienter av solid organtransplantat (8), der forholdet mellom QF-CMV-resultater før transplantasjonen og CMV-replikasjonsepisoder etter transplantasjonen ble analysert, ble det funnet at en høyere forekomst av CMV-replikasjon etter transplantasjonen ble observert hos CMV-seropositive resipienter med et ikke-reaktivt (ved bruk av en testterskelverdi på 0,2 IE/ml) QF-CMV-resultat før transplantasjonen (7/14 eller 50 %) sammenlignet med CMV-seropositive resipienter med et reaktivt QF-CMV-resultat før transplantasjonen (4/30 eller 13,3 %, $p = 0,021$).

Denne studien fant at resipienter med en ikke-reaktiv QF-CMV-respons før transplantasjonen som fikk et organ fra en CMV-seropositiv donor, hadde en tidoblet økt risiko for CMV-replikasjon sammenlignet med resipienter med en reaktiv QF-CMV-respons før transplantasjonen (justert OR 10,49, 95 % CI 1,88–58,46). En QF-CMV-analyse før transplantasjonen kan derfor være nyttig for å forutsi risikoen for CMV-replikasjon etter transplantasjon og således muliggjøre individualisering av CMV-infeksjonshåndtering etter transplantasjon av solide organer.

En rekke andre studier som undersøker påvisning av CMV-spesifikke CD8⁺ T-celleresponser ved QF-CMV i en kohort med transplantatresipienter, har blitt fullført (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) eller pågår på nåværende tidspunkt over hele verden.

Internasjonale retningslinjer for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer

Betydningen av CMV-spesifikk immunitetsovervåking har blitt anerkjent og publisert i *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Oppdaterte internasjonale retningslinjene for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer) (12). Disse internasjonale retningslinjene, utarbeidet av et panel med eksperter på CMV og transplantasjon av solide organer, satt sammen av avdelingen for smittsomme sykdommer ved Transplantation Society, utgjør bevis og konsensusretningslinjer for CMV-håndtering basert på ekspertuttalelser, inkludert: diagnostikk, immunologi, forebygging og behandling.

Disse retningslinjene konkluderte med at «Immunitetsovervåking av CMV-spesifikke T-celle-responser kan forutsi hvilke personer som er i faresonen for CMV-sykdom etter transplantasjonen, og kan være nyttige ved veiledning av profylakse og forebyggende behandling» (12).

Videre ga retningslinjene også anbefalinger for egenskapene til den ideelle immunitetsovervåkingsanalysen, som inkluderte:

- Evne til å vurdere mengden og funksjonen til en transplantasjonsmottakers CD4⁺ og CD8⁺ -T-celler
- Evne til å måle IFN- γ
- Enkel å utføre, kostnadseffektiv og reproducerbar
- Har en kort behandlingstid
- Lar prøver bli enkelt fraktet til spesialiserte henvisningslaboratorier

QF-CMV oppfyller nesten alle kriteriene som er spesifisert i disse retningslinjene, og representerer den eneste standardiserte immunitetsovervåkingsanalysen som kan oppdage IFN- γ spesifikk for CMV.

Analysens ytelsesegenskaper

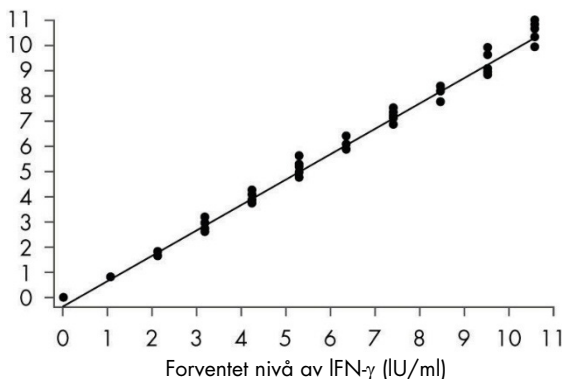
QF-CMV ELISA bruker rekombinant human IFN- γ -standard, som har blitt analysert mot et IFN- γ -referansepreparat (NIH-ref.: Gxg01-902-535). Resultater for testprøver rapporteres i internasjonale enheter (IE) i forhold til en standardkurve utarbeidet ved å teste fortykning av den sekundære standarden som følger med settet.

Heterofile (f.eks. humane anti-murine) antistoffer i serum eller plasma hos enkelte personer er kjent for å forårsake interferens med immunanalyser. Effekten av heterofile antistoffer i QF-CMV ELISA minimeres ved tilsetning av normalt murint serum i den grønne fortykningsløsningen og bruk av monoklonale F(ab')₂-antistofffragmenter som IFN- γ -innfangingsantistoffet belagt på mikroplatebrønnene.

Deteksjonsgrensen for QFM ELISA er 0,065 IU/ml, og det er ingen tegn på noen høydose-hook-effekt (prozoneeffekt) ved konsentrasjoner av IFN- γ opptil 10 000 IU/ml. QF-CMV ELISA-antistoffene er vist å ikke å kryss reagere med noen testede cytokiner, deriblant IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 og IL12.

QF-CMV ELISA har blitt vist å være lineær ved vilkårlig plassering av fem replikater av 11 plasmapooler med kjente IFN- γ -konsentrasjoner på ELISA-platen. Den lineære regresjonslinjen har en helling på $1,002 \pm 0,011$ og en korrelasjonskoeffisient på 0,99 (figur 7).

Bestemt nivå av IFN- γ



Figur 7. Linearitetsprofilen til QF-CMV ELISA bestemt ved å teste fem replikater av 11 plasmaprøver med kjente IFN- γ -konsentrasjoner.

Reproduserbarheten til QF-CMV ELISA ble anslått ved å teste 20 plasmaprøver med ulike IFN- γ -konsentrasjoner i replikater på tre, i tre laboratorier, på tre ikke-sammenhengende dager, av tre operatører. Hver prøve ble dermed testet 27 ganger, i ni uavhengige analysekjøringer. Én av prøvene var en Nil-kontroll og hadde en beregnet IFN- γ -konsentrasjon på 0,08 (95 % CI 0,07–0,09) IE/ml. Av de resterende 19 plasmaprøvene var konsentrasjonsområdet 0,33 (95 % CI 0,31–0,34) til 7,7 IE/ml (95 % CI 7,48–7,92).

Unøyaktighet innenfor kjøringen eller innenfor analysen ble estimert ved å beregne gjennomsnittet for %CV-er for hvert testplasma som inneholdt IFN- γ fra hver platekjøring ($n = 9$), og varierte fra 4,1 til 9,1 %CV. Gjennomsnitts-%CV innenfor kjøringen (± 95 % CI) var $6,6 \pm 0,6$ %. Null IFN- γ -plasma hadde et gjennomsnitt på 14,1 % CV.

Total unøyaktighet eller inter-analyseunøyaktighet ble bestemt ved å sammenligne de 27 beregnede konsentrasjonene av IFN- γ for hver plasmaprøve, og varierte fra 6,6 til 12,3 %CV. Total gjennomsnittlig %CV (± 95 % CI) var $8,7 \pm 0,7$ %. Null IFN- γ -Plasma viste en CV på 26,1%. Denne graden av variasjon er som forventet, fordi den beregnede konsentrasjonen av IFN- γ er lav, og fordi variasjonen rundt et lavt konsentrasjonsestimat er større enn for høyere konsentrasjoner.

Teknisk informasjon

Ubestemte resultater

Ubestemte resultater kan være relatert til immunstatusen til personen som testes, men de kan også være forbundet med en rekke tekniske faktorer:

- Mer enn 16 timer fra blodtrekking til inkubasjon ved 37 °C
- Oppbevaring av blod utenfor det anbefalte temperaturområdet (22 ± 5 °C)
- Utilstrekkelig blanding av blodprøvetakingsrør
- For dårlig vasking av ELISA-platen

Hvis det er mistanke om tekniske problemer ved innsamling eller håndtering av blodprøver, gjentar du hele QF-CMV-testen med nye blodprøver. Gjentakelse av ELISA-testing av stimulerede plasmaer kan utføres hvis det er mistanke om prosedyreavvik ved ELISA-testen. Ubestemte resultater (fra lave mitogenverdier) forventes ikke å forandre seg ved gjentakelse, med mindre det var en feil ved ELISA-testingen.

Koagulerte plasmaprøver

Hvis det dannes fibrin i forbindelse med langvarig oppbevaring av plasmaprøver, kan prøvene sentrifugeres for å sedimentere det koagulerte materialet og forenkle pipetteringen av plasma.

Feilsøkingeveiledning

Denne feilsøkingeveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, se også den tekniske informasjonen på www.QuantiFERON.com. Se baksiden for kontaktinformasjon.

Kommentarer og forslag

Avlesninger av lav optisk tetthet for standarder

- | | |
|--|---|
| a) Standardfortynningsfeil | Se til at fortynninger av settstandard klargjøres riktig i henhold til pakningsvedlegget for QFT ELISA. |
| b) Pipetteringsfeil | Sørg for at pipettene er kalibrert og brukes i henhold til produsentens instruksjoner. |
| c) For lav inkubasjonstemperatur | Inkubasjon av ELISA skal utføres ved romtemperatur (22 ± 5 °C). |
| d) For kort inkubasjonstid | Inkubasjon av plate med konjugat, standarder og prøver skal være i 120 ± 5 minutter. Enzymsubstratløsningen inkuberes på platen i 30 minutter. |
| e) Feil plateleserfilter brukt | Platen skal leses ved 450 nm med et referansefilter på mellom 620 og 650 nm. |
| f) For kalde reagenser | Alle reagenser, med unntak av 100x-konjugatkonsentrat, må bringes til romtemperatur før du begynner analysen. Dette tar ca. 1 time. |
| g) Settet/komponentene har gått ut på dato | Se til at settet brukes før utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert standard og 100x-konjugatkonsentrat brukes innen 3 måneder etter rekonstitusjonsdatoen. |

Ikke-spesifikk fargeutvikling

- | | |
|--|--|
| a) Ufullstendig vasking av platen | Vask platen minst seks ganger med 400 µl vaskebuffer per brønn. Mer enn seks vaskesykluser kan være nødvendig avhengig av vaskemaskinen som brukes. En bløtleggingsperiode på minst 5 sekunder mellom syklusene må benyttes. |
| b) Krysskontaminering av ELISA-brønner | Vær forsiktig ved pipettering og blanding av prøvene for å redusere risikoen for krysskontaminering. |
| c) Settet/komponentene har gått ut på dato | Se til at settet brukes før utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert standard og 100x-konjugatkonsentrat brukes innen 3 måneder etter rekonstitusjonsdatoen. |

Kommentarer og forslag

- | | | |
|----|---|---|
| d) | Enzymsubstratløsningen er kontaminert | Kast substratet dersom det forekommer blåfarging. Forsikre deg om at rene reagensbeholdere brukes. |
| e) | Blanding av plasma i sentrifugerør før innsamling | Sørg for at plasmaprøver samles inn nøyaktig fra oversiden av gelen uten å pipettere opp og ned, og pass på at materialet på overflaten av gelen ikke forstyrres. |

Høy bakgrunn

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Ufullstendig vasking av platen | Vask platen minst seks ganger med 400 µl vaskebuffer per brønn. Mer enn seks vaskesykluser kan være nødvendig avhengig av vaskemaskinen som brukes. En bløtleggingsperiode på minst 5 sekunder mellom syklusene må benyttes. |
| b) | Før høy inkubasjonstemperatur | Inkubasjon av ELISA skal utføres ved romtemperatur (22 °C ±5 °C). |
| c) | Settet/komponentene har gått ut på dato | Se til at settet brukes før utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert standard og 100x-konjugatkonsentrat brukes innen 3 måneder etter rekonstitusjonsdatoen. |
| d) | Enzymsubstratløsningen er kontaminert | Kast substratet dersom det forekommer blåfarging. Forsikre deg om at rene reagensbeholdere brukes. |

Ikke-lineær standardkurve og variabilitet mellom duplikat

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Ufullstendig vasking av platen | Vask platen minst seks ganger med 400 µl vaskebuffer per brønn. Mer enn seks vaskesykluser kan være nødvendig avhengig av vaskemaskinen som brukes. En bløtleggingsperiode på minst 5 sekunder mellom syklusene må benyttes. |
| b) | Standardfortynningsfeil | Påse at fortynninger av settstandard er klargjort på riktig måte i henhold til dette pakningsvedlegget. |
| c) | Dårlig blanding | Bland reagensene grundig ved å snu dem opp og ned eller ved å vortekse dem før de settes på platen. |
| d) | Inkonsekvent pipetteringsteknikk eller avbrudd under oppsett av analysen | Prøve- og standardtillegg skal utføres på kontinuerlig måte. Alle reagenser skal klargjøres før analysen starter. |

Produktinformasjon og tekniske veiledninger er gratis tilgjengelig fra QIAGEN via distributøren eller på www.QuantiFERON.com.

Referanser

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 vises på emballasjen og merkingen:

Symbol	Symbolforklaring
	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Siste forbruksdato
	CE-merke
	Medisinsk utstyr til in vitro-diagnostikk
	Katalognummer
	Partinummer
	Materialnummer
	Globalt handelsnummer
	Temperaturbegrensning
	Må ikke gjenbrukes
	Må beskyttes mot sollys
	Se bruksanvisningen
	Produsent
	Autorisert representant i EU

Kontaktinformasjon

Hvis du trenger teknisk hjelp eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportsenter på www.qiagen.com/Support, ringe 00800-22-44-6000 eller kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå til www.qiagen.com).

Forkortet ELISA testprosedyre

Trinn 1: Blodinkubasjon

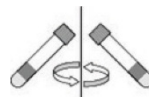
1. Samle pasientblod i blodprøvetakingsrør og bland ved å riste dem ti (10) ganger, akkurat godt nok til at hele den innvendige overflaten av røret er dekket med blod, slik at antigen på rørveggene løses opp.



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



3. Etter inkubering sentrifugerer du rørene i 15 minutter ved 2000–3000 RCF (g) for å separere plasmaet og de røde cellene.



4. Etter sentrifugering må du unngå å pipettere opp og ned eller blande plasma på noen som helst måte før innsamling. Du må til enhver tid passe på å ikke å forstyrre materialet på geloverflaten.



Trinn 2: IFN- γ ELISA

1. Ekvilibrer ELISA-komponenter, med unntak av 100x-konjugatkonsentratet, til romtemperatur i minst 60 minutter.

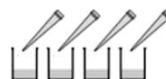


2. Rekonstituer settstandarden til 8,0 IE/ml med destillert eller avionisert vann. Klargjør fire (4) standardfortynninger.



3. Rekonstituer lyofilisert konjugatkonsentrat 100x med destillert eller deionisert vann.

4. Klargjør konjugat med arbeidsstyrke i grønn fortynningsløsning, og tilsett 50 µl i alle brønner.



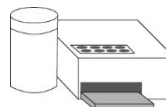
5. Tilsett 50 µl testplasmaprøver og 50 µl standarder i de aktuelle brønnene. Bland med en rister.



6. Inkuber i 120 minutter ved romtemperatur.



7. Vask brønnene minst 6 ganger med 400 µl vaskebuffer per brønn.



8. Tilsett 100 µl enzymsubstratløsning i brønnene. Bland med en rister.



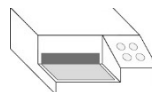
9. Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur.



10. Tilsett 50 μ l enzymstoppløsning i alle brønnene. Bland med en rister.



11. Avles resultater ved 450 nm med et 620 til 650 nm referansefilter.



12. Analyser resultatene.



Endringshistorikk for håndbok

Dokument	Endringer	Date
L1075110-R06	Nødvendige materialer som ikke er inkludert, ekstra tallerkenlokk, side 9	Oktober 2019

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

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

Begrenset lisensavtale for QuantiFERON-CMV ELISA

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan utelukkende brukes i samsvar med protokollene som følger med produktet og denne håndboken, og det skal bare brukes med komponenter som finnes i panelet. QIAGEN gir ingen lisens for noen av sine årsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette panelet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette panelet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Enkelte av disse ytterligere protokollene er levert av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette panelet og/eller dets bruk ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette panelet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydte, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av panelet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med panelet og/eller komponentene.

Du finner oppdaterte lisensvilkår på www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, med enerett.

