
QuantiFERON[®]-CMV

Indlægseddell ∇_{Σ} 2 x 96

Interferon-gamma-test i fuldblod til måling af responser
på humane cytomegalovirus-peptidantigener

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australien

Tlf.: (Australien) +613-9840-9800, (Europa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, TYSKLAND

1075110DA Rev. 01



Indhold

Tilsigtet brug	5
Indledning	5
Analyseprincipper	6
Påkrævet tid til udførelse af analysen	6
Reagenser og opbevaring	7
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	8
Opbevaring og håndtering	8
Advarsler og forholdsregler	9
Prøveindsamling og -håndtering	10
Brugsvejledning	11
Stadie 1 – Inkubering af blod og opsamling af plasma	11
Stadie 2 – QuantiFERON-CMV-ELISA for humant IFN- γ	11
Beregninger og testfortolkning	14
Fortolkning af resultater	15
Begrænsninger	16
Forventede værdier	16
Ydelseskarakteristika	18
Sammenlignende test	18
Analysetærskel	18
Kliniske undersøgelser	19
Specificitet	19
Følsomhed	19
Undersøgelser, som fremhæver den kliniske anvendelighed	20
Internationale konsensusretningslinjer for håndtering af cytomegalovirus ved transplantation af hele organer	22
Analysens ydelseskarakteristika	23
Teknisk information	25
Ubestemmelige resultater	25
Fejlfindingsvejledning	26

Litteraturliste	27
Teknisk service	28
Forkortet testprocedure	30
Stadie 1 – inkubering af blod	30
Stadie 2 – IFN- γ -ELISA	30

Tilsigtet brug

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

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

Indledning

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

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

Analyseprincipper

QF-CMV-testen udføres i 2 stadier. Først opsamles fuldblod i hvert af QF-CMV-blodprøvetagningsrørene, som omfatter et Nil Control (Negativ kontrol)-rør, et CMV Antigen (CMV-antigen)-rør og et Mitogen-rør.

Mitogen-røret anvendes som positiv kontrol i QF-CMV-testen. Dette kan især være berettiget, når der er tvivl om personens immunstatus.

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

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

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

En test anses for reaktiv for et IFN- γ -respons, når aflæsningsværdien for CMV Antigen-røret er væsentligt over Nil-IFN- γ -IE/ml-værdien. Den mitogenstimulerede plasmaprøve fungerer som en IFN- γ -positiv kontrol for hver testet prøve. Et lavt respons på mitogen indikerer et ubestemmeligt resultat, når en blodprøve også har et ikke-reaktivt respons på CMV-antigenerne. Dette mønster kan forekomme ved et utilstrækkeligt antal lymfocytter, nedsat lymfocytaktivitet grundet ukorrekt prøvehåndtering, ukorrekt fyldning/blanding af Mitogen-røret eller manglende evne hos patientens lymfocytter til at danne IFN- γ , såsom hos nyligt transplanterede patienter. Nil-prøven justerer for baggrund eller ikke-specifikt IFN- γ i blodprøverne. IFN- γ -niveauet for Nil-røret trækkes fra IFN- γ -niveauet for CMV Antigen-røret og Mitogen-røret (se "Fortolkning af resultater" på side 15 i denne indlægsseddel for en beskrivelse af, hvordan QF-CMV-resultater fortolkes).

Påkrævet tid til udførelse af analysen

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

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

Reagenser og opbevaring

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) [CMV- og kontrol-antigen-blodprøvetagningsrør (Pakke til én patient)]

Katalognr. 0192-0301

Antal forberedelser 1

QuantiFERON Nil Control (Negativ kontrol) (grå hætte) 1 rør

CMV Antigen (CMV-antigen) (blå hætte) 1 rør

QuantiFERON Mitogen Control (Mitogen-kontrol) (lilla hætte) 1 rør

Indlægsseddel 1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (Komponenter til QuantiFERON-CMV-ELISA)

Katalognr. 0350-0201

Mikropladestrips 24 x 8 brøndstrips

Human IFN- γ Standard (Humant IFN- γ -standard), frysetørret 1 x hætteglas

Green Diluent (Grøn diluent) 1 x 30 ml

QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate
(QuantiFERON-konjugat 100x koncentrat), frysetørret 1 x 0,3 ml

QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate
(QuantiFERON-vaskebuffer 20x koncentrat) 1 x 100 ml

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(QuantiFERON-enzymsubstratopløsning) 1 x 30 ml

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(QuantiFERON-enzymstandsningsoopløsning) 1 x 15 ml

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

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

Opbevaring og håndtering

Blodprøvetagningsrør

- Blodprøvetagningsrør opbevares ved 4 °C til 25 °C.
- QuantiFERON-CMV-blodprøvetagningsrørens holdbarhed er maksimalt 15 måneder fra fremstillingsdatoen, når de opbevares ved 4 °C til 25 °C.

ELISA-kittets reagenser

- Kittet opbevares ved 2 °C til 8 °C.
- Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratopløsning) skal altid beskyttes mod direkte sollys.

Rekonstituerede og ubrugte reagenser

Se instruktioner i rekonstituering af reagenserne i "Brugsvejledning – Stadie 2" (trin 3 og 5 på side 11 og 12).

- Den rekonstituerede Kit Standard (Kitstandard) har en holdbarhed på op til 3 måneder, hvis den opbevares ved 2 °C til 8 °C.

Notér den dato, hvor Kit Standard (Kitstandarden) blev rekonstitueret.

- Efter rekonstituering skal ubrugt QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantiFERON-konjugat 100x koncentrat) igen opbevares ved 2 °C til 8 °C og anvendes inden for 3 måneder.

Notér den dato, hvor Conjugate (Konjugatet) blev rekonstitueret.

- Konjugat med brugsstyrke skal anvendes inden for 6 timer efter fremstilling.
- Wash Buffer (Vaskebuffer) med brugsstyrke kan opbevares ved stuetemperatur (17 °C til 27 °C) i op til 2 uger.

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug.

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er). Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og hver kitkomponent.



FORSIGTIG: Håndter humant blod som potentielt infektiøst.

Overhold relevante retningslinjer for håndtering af blod.

Følgende risiko- og sikkerhedssætninger gælder for komponenterne i QF-CMV-ELISA-kittet.

QuantIFERON Enzyme Stopping Solution (QuantIFERON-enzymstandsningsopløsning)



Indeholder svovlsyre: Lokalirriterende. Risiko- og sikkerhedssætninger: * R36/38, S26-36/37/39

- **Green Diluent** (Grøn diluent) indeholder normalt museserum og kasein, som kan udløse allergiske reaktioner; undgå kontakt med huden.

I nødstilfælde, der involverer kemikalier

Spild, lækage, eksponering eller ulykkestilfælde

Ring til CHEMTREC – døgnet rundt

I USA og Canada: 1-800-424-9300

Uden for USA og Canada: +1-703-527-3887 (opkald, som modtageren betaler, accepteres)

Yderligere information

Sikkerhedsdatablade: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Irriterer øjnene og huden. S26: Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes. S36/37/39: Brug særligt beskyttelsestøj, -handsker og -briller/ansigtsskærm.

Prøveindsamling og -håndtering

Vigtige anvisninger før start:

Afvigelse fra indlægssedlen til QF-CMV kan forårsage fejlagtige resultater. Læs instruktionerne grundigt inden brug.

- Kittet må ikke anvendes, hvis en eller flere af reagensflaskerne viser tegn på beskadigelse eller lækage inden brug.
- ELISA-reagenser fra andre QF-CMV-ELISA-kitbatches må ikke blandes eller anvendes.
- Bortskaf ubrugte reagenser og biologiske prøver i henhold til lokale, regionale og nationale bestemmelser.
- Hverken QF-CMV-blodprøvetagningsrør eller QF-CMV-ELISA-kits må anvendes efter udløbsdatoen.

Der anvendes følgende blodprøvetagningsrør til QF-CMV:

1. Nil Control (Negativ kontrol) (grå hætte)
2. CMV Antigen (CMV-antigen) (blå hætte)
3. Mitogen Control (Mitogen-kontrol) (lilla hætte)

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

Følgende procedurer bør følges for at opnå optimale resultater:

- 1. For hver patient opsamles 1 ml blod ved venepunktur direkte i hvert af QF-CMV-blodprøvetagningsrørene.**
 - Eftersom 1 ml rør aftapper blod relativt langsomt, skal røret beholdes på kanylen i 2-3 sekunder, når røret ser ud til at være helt fyldt, for at sikre, at der udtækkes det korrekte volumen.
Det sorte mærke på siden af rørene angiver 1 ml fyldningsvolumenet. QF-CMV-blodprøvetagningsrør er godkendt til volumener i intervallet fra 0,8 til 1,2 ml. Hvis blodniveauet i et eller flere af rørene ikke er tæt på indikatorstregen, anbefales det at fremskaffe en anden blodprøve.
 - QF-CMV-blodprøvetagningsrør er godkendt til aftapning af mellem 0,8 ml og 1,2 ml i højder fra havniveau til 810 meter (2650 feet). Over denne højde bør brugerne sikre, at der til hvert rør aftappes blod inden for disse grænser. Hvis der aftappes for lidt blod, kan der udtages blod med en sprøjte og overføres 1 ml til hvert af de 3 rør. Af sikkerhedsmæssige årsager gøres dette bedst ved at fjerne sprøjtekanylen under overholdelse af passende sikkerhedsprocedurer, fjerne hæfterne fra de tre QF-CMV-rør og tilsætte 1 ml blod til hvert af dem (op til det sorte mærke på siden med røretiketten). Sæt hæfterne godt fast på rørene igen, og bland som beskrevet nedenfor.
 - Hvis der anvendes en sommerfuglekanyle til udtagning af blod, bør der anvendes et "gennemskylningsrør" for at sikre, at slangen fyldes med blod inden brug af QF-CMV-blodprøvetagningsrørene.
- 2. Straks efter påfyldning af rørene skal de rystes ti (10) gange lige akkurat kraftigt nok til at sikre, at hele indersiden af hvert rør er dækket af blod, så antigenerne på indersiden af røret opløses.**
 - Rørene skal holdes på mellem 17 °C og 25 °C, når de fyldes.
 - For kraftig rystning af rørene kan skabe gel-forstyrrelser og forårsage afvigende resultater.

3. Mærk rørene korrekt.
4. Rørene skal overføres til en $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubator så hurtigt som muligt og inden for 16 timer efter prøvetagning. Blodprøverne må ikke nedkøles eller -fryses.

Brugsvejledning

Stadie 1 – Inkubering af blod og opsamling af plasma

1. Hvis blodet ikke inkuberes straks efter prøvetagning, skal blanding af rørenes indhold gentages umiddelbart inden inkubering, som beskrevet i Trin 2 i det foregående afsnit.
2. Inkuber rørene STÅENDE ved 37 °C i 16 til 24 timer. Inkubatoren behøver ikke CO_2 eller befugtning.
3. Efter inkubering kan blodprøvetagningsrørene holdes mellem 2 °C og 27 °C i op til 3 dage inden næste trin. Efter inkubering af rørene ved 37 °C centrifugeres de i 15 minutter ved 2000 til 3000 RCF (g). Gelproppen skiller cellerne fra plasmaet. Hvis dette ikke sker, bør rørene recentrifugeres ved højere hastighed.
 - Det er muligt at opsamle plasmaet uden centrifugering, men der kræves større forsigtighed for at fjerne plasmaet uden at hvirvle cellerne op.
4. Efter centrifugering skal det undgås at pipettere op og ned eller på nogen måde blande plasmaet inden opsamling. Pas til enhver tid på ikke at hvirvle materialet på gelens overflade op.
 - Plasmaprøver bør kun opsamles ved brug af en pipette.
 - Plasmaprøverne kan overføres direkte fra centrifugerede blodprøvetagningsrør til QF-CMV-ELISA-pladen, også når der anvendes automatiserede ELISA-arbejdsstationer.
 - Plasmaprøverne kan opbevares i op til 28 dage ved 2 °C til 8 °C . Efter opsamling kan plasmaet også opbevares i længere perioder i rør eller plasmaopbevaringsbeholdere ved mindre end -20 °C (fortrinsvis mindre end -70 °C).

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

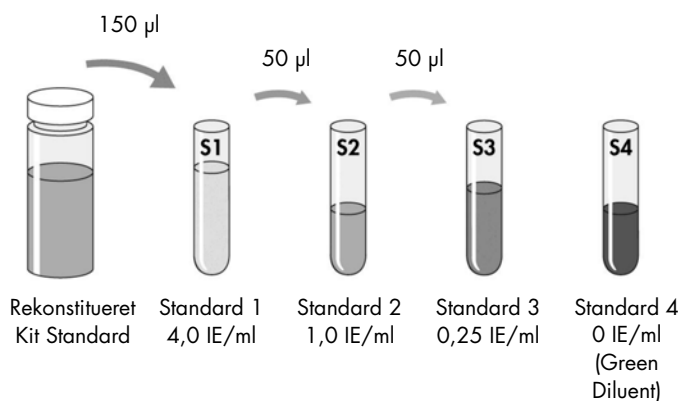
1. Alle plasmaprøver og reagenser, bortset fra Conjugate 100X Concentrate (Konjugat 100x koncentrat), skal bringes til stuetemperatur (17 °C til 27 °C) inden brug. Afsæt mindst 60 minutter til temperaturudligning.
2. Fjern de strips, der ikke er påkrævet, fra rammen, genforsegl dem i folieposen, og opbevar dem i køleskabet, indtil de skal bruges.

Anvend mindst én strip til QF-CMV-ELISA-standarderne og et tilstrækkeligt antal strips i forhold til det antal patienter, der skal testes. Gem rammen og låget efter brug med henblik på brug sammen med de resterende strips.
3. Rekonstituer den frysetørrede Kit Standard (Kitstandard) med det volumen deioniseret eller destilleret vand, som er angivet på etiketten på Standard-hætteglasset. Bland forsigtigt for at minimere skumdannelse og sikre fuldstændig genopløsning. Rekonstituering af Standard (Standarden) til det angivne volumen vil give en opløsning med en koncentration på 8,0 IE/ml.

4. Standard Curve (Standardkurven) frembringes ved brug af 3 fortyndinger af Kit Standard og, som Standard 4 (0 IE/ml), Green Diluent (Grøn diluent) alene.

Anvend den rekonstituerede Kit Standard til at frembringe en fortyndingsserie med 3 IFN- γ -koncentrationer. Fortynd i kittets Green Diluent (GD) (se figur 1). Standarderne bør som minimum analyseres med dobbeltbestemmelse; følgende trin genererer et tilstrækkeligt volumen til dette.

- Mærk 4 rør "S1", "S2", "S3", "S4".
- Tilsæt 150 μ l Green Diluent til 4 rør (S1-S4).
- Tilsæt 150 μ l Kit Standard til S1 og bland grundigt.
- Overfør 50 μ l fra S1 til S2 og bland grundigt.
- Overfør 50 μ l fra S2 til S3 og bland grundigt.
- Green Diluent alene fungerer som nulstandard (S4).



Figur 1. Frembringelse af standardkurve. Fremstil friske fortyndinger af Kit Standard til hver ELISA-session.

- Rekonstituer frysetørret QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate med 0,3 ml deioniseret eller destilleret vand. Bland forsigtigt for at minimere skumdannelse og sikre fuldstændig opløsning af Conjugate (Konjugatet).**
- Konjugat med brugsstyrke fremstilles ved at fortynde den påkrævede mængde rekonstitueret Conjugate 100X Concentrate i Green Diluent som angivet i tabel 1 – Fremstilling af konjugat med brugsstyrke.**
 - Bland grundigt, men forsigtigt for at undgå skumdannelse.
 - Sæt ubrugt Conjugate 100X Concentrate på køl igen ved 2 °C til 8 °C straks efter brug.
 - Brug kun Green Diluent.

Tabel 1. Fremstilling af konjugat med brugsstyrke

Antal strips	Volumen af Conjugate 100X Concentrate	Volumen af Green Diluent
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

7. **Inden analyse bør plasmaoprøver blandes for at sikre, at IFN- γ er jævnt fordelt i hver prøve. Fortynd også CMV- og Mitogen-plasmaoprøver 1/10 i Green Diluent (10 µl plasma blandes med 90 µl GD), hvis der kræves kvantitative resultater. Nil (Negativ kontrol)-plasma bør ikke fortyndes.**

Det anbefales at teste følgende prøver:

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

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

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

8. **Tilsæt 50 µl friskfremstillet konjugat med brugsstyrke til de påkrævede ELISA-brønde ved brug af en flerkanalpipette.**
9. **Tilsæt 50 µl testplasmaoprøver til de relevante brønde ved brug af en flerkanalpipette. Tilsæt til sidst 50 µl af hver af Standard 1 til 4.**
10. **Bland konjugatet og plasmaoprøver/standarder grundigt ved brug af en mikropaladeryster i 1 minut.**
11. **Dæk hver plade med et låg, og inkuber dem ved stuetemperatur (17 °C til 27 °C) i 120 ± 5 minutter.**
- Pladerne bør ikke udsættes for direkte sollys under inkuberingen.

12. **Mens inkuberingen foregår, fortyndes én del Wash Buffer 20X Concentrate (Vaskebuffer 20x koncentrat) med 19 dele deioniseret eller destilleret vand, hvorpå det blandes grundigt. Der er leveret tilstrækkeligt Wash Buffer 20X Concentrate til fremstilling af 2 liter vaskebuffer med brugsstyrke.**

Vask brøndene med **400 µl** vaskebuffer med brugsstyrke i mindst 6 cyklusser. Det anbefales at benytte en automatiseret pladevasker.

 - Grundig vask er meget vigtig for analysens ydeevne. Sørg for at fylde alle brønde **helt op til kanten** med vaskebuffer i hver eneste vaskecyklus. En iblødsætningsperiode på mindst 5 sekunder mellem hver cyklus anbefales.
 - Der bør tilsættes laboratoriedesinfektionsmiddel af standardtype til spildevandsreservoiret, og fastlagte procedurer for dekontaminering af potentielt infektiøst materiale bør følges.
13. **Bank pladerne let med oversiden nedad mod absorberende klæde for at fjerne resterende vaskebuffer. Tilsæt 100 µl Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratopløsning) til hver brønd, og bland grundigt ved brug af en mikropladeryster.**
14. **Dæk hver plade med et låg, og inkuber dem ved stuetemperatur (17 °C til 27 °C) i 30 minutter.**
 - Pladerne bør ikke udsættes for direkte sollys under inkuberingen.
15. **Når der er inkuberet i 30 minutter, tilsættes 50 µl Enzyme Stopping Solution (Enzymstandsningsopløsning) til hver brønd, hvorpå der blandes.**
 - Enzyme Stopping Solution bør tilsættes til brøndene i samme rækkefølge og med ca. samme hastighed som substratet i trin 13.
16. **Mål Optical Density (OD, Optisk densitet) for hver brønd inden for 5 minutter efter standsning af reaktionen ved brug af en mikropladelæser forsynet med et 450 nm filter og et 620 nm til 650 nm referencefilter. OD-værdier anvendes til beregning af resultater.**

Beregninger og testfortolkning

QuantiFERON-CMV-analysesoftware til analyse af rådata og beregning af resultater kan fås fra QIAGEN på www.QuantiFERON.com.

Softwaren udfører en kvalitetskontrolvurdering af analysen, genererer en standardkurve og leverer et testresultat for hver patient, som beskrevet i afsnittet Fortolkning af resultater.

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

Generering af standardkurve

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

Konstruer en $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardkurve ved at afbilde $\log_{(e)}$ af den gennemsnitlige OD (y-aksen) mod $\log_{(e)}$ af IFN- γ -koncentrationen i standarderne i IE/ml (x-aksen), idet nulstandard udelades fra disse beregninger. Beregn den bedst tilpassede linje for standardkurven ved regressionsanalyse.

Benyt standardkurven til at bestemme IFN- γ -koncentrationen (IE/ml) for hver af testplasma prøverne ved brug af OD-værdien for hver prøve.

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

Kvalitetskontrol af testen

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

Følgende er nødvendigt, for at ELISA er gyldig:

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

Hvis ovennævnte kriterier ikke er opfyldt, er kørslen ugyldig og skal gentages.

Den gennemsnitlige OD-værdi for Zero Standard (Green Diluent) [Nulstandarden (Grøn diluent)] bør være $\leq 0,150$. Hvis den gennemsnitlige OD-værdi er $> 0,150$, bør pladevaskeproceduren undersøges nærmere.

Fortolkning af resultater

QuantiFERON-CMV-resultater fortolkes ved brug af følgende kriterier:

CMV minus Nil (IE/ml)*	Mitogen minus Nil (IE/ml)	QF-CMV-resultat	Rapport/fortolkning
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Ikke-reaktiv	Anti-CMV-immunitet IKKE påvist
$\geq 0,2$	Alle værdier	Reaktiv	Anti-CMV-immunitet påvist
$< 0,2$	$< 0,5$	Ubestemmelig [†]	Resultat ubestemmeligt med hensyn til CMV-følsomhed

* Det er almindeligt forekommende, at IFN- γ -responser på den CMV Antigen (CMV-antigen)- og Mitogen-positive kontrol er uden for mikropladelæserens interval. Dette har ingen betydning for kvalitative resultater.

[†] Se afsnittet Fejlfinding vedrørende mulige årsager.

Begrænsninger

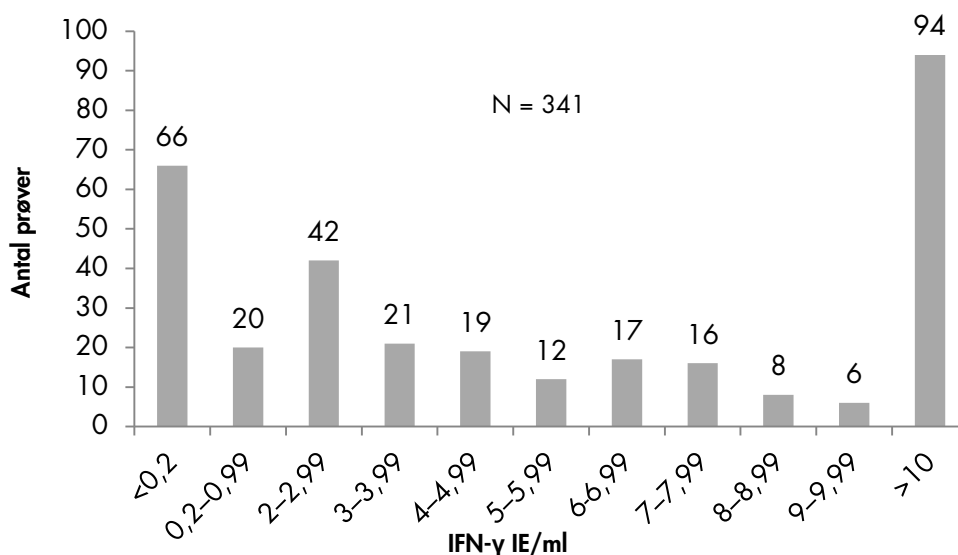
Resultaterne af QuantiFERON-CMV-test skal anvendes i sammenhæng med hver enkelt persons epidemiologiske anamnese, aktuelle helbredstilstand, og andre diagnostiske vurderinger.

Upålidelige eller ubestemmelige resultater kan forekomme som følge af:

- Afvigelse fra den procedure, der er beskrevet i indlægssedlen.
- For høje niveauer af IFN- γ i Nil-røret.
- Mere end 16 timer fra blodprøvetagning til inkubering ved 37 °C.

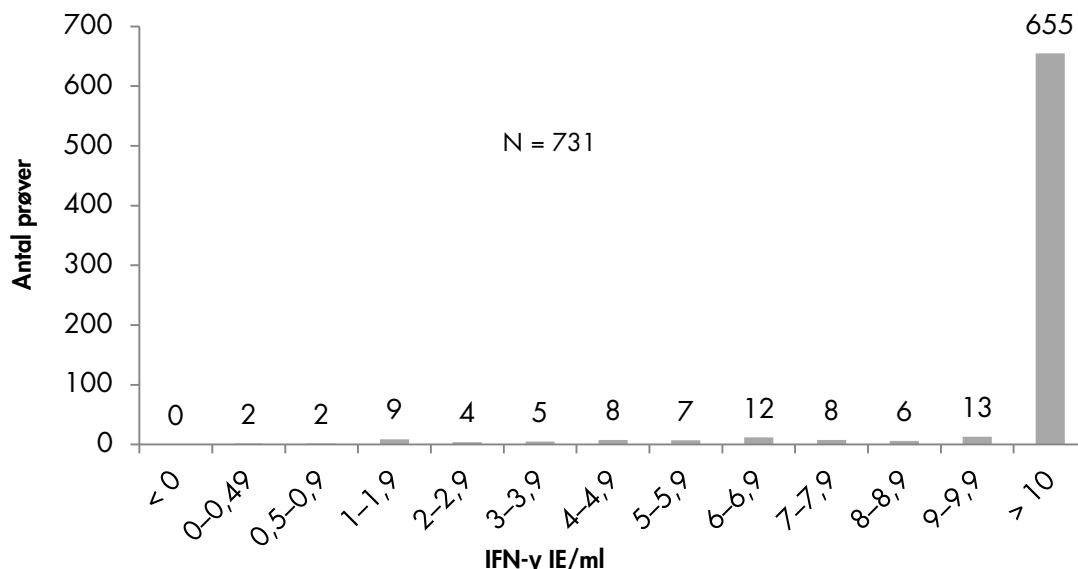
Forventede værdier

Forventede IFN- γ -værdier ved brug af QuantiFERON-CMV blev opnået ved test af 591 prøver fra raske voksne, hvoraf 341 var CMV-seropositive, og 250 var seronegative. Hos de 250 raske voksne uden CMV-infektion, som bestemt ved anti-CMV-serologi (CMV-seronegative), blev der hos 100 % af personerne udløst IFN- γ -respons på < 0,2 IE/ml på CMV Antigen (CMV-antigen)-røret (minus Nil). Fordelingen af CMV Antigen-rør (minus Nil) for de 341 raske personer med CMV-infektion, som bestemt ved anti-CMV-serologi (CMV-seropositive), er vist i figur 2.



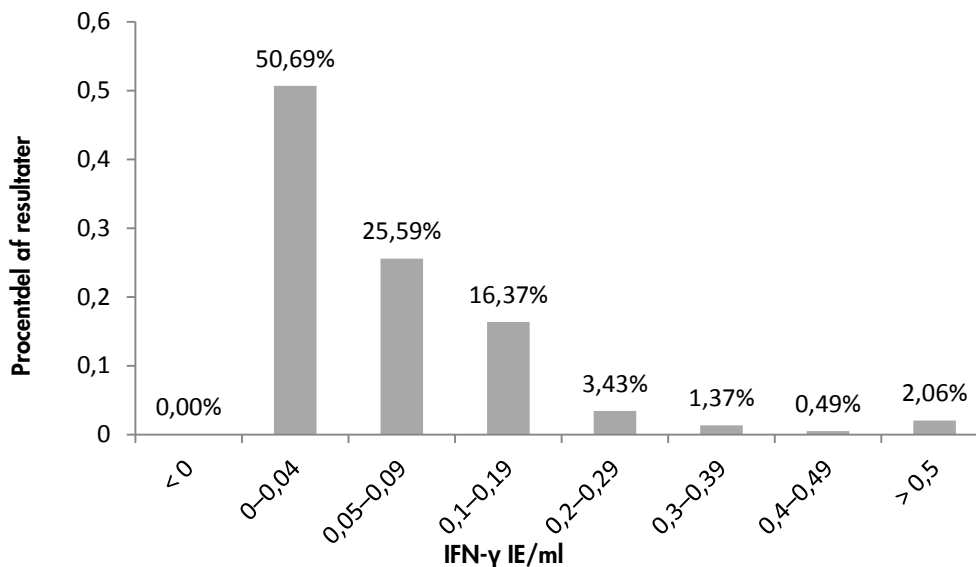
Figur 2. Fordeling af IFN- γ -respons på CMV-Nil hos seropositive raske personer (n = 341).

Fordelingen af Mitogen (minus Nil-baggrund)-resultater for 731 normale blodprøver fra raske voksne, uanset kendt CMV-infektion, er vist i figur 3. Et Mitogen (minus Nil)-resultat på mindre end 0,5 IE/ml indikerer enten testfejl, eller at personen er i immunkompromitteret tilstand. I en rask population faldt kun 2/731 resultater i denne kategori.



Figur 3. Fordeling af IFN- γ -responsen på Mitogen-Nil hos raske voksne (n = 731).

Forventede værdier for Nil-rør er vist i figur 4. Dataene stammer fra 1020 plasmaprøver fra raske voksne testet ved brug af QuantiFERON-CMV-ELISA.



Figur 4. Fordeling (udtrykt som % af population) af IFN- γ -responsen på Nil hos raske voksne (n = 1020).

Ydelseskarakteristika

Sammenlignende test

En testtærskel for påvisning af tidligere CMV-eksponering ved brug af QF-CMV blev fastlagt efter analyse af resultater for en gruppe raske personer (n = 223), hvor QF-CMV-resultater blev sammenlignet med CMV-serologieresultater. Det blev ved ROC-analyse fastslået, at en testtærskel på 0,04 IE/ml (efter nil-fratrækning) gav optimale positive og negative prædiktive værdier for QF-CMV (areal under kurven = 0,9679 [95 % CI = 0,9442 til 0,9915, $p < 0,0001$]) og dermed repræsenterede tærsklen, hvor denne analyse kunne udnyttes mest effektivt til sin tilsigtede brug i en rask population.

Ved sammenlignende test blev QF-CMV's ydeevne sammenlignet med SeraQuest-CMV-IgG-serologitesten (Quest International). QF-CMV-analysen udviste ved sammenligning 95 % (294/310 personer) overensstemmelse med anti-HCMV-serologitesten hos raske personer, idet ingen af de 149 seronegative donorer udviste reaktivitet ved QF-CMV, og 145 ud af 161 seropositive donorer udviste et reaktivt IFN- γ -respons. Den samlede positive overensstemmelse var 90 %, og den negative overensstemmelsesværdi var 100 %. Overensstemmelsesniveauet mellem IFN- γ -responsen på CMV-peptider hos raske frivillige, som målt med QF-CMV, og anti-CMV-serologistatus for disse personer bestemt ved brug af SeraQuest-CMV-IgG-serologitesten er vist i tabel 2.

Tabel 2. Overensstemmelse mellem QuantiFERON-CMV og CMV-IgG-serologitest hos raske personer.

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

Analysetærskel

Den anbefalede kliniske testtærskel for denne analyse er 0,2 IE/ml i CMV Antigen (CMV-antigen)-røret (minus Nil), omend der kan godkendes forskellige tærskler til forskellige kliniske miljøer. Dette skyldes de fundamentale immunologiske forskelle mellem en normal testpopulation og populationer, for hvilke testen anses for klinisk nyttig – specifikt immunsupprimerede personer, der som følge af immunsuppression har risiko for at udvikle symptomatisk CMV-infektion og/eller -sygdom. For sådanne personer med høj risiko beror QF-CMV's kliniske anvendelighed på præcis påvisning af niveauet af anti-CMV-immunitet hos disse personer, eftersom manglende immunitet kan være associeret med udvikling af CMV-sygdom (1-5, 7, 8, 11-16).

Kliniske undersøgelser

Da der ikke findes en endelig standard for bekræftelse eller udelukkelse af diagnosen cytomegalovirus-infektion, kan et estimat af følsomheden og specificiteten for QF-CMV ikke vurderes i praksis. Tilnærmet specificitet og følsomhed af QF-CMV blev bestemt ved at vurdere niveauet af overensstemmelse mellem IFN- γ -respons på CMV-peptider, som målt med QF-CMV hos raske frivillige, og anti-CMV-serologistatus for disse personer ved brug af en CMV-IgG-serologitest.

Tilnærmet specificitet af QF-CMV blev bestemt ved at vurdere falsk-positive rater (reaktivt QF-CMV-respons) hos raske frivillige uden tegn på tidligere CMV-eksponering (CMV-seronegative personer). Tilnærmet følsomhed blev bestemt ved at vurdere raske frivillige med tegn på tidligere CMV-eksponering (CMV-seropositive personer). Selv om QF-CMV benytter et stort antal CMV-specifikke epitoper fra forskellige CMV-proteiner og dermed har bred klinisk anvendelighed til et stort befolkningsudsnit med forskellige HLA-klasse I-haplotyper, har disse peptider ikke 100 % dækning. Eftersom HLA-haplotyperne hos personer testet i forhold til CMV-serologi var ukendt, var det forventet, at der for en lille procentdel af de serologipositive personer ikke ville være reaktion på QF-CMV-rørene.

Specificitet

I en undersøgelse udført hos raske personer uden tegn på tidligere CMV-eksponering (CMV-seronegative personer, hvor $n = 250$) blev der fundet et niveau af overensstemmelse mellem IFN- γ -respons på CMV-peptider, som målt med QF-CMV, og anti-CMV-serologi-information på 100 %.

I alle andre specificitetsvurderinger udført hos modtagere af hele organtransplantater (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), modtagere af hæmatopoietiske stamcelletransplantater (7, 13) og hiv-smittede patienter (2) er der konsekvent påvist et niveau af overensstemmelse mellem IFN- γ -respons på CMV-peptider, som målt med QF-CMV og anti-CMV-serologi, på 100 %.

Følsomhed

I en undersøgelse udført hos raske personer med tegn på tidligere CMV-eksponering (CMV-seropositive personer, hvor $n = 341$) blev der fundet et niveau af overensstemmelse mellem IFN- γ -respons på CMV-peptider, som målt med QF-CMV, og anti-CMV-serologi på 80,6 % (275/341). Den observerede uoverensstemmelse kan skyldes brugen af den højere testtærskel (0,2 IE/ml), falsk-positiv CMV-serologi eller personernes manglende reaktion på CMV-peptiderne i analysen.

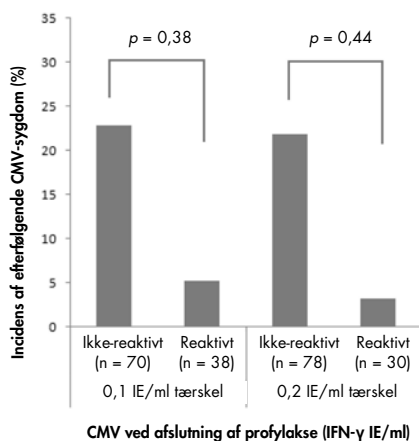
I følsomhedsvurderinger udført hos modtagere af hele organtransplantater (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), modtagere af hæmatopoietiske stamcelletransplantater (7, 13) og hiv-smittede patienter (2) er der fundet lidt lavere niveauer af overensstemmelse mellem IFN- γ -respons på CMV-peptider, som målt med QF-CMV, og CMV-seropositive respons hos disse patienter. Det lavere niveau af overensstemmelse kan skyldes enten falsk-positiv CMV-serologi, patienternes manglende reaktion på CMV-peptiderne i analysen eller fraværet af reaktive T-celler hos disse patienter som følge af deres immunsuppression.

Undersøgelser, som fremhæver den kliniske anvendelighed

For både serologi og QF-CMV er den tilsigtede brug beskrevet som muliggørelse af påvisning af immunitet over for CMV. I et transplantationsmiljø anvendes CMV-serologi hyppigt før transplantation for at fastlægge risikoen for, at der opstår CMV-komplikationer hos modtageren efter transplantation, men testmetoden har begrænset værdi efter transplantation. Alternativt kan QF-CMV anvendes hos transplantatmodtagere til vurdering af niveauet af CMV-immunitet hos de patienter, som har risiko for at udvikle symptomatisk CMV-infektion og/eller -sygdom som følge af immunsuppression (6, 9-11).

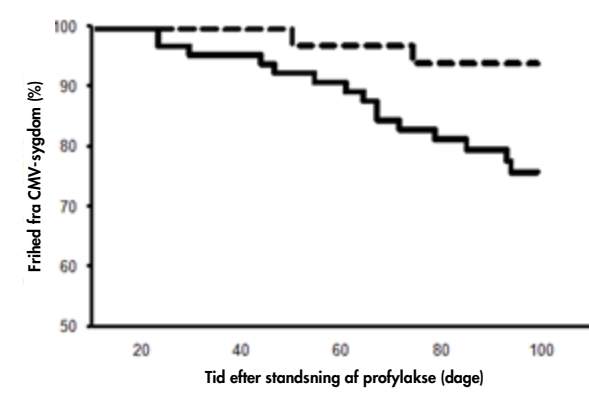
En række offentliggjorte kliniske undersøgelser for flere forskellige transplantatkohorter har nu påvist anvendeligheden af QuantiFERON-CMV (1-5, 7, 8, 11-16).

I en stor undersøgelse med 108 modtagere af hele organtransplantater (4) havde patienter med et reaktivt QF-CMV-resultat ved afslutningen af anti-CMV-profylakse en væsentligt lavere rate af sent debuterende sygdom sammenlignet med dem med et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat (5,3 % i forhold til 22,9 %, $p = 0,044$) (figur 5).



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

Endvidere forblev patienter med et reaktivt QF-CMV-testresultat efter afslutningen af profylakse fri for CMV-sygdom oftere og i længere tid (figur 6), hvilket indikerer, at QF-CMV kan anvendes til at identificere dem, der har risiko for at udvikle sent debuterende CMV-sygdom.

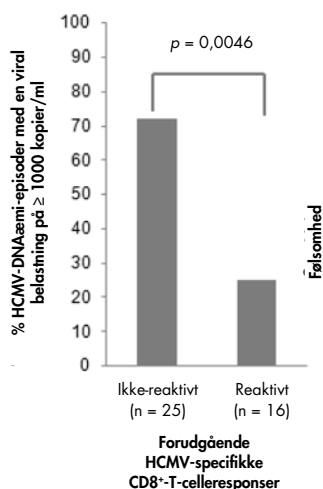


Figur 6. Tid til udvikling af CMV-sygdom hos patienter med et reaktivt QuantiFERON-CMV-resultat (fremhævet med stiplede linje) i forhold til et ikke-reaktivt QuantiFERON-CMV-resultat (fremhævet med en fuldt optrukket linje) ved afslutningen af profylakse. Data gengivet fra Kumar et al.(4)

Denne undersøgelse fremhævede også, at i kohorten med transplantationspatienter med den højeste risiko for udvikling af CMV-sygdom (CMV-seronegative transplantatmodtagere, som modtog et organ fra en CMV-seropositiv donor, dvs. D+/R-) var et reaktivt QF-CMV-resultat til enhver tid efter profylakse associeret med 90 % chance for at forblive fri for CMV-sygdom.

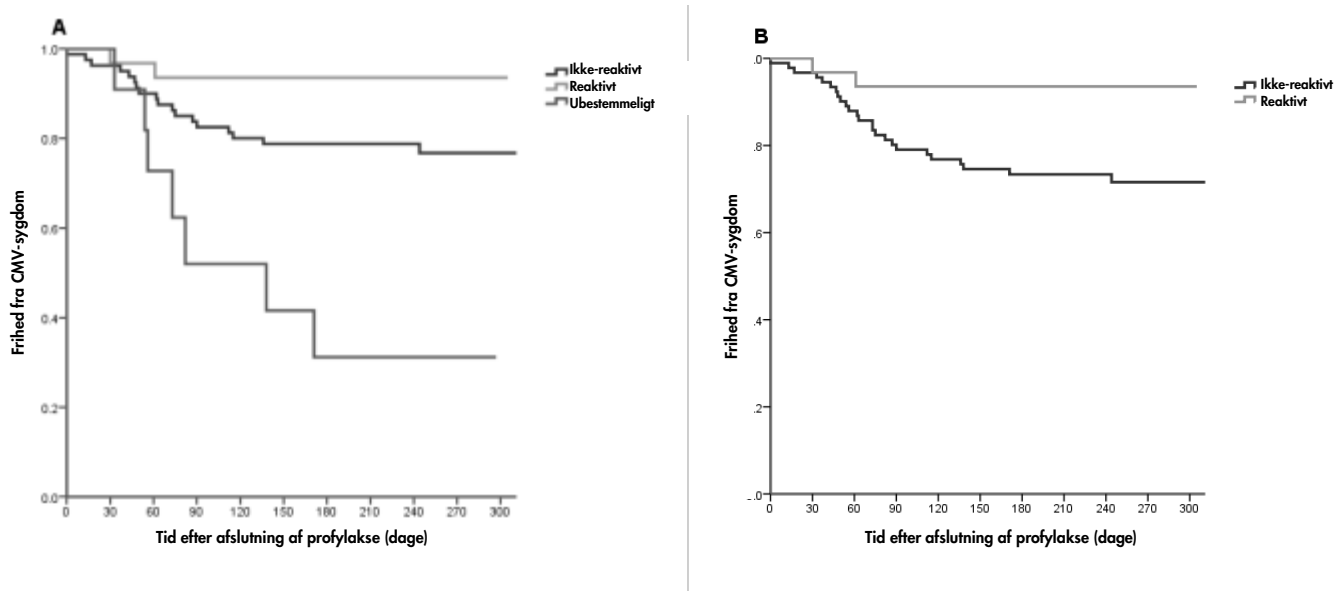
I en undersøgelse med 37 modtagere af hele organtransplantater (12) bidrog vurderingen af CMV-specifikke CD8⁺-T-celleresponser med QF-CMV til forudsigelse af spontan viral clearance i forhold til CMV-sygdomsprogression efter forhøjelser i CMV-viræmi. I denne undersøgelse opstod der spontan clearance af CMV-virus hos 24/26 patienter (92,3 %) med et reaktivt QF-CMV-resultat, mens samme udfald kun forekom hos 5/11 (45,5 %) patienter med et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat.

I en undersøgelse med 67 lungetransplantatmodtagere til vurdering af episoder af CMV-viræmi efter transplantation (14) blev det observeret, at 18/25 (72 %) episoder af CMV-viræmi forekom efter et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat, mens der forekom 4/16 (25 %) episoder efter et reaktivt QF-CMV-resultat (Fishers eksakte test, $p = 0,0046$, se figur 7).



Figur 7. Statistisk analyse af CMV-specifikke CD8⁺-T-celleresponser som påvist med QuantiFERON-CMV og udviklingen af CMV-viræmi (Fishers eksakte test, $p = 0,0046$). Data gengivet fra Weseslindtner et al (14).

I en stor prospektiv multicenterundersøgelse med 127 (D+/R-)modtagere af hele organtransplantater (15), som alle modtog antiviral profylakse, havde patienter med et reaktivt QF-CMV-resultat (ved brug af en 0,1 IE/ml testtærskel) til enhver tid efter afslutningen af anti-CMV-profylakse en væsentligt lavere rate af sent debuterende sygdom 12 måneder efter transplantation i forhold til dem med et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat og et ubestemmeligt resultat (6,4 % i forhold til henholdsvis 22,2 % og 58,3 %, $p < 0,001$). Ved klassificering af ubestemmelige resultater som også værende "ikke-reaktive" var incidensen af efterfølgende CMV-sygdom 6,4 % i forhold til 26,8 %, $p = 0,024$ (se figur 8). De positive og negative prædiktive værdier fra QF-CMV for beskyttelse mod CMV-sygdom var henholdsvis 0,90 (95 % CI 0,74-0,98) og 0,27 (95 % CI 0,18-0,37), hvilket indikerer, at et reaktivt QuantiFERON-CMV-resultat til enhver tid efter profylakse var associeret med en 90 % chance for at forblive fri for CMV-sygdom. I denne undersøgelse blev det påvist, at QF-CMV kan være brugbar til at forudsige, om patienter har lav, mellemhøj eller høj risiko for at udvikle CMV-sygdom efter profylakse.



Figur 8. Kaplan-Meier-kurver for incidensen af CMV-sygdom alt efter resultatet af QF-CMV-analysen.

A Henholdsvis reaktive, ikke-reaktive og ubestemmelige QF-CMV-resultater (log rank-test, $p < 0,001$).

B Reaktive i forhold til ikke-reaktive resultater, hvor ubestemmelige resultater blev anset for at være "ikke-reaktive" (log rank-test, $p = 0,024$).

I en prospektiv undersøgelse med 55 modtagere af hele organtransplantater (16), hvor forholdet mellem QF-CMV-resultater fundet før transplantation og CMV-replikationsepisoder opstået efter transplantation blev analyseret, viste det sig, at der blev observeret en højere incidens af CMV-replikation efter transplantation hos R(+)-modtagere, som havde et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat før transplantation (7/14 eller 50 %), end hos de R(+)-modtagere, som havde et reaktivt QF-CMV-resultat (4/30 eller 13,3 %).

I denne undersøgelse blev det påvist, at modtagere, som havde et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat før transplantation, og som modtog et organ fra en CMV-seropositiv donor, havde en ti gange større risiko for CMV-replikation end de modtagere, som havde et reaktivt QF-CMV-resultat før transplantation (justeret OR [Odds Ratio] 10,49, 95 % CI 1,88-58,46), og at en QF-CMV-analyse før transplantation kan være brugbar til at forudsige risikoen for CMV-replikation efter transplantation og dermed muliggøre individuel CMV-infektionsbehandling efter transplantation af et helt organ.

En række andre undersøgelser vedrørende påvisning af CMV-specifikke CD8⁺-T-celleresponser med QF-CMV i en kohorte af transplantatmodtagere, er gennemført (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) eller under udførelse verden over.

Internationale konsensusretningslinjer for håndtering af cytomegalovirus ved transplantation af hele organer

Vigtigheden af CMV-specifik immunmonitorering er anerkendt og offentliggjort i "International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation" (6). Disse internationale retningslinjer, som er udarbejdet af et panel af eksperter i CMV og transplantation af hele organer nedsat af The Infectious Diseases Section under The Transplantation Society, udgør konsensusretningslinjer, som er baseret på evidens og ekspertudtalelser, om CMV-håndtering inklusive: diagnostik, immunologi, forebyggelse og behandling.

I disse retningslinjer er det konkluderet, at immunmonitorering af CMV-specifikke T-celleresponser kan føre til forudsigelse af, hvilke individer, der har risiko for CMV-sygdom efter transplantation, og kan være brugbar til styring af profylakse og forebyggende behandlinger (6).

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

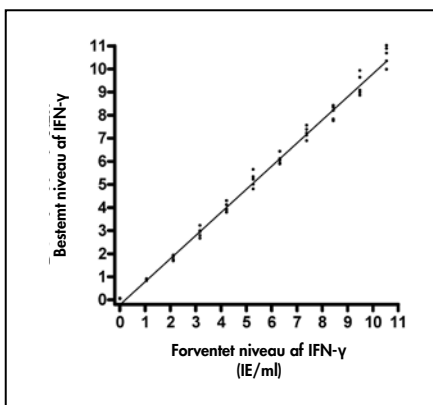
- Evne til at vurdere mængden og funktionen af en transplantatmodtagers CD4⁺- og CD8⁺-T-celler
- Evne til at måle IFN- γ
- Simpel at udføre, omkostningseffektiv og reproducerbar
- Kort analysetid
- Nem forsendelse af prøver til specialiserede henvisningslaboratorier

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

Analysens ydelseskarakteristika

Det er påvist, at metoden til at måle IFN- γ -koncentration med QF-CMV-ELISA er lineær fra nul til 10 IE/ml (figur 9). Linearitetsundersøgelsen blev gennemført ved at anbringe 5 replikater af 11 plasmapools med kendte IFN- γ -koncentrationer tilfældigt på ELISA-pladen.

QF-CMV-ELISA udviser ingen tegn på en prozoneeffekt ("højdosiskrogeffekt") for koncentrationer af IFN- γ på op til 100.000 IE/ml.



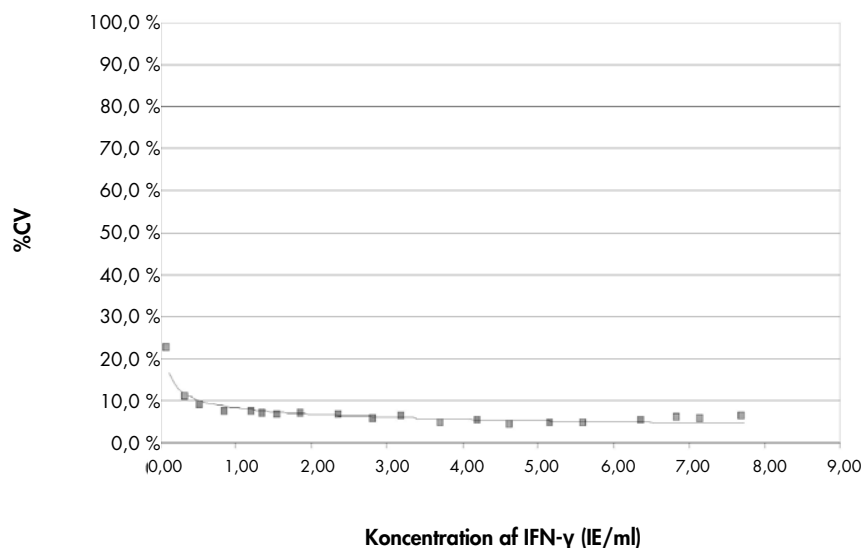
Figur 9. Linearitetsprofil for QF-CMV-ELISA bestemt ud fra test af 5 replikater af 11 plasmaprøver med kendte IFN- γ -koncentrationer. Den lineære regressionslinje har en hældning på $1,002 \pm 0,011$ og en korrelationskoefficient på 0,99.

Upræcised inden for og mellem analyser (%CV) for QF-CMV-ELISA blev estimeret ved test af 20 plasmaprøver med varierende IFN- γ -koncentrationer med tredobbeltestemmelse, i 3 laboratorier, på 3 ikke-fortløbende dage og udført af 3 operatører. Hver prøve blev således testet 27 gange og i 9 uafhængige analysekørsler. Den ene prøve var en Nil Control (Negativ kontrol) og havde en beregnet IFN- γ -koncentration på 0,08 (95 % CI 0,07-0,09) IE/ml. For de resterende 19 plasmaprøver var koncentrationsintervallet 0,33 (0,31-0,34) til 7,7 IE/ml (7,48-7,92).

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

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

Præcisionsprofilen for QF-CMV-ELISA er vist i figur 10 og indikerer, at upræcigheden ikke øges som funktion af stigende koncentration af IFN- γ .



Figur 10. Præcisionsprofil for QF-CMV-ELISA bestemt ud fra test af 20 plasmaoprøver med tredobbeltestemmelse, på 3 ikke-fortløbende dage, på 3 laboratorier og udført af 3 operatører. Tendenslinjen er en beregning baseret på mindste kvadraters tilpasning.

Der blev foretaget en undersøgelse for at fastlægge QF-CMV-testens reproducerbarhed ved brug af blodoprøver fra 8 personer med ukendt CMV-status. Der blev fra hver person indsamlet blod i tre sæt QF-CMV-rør (3x Nil, 3x CMV og 3x Mitogen). De tre sæt rør blev derpå inkuberet på tre forskellige teststeder (et sæt Nil, CMV og Mitogen pr. sted) som beskrevet i indlægssedlen. Efter 16-24 timers inkubering blev rørene centrifugeret, og plasmaet blev opsamlet.

Der blev efterfølgende udført ELISA tre gange på hvert af de tre teststeder, hvorved der blev genereret 3 QF-CMV-resultater for hver person pr. sted (i alt 9 resultater for de tre teststeder). Testene blev udført af tre forskellige operatører – én operatør pr. teststed. Pladerne til undersøgelsen havde ikke nødvendigvis samme lotnummer, men de blev alle brugt før deres respektive udløbsdatoer.

Reproducerbarhed med hensyn til både diagnostisk status (reaktivt, ikke-reaktivt eller ubestemmeligt resultat) og talværdi blev bestemt for hver blodoprøve. Reproducerbarheden af talværdien blev kun vurderet for reaktive prøver (udtrykt som %CV), da IFN- γ -niveauerne i "ikke-reaktive" prøver var for små til, at der kunne foretages et meningsfuldt præcisionsestimater.

Den diagnostiske reproducerbarhed var samlet set 100 %, idet QF-CMV-diagnostisk status for alle 8 frivillige blev reproduceret på alle teststeder ved alle test, og der ikke blev rapporteret ubestemmelige prøver. Reproducerbarheden for reaktive prøver var acceptabel, både inden for hvert teststed og mellem teststederne. Den gennemsnitlige %CV-værdi for hvert af teststederne var 4,5 % (Sted 1), 5,9 % (Sted 2) og 7,3 % (Sted 3). Samlet set var %CV-værdien på tværs af teststederne 5,9 % for alle 5 reaktive prøver. Procentværdier af variationskoefficienten på under 10 % anses for fremragende.

Teknisk information

Ubestemmelige resultater

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

- Mere end 16 timer fra blodprøvetagning til inkubering ved 37 °C.
- Opbevaring af blod uden for det anbefalede temperaturinterval (17 °C til 27 °C).
- Utilstrækkelig blanding af blodprøvetagningsrør.

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

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til Technical Information (Teknisk information) på: www.QuantiFERON.com. Kontaktinformation: Se side 28 og bagsiden.

Fejlfinding af ELISA

Lave aflæsningsværdier for optisk densitet for standarder

Mulig årsag	Løsning
a) Fejl ved fortynding af standard	Sørg for, at fortyndingerne af Kit Standard (Kitstandard) fremstilles korrekt i henhold til indlægssedlen.
b) Pipetteringsfejl	Sørg for, at pipetterne kalibreres og anvendes i henhold til producentens instruktioner.
c) For lav inkuberingstemperatur	Inkubering af ELISA bør ske ved stuetemperatur (17 °C til 27 °C).
d) For kort inkuberingstid	Inkubering af pladen med konjugatet, standarderne og prøverne bør ske i 120 ± 5 minutter. Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratopløsning) inkuberes på pladen i 30 minutter.
e) Brug af forkert pladelæserfilter	Pladen bør aflæses ved 450 nm med et referencefilter mellem 620 og 650 nm.
f) For kolde reagenser	Alle reagenser, med undtagelse af Conjugate 100X Concentrate (Konjugat 100x koncentrat), skal bringes til stuetemperatur inden påbegyndelse af analysen. Dette tager ca. 1 time.
g) Kittets/komponenternes udløbsdato er overskredet	Sørg for, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Sørg for, at rekonstitueret Standard og Conjugate 100X Concentrate anvendes inden for 3 måneder efter rekonstitueringsdatoen.

Uspecifik farveudvikling / høj baggrund

Mulig årsag	Løsning
a) Ufuldstændig vask af pladen	Vask pladen mindst 6 gange med 400 µl vaskebuffer pr. brønd. Alt efter hvilken vasker, der anvendes, kan der være behov for mere end 6 vaskecyklusser. Der bør være en iblødsætningsperiode på mindst 5 sekunder mellem hver cyklus.
b) For høj inkuberingstemperatur	Inkubering af ELISA bør ske ved stuetemperatur (17 °C til 27 °C).
c) Kittets/komponenternes udløbsdato er overskredet	Sørg for, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Sørg for, at rekonstitueret Standard og Conjugate 100X Concentrate anvendes inden for 3 måneder efter rekonstitueringsdatoen.
d) Kontamineret Enzyme Substrate Solution	Bortskaf substratet, hvis der er blåfarvning. Sørg for, at der anvendes rene reagensreservoirer.
e) Blanding af plasma i centrifugerør inden opsamling	Sørg for, at plasmaprøver opsamles forsigtigt oven over gelen uden at pipettere op og ned. Pas på ikke at hvirvle materialet på gelens overflade op.

Litteraturliste

1. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* **9**, 165.
2. Singh, K.P., Howard, J.L., Wild, S.P., Jones, S.L., Hoy, J., Lewin, S.R. (2007) Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of HCMV disease despite CD4+ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* **124**, 200.
3. Westall, G.P., Mifsud, N., Kotsimbos, T. (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. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**, 76.
6. Kotton, C.N., et al. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. 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.
8. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV Test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **42(9)**, 3574.
9. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* forhånds-onlinepublikation den 26. oktober 2010; doi:10.1038/nrneph.2010.
10. 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(10)**, 735.11.
11. Giulieri, S, Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11(1)**, 17.
12. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E., Humar, A. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93(2)**, 195.
13. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detecting and estimating the magnitude and functionality of the CMV-specific IFN- γ CD8+ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* Online forud for trykning den 29. februar 2012; doi: 10.1128/CVI.05633-111.
14. 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(8)**, 2172.
15. Manuel, O., et al. (2012) 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.* (Manuskript accepteret i november 2012).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Manuskript accepteret i november 2012).

Teknisk service

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ■ techservice-ap@qiagen.com

Europe ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

USA/Canada ■ techservice-na@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) ■ techservice-latam@qiagen.com

Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

Denne side er tom med vilje.

Forkortet testprocedure

Stadie 1 – inkubering af blod

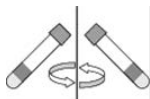
1. Udtag patientblod i blodprøvetagningsrør, og bland ved at ryste dem ti (10) gange lige akkurat kraftigt nok til at sikre, at hele indersiden af hvert rør er dækket af blod, så antigenerne på indersiden af røret opløses.



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



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



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



Stadie 2 – IFN- γ -ELISA

1. Lad ELISA-komponenterne, med undtagelse af Conjugate 100X Concentrate (Konjugat 100x koncentrat), temperaturudligne til stuetemperatur. Det tager mindst 60 minutter.



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

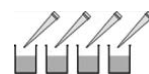


3. Rekonstituer frysetørret Conjugate 100X Concentrate med destilleret eller deioniseret vand.

4. Fremstil konjugat med brugsstyrke i Green Diluent (Grøn diluent) og tilsæt 50 μl til alle brønde.



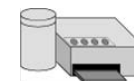
5. Tilsæt 50 μl testplasmaprøver og 50 μl standarder til de relevante brønde. Bland ved brug af en ryster.



6. Inkuber i 120 minutter ved stuetemperatur.



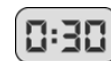
7. Vask brøndene mindst 6 gange med 400 μl Wash Buffer (Vaskebuffer) pr. brønd.



8. Tilsæt 100 μl Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratopløsning) til brøndene. Bland ved brug af en ryster.



9. Inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur.



10. Tilsæt 50 μl Enzyme Stopping Solution (Enzymstandsningsopløsning) til alle brønde. Bland ved brug af en ryster.



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



12. Analysér resultaterne.



Varemærker: QIAGEN®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

Begrænset licensaftale for QuantiFERON-CMV-ELISA-kit

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

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

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, alle rettigheder forbeholdes.

Phone: (Australia) +613- 9840-9800, (Europe) +49-2103-29-12000, (USA) 1-800-362-7737

E-mail: quantiferon@cellestis.com

