
QuantiFERON[®]-CMV -pakkausseloste Σ 2 x 96

Kokoveren interferoni-gammatesti sytomegalovirus-
peptidien antigeenien mittaamiseen

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Puhelin: (Australia) +613-9840-9800, (Eurooppa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, SAKSA

1075110FI Rev. 01



Sisältö

Käyttötarkoitus	5
Johdanto	5
Testin periaatteet	6
Testin suorittamiseen vaadittava aika	6
Reagenssit ja varastointi	7
Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)	8
Säilytys ja käsittely	8
Varoitukset ja huomautukset	9
Näytteen ottaminen ja käsittely	10
Käyttöohjeet	11
Osio 1–Veren inkubointi ja plasman talteenotto	11
Osio 2–QuantiFERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN- γ	11
Laskennat ja testien tulkinta	14
Tulosten tulkinta	15
Rajoitukset	15
Odotusarvot	16
Suoritusarvot	17
Predikaattien testaus	17
Testin kynnysarvot	18
Kliiniset tutkimukset	18
Spesifisyys	18
Herkyys	19
Kliinistä käytettävyyttä valottavat tutkimukset	19
Kansainväliset ohjeet sytomegaloviruksen hoidosta elinsiirtopotilailla	22
Testin suoritusarvot	22
Teknisiä tietoja	24
Määrittelemättömät tulokset	24
Ongelmien ratkaisu	25

Kirjallisuutta	26
Tekninen huolto	27
Pikaohteet testin tekoon	30
Osio 1–veren inkubointi	30
Osio 2–IFN- γ ELISA	30

Käyttötarkoitus

QuantIFERON-CMV (QF-CMV) on in vitro -testi, joka käyttää ihmisen sytomegaloviruksen (CMV) proteiinia simuloivaa peptidisekoitusta, joka stimuloi soluja heparinoidussa kokoveressä. Interferoni-gamman (IFN- γ) tunnistamiseen käytetään entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä eli ELISA-testiä (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kvantifoimaan in vitro -vastauksia peptidiantigeeneihin, jotka liittyvät CMV-infektion immuunikontrolliin. Tämän immuunifunktion puuttuminen voidaan yhdistää CMV-taudin kehittymiseen. QF-CMV on tarkoitettu valvomaan potilaan anti-CMV-immuunitasoa.

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

Johdanto

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

QF-CMV:lla testataan CMI-vastetta peptidiantigeenien suhteen, ja ne simuloivat CMV-proteiineja. CMV-peptidit kohdistetaan CD8⁺ -T-soluihin, mukaan lukien A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 ja Cw6 (A30, B13) HLA Luokan I haplotyyppit, jotka kattavat > 98 % maailman väestöstä. CMV:n saaneilla on yleensä veressään CD8⁺ -lymfosyyttejä, jotka tunnistavat nämä antigeenit. Tähän tunnistamisprosessiin liittyy sytokiinin IFN- γ kehittymistä ja erittymistä. IFN- γ :n tunnistaminen ja sen jälkeinen kvantifointi muodosta tämän testin perustan.

Testin periaatteet

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

Mitogeeniputkea käytetään QF-CMV-testissä positiiviseen kontrolliin. Sitä suositellaan erityisesti, jos potilaan immuunistatuksesta ei ole varmuutta.

Putket on inkuboitava 37 °C:ssa mahdollisimman pian, kuitenkin 16 tunnin kuluessa näytteen ottamisesta. 16–24 tunnin inkuboinnin jälkeen putket lingotaan, plasma poistetaan ja IFN- γ (IU/ml) mitataan QF-CMV ELISA:lla.

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

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

Testi katsotaan reaktiiviseksi IFN- γ -vastauksen suhteen, kun CMV-antigeeniputken lukema on merkittävästi suurempi kuin Nil IFN- γ IU/ml-arvo. Mitogeenisimuloitu plasmanäyte toimii IFN- γ -positiivisena kontrollina jokaiselle testatulle näytteelle. Alhainen mitogeenivaste merkitsee epävarmaa tulosta, kun verinäytteen vaste on ollut ei-reaktiivinen CMV-antigeneille. Tämä tilanne saattaa tulla esiin lymfosyyttien määrän ollessa riittämätön tai kun niiden aktiivisuus on laskenut virheellisen näytteen käsittelyn vuoksi, mitogeeniputken väärän täyttämisen tai sekoittamisen takia tai jos potilaan lymfosyytit eivät kykene muodostamaan IFN- γ :a, kuten on asia kudossiirto-potilaille. Nolla-näyte säätty taustakorjauksen mukaan tai ei-spesifisesti IFN- γ :n mukaan verinäytteissä. IFN- γ -taso nolla-putkessa saadaan IFN- γ -tasosta CMV-antigeeniputkelle ja mitogeeniputkelle (lue kohta "tulosten tulkitseminen" tämän pakkausselosteen sivulta 15, jossa kerrotaan, kuinka QF-CMV-tuloksi tulkitaan).

Testin suorittamiseen vaadittava aika

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

verinäyteputkien inkubaatio 37 °C:ssa:	16–24 tuntia
ELISA:	Noin 3 tuntia 1 ELISA-levylle
	Alle 1 työ
	Lisää 10–15 minuuttia jokaista ylimääräistä levyä kohti

Reagenssit ja varastointi

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (CMV ja kontrolliantigeenin verinäyteputket (pakkaus vain yhden potilaan käyttöön))	
Luettelonumero	0192-0301
Preparaatioiden määrä	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON-nollakontrolli)(harmaa korkki)	1 putki
CMV Antigen (CMV-antigeeni) (sininen korkki)	1 putki
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogeenikontrolli) (punainen korkki)	1 putki
Pakkausseloste	1
QuantiFERON-CMV ELISA Components (QuantiFERON-CMV ELISA –komponentit)	
Luettelonumero	0350-0201
Kuoppalevyn stripit	24 x 8 kaivoliuskaa
Human IFN- γ Standard (Ihmisen IFN- γ standardi), kylmäkuivattu	1 x pullo
Green Diluent (vihreä laimennusaine)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantiFERON konjugaatti 100X tiiviste), kylmäkuivattu	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (QuantiFERON pesupuskuri 20X tiiviste)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON-entsyymialustaliuos)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON-entsyymin pysäytysliuos)	1 x 15 ml

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

- 37 °C:n inkubaattori, CO₂ ei tarvita
- Kalibroidut, muuttuvan tilaisuuden pipetit 10 µl - 1000 µl, kertakäyttökärjet
- Kalibroidut, monikanavaiset pipetit 50 µl - 100 µl, kertakäytfökärjet
- Levyn ravistelija
- Deionisoitu tai tislattu vesi, 2 litraa
- Levyn pesin (suosittelemme automaattista pesintä)
- Levyn lukija, jossa 450 nm:n suodatin ja 620 - 650 nm:n referenssisuodatin

Säilytys ja käsittely

Verinäyteputket

- Säilytä verinäyteputkia 4 ... 25 °C:n lämpötilassa.
- QuantiFERON-CMV-verenkeräysputkien käyttöaika on enintään 15 kuukautta valmistuspäivästä säilytettynä 4 ... 25 °C:n lämpötilassa.

ELISA-reagenssarjat

- Säilytä sarjaa 2 ... 8 °C:n lämpötilassa.
- Suojaa entsyymisubstraattiliuos suoralta auringonvalolta.

Käyttövalmiit ja käytetyt reagenssit

Ohjeet reagenssien sekoittamisesta on annettu kohdassa "Käyttöohjeet - osio 2 (vaiheet 3 ja 5 sivuilla 11 ja 12).

- Sekoitettua standardia voidaan säilyttää jopa 3 kuukautta, jos sitä säilytetään 2 ... 8 °C:n lämpötilassa.

Merkitse muistiin sarjan sekoittamispäivä.

- Sekoitettu, mutta käyttämätön QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantiFERON konjugaatti 100X tiiviste) on varastoitava 2 ... 8 °C:n lämpötilassa ja käytettävä 3 kuukauden kuluessa.

Merkitse muistiin konjugaatin sekoittamispäivä.

- Käyttövahvuinen konjugaatti on käytettävä 6 tunnin kuluessa valmistamisesta.
- Käyttövahvuinen pesupuskuri voidaan varastoida huoneenlämpöön (17 ... 27 °C) enintään 2 viikoksi.

Varoitukset ja huomautukset

Vain In Vitro -tutkimuskäyttöön.

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne saa verkosta kätevässä PDF-muodossa osoitteesta www.qiagen.com/safety, josta jokaisen QIAGEN-sarjan ja sarjan osan käyttöturvatietoita voi lukea ja tulostaa.



HUOMIO: Käsittele ihmisverta mahdollisesti infektoituneena.
Noudata asianmukaisia verenkäsittelyohjeita.

Seuraavat vaaraa ja turvallisuustoimenpiteitä osoittavat vakiolausekkeet koskevat QF-CMV ELISA -sarjan komponentteja.

QuantifERON Enzyme Stopping Solution (QuantifERON-entsyymin pysäytysliuos)



Sisältää rikkihappoa: Ärsyttävä. Vaara- ja turvalausekkeet R36/38, S26-36/37/39

- **Vihreä laimennusneste** sisältää normaalia hiirestä saatua seerumia ja kaseiinia, jotka saattavat laukaista allergisen reaktion. Varottava joutumasta iholle.

Kemiallisen vaaran uhatessa

aineen kaatumisen, vuotamisen tai onnettomuuden takia

CHEMTRECin päivystykseen voi soittaa koska tahansa

USA ja Kanada: 1-800-424-9300

Muut maat: +1-703-527-3887 (myös vastapuhelut)

Lisätietoja

Käyttöturvatiedotteet www.qiagen.com/safety

* R36/38: Ärsyttää silmiä ja ihoa, S26: Roiskeet silmistä huuhdeltava välittömästi runsaalla vedellä ja mentävä lääkäriin, S36/37/39: Käytettävä sopivaa suojavaatetusta, suojakäsineitä ja silmien- tai kasvonsuojainta.

Näytteen ottaminen ja käsittely

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat:

QF-CMV-pakkausselosteen ohjeista poikkeaminen voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Lue ohjeet huolellisesti ennen käyttöä.

- Älä käytä sarjaa, jos missään reagenssipullossa on merkkejä vaurioista tai vuodosta ennen käyttöä.
- Älä sekoita ELISA-reagensseja muiden QF-CMV ELISA -sarjan erien reagensseihin.
- Hävitä käyttämättömät reagenssit ja biologiset näytteet paikallisen viranomais määräysten mukaisesti.
- Älä käytä QF-CMV-verinäyteputkia tai QF-CMV ELISA -sarjoja niiden viimeisen käyttöpäivän jälkeen.

QF-CMV käyttää seuraavia verinäyteputkia:

1. Nil Control (nollakontrolli)(harmaa korkki)
2. CMV Antigen (CMV-antigeeni) (sininen korkki)
3. Mitogen Control (mitogeenikontrolli) (punainen korkki)

Antigeenit on kuivattu verinäyteputkien sisäseinälle, joten on ehdottoman tärkeää, että putkien sisältö sekoitetaan vereen huolellisesti. Putket on siirrettävä inkubaattoriin 37 °C:een mahdollisimman pian, kuitenkin 16 tunnin kuluessa näytteen ottamisesta.

Seuraavia toimenpideohjeita on noudatettava optimaalisten tulosten saavuttamiseksi:

1. Ota jokaiselta potilaalta 1 ml verta laskimopunktiolla suoraan kuhunkin QF-CMV-verinäyteputkeen.

- Koska veren ottaminen 1 ml:n putkella käy suhteellisen hitaasti, pidä putkea neulalla 2 - 3 sekuntia, kun putki näyttää olevan täynnä. Näin varmistat, että putkeen saadaan oikea määrä verta.
Putken sivulla oleva musta merkki osoittaa 1 ml:n täyttömäärän. QF-CMV-verinäyteputkilot on validoitu 0,8 - 1,2 ml:n määrille. Jos verimäärä ei jossain putkessa ole lähellä merkkiviivaa, suosittelemme uuden näytteen ottamista.
- QF-CMV-verinäyteputket on validoitu 0,8 - 1,2 ml:n määrille meren pinnan tasolta 810 metrin (2650 jalan) korkeuteen. Tätä korkeammalla on varmistettava, että verta saadaan jokaiseen putkeen rajojen sisäpuolella oleva määrä. Jos veren imeytymistä putkeen ei tapahdu, näyte voidaan ottaa ruiskulla, josta voidaan siirtää 1 ml verta kuhunkin 3 putkesta. Turvallisuussyistä se tapahtuu parhaiten poistamalla ruiskun neula ja varmistamalla, että käytössä ovat asianmukaiset turvatoimet, irrottamalla korkit kolmesta QF-CMV-putkesta ja lisäämällä 1 ml verta jokaiseen niistä (putken sivulla olevaan mustaan merkkiin asti). Kiinnitä putkien korkit kunnolla ja sekoita alla annettujen ohjeiden mukaan.
- Jos näytteen ottoon käytetään siipineulaa, on käytettävä "tyhjennysputkea" sen varmistamiseksi, että putki on täytetty verellä ennen QF-CMV-verinäyteputkien käyttöä.

2. Ravista putkia välittömästi niiden täytön jälkeen kymmenren (10) kertaa juuri sen verran, että putken koko sisäpinta on veren peitossa niin, että putken seinämällä olevat antigeenit pääsevät liukenemaan vereen.

- Putkien on oltava 17 ... 25 °C:n lämpötilassa täyttämisen aikana.
- Liian raju ravistaminen voi aiheuttaa geelin rikkoutumisen ja johtaa virheellisiin tuloksiin.

3. Kiinnitä putkiin asianmukaiset merkinnät.

4. Putket on siirrettävä inkubaattoriin 37 °C:een ± 1 °C mahdollisimman pian, kuitenkin 16 tunnin kuluessa näytteen ottamisesta. Verinäytteitä ei saa viedä jääkaappiin tai pakastaa.

Käyttöohjeet

Osio 1–Veren inkubointi ja plasman talteenotto

1. Jos verta ei inkuboida välittömästi näytteenoton jälkeen, putkia on sekoitettava uudelleen juuri ennen inkubointia edellisen kohdan vaiheen 2 mukaisesti.
2. Inkuboi putkia PYSTYASENNOSSA 37 °C:ssa 16 - 24 tuntia. Inkubaattori ei edellytä CO₂:n käyttöä tai kosteutusta.
3. Inkuboinnin jälkeen voidaan verinäyteputkia säilyttää 2 ... 27 °C:n lämpötilassa enintään 3 päivää ennen seuraavaa vaihetta. Kun putket on inkuboitu 37 °C:ssa, linkoa putkia 15 minuuttia 2000 - 3000 RCF (g). Geelitulppa erottelee solut plasmasta. Jos niin ei tapahdu, putket on lingottava uudelleen suuremmalla nopeudella.
 - Plasman talteenotto on mahdollista ilman linkoamista, mutta tällöin plasman keräämisessä on oltava erityisen huolellinen, etteivät solut rikkoudu.
4. Kun linkois on tehty, varo pipetin ylös ja alas suuntautuvaa liikettä tai plasman sekoittumista millään tavoin ennen sen talteenottoa. Varo aina rikkomasta geelin pinnalla olevaa materiaalia.
 - Plasmanäytteet on kerättävä ainoastaan pipetin avulla.
 - Plasmanäytteet voidaan ladata suoraan lingotuista näyteputkista QF-CMV ELISA -levyllä, myös silloin, kun käytössä on automaattinen ELISA-työasema.
 - Plasmanäytteitä voidaan varastoida enintään 28 päivää 2 ... 8 °C:n lämpötilassa tai talteen otettuna alle -20 °C (ei mielellään alle -70 °C), jos näytteet ovat pidemmän aikaa putkissa tai plasmasäiliöissä.

Osio 2–QuantifERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN-γ

1. Kaikki plasmanäytteet ja reagenssit paitsi Conjugate 100X Concentrate (konjugaatti 100X tiiviste) on tuotava huoneen lämpöön (17 ... 27 °C) ennen käyttöä. Anna tasoittua vähintään 60 minuuttia.
2. Irrota ylimääräiset liuskat kehyksestä, sulje ne takaisin foliopussiin ja vie jääkaappiin myöhempää tarvetta varten.

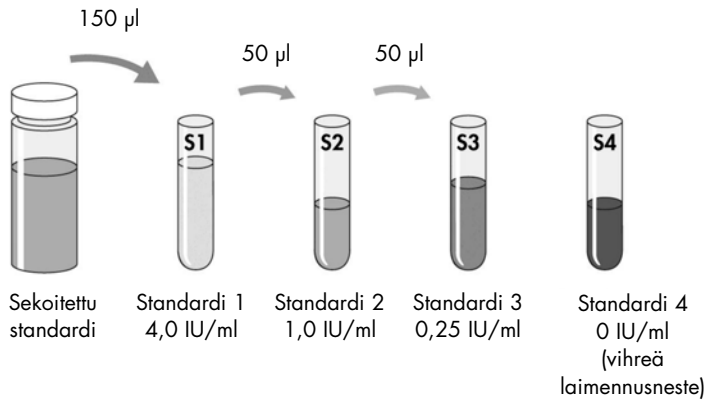
Varaa ainakin yksi liuska jokaiselle QF-CMV ELISA -mitalle ja riittävästi liuskoja testattaville potilaille. Palauta kehys ja kansi käytön jälkeen jäljellä olevien liuskojen käyttöön.

3. **Sekoita kylmäkuivattuun standardiin se määrä deionisoitua tai tislattua vettä, joka on merkitty tarraan standardipullon kyljessä. Sekoita varovasti vaahtoaminen minimoiden ja varmistatäydellinen liukeneminen. Ilmoitetun määrän sekoittaminen standardiin saa aikaan liuksen, jonka pitoisuus on 8,0 IU/ml.**
4. **Standardisuora laaditaan käyttämällä 3 laimennusta pelkällä vihreällä laimennusnesteellä, josta tulee standardi 4 (0 IU/ml).**

Tee sekoitetulla mitalla 3 laimennusta IFN-γ pitoisuuksista. Laimenna vihreä laimennusneste (GD) (katso kuva 1 seuraavalla sivulla). Määrittely on tehtävä vähintään kahdesta näytteestä. Seuraavia vaiheita noudattamalla käyttöön tulee siihen riittävä määrä.

- a. Merkitse 4 putkea merkinnöin "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Lisää 150 µl vihreää laimennusnestettä 4 putkeen (S1–S4).
- c. Lisää 150 µl sarjan standardia putkeen S1 ja sekoita huolellisesti.
- d. Siirrä 50 µl putkesta S1 putkeen S2 ja sekoita huolellisesti.

- e. Siirrä 50 µl putkesta S2 putkeen S3 ja sekoita huolellisesti.
 f. Pelkkä vihreä laimennusneste toimii nollastandardina (S4).



Kuva 1. Standardisuoran laatiminen. Tee tuoret laimennukset sarjan standardista jokaista ELISA-käsittelyä varten.

5. **Sekoita kylmäkuivattu QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantiFERON konjugaatti 100X tiiviste) ja 0,3 ml deionisoitua tai tislattua vettä. Sekoita varovasti vaahtoaminen minimoiden ja varmista konjugaatin täydellinen liukeneminen.**
6. **Konjugaatin työskentelyvoimakkuus valmistetaan laimentamalla riittävä määrä sekoitettua konjugaatti 100X tiivistettä vihreään laimennusnesteeseen, katso Taulukko 1 - Konjugaatin valmistaminen.**
 - Sekoita huolellisesti, mutta varo vaahtoamista.
 - Palauta käyttämätön Conjugate 100X Concentrate (konjugaatti 100X tiiviste) välittömästi käytön jälkeen 2 ... 8 °C:n lämpötilaan.
 - Käytä vain vihreää laimenninta.

Taulukko 1. Konjugaatin valmistaminen

Liuskojen määrä	Conjugate 100X Concentrate (konjugaatti 100X tiiviste), määrä	Vihreän laimentimen määrä
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

7. Ennen testiä on plasmata sekoitettava, jotta voidaan varmistaa, että IFN- γ on jakautunut tasaisesti kaikkialle näytteeseen. Laimenna myös CMV- ja mitogeeniplasmata vihreään laimennusnesteseen suhteessa 1/10 (10 µl plasmaa ja 90 µl GD), jos kvantitatiivisia tuloksia edellytetään. Nolla-pasmaa ei saa laimentaa. Suosittelemme testaamaan seuraavat näytteet:
- Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni (1/10)
- QuantiFERON-CMV-analyysiohjelmisto tukee kuitenkin myös seuraavia potilasnäytteitä:
- Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni
 - Nolla, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni (1/10)
 - Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni, CMV-antigeeni (1/10)
 - Nolla, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni
8. Lisää 50 µl juuri valmistettua, työskentelyvahvuista konjugaattia ELIS-kaivoihin käyttämällä monikanavapitettä.
9. Lisää 50 µl testiplasmaa asianmukaisesti kaivoihin käyttämällä monikanavapitettä. Lisää lopuksi 50 µl kutakin standardia 1 - 4.
10. Sekoita konjugaatti ja plasmanäytteet/standardit huolellisesti 1 minuutin ajan käyttämällä levyn ravistelijaa.
11. Peitä jokainen levy kannella ja inkuboi huoneenlämmössä (17 ... 27 °C) 120 ± 5 minuuttia.
- Levyt eivät saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana.

12. Laimenna inkuboinnin aikana yksi osa Wash Buffer 20X Concentrate (pesupuskuri 20X tiivistetty) ja 19 osaa deionisoitua tai tislattua vettä ja sekoita huolellisesti. Wash Buffer 20X Concentrate (pesupuskuri 20X tiiviste) riittää 2 litraan riittävän voimakasta vesipuskuria.
- Pese kaivot 400 µl pesupuskurilla (työskentelyvoimakkuus) vähintään 6 jakson ajan. Suosittelemme automaattista levynpesulaitetta.
- Huolellinen peseminen on erittäin tärkeää testin onnistumisen kannalta. Varmista, että jokainen kaivo on **kokonaan täynnä** pesupuskuria (reunaan asti) jokaisen pesujakson aikana. Suosittelemme vähintään 5 sekunnin liotusta jaksojen välissä.
 - Jätevesisäiliöön on lisättävä laboratoriodesinfiointiaainetta, ja vakiintuneita käytäntöjä on noudatettava mahdollisesti infektoivan materiaalin dekontaminaatioissa.
13. Käännä levyt alassuun imukykyiselle liinalle ylimääräisen pesupuskurin poistamiseksi. Lisää 100 µl entsyymisubstraattiliuosta jokaiseen kaivoon ja sekoita huolellisesti levyn ravistinta käyttämällä.
14. Peitä jokainen levy kannella ja inkuboi huoneenlämmössä (17 ... 27 °C) 30 minuuttia.
- Levyt eivät saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana.
15. Lisää 30 minuutin inkuboinnin jälkeen 50 µl entsyyminpysäytysliuosta jokaiseen kaivoon ja sekoita.
- Entsyyminpysäytysliuosta pitää lisätä kaivoihin samassa järjestyksessä ja suunnilleen samalla nopeudella, kun substraattia vaiheessa 13.
16. Mittaa optinen tiheys (OD) jokaisesta kaivosta 5 minuutin kuluessa kunkin reaktion päättymisestä käyttämällä levynlukijaa, johon on kiinnitetty 450 nm:n suodatin ja 620 - 650 nm:n referenssuodatin. Tulosten laskemiseen on käytetty OD-arvoja.

Laskennat ja testien tulkinta

QuantiFERON-CMV-analyysiohjelmisto raakadatan analysointiin ja tulosten laskentaan on saatavilla QIAGENin verkkosivuilta osoitteesta www.QuantiFERON.com.

Ohjelmisto suorittaa testin laadunarvioinnin, laatii standardisuoran ja antaa testituloksen jokaiselle potilaalle "Tulosten tulkinta" -kappaleessa esitetyllä tavalla.

QF-CMV-analyysiohjelmiston käytön sijaan tulokset voidaan analysoida myös seuraavalla menetelmällä.

Standardisuoran laatiminen

Määrittele standardien OD-arvojen keskiarvo jokaiselta levyltä.

Laadi $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardisuora hakemalla $\log_{(e)}$ OD-keskiarvosta (y-akseli) verrattuna $\log_{(e)}$ standardien IFN- γ pitoisuuteen IU/ml (x-akseli) jättämällä nollastandardi pois näistä laskelmista. Laske standardisuora regressioanalyysillä.

Käytä standardisuoraa määrittämään IFN- γ pitoisuus (IU/ml) jokaiselle testin plasmanäytteelle käyttämällä kunkin näytteen OD-arvoa.

Nämä laskennat voidaan tehdä ohjelmistoilla, joita on levynlukijoissa, standardien laskentataulukolla tai tilastoivalla ohjelmistolla (esim. Microsoft® Excel®). Suosittelemme käyttämään näitä paketteja regressioanalyysin laskennassa, standardien variaatiokertoimen (%CV) määrittelyssä ja standardisuoran korrelaatiokertoimen (r) laskennassa.

Testin laadunvarmistus

Testin tarkkuus riippuu standardisuoran tarkkuudesta. Tästä syystä standardeista saadut tulokset on tarkastettava ennen kuin testituloksia voidaan tulkita.

ELISA:a koskee seuraava:

- OD-keskiarvon standardille 1 on oltava $\geq 0,600$.
- %CV standardille 1 ja 2 toistettavien OD-arvojen on oltava $< 15 \%$.
- Toistettavat OD-arvot standardeille 3 ja 4 eivät saa poiketa enempää kuin 0,040 optista tiheysyksikköä keskiarvosta.
- Korrelaatiokerroin (r), joka on laskettu standardin absorbanssin keskiarvosta on oltava $\geq 0,98$.

Jos yllä mainitut kriteerit eivät täyty, ajo on virheellinen ja testi on tehtävä uudelleen.

Nollastandardin OD-keskiarvo (vihreä liuotinneste) pitää olla $\leq 0,150$. Jos OD-keskiarvo on $> 0,150$, levyn pesuprosessi on tarkistettava.

Tulosten tulkinta

QuantiFERON-CMV-tulokset tulkitaan seuraavien kriteereiden avulla:

CMV miinus nolla (IU/ml)*	Mitogeeni miinus nolla (IU/ml)	QF-CMV-tulos	Raportti/tulkinta
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Ei-reaktiivinen	Anti-CMV-immuniteettia EI havaittu
$\geq 0,2$	Mikä tahansa	Reaktiivinen	Anti-CMV-immuniteetti havaittu
$< 0,2$	$< 0,5$	Määrittelemätön [†]	CMV-vasteen tulosta ei voida määritellä

* IFN- γ vaste CMV-antigeenin ja mitogeenin positiiviselle kontrollille voi yleisesti olla levynlukijan alueen ulkopuolella. Sillä ei ole vaikutusta kvalitatiivisiin tuloksiin.

[†] Lue mahdollisista syistä kohdasta "Ongelmien ratkaisu".

Rajoitukset

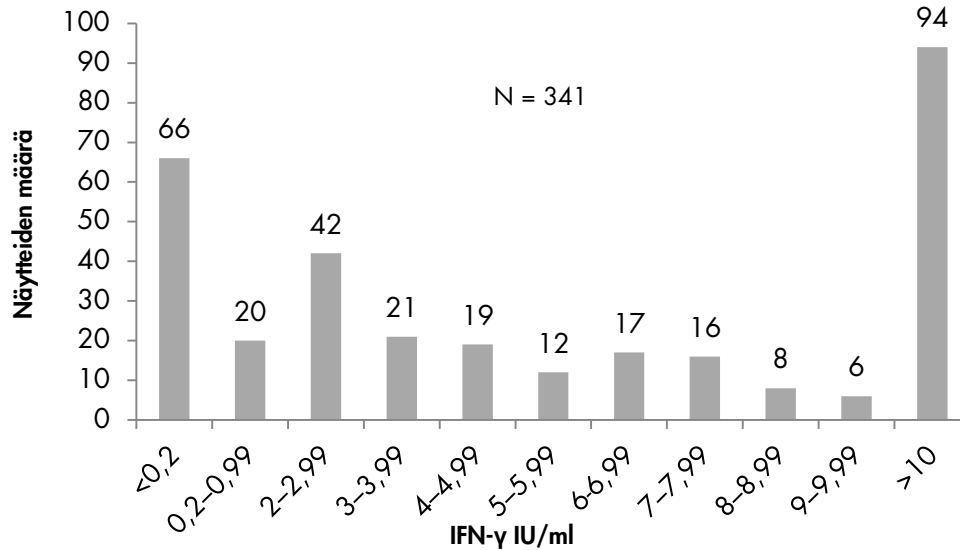
QuantiFERON-CMV-testin tulosten on oltava linjassa kunkin potilaan epidemiologisen historian, nykyisen lääketieteellisen statuksen ja muiden diagnostisten arvioiden kanssa.

Epäluotettavat tai määrittelemättömät tulokset voivat johtua seuraavasta:

- Prosessi poikkeaa pakkausselosteen ohjeista.
- Liian suuri IFN- γ -taso nollaputkessa.
- Inkubointi 37 °C:ssa on tapahtunut myöhemmin kuin 16 tuntia näytteenotosta.

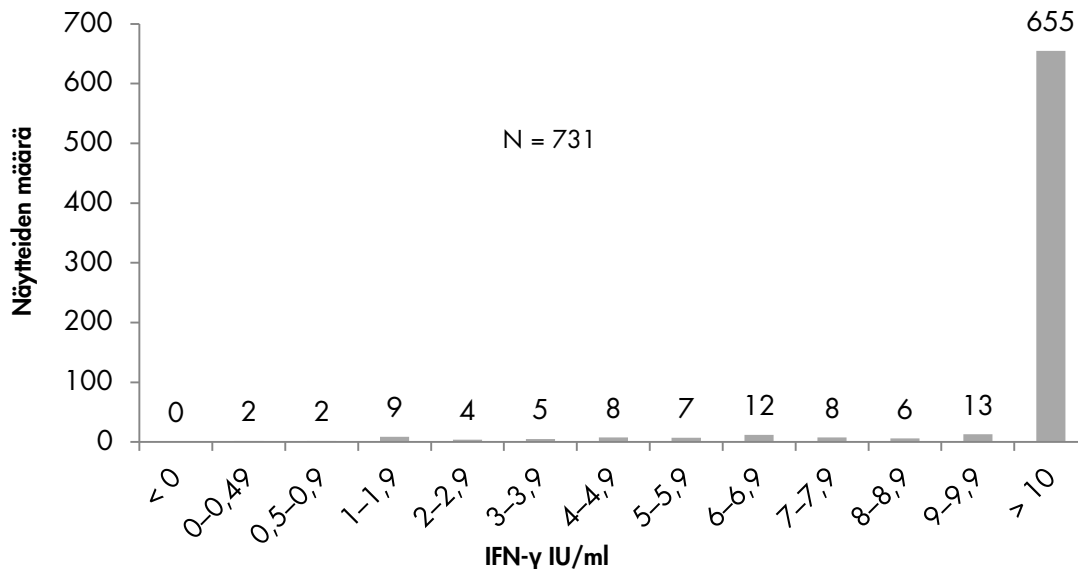
Odotusarvot

Odotetut IFN- γ -arvot käytettäessä QuantiFERON-CMV:a on saatu testaamalla 591 näytettä terveiltä aikuisilta, joista 341 oli CMV-seropositiivisia ja 250 seronegatiivisia. 250 terveen aikuisen joukosta, joilla ei ollut CMV-infektiota anti-CMV-serologian määrittelyn mukaan (CMV-seronegatiiviset) 100 % testatuista tuotti IFN- γ -vasteen, joka oli < 0,2 IU/ml CMV-antigeeniputkessa (miinus nolla). Jakauma CMV-antigeeniputkessa (miinus nolla) niiden 341 terveen testatun kohdalla, joilla oli CMV-infektio anti-CMV-serologian mukaan (CMV-seropositiiviset), on esitetty kuvassa 2.



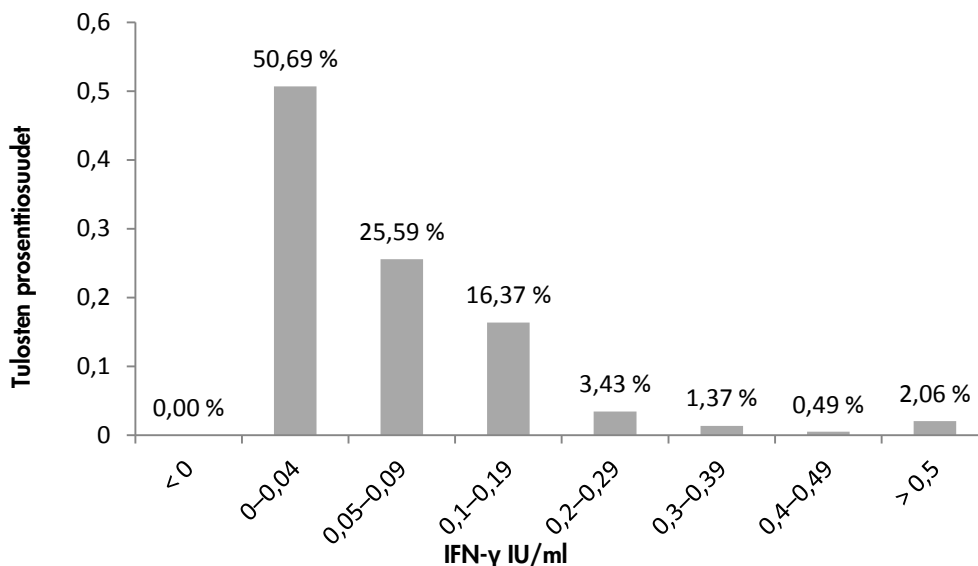
Kuva 2. CMV-nolla IFN- γ -vasteiden jakauma terveillä seropositiivisilla testattavilla (n = 341).

Mitogeenien jakauma (miinus nolla taustalla) tuloksista, jotka on saatu 731 normaalista verinäytteestä terveiltä aikuisilta riippumatta CMV-infektiosta, on esitetty kuvassa 3. Mitogeenin (miinus nolla) tulos, joka on alle 0,5 IU/ml osoittaa joko testin epäonnistuneen tai testattavan olevan immuunipuutteinen. Terveessä väestössä vain 2 tulosta 731 joukosta osuu tähän luokkaan.



Kuva 3. Mitogeenin nollan jakauma IFN- γ -vasteessa terveillä aikuisilla (n = 731).

Odotusarvot nollaputkille on osoitettu kuvassa 4. Tiedot on saatu 1020 plasmanäytteestä terveiltä aikuisilta, jotka on testattu QuantiFERON-CMV ELISA:n avulla.



Kuva 4. Jakauma (ilmaistuna prosentteina väestöstä) IFN- γ -vasteesta terveillä aikuisilla (n = 1020).

Suoritusarvot

Predikaattien testaus

Testikynnys ennen CMV-altistusta käyttämällä QF-CMV-testiä on määritelty seuraavan tulosanalyysin perusteella terveiden aikuisten ryhmästä (n = 223), jossa QF-CMV-tuloksia verrattiin CMV-serologisiin tuloksiin. ROC-analyysi määritteli, että 0,04 IU/ml:n testikynnys (nollan vähentämisen jälkeen) antoi optimaaliset positiiviset ja negatiiviset arvot QF-CMV:lle (alue suoran alla = 0,9679 [95,% CI = 0,9442 - 0,9915, $p < 0,0001$]), joten se edusti kynnystä, jossa tämä testi toteutui tarkoitetulla tavalla ja tehokkaimmin terveessä väestössä.

Predikaattitestauksessa QF-CMV-suoritusarvoa verrattiin SeraQuest CMV IgG -serologiatestiin (Quest International). QF-CMV-testi osoitti 95 %:n (294/310 henkilön) sopivuuden anti-HCMV-serologiatestiin terveillä aikuisilla, joista kukaan 149 seronegatiivisesta luovuttajasta ei osoittanut mitään reaktiivisuutta QF-CMV:ssä, ja 145 seropositiivista luovuttajaa 161 luovuttajan joukosta antoi reaktiivisen IFN- γ -vasteen. Yleisesti ottaen positiivinen yhtäpitävyys oli 90 % negatiivisen yhtäpitävyyden arvon ollessa 100 %. Yhtäpitävyytaso IFN- γ -vasteissa CMV-peptideihin mitattuna QF-CMV:lla terveistä vapaaehtoisista sekä näiden henkilöiden anti-CMV-serologinen status käytettävässä SeraQuest CMV IgG -serologiatestiä on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Yhtäpitävyys QuantiFERON-CMV- ja CMV IgG-serologiatestien välillä terveillä aikuisilla.

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

Testin kynnsarvot

Suosittelun kliininen testiarvo tälle testille on 0,2 IU/ml CMV-antigeeniputkessa (miinus nolla), vaikka eri kynnyksiä voidaan validoida eri klinisiin ympäristöihin. Tämä perustuu immunologisiin peruseroihin normaalin testiväestön ja niiden henkilöiden välillä, joiden kohdalla testin katsotaan olevan kliinisesti hyödyllinen eli erityisesti immuunivajeiset henkilöt, jotka immuunivajeensa vuoksi ovat vaarassa saada oireiden CMV-infektion ja/tai taudin. Tässä riskiryhmässä QF-CMV:n kliininen hyöty on tarkassa anti-CMV-immuniteettitason määrittämisessä, sillä immuunipuutos saattaa liittyä CMV-taudin kehittymiseen (1–5, 7, 8, 11–16).

Kliiniset tutkimukset

Koska sutomegalovirusinfektion vahvistamisesta tai poissulkemisesta ei ole olemassa tarkkaa standardia, QF-CMV-sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä ei voida käytännössä arvioida. QF-CMV-sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä likimääräistettiin arvioimalla yhteneväisyystasoa QF-CMV:lla terveillä aikuisilla mitattun IFN- γ -CMV-peptodivasteen ja henkilöiden anti-CMV-serologiasatuksen välillä käyttämällä CMV IgG -serologiatestia.

QF-CMV-spesifisyys likimääräistettiin arvioimalla virheellisten positiivisten määrä QF-CMV:n reaktiivinen vaste) terveillä vapaaehtoisilla, joilla ei ole todettu aiempaa CMV-altistusta (CMV-seronegatiiviset henkilöt). Sensitiivisyys likimääräistettiin arvioimalla terveitä vapaaehtoisia, joiden kohdalla oli todisteita aiemmasta CMV-altistuksesta (CMV-seropositiiviset henkilöt). Vaikka QF-CMV hyödyntää suurta CMV-spesifisten epitooppien määrää eri CMV-proteiineista ja saa näin laajan kliinisen pohjan suuresta väestötannasta, joita on erilaisia HLA luokan I halotyyppejä, näiden peptidien peitto ei ole 100 %. Koska CMV-serologiatestattujen HLA-halotyyppejä ei ollut tiedossa, pienen prosentin seropositiivisista henkilöistä odotetaan jäävän ilman vastetta QF-CMV-putkissa.

Spesifisyys

Terveillä henkilöillä tehdyssä tutkimuksessa, joiden kohdalla ei ollut todisteita aiemmasta CMV-altistuksesta (CMV-seronegatiivisia henkilöitä oli n = 250), ja yhteneväisyystaso IFN- γ QF-CMV:lla mitattun CMV-peptodivasteen ja anti-CMV-serologiatiedon välillä oli 100 %.

Kaikissa muissa spesifisyysarvioissa, jotka tehtiin kiinteän elinsiirron saaneilla potilailla (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), luuydinsiirtopotilailla (7, 13) ja HIV-potilailla (2), yhteneväisyystaso IFN- γ QF-CMV:lla mitatun CMV-peptidivasteen ja anti-CMV-serologian välillä on jatkuvasti ollut 100 %.

Herkkyyks

Terveillä henkilöillä tehdyssä tutkimuksessa, joilla oli todistetusti aiempi CMV-altistus (CMV-seroposiitivisia henkilöitä oli $n = 341$), ja yhteneväisyystaso IFN- γ QF-CMV:lla mitatun CMV-peptidivasteen ja anti-CMV-serologiatiedon välillä oli 80,6 % (275/341) Havaittu eroavaisuus saattaa johtua korkeamman testikynnyksen käytöstä (0,2 IU/ml), väärästä positiivisesta CMV-serologiasta tai siitä, että henkilöillä ei havaittu vastetta CMV-peptideille.

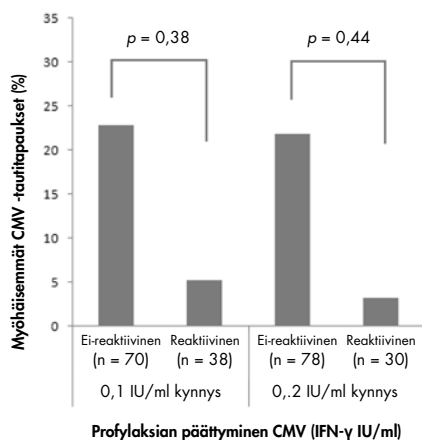
Sensitiivisyyden arviointi tehtiin kiinteän elinsiirron saaneilla potilailla (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), luuydinsiirtopotilailla (7, 13) ja HIV-positiivisilla potilailla (2). Hieman alemmaa yhteneväisyystasoa mitattiin IFN- γ QF-CMV:lla mitatun CMV-peptidivasteen CMV-seroposiitivisen vasteen välillä näillä potilailla. Havaittu eroavaisuus saattaa johtua väärästä positiivisesta CMV-serologiasta, siitä, että henkilöillä ei havaittu vastetta CMV-peptideille tai reaktiivisten T-solujen puuttumisesta näillä potilailla heidän immuunivajeensa vuoksi.

Kliinistä käytettävyyttä valottavat tutkimukset

Sekä serologia että QF-CMV ilmoittavat käyttötarkoituksensa olevan CMV-immuniteetin havaitseminen. Kudossiirroissa CMV-serologia on laajalti käytetty ennen siirtoa kartoitettaessa potilaan CMV-komplikaatioiden riskiä siirron jälkeen, mutta sen arvo on rajallinen kudossiirtojen jälkeen. QF-CMV:lla voidaan testata myös kudossiirtojen saajat arvioitaessa CMV-immuunitasoa potilailla, jotka ovat vaarassa saada oireellisen CMV-infektion ja/tai taudin immuunivajeensa vuoksi (6, 9–11).

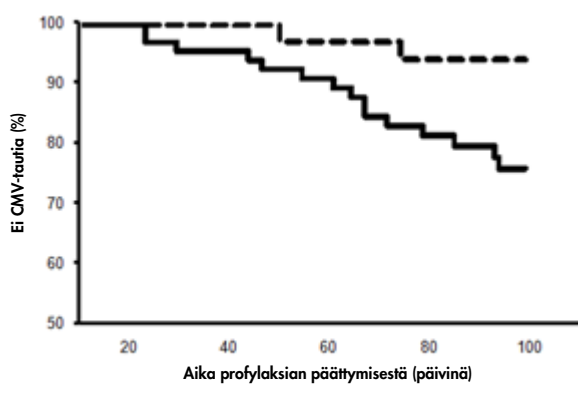
QuantiFERON-CMV:n teho on osoitettu useissa eri ikäluokkia koskevissa kliinisissä tutkimuksissa (1–5, 7, 8, 11–16).

Laajassa tutkimuksessa, joka koski 108 elinsiirtopotilasta (4), havaittiin että niiden potilaiden, joiden kohdalla QF-CMV-tulos oli reaktiivinen anti-CMV-profylaksan päätteeksi, myöhemmin ilmenneiden tautien määrä oli merkittävästi pienempi verrattuna henkilöihin, joiden QF-CMV-tulos oli ei-reaktiivinen (5,3 % vs. 22,9 %, $p = 0,044$) (kuva 5).



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

Lisäksi potilailla, joiden QF-CMV-testi oli reaktiivinen profylaksian päätteeksi, jäivät ilman CMV-tautia useammin ja pidempään (kuva 6). Tämä osoittaa, että QF-CMV soveltuu myös niiden potilaiden tunnistamiseen, jotka ovat vaarassa saada CMV-taudin myöhemmin.



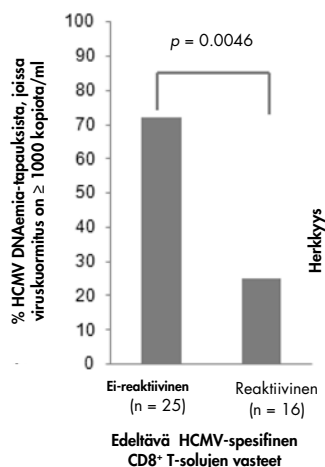
Kuva 6. CMV-taudin kehittymisaika potilailla, joiden QuantiFERON-CMV-tulos oli reaktiivinen (esitetty katkoviivalla) vs. ei-reaktiiviset QuantiFERON-CMV-tulokset (esitetty kiinteällä viivalla) profylaksian päätteeksi.

Tiedot: Kumar et al.(4)

Tämä tutkimus osoitti myös, että siirrännäispotilaiden ikäryhmässä suurimmassa CMV-taudin riskiryhmässä (CMV-seronegatiivinen siirre, henkilöt jotka saivat siirteen CMV-seronegatiiviselta luovuttajalta eli D+/R-) QF-CMV-reaktiiviseen tulokseen koska tahansa profylaksian jälkeen liittyi 90 % mahdollisuus olla saamatta CMV-tautia.

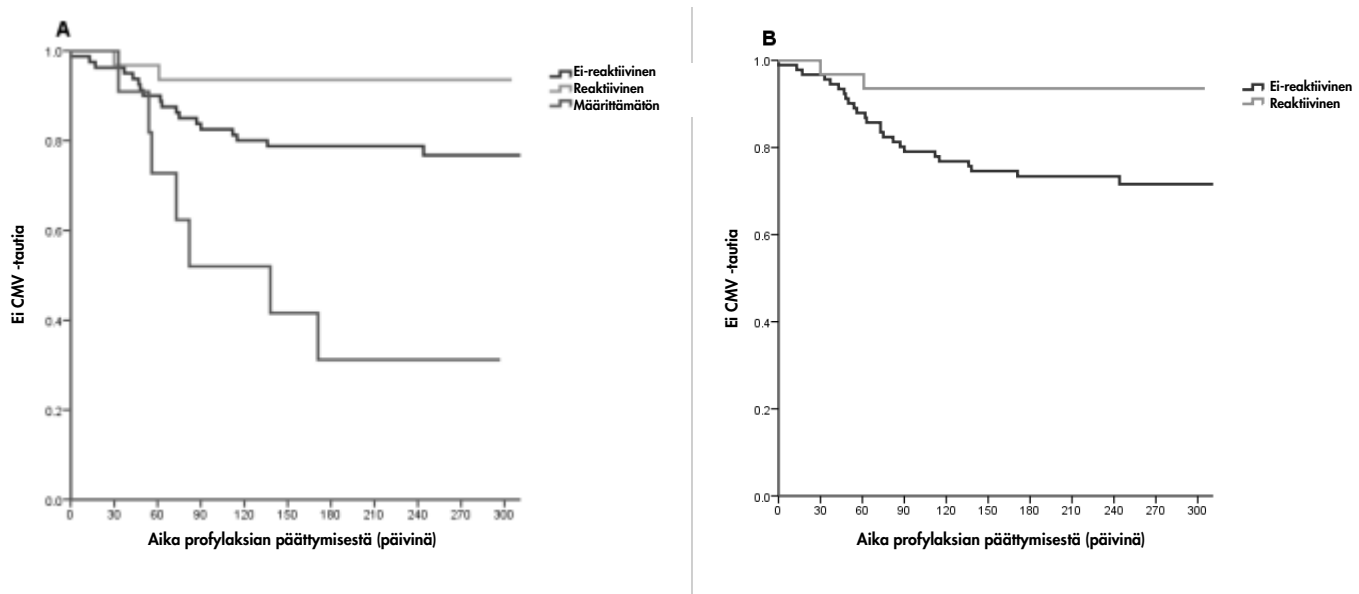
Tutkimuksessa, joka koski 37 elinsiirtopotilasta (12), arvio CMV-spesifisistä CD8⁺ T-soluvasteista QF-CMV:lla myötävaikutti spontaaniin virusten poistumisen ennustamiseen verrattuna CMV-taudin etenemiseen ja CMV-virusten myöhäisempään esiintymiseen veressä. Tässä tutkimuksessa 24/26 potilaalla (92,3 %), joiden QF-CMV-tulos oli reaktiivinen, CMV-virukset poistuivat, ja vain 5/11 (45,5 %) potilaista, joiden QF-CMV-tulos oli ei-reaktiivinen, saivat saman tuloksen.

Tutkimus, jossa 67 keuhkosiirrepotilaalla arvioitiin CMV-virustartuntojen määrää siirteen jälkeen (14), havaittiin että 18/25 (72 %) CMV-virustartuntaa edelsi ei-reaktiivinen QF-CMV-tulos versus 4/16 (25 %) tapausta, joita edelsi reaktiivinen QF-CMV-vaste (Fisherin eksakti testi, $p = 0,0046$, katso kuva 7).



Kuva 7. Tilastollinen CMV-spesifinen CD8⁺ T-soluvasteen analyysi QuantiFERON-CMV:n tunnistamana ja CMV-viruskannan kehitys (Fisherin eksakti testi, $p = 0,0046$). Tiedot: Weseslindtner et al (14).

Laajassa monikeskustutkimuksessa, jonka otanta oli 127 D+/R- elinsiirtopotilasta (15), joista kaikki saivat viruksentorjuntahoitoa, potilailla, joiden QF-CMV-vaste oli reaktiivinen (käyttämällä 0,1 IU/ml:n testikynnysarvoa) jokaisessa aikapisteessä CMV-viruksentorjuntahoidon jälkeen, myöhemmin esiintyneiden tautien määrää oli merkittävästi pienempi 12 kuukautta siirteen jälkeen verrattuna niihin, joiden QF-CMV-vaste oli ei-reaktiivinen tai tulos määrittelemätön (6,4 % vs. 22,2 % vs. 58,3 %, $p < 0,001$). Luokiteltaessa määrittämättömiä vasteita, jotka myös katsottiin "ei-reaktiivisiksi", myöhemmin esiintyneiden CMV-tapausten määrä oli 6,4 % vs. 26,8 %, $p = 0,024$ (katso kuva 8). Positiiviset ja negatiiviset ennakoivat QF-CMV-arvot, jotka suojasivat CMV-taudilta, olivat 0,90 (95 % CI 0,74 - 0,98) ja ,27 (95 % CI 0,18 - 0,37) ja osoittivat, että QuantiFERON-CMV:n reaktiivinen tulos koska tahansa profylaksian jälkeen liittyi yli 90 % todennäköisyydellä siihen, että CMV-tautia ei tullut. Tämä tutkimus osoitti, että QF-CMV saattaa olla hyödyllinen ennustettaessa potilaan alhaista, keskimääräistä tai suurta riskiä saada CMV-tauti profylaksian jälkeen.



Kuva 8 Kaplan-Meier-käyrät CMV-taudin esiintyvyydestä QF-CMV-testin tulosten mukaan.

A Reaktiivinen vs. ei-reaktiivinen vs. määrittelemätön QF-CMV-tulos (log rank -testi, $p < 0,001$).

B Reaktiivinen vs. ei-reaktiivinen, jossa määrittämätön tulos laskettiin ei-reaktiiviseksi (log rank -testi, $p = 0,024$).

Ennakoivassa tutkimuksessa otanta oli 55 elinsiirtopotilasta (16), jossa suhde ennen siirrettä saatujen QF-CMV-tulosten ja siirteen jälkeen todettujen CMV-tapausten välillä analysoitiin, todettiin, että suurempi CMV-esiintyvyys havaittiin R(+)-potilailla, joiden ennen siirrettä antama QF-CMV-vaste oli ei-reaktiivinen (7/14 tai 50%) verrattuna niihin R(+)-potilaisiin, joiden QF-CMV-vaste oli reaktiivinen (4/30 tai 13,3 %).

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

Monia muita tutkimuksia CMV-spesifisen CD8⁺ T-soluvasteen tunnistamisesta QF-CMV:lla elinsiirtopotilaiden ryhmässä on tehty (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) tai niitä ollaan tekemässä eri puolilla maailmaa.

Kansainväliset ohjeet sytomegaloviruksen hoidosta elinsiirtopotilailla

CMV-spesifisen immuunivalvonnan merkitys on tunnistettu, ja aiheesta on annettu julkaisu "International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation" (Kansainväliset ohjeet sytomegaloviruksen hoidosta elinsiirtopotilailla) (6). Nämä kansainväliset ohjeet, jotka ovat CMV- ja elinsiirto-asiantuntijaryhmän Infectious Diseases Section of The Transplantation Society -yhdistyksen valvonnan alaisuudessa laatimat, edustavat asiantuntijamielipiteiden pohjalta laadittuja yhteisiä ohjeita CMV-valvonnassa diagnostiikka, immunologia, ehkäisy ja hoito mukaan lukien.

Ohjeissa todetaan, että "immuniteetin valvonta CMV-spesifisen T-soluvasteen osalta saattaa ennustaa CMV riskiryhmät elinsiirron jälkeen, ja se saattaa olla hyödyllinen työkalu profylaksian ja ennakoivan hoidon kohdalla" (6).

Lisäksi ohjeissa annetaan suosituksia immuunivasteen testauksesta, johon kuuluu:

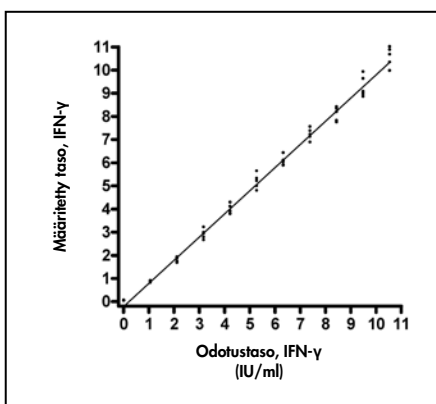
- kyky arvioida elinsiirtopotilaan CD4⁺ ja CD8⁺ T-solujen määrää ja toimintaa
- kyky mitata IFN- γ -arvoa.
- Yksinkertainen suorittaa, edullinen ja toistettava
- Nopea vastaus
- Näytteiden lähettäminen on helppoa erikoislaboratorioihin

QF-CMV vastaa käytännössä kaikkia ohjeissa määriteltyjä kriteereitä, ja se on ainoa standardoitu immuniteetin valvontatesti, joka pystyy tunnistamaan IFN- γ , spesifiset arvot CMV:lle.

Testin suoritusarvot

IFN- γ -pitoisuuden mittaamenetelmän QF-CMV ELISA:n avulla on osoitettu olevan lineaarinen välillä nolla - 10 IU/ml (kuva 9). Linearisuustutkimus tehtiin asettamalla 5 kpl 11 plasmanäytteestä, joiden IFN- γ -pitoisuus oli tiedossa, sattumanvaraisessa järjestyksessä ELISA-levylle.

QF-CMV ELISA ei osoittanut merkkejä suurten annosten (protsooni) vaikutuksesta IFN- γ -pitoisuuteen aina 100 000 IU/ml:iin asti.



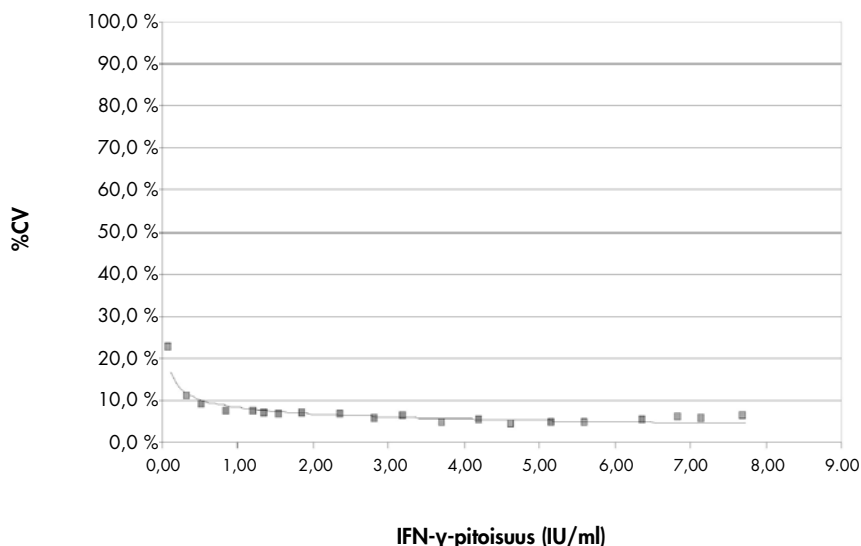
Kuva 9. QF-CMV ELISA:n lineaarisuusprofiili määriteltiin testaamalla 5 plasmanäytettä 11 joukosta, joiden IFN- γ -pitoisuus oli tiedossa. Linearisessa regressioliinassa on $1,002 \pm 0,011$ pudotus, ja korrelaatiokerroin on 0,99.

QF-CMV ELISA:n sisäinen ja määritysten välinen toistettavuus (%CV) arvioitiin testaamalla 20 plasmanäytettä, joiden IFN- γ -pitoisuus vaihteli (3 näytettä, 3 laboratoriota, 3 ei-peräkkäistä päivää ja 3 tekijää). Jokainen näyte testattiin 27 kertaa 9 riippumattomassa testiajossa. Eräs näytteistä oli nollakontrolli, ja sen laskennallinen IFN- γ -pitoisuus oli 0,08 (95 % CI 0,07 – 0,09) IU/ml. Muiden 19 plasmanäytteen pitoisuudet olivat välillä 0,33 (0,31 – 0,34) - 7,7 IU/ml (7,48 – 7,92).

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

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

QF-CMV ELISA:n tarkkuusprofiili on esitetty kuvassa 10, ja siinä osoitetaan, että toistettavuus ei kasva suuremmilla IFN- γ -pitoisuuksilla.



Kuva 10. QF-CMV ELISA:n tarkkuusprofiili määriteltiin testaamalla 20 plasmanäytettä kolminkertaisena 3 ei-perättäisenä päivänä 3 eri laboratoriossa ja 3 eri tekijän voimin. Käytä muodostetaan pienimmän neliösumman mukaan.

Tutkimus suoritettiin osoittamaan QF-CMV-testin toistettavuutta käyttämällä verinäytteitä 8 henkilöltä, joiden CMV-status ei ole tiedossa. Jokaiselta testattavalta otettiin verinäyte kolmeen QF-CMV-putken sarjaan (3 x nolla, 3 x CMV ja 3 x mitogeeni). Kolmen putken sarjat inkuboitiiin kolmessa eri laitoksessa (yksi nolla, CMV ja mitogeeni per laitos), kuten pakkausselosteessa esitetään. 16 - 24 tunnin inkuboinnin jälkeen putket lingottiin ja plasma kerättiin talteen.

ELISA suoritettiin sitten kolme kertaa kussakin kolmessa laitoksessa, ja lopputuloksena on kolme QF-CMV-tulosta jokaiselta henkilöltä per laitos (yhteensä 9 tulosta kaikilta laitoksilta). Jokaisessa laitoksessa testin suoritti eri henkilö. Tutkimuksessa käytetyt levyt eivät välttämättä olleet samasta erästä, mutta niiden käyttöaika oli sama.

Toistettavuus sekä diagnostisen statuksen (reaktiivinen, ei-reaktiivinen tai määrittelemätön) etä numeeristen arvojen suhteen määriteltiin jokaisesta verinäytteestä. Numeeristen arvojen toistettavuus arvioitiin vain reaktiivisissa näytteissä (ilmoitettu arvoina %CV), sillä IFN- γ -tasot ei-reaktiivisissa näytteissä olivat liian pieniä antamaan mitään merkityksellistä arvioita tarkkuudesta.

Diagnostinen toistettavuus oli 100 %, jossa QF-CMV:n diagnostinen status kaikkien 8 vapaaehtoisen kohdalla toisettiin kaikissa laitoksissa ilman väliraportointia. Reaktiivisten näytteiden toistettavuus oli hyväksyttävä sekä laitoksen sisällä että laitosten välillä. Keskiarvo %CV kussakin testilaitoksessa oli 4,5 % (laitos 1), 5,9 % (laitos 2) ja 7,3 % (laitos 3). Laitosten välinen %CV oli 5,9 % kaikissa 5 reaktiivisessa näytteessä. Muuttuvien arvojen alle 10 % prosenttiosuuskerrointa pidetään erinomaisena.

Teknisiä tietoja

Määrittelemättömät tulokset

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

- Inkubointi 37 °C:ssa on tapahtunut myöhemmin kuin 16 tuntia näytteenotosta.
- Verinäytteen säilyttäminen suositusalueen (17 ... 27 °C) ulkopuolella.
- Verinäyteputkien liian vähäinen sekoittaminen.

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

Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisuopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoa saa myös teknisistä tiedoista osoitteesta www.QuantiFERON.com. Yhteystiedot on annettu sivulla 27 ja takakannessa.

ELISA:n ongelmien ratkaisu

Standardien lukemien alhainen optinen tiheys

Mahdollinen syy	Ratkaisu
a) Standardin laimennusvirhe	Varmista, että standardien laimennukset on tehty oikein pakkauksen ohjeen mukaan.
b) Pipetoitinvirhe	Varmista, että pipetit on kalibroitu ja niitä käytetään valmistajan ohjeiden mukaan.
c) Inkubointilämpötila on liian alhainen	ELISA:n inkubointi on tehtävä huoneenlämpötilassa (17 ... 27 °C).
d) Inkubointiaika on liian lyhyt	Konjugaattilevyn, standardien ja näytteiden inkuboinnin tulee kestää 120 ± 5 minuuttia. Entsyymisubstraattiliuosta inkuboidaan levyllä 30 minuuttia.
e) Käytössä on väärä levynlukijan suodatin	Levyn pitää lukea 450 nm, 620 - 650 nm:n referenssisuodattimella.
f) Reagenssit ovat liian kylmiä	Kaikki reagenssit lukuun ottamatta Conjugate 100X Concentrat (konjugaatti 100X tiiviste) -reagenssia on tuotava huoneenlämpöön ennen testin aloittamista. Se vie noin 1 tunnin.
g) Sarja/komponentit ovat vanhentuneet	Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardit ja konjugaatti 100X tiiviste käytetään 3 kuukauden kuluessa sekoituspäivästä.

Epätavallisen värin kehittyminen/korkea tausta

Mahdollinen syy	Ratkaisu
a) Levy ei ole täysin pesty	Pese levy vähintään 6 kertaa pesupuskurilla 400 µl/kaivo. Saatat tarvita yli 6 pesukertaa käytetystä pesulaitteesta riippuen. Suosittelemme vähintään 5 sekunnin liotusta jaksojen välissä.
b) Inkubointilämpötila on liian korkea	ELISA:n inkubointi on tehtävä huoneenlämpötilassa (17 ... 27 °C).
c) Sarja/komponentit ovat vanhentuneet	Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardit ja konjugaatti 100X tiiviste käytetään kolmen kuukauden kuluessa sekoituspäivästä.
d) Entsyymisubstraattiliuos on likaantunut	Heitä substraatti pois, jos sinistä väriä on havaittavissa. Varmista, että käytössä olevat reagenssisäiliöt ovat puhtaat.
e) Plasma on sekoittunut lingon putkissa ennen keräämistä	Varmista, että plasmanäytteet kerätään huolellisesti yllä olevasta geelistä ilman pipetin ylös ja alas suuntautuvaa liikettä, ja huolehdi siitä, että et koske geelin pinnalla olevaan materiaaliin.

Kirjallisuutta

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.* advance online publication 26 October 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 ahead of print 29 February 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.* (Manuscript accepted 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.* (Manuscript accepted November 2012).

Tekninen huolto

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

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

Pikaohjeet testin tekoon

Osio 1–veren inkubointi

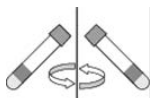
1. Ota potilaalta verinäyte ja ravista putkia välittömästi niiden täytön jälkeen kymmenen (10) kertaa juuri sen verran, että putken koko sisäpinta on veren peitossa niin, että putken seinämällä olevat antigeenit pääsevät liukenemaan vereen.



2. Inkuboi putkia pystyasennossa 37 °C:ssa ± 1 °C 16–24 tuntia.



3. Inkuboinnin jälkeen putkia lingotaan 15 minuuttia 2000–3000 RCF (g) plasman erottamiseksi punasoluista.



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



Osio 2–IFN-γ ELISA

1. Anna ELISA-komponenttien Conjugate 100X Concentrate (konjugaatti 100X tiivisteettä) lukuun ottamatta tasaantua huoneenlämpöön vähintään 60 minuuttia.



2. Sekoita standardi ja 8,0 IU/ml tislattua tai deionisoitua vettä. Valmista neljä (4) laimennettua standardia.

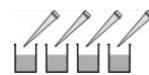


3. Sekoita kylmäkuivattu Conjugate 100X Concentrate sekä tislattu tai deionisoitu vesi.

4. Valmista työskentelyvahvuinen konjugaatti vihreään laimennusnesteeseen ja lisää 50 µl jokaiseen kaivoon.



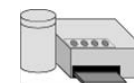
5. Lisää 50 µl testiplasmanäytettä ja 50 µl standardia asianomaisiin kaivoihin. Sekoita käyttämällä ravistelijaa.



6. Inkuboi 120 minuuttia huoneenlämpötilassa.



7. Pese kaivot vähintään 6 kertaa pesupuskurilla 400 µl/kaivo



8. Lisää 100 µl entsyymi-substraattiliuosta kaivoihin. Sekoita käyttämällä ravistelijaa.



9. Inkuboi 30 minuuttia huoneenlämpötilassa.



10. Lisää 50 µl entsyyminpysäytysliuosta kaivoihin. Sekoita käyttämällä ravistelijaa.



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



12. Analysoi tulokset.



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

Rajoitettu lisenssisopimus QuantiFERON-CMV ELISA Kit

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen asiakirjojen ja tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa asiakirjoissa, tässä käyttöoppaassa ja lisämateriaalissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
2. QIAGEN ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN sanoutuu irti muista suorista ja epäsuorista lisensseistä.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi panna vireille tämän rajoitetun lisenssisopimuksen purkamisen missä tahansa tuomioistuimessa, ja vaatii korvattavaksi kaikki valmistelu- ja oikeuskulut mukaan lukien asianajopalkkiot, jos tämän lisenssisopimuksen tai minkään sen immateriaalioikeuksia koskevaa saa koskien tätä sarjaa ja/tai sen komponentteja rikotaan.

Päivitetyt lisenssiehdot saa osoitteesta www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, kaikki oikeudet pidätetään

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

