

---

# QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV

## Pakningsvedlegg $\Sigma$ 2 x 96

Fullblodstest med interferon-gamma som måler responsen til peptidantigenene til det humane cytomegaloviruset

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Telefonnr.: (Australia) +613-9840-9800, (Europa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, TYSKLAND

1075110NO Rev. 01



# Innhold

<b>Tiltenkt bruk</b>	<b>4</b>
<b>Innledning</b>	<b>4</b>
Analyseprinsipp	5
Tiden som er nødvendig for utføre analysen	5
<b>Reagenser og oppbevaring</b>	<b>6</b>
Materiale som er nødvendig, men som ikke medfølger	7
Oppbevaring og håndtering	7
<b>Advarsler og forholdsregler</b>	<b>8</b>
<b>Prøvetaking og -klargjøring</b>	<b>9</b>
<b>Bruksanvisning</b>	<b>10</b>
Ledd 1 – Inkubasjon av blod og innsamling av plasma	10
Ledd 2 – QuantiFERON-CMV ELISA for humant IFN- $\gamma$	10
<b>Beregninger og tolkning av tester</b>	<b>13</b>
Tolkning av resultater	14
<b>Begrensninger</b>	<b>14</b>
<b>Forventede verdier</b>	<b>15</b>
<b>Ytelseskarakteristikker</b>	<b>16</b>
Predikattesting	16
Analyseterskelverdi	17
<b>Kliniske studier</b>	<b>18</b>
Spesifisitet	18
Sensitivitet	18
Studier som fremhever klinisk nytte	19
Internasjonale konsensusretningslinjer for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer	21
<b>Analysens ytelseskarakteristika</b>	<b>22</b>
<b>Teknisk informasjon</b>	<b>24</b>
Ubestemte resultater	24
Feilsøkingsveiledning	25

<b>Bibliografi</b>	<b>26</b>
<b>Teknisk service</b>	<b>27</b>
<b>Forkortet testprosedyre</b>	<b>28</b>
Ledd 1 – blodinkubasjon	30
Ledd 2 – IFN- $\gamma$ ELISA	30

## Tiltenkt bruk

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

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

## Innledning

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

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

## Analyseprinsipp

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

Mitogenrøret brukes i QF-CMV-testen som en positiv kontroll. Dette kan være spesielt berettiget i tilfeller der det er tvil om pasientens immunstatus.

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

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

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

En test betraktes som reaktiv for en IFN- $\gamma$ -respons når CMV-antigenrøravlesningen ligger betydelig over Nil IFN- $\gamma$  IE/ml-verdien. Den mitogenstimulerte plasmaprøven tjener som en IFN- $\gamma$ -positiv kontroll for hver prøve som testes. En lav respons på mitogen indikerer et ubestemt resultat når en blodprøve også har en ikke-reaktiv respons på CMV-antigener. Dette mønsteret kan oppstå ved utilstrekkelig mengde lymfocytter, redusert lymfocytaktivitet på grunn av feil prøvebehandling, feil påfylling/blanding av mitogenrør eller når pasientens lymfocytter mangler evnen til å produsere IFN- $\gamma$ , slik som hos pasienter som nylig har fått transplantater. Nil-prøven benyttes til justering av bakgrunn eller ikke-spesifikk IFN- $\gamma$  i blodprøver. IFN- $\gamma$ -nivået i Nil-røret trekkes fra IFN- $\gamma$ -nivået for CMV-antigenrøret og mitogenrøret (se "Tolkning av resultater" på side 14 i dette pakningsvedlegget for en oversikt over hvordan QF-CMV-resultatene tolkes).

## Tiden som er nødvendig for utføre analysen

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

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

# Reagenser og oppbevaring

<b>CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (Blodprøvetakingsrør med CMV- og kontrollantigen (enkeltpasientpakke))</b>	
<b>Katalognr.</b>	<b>0192-0301</b>
<b>Antall klargjøringer</b>	<b>1</b>
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON Nil-kontroll) (grå hette)	1 rør
CMV Antigen (CMV-antigen) (blå hette)	1 rør
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON-mitogenkontroll) (lilla hette)	1 rør
Pakningsvedlegg	1
<b>QuantiFERON-CMV ELISA Components (QuantiFERON-CMV ELISA-komponenter)</b>	
<b>Katalognr.</b>	<b>0350-0201</b>
Mikroplateremser	24 x 8-brønnsremser
Human IFN- $\gamma$ Standard (Human IFN- $\gamma$ -standard), lyofilisert	1 x flaske
Green Diluent (grønn fortynningsløsning)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantiFERON-konjugat, 100X-konsentrat), lyofilisert	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (QuantiFERON-vaskebuffer, 20X-konsentrat)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON Wash Buffer 20X-enzymsubstratløsning)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON Wash Buffer 20X-enzymstoppløsning)	1 x 15 ml

## Materiale som er nødvendig, men som ikke medfølger

- 37°C-inkubator; CO<sub>2</sub> ikke nødvendig
- Kalibrerte pipetter med variabelt volum for tilsetning av 10 µl til 1000 µl med engangsspisser
- Kalibrerte pipetter med flere kanaler som kan tilsette 50 µl og 100 µl med engangsspisser
- Mikroplaterister
- Deionisert eller destillert vann, 2 liter
- Oppvaskmaskin for mikroplater (automatisert vaskemaskin anbefales)
- Mikroplateleser utstyrt med 450 nm filter og 620 nm til 650 nm referansefilter

## Oppbevaring og håndtering

### Blodprøvetakingsrør

- Blodprøvetakingsrør skal oppbevares ved 4 °C til 25 °C.
- Oppbevaringstiden til QuantiFERON-CMV-blodprøvetakingsrørene er maksimalt 15 måneder fra produksjonsdato, ved oppbevaring ved 4 °C til 25 °C.

### ELISA-settreagenser

- Settet skal oppbevares ved 2 °C til 8 °C.
- Enzymsubstratløsningen må alltid beskyttes mot direkte sollys.

### Rekonstituerte og ubrukte reagenser

For instruksjoner om rekonstituering av reagenser, se "Bruksanvisning – ledd 2" (trinn 3 og 5 på side 10 og 11).

- Den rekonstituerte settstandard kan oppbevares i inntil 3 måneder dersom den oppbevares ved 2 °C til 8 °C.

Legg merke til datoen da settstandard ble rekonstruert.

- Etter rekonstituering må 100X-konsentratet med QuantiFERON-konjugat settes tilbake til oppbevaring ved 2 °C til 8 °C og det må brukes innen 3 måneder.

Legg merke til datoen da konjugatet ble rekonstruert.

- Konjugat med arbeidsstyrke må brukes innen 6 timer etter klargjøring.
- Vaskebuffer med arbeidsstyrke kan oppbevares ved romtemperatur (17 °C til 27 °C) i opptil 2 uker.

# Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk.

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



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

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

## QuantiFERON-enzymstoppløsning



Inneholder svovelsyre: Irriterende stoff. Risiko- og sikkerhetssetninger: \* R36/38, S26-36/37/39

- **Grønn fortynningsløsning** inneholder normalt museserum og kasein, som kan utløse allergiske reaksjoner. Unngå kontakt med hud.

## Ved kjemisk nødsfall

### Søl, lekkasje, eksponering eller ulykke

Ring CHEMTREC dag eller natt

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

Utenfor USA og Canada: +1-703-527-3887 (noteringsoverføring aksepteres)

## Ytterligere informasjon

Sikkerhetsdatablad: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

\* R36/38: Irriterer øynene og huden; S26: Ved kontakt med øynene, skyll omgående med store mengder vann og kontakt lege; S36/37/39: Bruk egnede verneklær, hansker og vernebriller/ansiktsskjerm.



# Prøvetaking og -klargjøring

Viktige poeng før du starter:

Fravikelse fra QF-CMV-pakningsvedlegget kan gi feilaktige resultater. Instruksjonene må leses nøye før bruk.

- Ikke bruk settet hvis noen av reagensflaskene viser tegn til skade eller lekkasje før bruk.
- Ikke bland eller bruk ELISA-reagenser fra andre QF-CMV ELISA-settbatcher.
- Kast ubrukte reagenser og biologiske prøver i samsvar med lokale og statlige forskrifter.
- Ikke bruk QF-CMV-blodprøvetakingsrør eller QF-CMV ELISA-sett etter utløpsdatoen.

QF-CMV benytter følgende blodprøvetakingsrør:

1. Nil-kontroll (grå hette)
2. CMV-antigen (blå hette)
3. Mitogenkontroll (lilla hette)

Antigener har blitt tørket på den indre veggen til blodprøvetakingsrørene, så det er viktig at innholdet i rørene blandes grundig med blodet. Rørene må overføres til en 37 °C-inkubator så snart som mulig og innen 16 timer etter prøvetaking.

**Følgende prosedyrer må følges for optimale resultater:**

**1. For hver pasient samler du inn 1 ml blod ved venepunksjon direkte oppi hvert QF-CMV-blodprøvetakingsrør.**

- Da 1 ml rør trekker blod forholdsvis langsomt, holder du røret på nålen i 2–3 sekunder når røret virker å ha fullført fylling, for å sikre at korrekt volum trekkes.

Det svarte merket på siden av rørene angir 1 ml fyllvolum. QF-CMV-blodprøvetakingsrør har blitt godkjent for volumer som spenner fra 0,8 til 1,2 ml. Hvis blodnivået i et rør ikke er nære indikatorlinjen, anbefales det å ta en ny blodprøve.

- QF-CMV-blodprøvetakingsrør har blitt godkjent for å trekke mellom 0,8 ml og 1,2 ml i høyder fra havoverflaten til 810 meter. Over denne høyden må brukere sikre at blodet trekkes inn i hvert rør innenfor disse grensene. Hvis lav blodtrekking oppstår, kan blod samles inn ved hjelp av en sprøyte og 1 ml overføres til hvert av de tre rørene. Av sikkerhetsmessige grunner er det best å utføre dette ved å fjerne sprøytenålen mens du sørger for å overholde hensiktsmessige sikkerhetsprosedyrer, fjerne hettene fra de tre QF-CMV-rørene og tilsette 1 ml blod til hvert av disse (til det svarte merket på siden av røretiketten). Bytt ut rørhetter på en sikker måte og bland som beskrevet nedenfor.
- Hvis en sommerfuglnål brukes til å samle inn blod, må et "tømmings"-rør brukes for å sikre at slangen fylles med blod før bruk av QF-CMV-blodprøvetakingsrør.

**2. Rett etter at rørene er fylt, skal de ristes ti (10) ganger, akkurat godt nok til at hele den innvendige overflaten av røret er dekket med blod, slik at antigen på rørveggene løses opp.**

- Rørene skal holde 17 °C–25 °C når de fylles med blod.
- For kraftig risting kan føre til gelforstyrrelse og feil resultater.

**3. Rørene må merkes riktig.**

**4. Rørene må overføres til en 37 °C ± 1 °C-inkubator så snart som mulig og innen 16 timer etter prøvetaking. Blodprøvene må ikke settes i kjøleskap eller fryses.**

# Bruksanvisning

## Ledd 1 – Inkubasjon av blod og innsamling av plasma

1. Hvis blodet ikke inkuberes umiddelbart etter innsamling, må blanding av rørene gjentas umiddelbart før inkubasjon, som beskrevet i trinn 2 i foregående avsnitt.
2. Inkuber rørene VERTIKALT ved 37 °C i 16 til 24 timer. Inkubatoren krever ikke CO<sub>2</sub> eller befuktning.
3. Etter inkubasjon kan blodprøvetakingsrørene holdes i en temperatur på mellom 2 °C og 27 °C for opptil 3 dager før utførelse av neste trinn. Etter inkubering av rørene ved 37 °C, sentrifugerer du dem i 15 minutter ved 2000–3000 RCF (g). Gelpluggen vil skille cellene fra plasma. Hvis dette ikke skjer, bør rørene sentrifugeres på nytt ved en høyere hastighet.
  - Det er mulig å samle inn plasma uten sentrifugering, men man må være ekstra forsiktig for å fjerne plasma uten å forstyrre cellene.
4. Etter sentrifugering må du unngå å pipettere opp og ned eller blande plasma på noen måte før innsamling. Du må til enhver tid passe på å ikke å forstyrre materialet på geloverflaten.
  - Plasmaprøver må bare samles inn ved hjelp av en pipette.
  - Plasmaprøver kan overføres direkte fra sentrifugerte blodprøvetakingsrør og inn i QF-CMV ELISA-platen, også ved bruk av automatiserte ELISA-arbeidsstasjoner.
  - Plasmaprøver kan oppbevares i opptil 28 dager ved 2 °C til 8 °C. Etter innsamling kan prøver i rør eller plasmaoppbevaringsbeholdere oppbevares i lengre perioder under –20 °C (fortrinnsvis under –70 °C).

## Ledd 2 – QuantiFERON-CMV ELISA for humant IFN-γ

1. Alle plasmaprøver og reagenser, med unntak av 100X-konjugatkonsentratet, må bringes til romtemperatur (17 °C til 27 °C) før bruk. Beregn minst 60 minutter på ekvilibring.
2. Fjern remser som ikke er nødvendige fra rammen, forsegl i folieposen og sett tilbake i kjøleskapet for oppbevaring frem til de blir nødvendige.

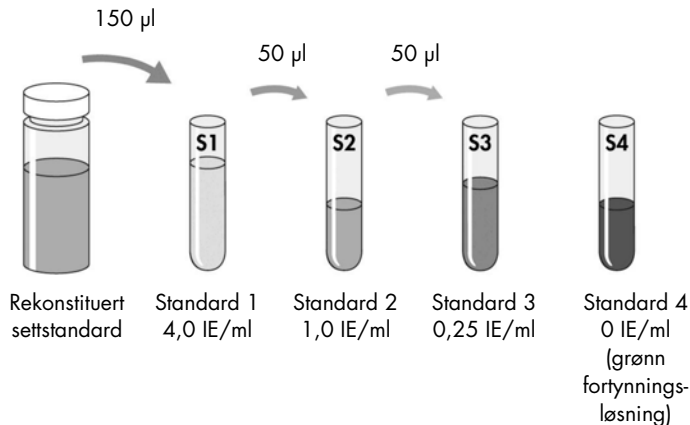
Sett av minst én stripe for QF-CMV ELISA-standarder og tilstrekkelig med remser for det antallet pasienter som testes. Etter bruk beholder du rammen og lokket for bruk med gjenværende remser.
3. Rekonstituer frysetørret settstandard med det volumet med deionisert eller destillert vann som angis på etiketten til standardflasken. Bland forsiktig for å redusere skumming og sikre fullstendig resolubilisering. Rekonstituering av standarden til det angitte volumet gir en løsning med en konsentrasjon på 8,0 IE/ml.
4. Standardkurven klargjøres ved å bruke 3 fortyngninger av settstandard og den grønne fortyngningsløsningen alene som standard 4 (0 IE/ml).

Bruk det rekonstituerte standardsettet til å lage en fortyngningsserie på 3 IFN-γ-konsentrasjoner. Fortynn i settet som inneholder den grønne fortyngningsløsningen (GD) (se figur 1 på neste side). Standardene må analyseres i minst to eksemplarer. Utførelse av følgende trinn gir tilstrekkelig volum for dette.

  - a. Merk 4 rør: "S1", "S2", "S3", "S4".
  - b. Tilsett 150 µl av den grønne fortyngningsløsningen til de 4 rørene (S1–S4).
  - c. Tilsett 150 µl av settstandard til S1 og bland godt.
  - d. Overfør 50 µl fra S1 til S2 og bland godt.

d. Overfør 50 µl fra S2 til S3 og bland godt.

f. Den grønne fortynningsløsningen alene tjener som nullstandard (S4).



**Figur 1. Klargjøring av standardkurven.** Klargjør ferske fortynninger av settstandarden for hver ELISA-økt.

5. Rekonstruer frysetørret QuantiFERON 100X-konjugatkonsentrat med 0,3 ml deionisert eller destillert vann. Bland forsiktig for å redusere skumming og sikre fullstendig solubilisering av konjugatet.
6. Konjugat med arbeidsstyrke klargjøres ved å fortynne den nødvendige mengden av 100X-konsentrat av rekonstituert konjugat i den grønne fortynningsløsningen som angitt i tabell 1 – Konjugatklargjøring.
  - Bland grundig men forsiktig for å unngå skumming.
  - Ubrukt 100X-konjugatkonsentrat skal umiddelbart etter bruk settes tilbake i en temperatur på 2 °C til 8 °C.
  - Bruk kun den grønne fortynningsløsningen.

**Tabell 1. Konjugatklargjøring**

Antall remser	Volumet til 100X-konjugatkonsentratet	Volum til den grønne fortynningsløsningen
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

7. **Før analysen må plasma blandes for å sikre at IFN- $\gamma$  fordeles jevnt i hver prøve. Fortynn også CMV og mitogenplasma 1/10 i den grønne fortynningsløsningen (10  $\mu$ l plasma blandet med 90  $\mu$ l GD) hvis det er nødvendig med kvantitative resultater. Nil-plasma skal ikke fortynnes.**

Det anbefales at følgende prøver testes:

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

Følgende pasientprøvealternativer støttes imidlertid også av QuantiFERON-CMV-analyseprogramvaren:

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

8. **Tilsett 50  $\mu$ l nylig klargjort konjugat med arbeidsstyrke til de påkrevde ELISA-brønnene ved hjelp av en flerkanalspipette.**
9. **Tilsett 50  $\mu$ l testplasmaprøver til riktige brønner ved hjelp av en flerkanalspipette. Til slutt tilsetter du 50  $\mu$ l av hver av standardene 1–4.**
10. **Bland konjugat og plasmaprøver/standarder grundig ved hjelp av en mikroplaterister i 1 minutt.**
11. **Dekk hver plate med et lokk og inkuber ved romtemperatur (17 °C til 27 °C) i 120  $\pm$  5 minutter.**
- Platene må ikke utsettes for direkte sollys under inkubasjon.
12. **Under inkubasjonen fortynner du én del 20X-konsentrat vaskebuffer med 19 deler deionisert eller destillert vann og blander godt. Tilstrekkelig mengde 20X-vaskebufferkonsentrat følger med for klargjøring av 2 liter vaskebuffer med arbeidsstyrke.**

Vask brønner med **400  $\mu$ l** vaskebuffer med arbeidsstyrke i minst 6 sykluser. En automatisert oppvaskmaskin for plater anbefales.

- Grundig vask er svært viktig for analyseytelsen. Sørg for at hver brønn **fylles helt** med vaskebuffer til toppen av brønnen for hver vaskesyklus. En bløtleggingsperiode på minst 5 sekunder mellom hver syklus anbefales.
  - Standard laboratedesinfeksjonsmiddel må tilsettes til avløpsvannreservoaret, og etablerte prosedyrer for dekontaminering av potensielt smittefarlig materiale må følges.
13. **Bank lett på platene med forsiden ned på et absorberende håndkle for å fjerne resterende vaskebuffer. Tilsett 100  $\mu$ l enzymsubstratløsning til hver brønn og bland grundig ved hjelp av en mikroplaterister.**
14. **Dekk hver plate med et lokk og inkuber ved romtemperatur (17 °C til 27 °C) i 30 minutter.**
- Platene må ikke utsettes for direkte sollys under inkubasjon.
15. **Etter 30 minutters inkubasjon tilsetter du 50  $\mu$ l enzymstoppløsning til hver brønn og blander materialet.**
- Enzymstoppløsning må tilsettes til brønnene i samme rekkefølge og med omtrent samme hastighet som substratet i trinn 13.
16. **Mål den optiske tettheten (OD) til hver brønn innen 5 minutter etter at reaksjonen er stoppet ved hjelp av en mikroplateleser utstyrt med et 450 nm filter og med et 620 nm til 650 nm referansefilter. OD-verdier brukes til å beregne resultatene.**

## Beregninger og tolkning av tester

QuantiFERON-CMV-analyseprogramvare for analyse av rådata og beregning av resultater er tilgjengelig fra QIAGEN på [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).

Programvaren utfører en kvalitetskontrollvurdering av analysen, genererer en standardkurve og gir et testresultat for hver pasient, som beskrevet i avsnittet *Tolkning av resultater*.

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

### Generering av standardkurve

Bestem gjennomsnittlige OD-verdier for settstandardreplikaterne på hver plate.

Opprett en  $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardkurve ved å plote inn  $\log_{(e)}$  for gjennomsnittlig OD (y-aksen) mot  $\log_{(e)}$  for IFN- $\gamma$ -konsentrasjonen av standardene i IE/ml (x-aksen). Utelat nullstandarden fra disse beregningene. Beregn den best tilpassede linjen for standardkurven ved regresjonsanalyse.

Bruk standardkurven til å bestemme IFN- $\gamma$ -konsentrasjonen (IE/ml) for hver testplasmaprøve ved hjelp av OD-verdien for hver prøve.

Disse beregningene kan utføres med programvarepakker som er tilgjengelig med mikroplatelesere og standard regneark eller statistisk programvare (for eksempel Microsoft® Excel®). Det anbefales at disse pakkene brukes til å beregne regresjonsanalysen, variasjonskoeffisienten (% CV) for standardene og korrelasjonskoeffisienten (r) til standardkurven.

### Kvalitetskontroll av testen

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

For at ELISA skal være gyldig må:

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

Hvis de ovennevnte kriteriene ikke oppfylles, er kjøringen ugyldig og må gjentas.

Gjennomsnittlig OD-verdi for nullstandard (grønn fortynningsløsning) skal være  $\leq 0,150$ . Hvis den gjennomsnittlige OD-verdien er  $> 0,150$ , må vaskeprosedyren for plater undersøkes.

## Tolkning av resultater

QuantiFERON-CMV-resultatene tolkes i henhold til følgende kriterier:

CMV minus Nil (IE/ml)*	Mitogen minus Nil (IE/ml)	QF-CMV-resultat	Rapport/tolkning
< 0,2	≥ 0,5	Ikke-reaktiv	Anti-CMV-immunitet IKKE påvist
≥ 0,2	Hvilket som helst resultat	Reaktiv	Anti-CMV-immunitet påvist
< 0,2	< 0,5	Ubestemt†	Ubestemt resultat for CMV-reaksjonsevne

\* IFN- $\gamma$ -responser på CMV-antigen og mitogenpositiv kontroll kan ofte befinne seg utenfor måleområdet til mikroplateleseren. Dette har ingen innvirkning på kvalitative resultater.

† Se avsnittet Feilsøking for mulige årsaker.

## Begrensninger

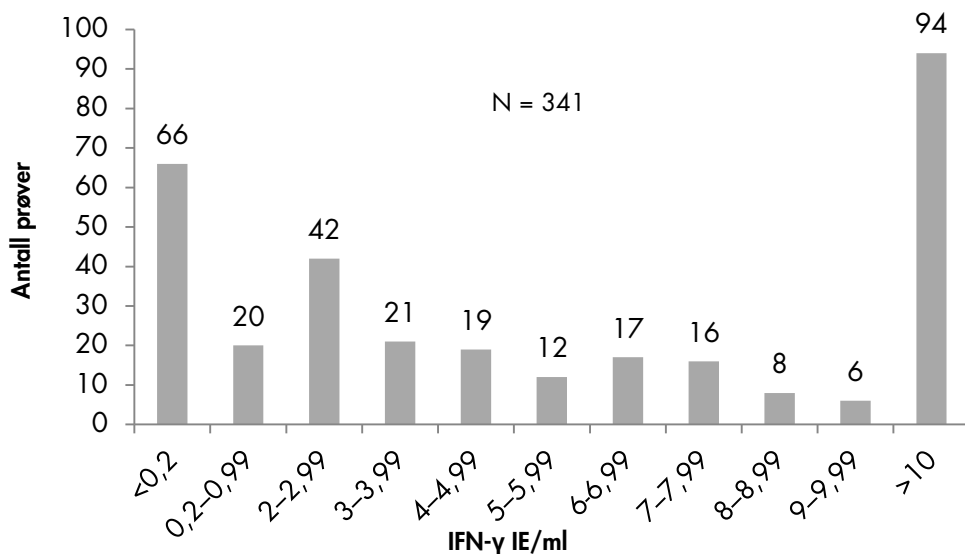
QuantiFERON-CMV-testeresultatene må brukes i forbindelse med hver pasients epidemiologiske historie, nåværende medisinske status og andre diagnostiske evalueringer.

Upålitelige eller ubestemte resultater kan oppstå på grunn av:

- avvik fra prosedyren som er beskrevet i pakningsvedlegget
- overskytende nivåer av IFN- $\gamma$  i Nil-røret
- mer enn 16 timer fra blodprøvetrekking til inkubasjon ved 37 °C

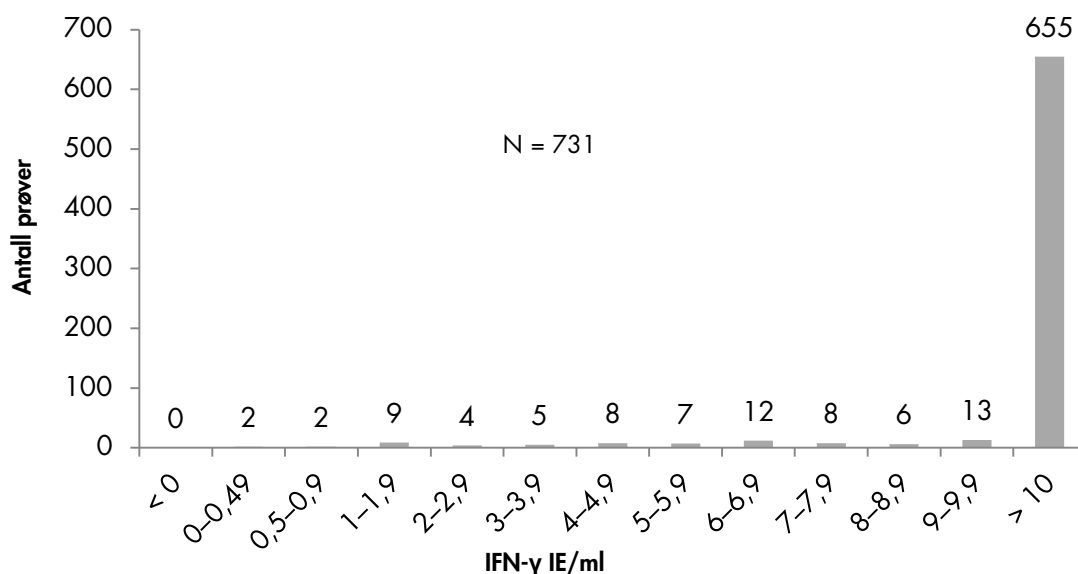
## Forventede verdier

Forventede IFN- $\gamma$ -verdier ved bruk av QuantiFERON-CMV ble oppnådd ved å teste 591 prøver fra friske voksne, der 341 var CMV-seropositive og 250 var seronegative. Hos de 250 friske, voksne forsøkspersonene uten CMV-infeksjon, bestemt ved anti-CMV-serologi (CMV-seronegative), hadde 100 % av forsøkspersonene IFN- $\gamma$ -responser på CMV-antigenrøret (minus Nil) som lå på < 0,2 IE/ml. Fordelingen av CMV-antigenrør (minus Nil) for de 341 friske forsøkspersonene med CMV-infeksjon, bestemt av anti-CMV-serologi (CMV-seropositive), er vist i figur 2.



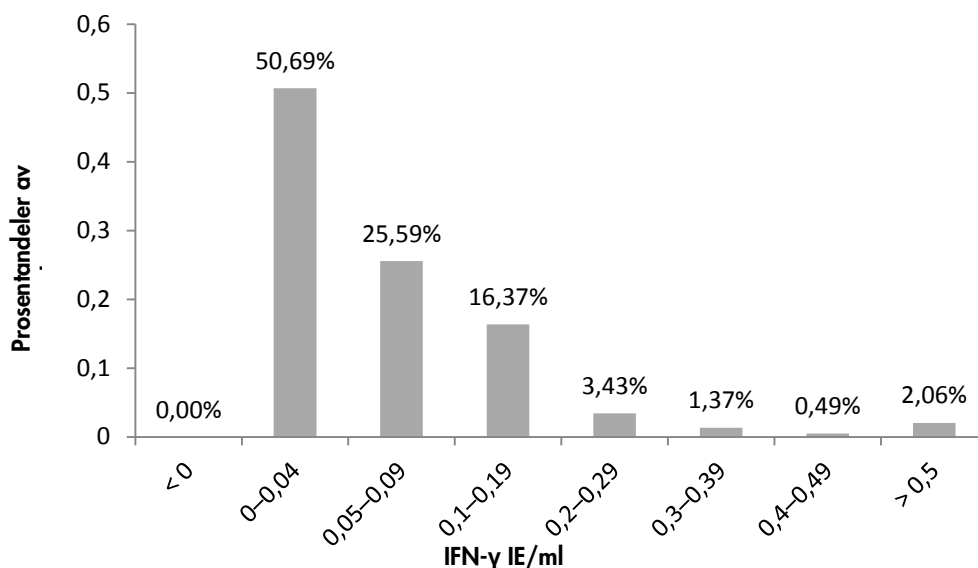
**Figur 2. Fordeling av CMV-Nil IFN- $\gamma$ -responser hos friske, seropositive forsøkspersoner (n=341).**

Fordelingen av mitogenresultater (minus Nil-bakgrunn) for 731 normale blodprøver fra friske voksne, uavhengig av kjent CMV-infeksjon, er vist i figur 3. Mitogenresultat (minus Nil) på mindre enn 0,5 IE/ml indikerer enten at testen ble mislykket eller at personen er i en immunkompromittert tilstand. I en sunn populasjon kom bare 2 av 731 resultater i denne kategorien.



**Figur 3. Fordeling av mitogen-Nil IFN- $\gamma$ -responser hos friske voksne forsøkspersoner (n = 731).**

Forventede verdier for Nil-rør vises i figur 4. Dataene er utledet fra 1020 plasmaprøver fra friske, voksne personer testet med QuantiFERON-CMV ELISA.



Figur 4. Fordeling (uttrykt som % av populasjonen) av Nil IFN- $\gamma$ -responser hos friske, voksne forsøkspersoner (n = 1020).

## Ytelseskarakteristikk

### Predikattesting

En testterskelverdi for påvisning før CMV-eksponering ved hjelp av QF-CMV ble etablert ved å følge analysen av resultatene fra en gruppe friske forsøkspersoner (n = 223) hvor QF-CMV-resultatene ble sammenlignet med serologiske CMV-resultater. En ROC-analyse fastslo at en testterskelverdi på 0,04 IE/ml (etter Nil-subtraksjon) ga optimale positive og negative prediktive verdier for QF-CMV (areal under kurven = 0,9679 [95%CI = 0,9442 til 0,9915,  $p < 0,0001$ ]) og dermed representerte terskelverdien for når denne analysen yter mest effektivt for den tiltenkte bruken for en sunn populasjon.

Ved predikattesting ble QF-CMV-ytelsen sammenlignet med SeraQuest CMV IgG-serologitesten (Quest International). QF-CMV-analysen viste 95 % (294/310 personer) samsvar med predikattesten for anti-HCMV-serologi hos friske personer, der ingen av de 149 seronegative donorene utviste reaktivitet ved QF-CMV, og 145 av 161 seropositive donorer utviste en reaktiv IFN- $\gamma$ -respons. Det generelle positive samsvaret var på 90 % med en negativ samsvarsverdi på 100 %. Samsvarsnivået mellom IFN- $\gamma$ -responser på CMV-peptider, målt ved QF-CMV, hos friske frivillige, og anti-CMV-serologistatusen for disse personene ved bruk av SeraQuest CMV IgG-serologitesten vises i tabell 2.



**Tabell 2. Samsvar mellom QuantiFERON-CMV og CMV IgG-serologitesten hos friske forsøkspersoner.**

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

## Analyseterskelverdi

Anbefalt klinisk testterskelverdi for denne analysen er 0,2 IE/ml i CMV-antigenrøret (minus Nil), men ulike terskelverdier kan være godkjent for ulike kliniske settinger. Begrunnelsen ligger i de grunnleggende immunologiske forskjellene mellom en vanlig testpopulasjon og populasjoner der testen anses som klinisk nyttig – spesielt hos immunosupprimerte personer som grunnet immunosuppresjon befinner seg i faresonen for å utvikle symptomatisk CMV-infeksjon og/eller -sykdom. Hos slike høyrisikopersoner ligger nytten til QF-CMV i nøyaktig påvisning av nivået av anti-CMV-immunitet hos disse forsøkspersonene, da mangel på immunitet kan være forbundet med utvikling av CMV-sykdom (1–5, 7, 8, 11–16).

## Kliniske studier

Ettersom det ikke finnes noen definitiv standard for bekreftelse eller eksklusjon av diagnosen cytomegalovirus-infeksjon, kan et estimat på sensitivitet og spesifisitet for QF-CMV ikke evalueres praktisk. Spesifisiteten og sensitiviteten til QF-CMV ble anslått ved å evaluere graden av samsvar mellom IFN- $\gamma$ -respons på CMV-peptider, målt med QF-CMV hos friske frivillige, og anti-CMV-serologistatus for disse forsøkspersonene ved bruk av CMV IgG-serologitesten.

Spesifisiteten til QF-CMV ble anslått ved å evaluere hyppigheten av falske positive resultater (QF-CMV-reaktiv respons) hos friske frivillige uten tegn til tidligere CMV-eksponering (CMV-seronegative personer). Sensitivitet ble anslått ved å evaluere friske frivillige med tegn til tidligere CMV-eksponering (CMV-seropositive personer). Selv om QF-CMV benytter et stort antall CMV-spesifikke epitoper fra forskjellige CMV-proteiner og dermed har bred klinisk anvendelse for en stor andel av populasjonen med ulike HLA klasse I-haplotyper, ligger dekningen av disse peptidene ikke på 100 %. Da HLA-haplotypene til personene som ble testet mot CMV-serologi var ukjent, ble en liten prosentandel av serologipositive personer forventet å være ikke-responsive til QF-CMV-rørene.

## Spesifisitet

I en studie utført med friske forsøkspersoner uten tegn til tidligere CMV-eksponering (CMV-seronegative personer der  $n = 250$ ) ble graden av samsvar mellom IFN- $\gamma$ -respons på CMV-peptider, målt ved QF-CMV og anti-CMV-serologiinformasjon, funnet å være 100 %.

I alle andre spesifisitetsevalueringer utført hos resipienter av solide organtransplantater (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), resipienter av hematopoietiske stamcelletransplantater (7, 13) og HIV-smittede pasienter (2), lå graden av samsvar mellom IFN- $\gamma$ -respons mot CMV-peptider, målt ved QF-CMV og anti-CMV-serologi, konsekvent på 100 %.

## Sensitivitet

I en studie utført med friske forsøkspersoner med tegn til tidligere CMV-eksponering (CMV-seropositive personer der  $n = 341$ ) ble graden av samsvar mellom IFN- $\gamma$ -respons på CMV-peptider, målt ved QF-CMV og anti-CMV-serologi, funnet å være 80,6 % (275/341). Den observerte uoverensstemmelsen kan skyldes bruk av den høyere testterskelverdien (0,2 IE/ml), falskt positiv CMV-serologi, eller forsøkspersonenes ikke-responsivitet på CMV-peptidene som er inkludert i analysen.

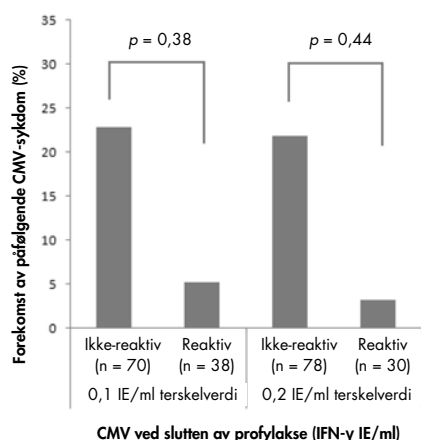
Ved sensitivitetsevalueringer utført for resipienter av solide organtransplantater (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), resipienter av hematopoietiske stamcelletransplantater (7, 13) og HIV-smittede pasienter (2), ble noe lavere nivåer av samsvar funnet mellom IFN- $\gamma$ -respons på CMV-peptider, målt ved QF-CMV og CMV-seropositive respons hos disse pasientene. Den lavere nivået av samsvar kan være et resultat av enten falskt positiv CMV-serologi, pasientenes ikke-responsivitet på CMV-peptidene som er inkludert i analysen eller fraværet av reaktive T-celler hos disse pasienter på grunn av immunsuppresjon.

## Studier som fremhever klinisk nytte

Både for serologi og QF-CMV beskrives den tiltenkte bruken som påvisning av immunitet mot CMV. Innenfor transplantasjonssettinger er CMV-serologi mye brukt før transplantasjonen for å bestemme risiko for oppståelse av CMV-komplikasjoner hos resipienten etter transplantasjonen, men etter transplantasjonen har den begrenset verdi i seg selv. Alternativt kan QF-CMV brukes hos resipienter av transplantater for å vurdere nivået av CMV-immunitet hos pasienter som har en risiko for å utvikle symptomatisk CMV-infeksjon og/eller -sykdom på grunn av immunsuppresjon (6, 9–11).

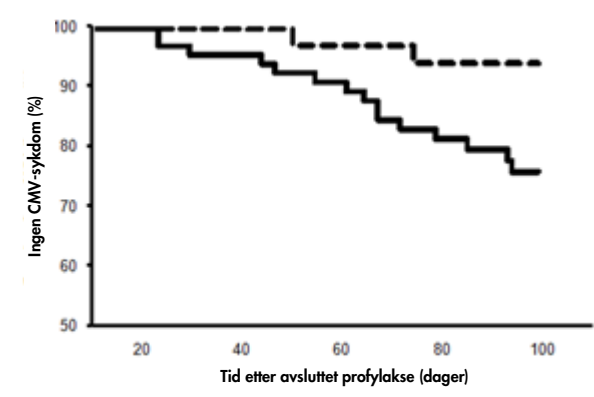
Flere publiserte kliniske studier for en rekke transplantasjonskohorter har nå vist nytten til QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

I en stor studie av 108 resipienter av faste organtransplantater (4) ble det funnet at pasienter med et QF-CMV-reaktivt resultat ved avslutningen av anti-CMV-profylakse hadde en betydelig lavere hyppighet av sen sykdomsdebut sammenlignet med dem som hadde et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat (henholdsvis 5,3 % vs. 22,9 %,  $p=0,044$ ) (figur 5).



**Figur 5. Utbredelsen av CMV-sykdom med sen debut hos pasienter med et QuantiFERON-CMV-reaktivt resultat vs. et ikke-reaktivt QuantiFERON-CMV resultat på slutten av profylaksen.** Data gjengitt fra Kumar et al.(4)

Videre forble pasienter med en reaktiv QF-CMV-test ved fullføring av profylakse friske fra CMV-sykdom oftere og lengre (figur 6), noe som indikerer at QF-CMV kan anvendes for å identifisere personer med risiko for utvikling av CMV-sykdom med sen debut.

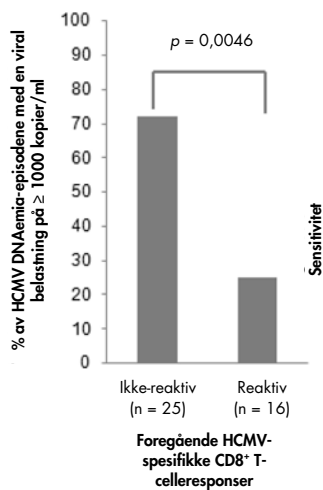


**Figur 6. Tiden til utvikling av CMV-sykdom hos pasienter med et QuantiFERON-CMV-reaktivt resultat (markert med stiplet linje) vs. et ikke-reaktivt QuantiFERON-CMV-resultat (markert med heltrukket linje) på slutten av profylaksen.** Data gjengitt fra Kumar et al.(4)

Denne studien fremhevet også at et QF-CMV-reaktivt resultat på et hvilket som helst tidspunkt etter profylaksen i kohorten med transplantasjonspasienter med høyest risiko for utvikling av CMV-sykdom (CMV-seronegative transplantasjonsresipienter som får et organ fra en CMV-seropositiv donor, dvs. D+/R-) ble assosiert med en 90 % sannsynlighet for å forbli frisk fra CMV-sykdom.

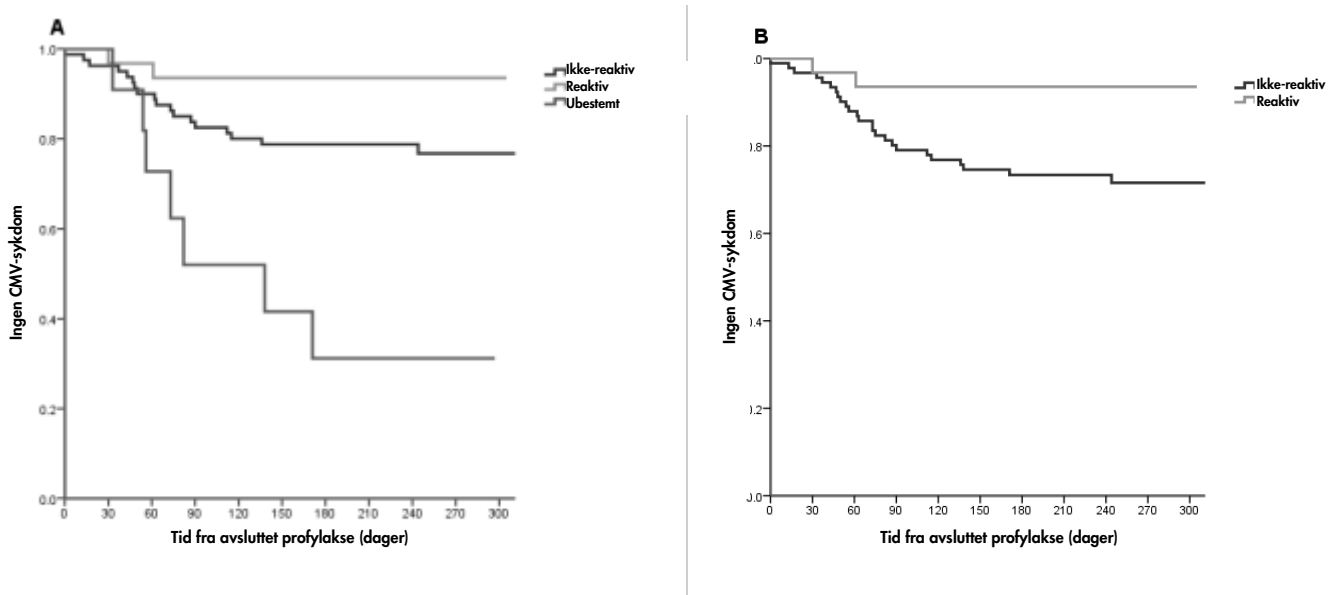
I en studie av 37 pasienter med solide organtransplantater (12), ble vurdering av CMV-spesifikke CD8<sup>+</sup> T-celleresponser ved QF-CMV brukt som assistanse ved prediksjon av spontan viral clearance sammenlignet med CMV-sykdomsprogresjon etter økning i CMV-viremi. I denne studien ble CMV-viruset fjernet spontant hos 24/26 pasienter (92,3 %) med et QF-CMV-reaktivt resultat, mens bare 5/11 (45,5 %) pasienter med et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat fikk samme utfall.

En studie av 67 lungetransplantatresipienter som vurderte CMV-viremieepisoder etter transplantasjonen (14), observerte at 18/25 (72 %) CMV-viremieepisoder ble innledet av et ikke-reaktivt QF-CMV resultat mot 4/16 (25 %) episoder som ble innledet av en QF-CMV-reaktiv respons (Fishers eksakte test,  $p = 0,0046$ , se figur 7).



**Figur 7. Statistisk analyse av CMV-spesifikke CD8<sup>+</sup> T-celleresponser påvist av QuantiFERON-CMV, og utviklingen av CMV-viremi (Fishers eksakte test,  $p = 0,0046$ ). Data gjengitt fra Kumar et al (14).**

I en stor prospektiv multisenterstudie av 127 (D+/R-)-resipienter av solide organtransplantater (15) som alle fikk antiviral profylakse, ble det funnet at pasienter med et QF-CMV-reaktivt resultat (ved bruk av en testterskelverdi på 0,1 IE/ml) på et hvilket som helst tidspunkt etter gjennomføring av anti-CMV-profylakse hadde en signifikant lavere forekomst av sykdom med sen debut 12 måneder etter transplantasjonen sammenlignet med dem som hadde et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat og et ubestemt resultat (henholdsvis 6,4 % vs. 22,2 % vs. 58,3 %,  $p < 0,001$ ). Ved klassifisering av ubestemte resultater som "ikke-reaktive" også, var forekomsten av påfølgende CMV-sykdom 6,4 % vs. 26,8 %,  $p = 0,024$  (se figur 7). De positive og negative prediktive verdiene for QF CMV for beskyttelse mot CMV-sykdom var henholdsvis 0,90 (95 % CI 0,74–0,98) og 0,27 (95 % CI 0,18–0,37), hvilket indikerer at et QuantiFERON-CMV-reaktivt resultat på et hvilket som helst tidspunkt etter profylakse var assosiert med en 90 % sannsynlighet for å forbli frisk fra CMV-sykdom. Denne studien fant at bruk av QF-CMV kan være nyttig til å forutsi om pasienter har lav, middels eller høy risiko for utvikling av påfølgende CMV-sykdom etter profylakse.



**Figur 7. Kaplan-Meier-kurver for forekomsten av CMV-sykdom i henhold til resultatet av QF-CMV-analysen.**

**A** Reaktive vs. ikke-reaktive vs. ubestemte QF-CMV-resultater (logrank-test,  $p < 0,001$ ).

**B** Reaktive vs. ikke-reaktive, der ubestemte resultater ble ansett som "ikke-reaktive" (logrank-test,  $p = 0,024$ ).

I en prospektiv studie av 55 resipienter av solide organtransplantater (16), der forholdet mellom QF-CMV-resultater etter transplantasjonen og CMV-replikasjonsepisoder etter transplantasjonen ble analysert, ble det funnet at en høyere forekomst av CMV-replikasjon etter transplantasjonen ble observert hos R(+)-resipienter med et ikke-reaktivt QF-CMV-resultat før transplantasjonen (7/14 eller 50 %) sammenlignet med R(+)-resipienter med et QF-CMV-reaktivt resultat (4/30 eller 13,3 %).

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

En rekke andre studier som undersøker påvisning av CMV-spesifikke CD8<sup>+</sup> T-celleresponser ved QF-CMV i en kohort med transplantatresipienter har blitt fullført (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) eller pågår på nåværende tidspunkt over hele verden.

## Internasjonale konsensusretningslinjer for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer

Betydningen av CMV-spesifikk immunitetsovervåking har blitt anerkjent og publisert i "Internasjonale konsensusretningslinjer for håndtering av cytomegalovirus ved transplantasjon av solide organer" (6). Disse internasjonale retningslinjene, utarbeidet av et panel med eksperter på CMV og transplantasjon av solide organer, satt sammen av avdelingen for smittsomme sykdommer ved Transplantation Society, utgjør bevis og konsensusretningslinjer for CMV-håndtering basert på ekspertuttalelser, inkludert: diagnostikk, immunologi, forebygging og behandling.

Disse retningslinjene konkluderte med at "Immunitetsovervåking av CMV-spesifikke T-celle-responser kan forutsi hvilke personer som er i faresonen for CMV-sykdom etter transplantasjonen, og kan være nyttige ved veiledning av profylakse og forebyggende behandling" (6).

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

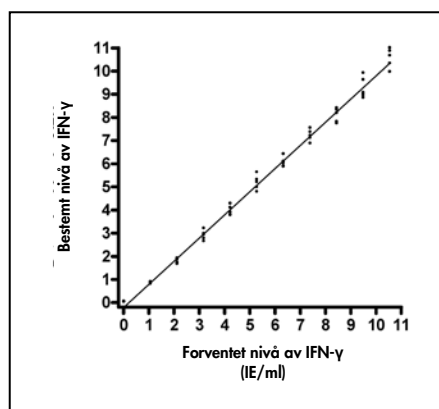
- Evne til å vurdere mengden og funksjonen til en transplantatresipients CD4<sup>+</sup>- og CD8<sup>+</sup> T-celler
- Evne til å måle IFN- $\gamma$
- Enkel å utføre, kostnadseffektiv og reproduserbarhet
- Kort behandlingstid
- Enkel frakt av prøver til spesialiserte henvisningslaboratorier

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

## Analysens ytelseskaraktistika

Metoden for måling av IFN- $\gamma$ -konsentrasjon ved hjelp av QF-CMV ELISA har blitt vist å være lineær fra null til 10 IE/ml (figur 9). Lineærhetsstudien ble utført ved å plassere 5 replikater av 11 plasmapooler med kjente IFN- $\gamma$ -konsentrasjoner tilfeldig på ELISA-platen.

QF-CMV ELISA viser ingen tegn til høydose-"hook"-effekt (prozone-effekt) med IFN- $\gamma$ -konsentrasjoner på opptil 100 000 IE/ml.



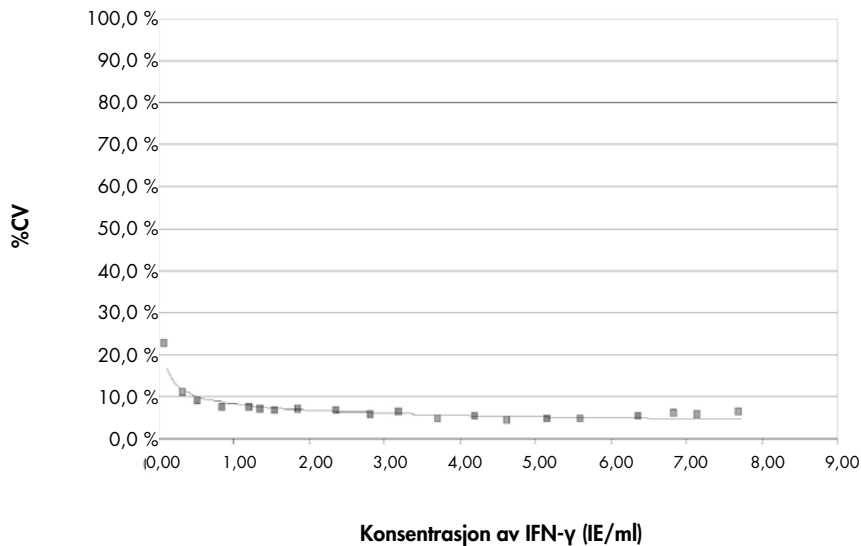
**Figur 9. Lineærhetsprofilen til QF-CMV ELISA bestemt ved å teste 5 replikater av 11 plasmaprøver med kjente IFN- $\gamma$ -konsentrasjoner.** Den lineære regresjonslinjen har en helling på  $1,002 \pm 0,011$  og en korrelasjonskoeffisient på 0,99.

QF-CMV ELISAs unøyaktighet innenfor og mellom analysene (% CV) ble anslått ved å teste 20 plasmaprøver med ulike IFN- $\gamma$ -konsentrasjoner i replikater på 3, i 3 laboratorier, på 3 ikke-sammenhengende dager, av 3 operatører. Hver prøve ble dermed testet 27 ganger, i 9 uavhengige analysekjøringer. Én av prøvene var en Nil-kontroll og hadde en beregnet IFN- $\gamma$ -konsentrasjon på 0,08 (95 % CI 0,07–0,09) IE/ml. Av de resterende 19 plasmaprøvene var konsentrasjonsområdet 0,33 (0,31–0,34) til 7,7 IE/ml (7,48–7,92).

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

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

Presisjonsprofilen for QF-CMV ELISA vises i figur 10 og indikerer at unøyaktighet ikke øker med høyere konsentrasjoner av IFN- $\gamma$ .



**Figur 10. Presisjonsprofilen til QF-CMV ELISA bestemt ut ifra testing av 20 plasmaprøver i 3 eksemplarer, på 3 ikke-sammenhengende dager, i 3 laboratorier og av 3 operatører.** Trendlinjen er en beregning ved minste kvadraters metode.

Det ble gjennomført en studie for å etablere reproduserbarheten til QF-CMV-testen ved bruk av blodprøver fra 8 personer med ukjent CMV-status. Blod for hver forsøksperson ble samlet inn i tre sett med QF-CMV-rør (3x Nil, 3x CMV og 3x mitogen). Deretter ble de tre settene med rør inkubert ved tre ulike steder (ett sett med Nil, CMV, og mitogen per sted), som beskrevet i pakningsvedlegget. Etter 16–24 timers inkubasjon ble rørene sentrifugert, og plasmaet ble samlet inn.

Deretter ble ELISA-er utført tre ganger på hvert av de tre stedene, noe som ga tre QF-CMV-resultater for hver forsøksperson per sted (9 resultater totalt for alle stedene). Alle stedene brukte forskjellige operatører. Platene som ble brukt for studien, var ikke nødvendigvis innenfor samme partinummer, men de var alle innenfor de respektive utløpsdatoene.

Reproduserbarhet, både når det gjelder diagnostisk status (reaktiv, ikke-reaktiv eller ubestemt) og numerisk verdi, ble bestemt for hver blodprøve. Reproduserbarheten til tallverdien ble kun vurdert i reaktive prøver (uttrykt som %CV), da IFN- $\gamma$ -nivåene i "ikke-reaktive" prøver var for lave til å gi et relevant estimat av presisjon.

Totalt lå den diagnostiske reproduserbarheten på 100 %, der diagnostisk QF-CMV-status for alle 8 frivillige ble reproduisert på alle stedene ved alle anledningene, uten at noen ubestemmelige prøver ble innrapportert. Reproduserbarheten til reaktive prøver var akseptabel både innenfor hvert sted og mellom stedene. Gjennomsnittlig %CV for hvert av teststedene var 4,5 % (sted 1), 5,9 % (sted 2) og 7,3 % (sted 3). Totalt lå %CV mellom stedene på 5,9 % for alle 5 reaktive prøver. Prosentvis koeffisient for variansverdier under 10 % betraktes som utmerket.

# Teknisk informasjon

## Ubestemte resultater

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

- mer enn 16 timer fra blodtrekking til inkubasjon ved 37 °C
- oppbevaring av blod utenfor det anbefalte temperaturområdet (17 °C til 27 °C)
- utilstrekkelig blanding av blodprøverør

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



# Feilsøkningsveiledning

Denne feilsøkningsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, se også den tekniske informasjonen på: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Hvis du ønsker kontaktinformasjon, se side 27 og omslaget.

## ELISA-feilsøking

---

### *Avlesninger av lav optisk tetthet for standarder*

<b>Mulig årsak</b>	<b>Løsning</b>
a) Standard fortynningsfeil	Forsikre deg om at fortyninger av settstandarden er klargjort på riktig måte i henhold til pakningsvedlegget.
b) Pipetteringsfeil	Sørg for at pipettene er kalibrert og brukes i henhold til produsentens instruksjoner.
c) For lav inkubasjonstemperatur	ELISA-inkubasjon må utføres ved romtemperatur (17 °C til 27 °C).
d) For kort inkubasjonstid	Inkubasjon av platen med konjugatet, standardene og prøvene bør vare i 120 ± 5 minutter. Enzymsubstratløsningen inkuberes på platen i 30 minutter.
e) Feil plateleserfilter brukt	Platen bør leses av ved 450 nm med et referansefilter på mellom 620 og 650 nm.
f) For kalde reagenser	Alle reagenser, med unntak av 100X-konjugatkonsentratet, må bringes til romtemperatur før du begynner analysen. Dette tar ca. 1 time.
g) Settet/komponentene har gått ut på dato	Se til at settet brukes før utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert standard og 100X-konjugatkonsentrat brukes innen 3 måneder etter rekonstitueringsdatoen.

### *Ikke-spesifikk fargeutvikling / høy bakgrunn*

<b>Mulig årsak</b>	<b>Løsning</b>
a) Ufullstendig vasking av platen	Vask platen minst 6 ganger med 400 µl vaskebuffer per brønn. Mer enn 6 vaskesykluser kan være nødvendig, avhengig av oppvaskmaskinen som brukes. En bløtleggingsperiode på minst 5 sekunder mellom syklusene må benyttes.
b) For høy inkubasjonstemperatur	ELISA-inkubasjon må utføres ved romtemperatur (17 °C til 27 °C).
c) Settet/komponentene har gått ut på dato	Se til at settet brukes før utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert standard og 100X-konjugatkonsentrat brukes innen tre måneder etter rekonstitueringsdatoen.
d) Enzymsubstratløsningen er kontaminert	Kast substratet dersom det forekommer blå fargeskjær. Forsikre deg om at rene reagensbeholdere brukes.
e) Blanding av plasma i sentrifugerør før innsamling	Sørg for at plasmaprøver samles inn nøyaktig ovenfra gelen uten å pipettere opp og ned, og pass på at materialet på overflaten av gelen ikke forstyrres.

# Bibliografi

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- $\gamma$  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.* (Manuskript akseptert november 2012).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Manuskript akseptert november 2012).

# Teknisk service

[www.QuantiFERON.com](http://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

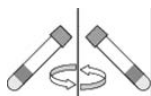
Denne siden skal være tom.

Denne siden skal være tom.

# Forkortet testprosedyre

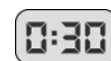
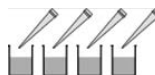
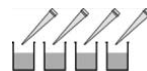
## Ledd 1 – blodinkubasjon

1. Samle inn pasientblod oppi innsamlingsrør og bland ved å riste dem ti (10) ganger, akkurat godt nok til at hele den innvendige overflaten av røret er dekket med blod, slik at antigen på rørveggene løses opp.
2. Inkuber rørene vertikalt ved  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 16 til 24 timer.
3. Etter inkubering sentrifugerer du rørene i 15 minutter ved 2000 til 3000 RCF (g) for å separere plasmaet og de røde cellene.
4. Etter sentrifugering må du unngå å pipettere opp og ned eller blande plasma på noen måte før innsamling. Du må til enhver tid passe på å ikke å forstyrre materialet på geloverflaten.



## Ledd 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

1. Ekvilibrer ELISA-komponenter, med unntak av 100X-konjugat-konsentratet, til romtemperatur i minst 60 minutter.
2. Rekonstituer settstandarden til 8,0 IE/ml med destillert eller deionisert vann. Klargjør fire (4) standardfortynninger.
3. Rekonstituer frysetørret 100X-konjugatkonsentrat med destillert eller deionisert vann.
4. Klargjør konjugat med arbeidsstyrke i den grønne fortynningsløsningen og tilsett 50  $\mu\text{l}$  til alle brønnene.
5. Tilsett 50  $\mu\text{l}$  testplasmaprøver og 50  $\mu\text{l}$  standarder til de aktuelle brønnene. Bland med en rister.
6. Inkuber i 120 minutter ved romtemperatur.
7. Vask brønnene minst 6 ganger med 400  $\mu\text{l}$  vaskebuffer per brønn.
8. Tilsett 100  $\mu\text{l}$  enzymsubstratløsning til brønnene. Bland med en rister.
9. Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur.
10. Tilsett 50  $\mu\text{l}$  enzymstoppløsning til alle brønnene. Bland med en rister.
11. Les av resultatene ved 450 nm med 620 til 650 nm referansefilter.
12. Analyser resultatene.



Varemerker: QIAGEN®, QuantiFERON® (QIAGEN-gruppen); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

#### **Begrenset lisensavtale for QuantiFERON-CMV ELISA-settet**

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

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Noen av disse andre kontrollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem, og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruksrådene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydning, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i ikke å la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2012 Cellestis, et QIAGEN-selskap, med enerett.

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

E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)

