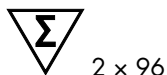


Februar 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Pakningsvedlegg



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

IVD Til bruk i in vitro-diagnostikk



REF 0350-0201



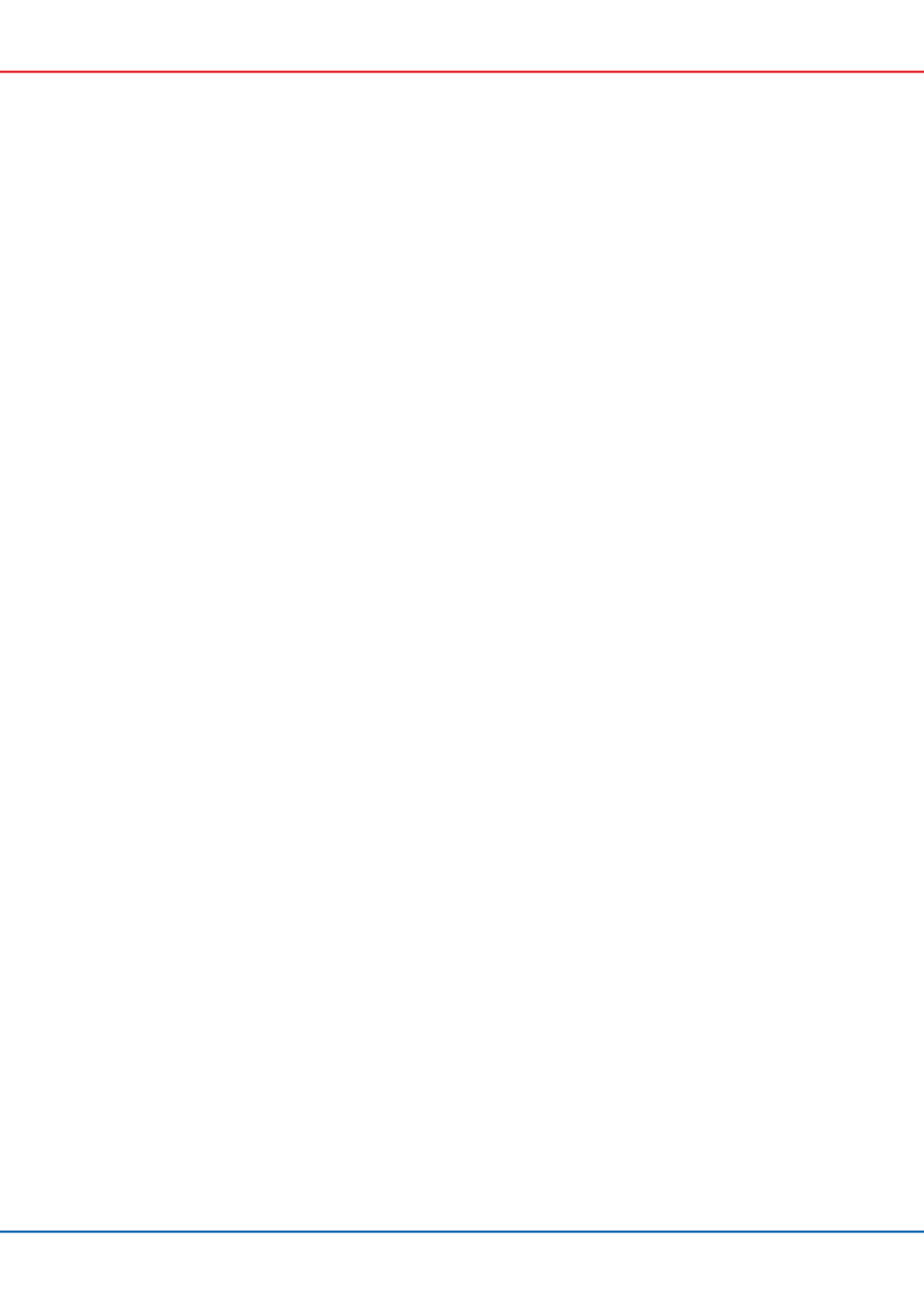
QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, USA +1-800-426-8157

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY

1075110NO Rev. 05



www.QuantiFERON.com



Innhold

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

Analyseterskelverdi	28
Kliniske studier	29
Spesifisitet	29
Sensitivitet	30
Studier som fremhever klinisk nytte	30
Internasjonale konsensusretningslinjer for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer	34
Analysens ytelseskarakteristika	35
Teknisk informasjon	37
Ubestemte resultater	37
Koagulerte plasmaprøver	37
Feilsøkingsveiledning	38
Referanser	40
Symboler	42
Kontaktinformasjon	43
Forkortet ELISA-testprosedyre	44
Nivå 1: Blodinkubasjon	44
Nivå 2: IFN- γ ELISA	44
Endringshistorikk for håndbok	47

Tiltenkt bruk

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) er en in vitro-analyse som anvender en peptidblanding som simulerer humant cytomegalovirus-proteiner (CMV-proteiner) for å stimulere celler i heparinisert fullblod. Påvisning av interferon-gamma (enzyme-linked immunosorbent assay, IFN- γ) ved hjelp av enzytbundet 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.

Sammendrag 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 gjenkjennelsesprosessen omfatter generering og sekresjon av cytokinet IFN- γ . Påvisning og etterfølgende kvantifisering av IFN- γ danner grunnlaget for denne testen.

Prosedyreprinsipp

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 og innen 16 timer etter prøvetaking. 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 uforynnnet 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 uforynnnet 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 uforynnede 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 IFN- γ -positiv 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).

Tiden som er nødvendig 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 rør med blod:	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

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
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
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Pakningsvedlegg for QF-CMV-blodprøverør)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	
Katalognr.	0350-0201
Mikroplateremser (12 x 8 brønner) belagt med murint anti-humant IFN- γ -monoklonalt antistoff)	2 sett mikroplateremser med 12 x 8 brønner
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Human IFN- γ -standard, lyofilisert; inneholder rekombinant humant IFN- γ , bovin kasein, 0,01 % vekt/volum timerosal)	1 prøveglass (8 IE/ml rekonstituert)
Green Diluent (Grønn fortyner; inneholder bovin kasein, normalt museserum, 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 (Vaskebufferkonsentrat 20x; pH 7,2, inneholder 0,05 % vekt/volum ProClin [®] 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratløsning; inneholder H ₂ O ₂ , 3,3', 5, 5' tetrametylbenzidin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (enzymstoppende løsning; inneholder 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (pakningsvedlegg for QF-CMV ELISA)	1

* Inneholder svovelsyre. Se side 9 for forholdsregler.

Materialer som er nødvendige, men som ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (safety data sheet, 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 vaskemaskin anbefales)
- Mikroplateleser utstyrt med 450 nm filter og 620 nm til 650 nm referansefilter

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN®-sett og hver enkelt komponent.

FORSIKTIG



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

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

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Inneholder: svovelsyre. Advarsel! Kan være etsende for metaller. Irriterer huden. Gir 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-hydroksy-1-(4-sulfofenyl)-4-(4-sulfofenylazo)-pyrazol-3-karboksyilat. Inneholder: tartrazine. Advarsel! Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Inneholder: ProClin 300. Skadelig, med langtidsvirkning, for liv i vann. Unngå utslipp til miljøet.

Sikkerhetsinformasjon

Ytterligere informasjon

- Fravikelse fra QF-CMV-pakningsvedlegget kan gi feilaktige resultater. Instruksjonene må leses nøye før bruk.
- Ikke bruk settet hvis noen av reagensflaskene viser tegn til skade eller lekkasje før bruk.
- Viktig: Inspiser flasker før bruk. IFN- γ -standardflasker skal ikke brukes dersom flaskene har tegn til skader eller gummiforseglingen er åpnet. Knuste flasker skal ikke håndteres. Kast prøveglassene i tråd med egnede sikkerhetsprosedyrer. Anbefaling: Bruk en spesialåpner til å åpne konjugatet eller IFN- γ -standardprøveglasset for å begrense risiko for skade fra metallkrypelokket.
- Mikroplateremser, human IFN- γ -standard, grønn fortyner og konjugatkonsentrat 100 \times fra ulike QFCMV-sett må ikke blandes og brukes. Andre reagenser (vaskebufferkonsentrat 20 \times , enzymsubstratløsning og enzymstoppende løsning) 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 laboratoriestyr 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-blodprøvetakingsrørene bør holde en temperatur på 17–25 °C under fyllingen.
- Oppbevaringstiden til QF-CMV-blodprøvetakingsrørene er maksimalt 15 måneder fra produksjonsdato, ved oppbevaring ved 4–25 °C.

ELISA-settreagenser

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

Rekonstituerte og ubrukte reagenser

For instruksjoner om rekonstituering av reagenser, se "Nivå 2: QuantiFERON-CMV ELISA for humant IFN- γ " (trinn 3 og 5 på side 17 og 19).

- Den rekonstituerte human IFN- γ -standarden kan oppbevares i opptil 3 måneder dersom den lagres ved 2–8 °C.

Skriv ned datoen for rekonstituering av den humane IFN- γ -standarden.

- Etter rekonstituering må konjugatkonsentratet 100 \times 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 \pm 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 37 °C-inkubator 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 bør utføres av en fagperson som har 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). Bytt ut rørhetter på en sikker måte og bland som beskrevet nedenfor. Da 1 ml rør trekker blod forholdsvis langsamt, 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 bør utføres av en fagperson som har opplæring i blodprøvetaking. Blodet bør holde romtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) 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 17–25 °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 mengder på 1 ml (én i hvert QF-CMV-blodprøvetakingsrør) i et egnet Nil-, CMV-antigen- og Mitogen-rør. 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. Rørene må merkes 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 $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ så snart som mulig, og innen 16 timer etter prøvetaking. Før inkubasjon må rørene holde romtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). Blodprøvene må ikke settes i kjøleskap eller fryses.

Prosedyre

Nivå 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 samle inn plasma uten sentrifugering, men man må være ekstra forsiktig for å fjerne plasma uten å forstyrre cellene.

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

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

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

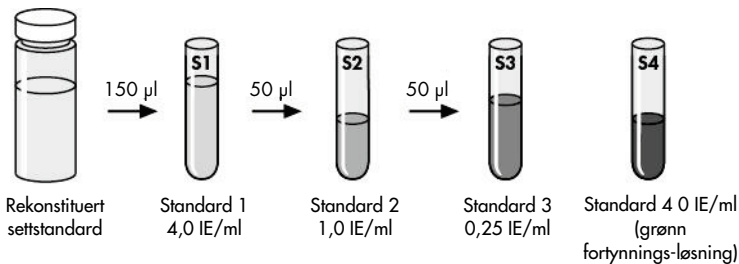
1. Alle plasmaprøver og reagenser, unntatt konjugat 100x-konsentrat, må oppnå romtemperatur (22 ± 5 °C) før bruk. Beregn minst 60 minutter på ekvilibrerings.
2. ELISA-plateremser som ikke er nødvendige, skal fjernes fra rammen, forsegles i folieposen og settes tilbake i kjøleskapet for oppbevaring frem 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 -standarden med volumet med deionisert eller destillert vann angitt på etiketten til flasken. Bland forsiktig for å redusere skumming og sikre fullstendig resolubilisering. Rekonstitusjon av IFN- γ -standarden 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 fortyningsserie på fire IFN- γ -konsentrasjoner i den grønne fortyningssløsningen (Green Diluent, 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 fortyninger av settstandarder for hver ELISA-prosedyre.

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 til 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 forhindre 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 den grønne fortynningsløsningen.

Tabell 1. Klargjøring av konjugat med arbeidsstyrke

Antall remser	Volumet til 100x-konjugatkonsentratet	Volum til den grønne fortynningsløsningen
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 blodprøvetakingsrør og deretter fryses eller oppbevares i mer enn 24 timer før analyse, må blandes godt før tilsetning i ELISA-brønneren.

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 QuantiFERON-CMV-analyseprogramvaren:

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 bør 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. En del vaskebufferkonsentrat (20x) 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 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 μ l 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 mikroplaterister.
16. Mål den optiske tettheten (Optical Density, OD) til hver brønn innen 5 minutter etter at reaksjonen er stoppet ved hjelp av en mikroplateleser utstyrt med et 450 nm filter og med et 620 nm til 650 nm referansefilter. OD-verdier brukes til å beregne resultatene.

Beregninger og tolkning av tester

QuantiFERON-CMV-analyseprogramvare for analyse av rådata og beregning av resultater er tilgjengelig fra QIAGEN på www.QuantiFERON.com. Pass på at den nyeste versjonen av QF-CMV-analyseprogramvaren 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 "Tolkning av resultater" på side 24. Programvaren rapporterer den laveste fortyningen som genererer et resultat innenfor QF-CMV ELISA-området, iberegnet fortynningsfaktoren.

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

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

Bestem gjennomsnittlige OD-verdier for settstandardreplikatene på hver plate.

Lag en $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ -standardkurve ved å legge inn $\log_{(e)}$ for gjennomsnittlig OD (y-akse) mot $\log_{(e)}$ for IFN- γ -konsentrasjonen av standardene i IE/ml (x-akse). Nullstandarden tas ikke med i disse beregningene. Beregn den best tilpassede linjen for standardkurven ved regresjonsanalyse.

Bruk standardkurven for å bestemme IFN- γ -konsentrasjonen (IE/ml) til hver av testplasmaprøvene 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:

- Middelverdien for OD 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 $\geq 0,98$.

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

Gjennomsnittlig OD-verdi for nullstandarden (grønn fortynner) 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 38) 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 kandidatene IFN- γ -nivåer på >8,0 IE/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

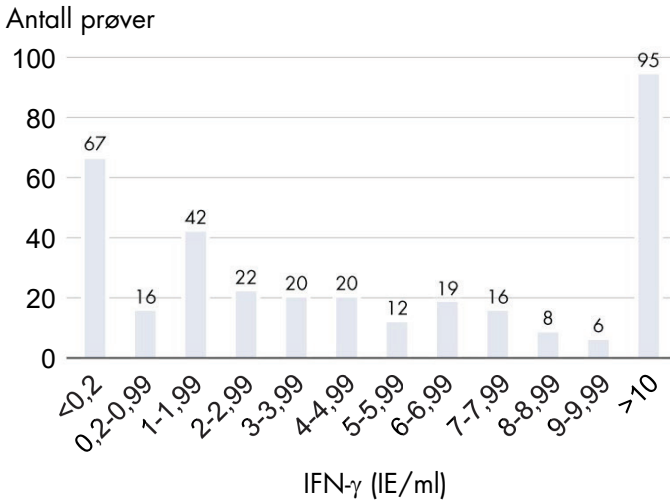
QuantiFERON-CMV-testresultatene må brukes i forbindelse med hver pasients epidemiologiske historie, nåværende medisinske status og andre diagnostiske evalueringer.

Upålitelige eller ubestemte resultater kan oppstå på grunn av:

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

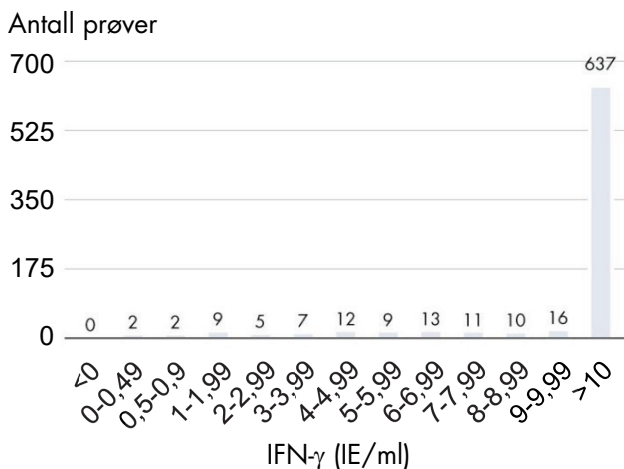
Forventede verdier

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-antigenrør (Nil subtrahert) for de 343 CMV-seropositive personene vises (Figur 2).



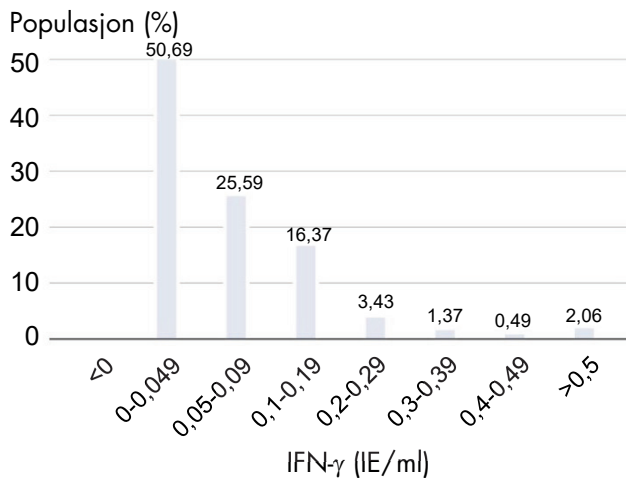
Figur 2. Distribusjon av QF-CMV IFN γ -responser (Nil subtrahert) hos seropositive friske personer (n = 343).

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 at testen enten 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 personer 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. Den observerte uoverensstemmelsen kan skyldes falskt positiv CMV-serologi eller fravær av responsive HLA-typer hos de testede personene.

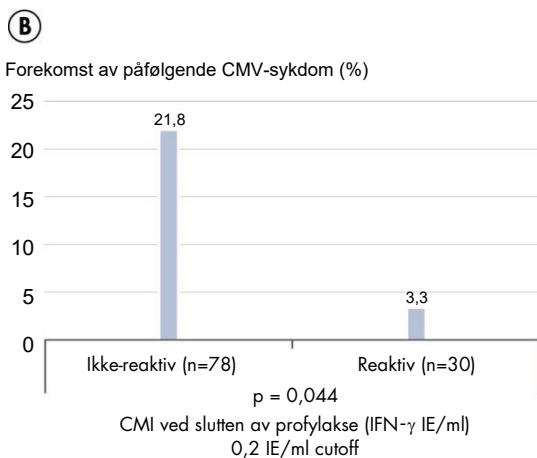
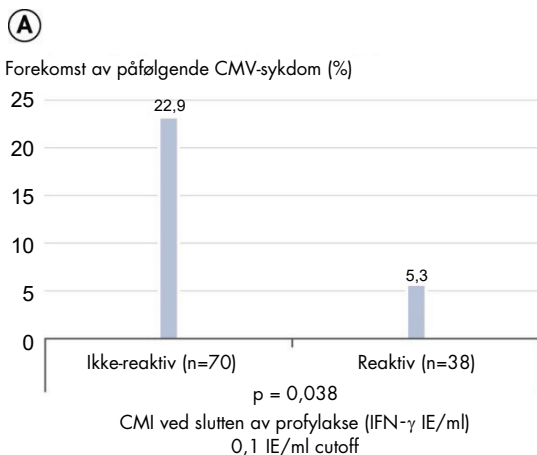
Graden av samsvar ved sensitivitetsevalueringer utført for resipienter av solid organtransplantat (1–8), resipienter av hematopoietiske stamcelletransplantater (9, 10) og HIV-smittede pasienter (11) ble vist å være noe lavere og kan skyldes falskt positiv CMV-serologi, fravær av responsive HLA-typer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

Studier som fremhever klinisk nytte

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).

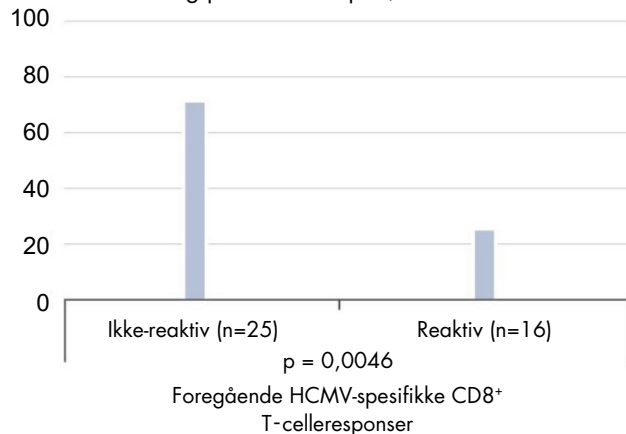
CMV-seronegative transplantasjonspasienter som mottok et organ fra en CMV-positiv donor (D+R-) med et QF-CMV-reaktivt resultat ved fullføring av profylakse, forble videre friske fra CMV-sykdom oftere og lenger, noe som indikerer at QF-CMV kan anvendes for å identifisere personer med risiko for utvikling 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⁺ T-celleresponser 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 CMV-viruset fjernet spontant hos 24/26 pasienter (92,3 %) med et QFCMV-reaktivt resultat (ved bruk av en testterskelverdi på IFN- γ $\geq 0,2$ IE/ml), mens bare 5/11 (45,5 %) pasienter med et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat fikk 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, $p = 0,0046$, 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 QFCMV-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 også som "ikke-reaktive", 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 viste 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 konsensusretningslinjer for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer

Betydningen av CMV-spesifikk immunitetsovervåking har blitt anerkjent og publisert i *Oppdaterte internasjonale konsensusretningslinjer 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 transplantatresipients CD4⁺- og CD8⁺ T-celler
- Evne til å måle IFN- γ
- Enkel å utføre, kostnadseffektiv og reproduserbar
- 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.

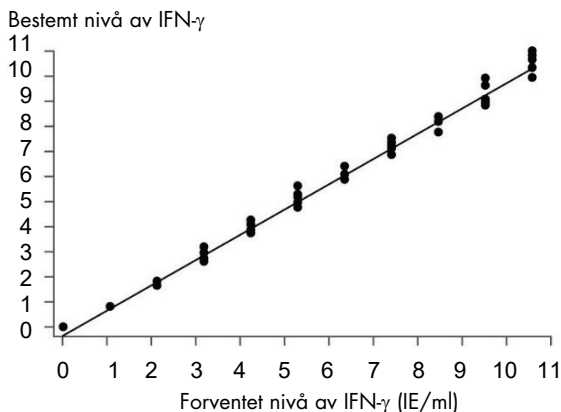
Analysens ytelseskarakteristika

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. human 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 QF-CMV ELISA er 0,065 IE/ml, og det er ingen tegn til noen høydose-hook-effekt (prozoneeffekt) ved konsentrasjoner av IFN- γ opptil 10.000 IE/ml. QF-CMV ELISA-antistoffene er vist å ikke å kryssreagere 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).



Figur 7. Lineærhetsprofilen 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. Gjennomsnitt-%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 26,1 %CV. 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) Standard fortynningsfeil | Se til at fortynninger av settstandard klargjøres riktig i henhold til pakningsvedlegget for QF-CMV 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) Reagensene er for kalde | Alle reagenser, med unntak av 100x-konjugatkonsentratet, må oppnå romtemperatur før du starter analysen. Dette tar ca. 1 time. |
| g) Settset/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 rekonstitueringsdatoen. |

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) Settset/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 rekonstitueringsdatoen. |

Kommentarer og forslag

- | | |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d) Enzymsubstratløsningen er kontaminert | Kast substratet dersom det forekommer blå fargeskjær. 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) For høy inkubasjonstemperatur | Inkubasjon av ELISA skal utføres ved romtemperatur (22 ± 5 °C). |
| c) Settett/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 rekonstitueringsdatoen. |
| d) Enzymsubstratløsningen er kontaminert | Kast substratet dersom det forekommer blå fargeskjær. 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) Standard fortynningsfeil | 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 teknisk veiledning er gratis tilgjengelig fra QIAGEN via distributøren eller på www.QuantiFERON.com.














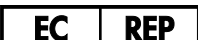
Referanser

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	Symboldefinisjon
	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Brukes innen
	CE-merke
	Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Ikke til gjenbruk
	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 supportcenter 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

Nivå 1: Blodinkubasjon

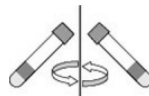
1. Samle pasientblod i blodprøvetakingsrør og bland ved å riste dem ti (10) ganger, akkurat godt nok til at hele den innvendige overflaten av røret er dekket med blod, slik at antigen på rørveggene løses opp.



2. Inkuber rørene stående ved 37 ± 1 °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.



Nivå 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 deionisert vann. Klargjør fire (4) standardfortynninger.



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

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



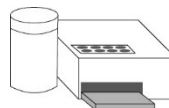
5. Tilsett 50 µl testplasma prøver og 50 µl standarder i de aktuelle brønnene. Bland med en rister.



6. Inkuber i 120 minutter ved romtemperatur.



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



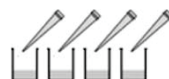
8. Tilsett 100 µl enzymsubstratløsning til brønnene. Bland med en rister.



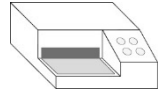
9. Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur.



10. Tilsett 50 µl enzymstoppløsning til alle brønnene. Bland med en rister.



11. Les av resultatene ved 450 nm med 620 til 650 nm referansefilter



12. Analyser resultatene.



Endringshistorikk for håndbok

Dokument	Endringer	Dato
L1075110-R5	Tilføyelse av sikkerhetsinformasjon vedrørende ødelagte prøveglass Oppdateringer til tabell 2, Tolkning av QF-CMV-resultater, side 24.	Februar 2018
L1075110-R5	Oppdatert GHS-informasjon, side 10.	Februar 2018

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 bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i panelet. QIAGEN gir ingen lisens for noen av sine åndsprodukter 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. Noen av disse andre kontrollene er utarbeidet 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 antydnet, 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.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Feb-18 © 2018 QIAGEN, med enerett.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettside www.qiagen.com