
QuantiFERON[®]-CMV

bipacksedel 2 x 96

Ett interferon-gammatest för helblod som mäter respons på peptidantigener för humant cytomegalovirus

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australien

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

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, Tyskland

1075110SV rev. 01



Innehåll

Avsedd användning	5
Inledning	5
Användningsprinciper för analysen	6
Tid som krävs för att utföra analysen	6
Reagenser och förvaring	7
Material som behövs men inte medföljer	8
Förvaring och hantering	8
Varningar och säkerhetsåtgärder	9
Provtagning och -hantering	10
Anvisningar för användning	11
Steg 1 – Inkubering av blod och insamling av plasma	11
Steg 2 – QuantiFERON-CMV ELISA för mänskligt IFN- γ	11
Beräkningar och tolkningar av testet	14
Tolkning av resultat	15
Begränsningar	15
Förväntade värden	16
Testets egenskaper	17
Jämförande testning	17
Analyströskel	18
Kliniska studier	18
Specificitet	19
Sensitivitet	19
Studier som påvisar klinisk nytta	19
Internationella konsensusriktlinjer för hantering av cytomegalovirus vid transplantation av fasta organ	22
Analyseffektens egenskaper	23
Teknisk information	25
Indeterminanta resultat	25
Felsökningsguide	26

Referenser	27
Teknisk support	28
Förkortad testprocedur	30
Steg 1 – blodinkubering	30
Steg 2 – IFN- γ ELISA	30

Avsedd användning

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) är en in vitro-analys som använder en blandning av peptider som simulerar humant cytomegalovirus-proteiner (CMV) i syfte att stimulera celler i hepariniserat helblod. Detektion av interferon-gamma (IFN- γ) med enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) används för att kvantifiera in vitro-respons på de peptidantigener som är associerade med immunkontroll av CMV-infektion. Försämring av den här immunfunktionen kan associeras med utveckling av CMV-sjukdom. Den avsedda användningen av QF-CMV är att övervaka en patients nivå av anti-CMV-immunitet.

QF-CMV är inte ett test för att fastställa CMV-infektion och ska inte användas för att utesluta CMV-infektion.

Inledning

CMV är ett herpesvirus som infekterar mellan 50–85 % av den vuxna befolkningen. Det är en vanligt förekommande komplikation vid immunsupprimering, särskilt efter transplantation, och kan bidra avsevärt till ökad morbiditet och mortalitet hos transplantationspatienter. Aktuella behandlingar mot immunsupprimering som används för att förhindra att ett transplanterat organ stöts bort har skadliga effekter på respons för T-lymfocyter och cellförmedlad immunitet (CMI), vilket resulterar i ökad känslighet för virusinfektioner efter transplantation. Betydelsen av T-celfunktionen vid hämmande av CMV-replikation understryks också av det faktum att CD8⁺ CMV-specifika cytotoxiska T-lymfocyter (CTL:er) kan skydda mot virusassocierade patogener. Uppräkning av CD8⁺ CMV-specifika CTL:er hos immunsupprimerade patienter och produktion av IFN- γ kan hjälpa till att förutse risken för att utveckla CMV-sjukdom. IFN- γ -produktion kan vara en funktionell ersättning för identifiering av CMV-specifika CTL:er.

QF-CMV är en analys för CMI-responser på peptidantigener som simulerar CMV-proteiner. CMV-peptiderna är utformade för att rikta in sig på CD8⁺ T-celler, inklusive följande HLA klass I-haplotyper: A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 och Cw6 (A30, B13), vilka täcker in > 98 % av befolkningen. Personer som är infekterade med CMV har vanligen CD8⁺-lymfocyter i blodet som känner igen de här antigenerna. Den här igenkänningsprocessen innefattar generering och sekretion av cytokinet, IFN- γ . Detektionen och den efterföljande kvantifieringen av IFN- γ utgör grunden för det här testet.

Användningsprinciper för analysen

Testet QF-CMV utförs i 2 steg. Först samlas helblod upp i vart och ett av QF-CMV-CMV-provtagningsrören, vilka inkluderar ett Nil-kontrollrör, CMV-antigenrör och ett mitogenrör.

Mitogenröret används som positiv kontroll i QF-CMV-testet. Detta kan vara särskilt befogat om det finns tveksamheter om personens immunstatus.

Rören ska inkuberas i 37 °C så fort som möjligt, och inom 16 timmar efter uppsamlingen. Efter en inkuberingstid på 16 till 24 timmar centrifugeras rören, plasman tas bort och mängden IFN- γ (IU/ml) mäts med QF-CMV ELISA.

Mängden IFN- γ i plasmaprover från CMV-antigenrör och mitogenrör kan ofta ligga ovanför den övre gränsen för de flesta ELISA-läsare, även för personer som är måttligt immunsupprimerade. För **kvalitativa** resultat använder du värdena som beräknats för utspädd plasma. För **kvantitativa** resultat, där de faktiska IU/ml-värdena krävs, ska plasmaproverna spädas till 1/10 i Green Diluent och analyseras i ELISA tillsammans med utspädd plasma.

Obs: För prover som ligger innanför intervallet för QF-CMV ELISA (dvs. upp till 10 IU/ml) ska resultatet som erhålls med den utspädda plasman användas. För sådana IFN- γ -koncentrationer kan värdena som erhålls med 1/10-spädningen för plasmaproverna vara inexakta.

Ett test anses vara reaktivt för en IFN- γ -respons när värdena vid avläsning av CMV-antigenröret ligger avsevärt över värdet för Nil IFN- γ IU/ml. Det mitogenstimulerade plasmaprovet fungerar som en IFN- γ -positiv kontroll för varje prov som testats. En låg respons på mitogen indikerar ett obestämt resultat när ett blodprov även har en icke-reaktiv respons på CMV-antigenerna. Detta mönster kan uppstå vid otillräckligt antal lymfocyter, minskad lymfocytaktivitet på grund av felaktig provhantering, felaktig fyllning/blandning av mitogenröret, eller oförmåga hos patientens lymfocyter att generera IFN- γ , som är fallet hos patienter som nyligen har genomgått en transplantation. Nil-provet är avsett för bakgrundskorrigerig eller korrigerig för icke-specifik IFN- γ i blodprover. IFN- γ -nivån hos Nil-röret subtraheras från IFN- γ -nivån för CMV-antigenröret och mitogenröret (i "Tolkning av resultat" på sidan 15 i den här bipacksedelns finns anvisningar för hur QF-CMV-resultat ska tolkas).

Tid som krävs för att utföra analysen

En uppskattning av den tid som krävs för att utföra analysen QF-CMV anges nedan. Tiden för att testa flera prover när de är indelade i batchar visas också:

Inkubering av blodrör i 37 °C:	16 till 24 timmar
ELISA:	Ca 3 timmar för 1 ELISA-platta
	Mindre än 1 timmes arbete
	Lägg till 10 till 15 minuter för varje extra platta

Reagenser och förvaring

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (provtagingsrör för CMV och kontrollantigen, förpackning för en patient)	
Katalognr	0192-0301
Antal beredningar	1
QuantIFERON Nil Control (QuantIFERON Nil-kontroll, grått lock)	1 rör
CMV Antigen (CMV-antigen, blått lock)	1 rör
QuantIFERON Mitogen Control (QuantIFERON mitogen-kontroll, lila lock)	1 rör
Bipacksedel	1

QuantIFERON-CMV ELISA Components (QuantIFERON-CMV ELISA-komponenter)	
Katalognr	0350-0201
Remсор för mikropatta	24 x 8 brunnremсор
Human IFN- γ Standard (human IFN- γ -standard), frystorkad	1 x flaska
Green Diluent (grön diluent)	1 x 30 ml
QuantIFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantIFERON-konjugatkoncentrat (100X)), frystorkat	1 x 0,3 ml
QuantIFERON Wash Buffer 20X Concentrate (QuantIFERON-tvättbuffertkoncentrat (20X))	1 x 100 ml
QuantIFERON Enzyme Substrate Solution (QuantIFERON-enzymsubstratlösning)	1 x 30 ml
QuantIFERON Enzyme Stopping Solution (QuantIFERON-enzymstopplösning)	1 x 15 ml

Material som behövs men inte medföljer

- 37 °C-inkubator; CO₂ behövs inte
- Kalibrerade pipetter med variabel volym för tillförsel av 10 µl till 1000 µl med engångspetsar
- Kalibrerad flerkanalspipett med kapacitet för tillförsel av 50 µl och 100 µl med engångspetsar
- Skakapparat för mikroplatta
- Avjoniserat eller destillerat vatten, 2 liter
- Tvätt för mikroplatta (automatisk tvätt rekommenderas)
- Läsare för mikroplatta utrustad med 450 nm-filter och referensfilter för 620 nm till 650 nm

Förvaring och hantering

Provtagningsrör

- Förvara provtagningsrör i 4 °C till 25 °C.
- Hållbarheten för QuantiFERON-CMV-provtagningsrör är maximalt 15 månader från tillverkningsdatum om de förvaras i 4 °C till 25 °C.

Reagenser i ELISA-kitet

- Förvara kitet i 2 °C till 8 °C.
- Skydda alltid enzymsubstratlösning mot direkt solljus.

Rekonstituerade och oanvända reagenser

Instruktioner om hur reagenser rekonstitueras finns i "Anvisningar för användning – steg 2" (steg 3 och 5 på sidorna 11 och 12).

- Den rekonstituerade kit-standarden kan förvaras i upp till 3 månader om den förvaras i 2 °C till 8 °C.

Notera datumet då kit-standarden rekonstituerades.

- Efter rekonstituering måste oanvänt QuantiFERON-konjugatkoncentrat (100X) återföras till förvaring i 2 °C till 8 °C och det måste användas inom 3 månader.

Notera datumet då konjugatet rekonstituerades.

- Working strength-konjugat måste användas inom 6 timmar efter beredning.
- Working strength-tvättbuffert kan förvaras i rumstemperatur (17 °C till 27 °C) i upp till 2 veckor.

Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning.

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.



VARNING: Hantera humant blod som potentiellt infektiöst.
Följ relevanta riktlinjer för hantering av blod.

Följande risk- och säkerhetsfraser gäller för komponenter i QF-CMV ELISA Kit.

QuantiFERON-enzymstopplösning



Innehåller svavelsyra: Irriterande. Risk- och säkerhetsfraser: * R36/38, S26-36/37/39

■ **Grön diluent** innehåller vanligt musserum och kasein, vilket kan framkalla allergiska reaktioner. Undvik hudkontakt.

Akuthjälp vid incidenter med kemikalier

Spill, läckage, exponering eller olycka

Ring CHEMTREC dygnet runt

I USA och Kanada: 1-800-424-9300

Utanför USA och Kanada: +1-703-527-3887 (mottagaren betalar samtalet)

Mer information

Säkerhetsdatablad: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Irriterande för ögon och hud; S26: Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare; S36/37/39: Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar och skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

Provtagning och -hantering

Viktigt att tänka på före start:

Avvikelser från anvisningarna på bipacksedeln för QF-CMV kan leda till felaktiga resultat. Läs anvisningarna noga före användning.

- Använd inte kitet om någon reagensflaska uppvisar tecken på skador eller läckage.
- Blanda eller använd inte ELISA-reagenser från andra QF-CMV ELISA-kitbatchar.
- Kassera oanvända reagenser och biologiska prover i enlighet med lokala och nationella föreskrifter.
- Använd inte QF-CMV-provtagningsrör eller QF-CMV ELISA-kit efter utgångsdatum.

QF-CMV använder följande provtagningsrör:

1. Nil-kontroll, grått lock
2. CMV-antigen, blått lock
3. Mitogen-kontroll, lila lock

Antigener har torkats på innerväggarna i provtagningsrören, så det är därför viktigt att innehållet i rören blandas omsorgsfullt med blodet. Rören ska överföras till en 37 °C-inkubator så fort som möjligt, och inom 16 timmar efter uppsamlingen.

För att få ett optimalt resultat ska följande procedurer tillämpas:

1. Använd venpunktur och samla upp 1 ml blod från varje patient direkt i vart och ett av QF-CMV-provtagningsrören.

- Eftersom 1 ml-rör samlar upp blod relativt långsamt ska röret hållas kvar mot nålen i 2–3 sekunder när röret verkar vara helt fyllt så säkerställer du att rätt volym blod har samlats upp.

Det svarta märket på sidan av rören indikerar volymen 1 ml. QF-CMV-blodprovtagningsrör är godkända för volymer mellan 0,8 och 1,2 ml. Om blodnivån i ett rör inte ligger nära markeringen bör blodprovet tas om.

- QF-CMV-provtagningsrör är godkända för uppsamling av volymer från 0,8 ml till 1,2 ml på 810 meters höjd. Ovanför denna höjd ska användaren säkerställa att blod samlas upp i varje rör inom de här gränserna. Om endast små blodvolymer erhålls kan blod samlas upp med hjälp av en spruta. Överför sedan 1 ml till vart och ett av de 3 rören. Av säkerhetsskäl utförs detta lämpligast genom att ta bort sprutnålen (relevanta säkerhetsprocedurer måste följas), ta bort locken från de tre QF-CMV-rören och tillsätta 1 ml blod i varje rör (upp till det svarta märket på sidan av etiketten på röret). Sätt tillbaka locken ordentligt och blanda enligt beskrivningen nedan.
- Om en fjärilsnål används för blodprovet bör ett s.k. spolrör användas för att säkerställa att slangen fylls med blod innan QF-CMV-provtagningsrören används.

2. Omedelbart efter att du har fyllt rören skakar du dem tio (10) gånger så att hela den invändiga ytan är täckt med blod. Detta görs för att lösa upp antigenerna som finns på väggarna inuti röret.

- Rören ska ha en temperatur på 17–25 °C när de fylls med blod.
- För häftig skakning av rören kan orsaka att gel förstörs vilket kan leda till avvikande resultat.

3. Märk rören ordentligt.
4. Rören ska överföras till en $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ -inkubator så fort som möjligt, och inom 16 timmar efter uppsamlingen. Blodproverna får inte kylas eller frysas ned.

Anvisningar för användning

Steg 1 – Inkubering av blod och insamling av plasma

1. Om blodet inte inkuberas direkt efter insamling måste rören blandas igen omedelbart innan inkuberingen, enligt beskrivningen i steg 2 i det föregående avsnittet.
2. Inkubera rören STÅENDE i 37 °C i 16 till 24 timmar. Inkubatorn behöver inte CO_2 eller fuktas.
3. Efter inkubering kan provtagningsrören förvaras i mellan 2 °C och 27 °C i upp till 3 dagar innan nästa steg. Efter inkubering av rören i 37 °C ska de centrifugeras i 15 minuter med 2000 till 3000 RCF (g). Gelpluggen separerar cellerna från plasman. Om separering uteblir ska rören centrifugeras igen med högre hastighet.
 - Plasma kan också samlas in utan centrifugering, men du måste då vara extra försiktig för att inte cellerna ska skadas när plasman avlägsnas.
4. Efter centrifugering ska du undvika att pipettera upp och ned eller blanda plasman på något sätt innan insamling. Var alltid försiktig så att inte materialet på gelytan förstörs.
 - Plasmaprover ska endast samlas in med pipett.
 - Plasmaprover kan laddas direkt från centrifugerade provtagningsrör till QF-CMV ELISA-plattan, även när automatiska ELISA-terminaler används.
 - Plasmaprover kan förvaras i upp till 28 dagar i 2 °C till 8 °C eller, om plasman har extraherats, även under längre tid vid förvaring i -20 °C (helst under -70 °C) i rör eller förvaringsbehållare för plasma.

Steg 2 – QuantiFERON-CMV ELISA för mänskligt IFN- γ

1. Alla plasmaprover och reagenser utom konjugatkoncentrat (100X) måste ha rumstemperatur (17 °C till 27 °C) innan de används. Ekvilibrera i minst 60 minuter.
2. Ta bort remsor som inte används från ramen. Lägg tillbaka i foliebehållaren, återförslut och förvara dem i kylskåp tills de behövs.

Se till att det finns minst en remsa för QF-CMV ELISA-standarder och tillräckligt många remsor för de patienter som ska testas. Ramen och locket ska sparas efter användning och användas tillsammans med de oanvända remsorna.
3. Rekonstituera den frystorkade kitstandarderna med den volym avjoniserat eller destillerat vatten som anges på etiketten till standardflaskan. Blanda försiktigt för att minimera skumbildning och få en fullständig solubilisering. Rekonstituering av standarderna till den angivna volymen ger en lösning med en koncentration på 8,0 IU/ml.

4. **Standardkurvan bereds med 3 spädningar av kitstandarden och enbart grön diluent som standard 4 (0 IU/ml).**

Använd den rekonstituerade kitstandarden för att få fram en spädningsserie med 3 IFN- γ -koncentrationer. Späd i grön diluent (GD) (se bild). Standarderna måste minst analyseras i duplikat, och följande steg ger en tillräcklig volym för detta.

- Märk 4 rör med "S1", "S2", "S3", "S4".
- Tillsätt 150 μ l grön diluent i 4 rör (S1–S4).
- Tillsätt 150 μ l kitstandard i S1 och blanda väl.
- Överför 50 μ l från S1 till S2 och blanda väl.
- Överför 50 μ l från S2 till S3 och blanda väl.
- Enbart grön diluent används som nollstandard (S4).

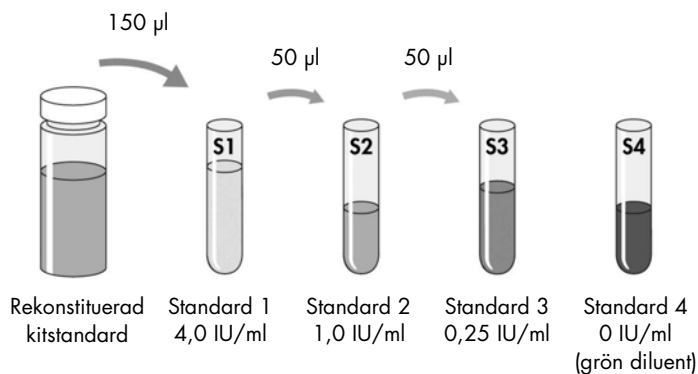


Bild 1. Beredning av standardkurva. Bered nya spädningar av kitstandarden för varje ELISA-procedur.

- Rekonstituera frystorkat QuantiFERON-konjugatkoncentrat (100X) med 0,3 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda försiktigt för att minimera skumbildning och ge konjugatet en fullständig solubilisering.**
- Working strength-konjugat bereds genom att erforderad mängd rekonstituerat konjugatkoncentrat (100X) späds i grön diluent enligt Tabell 1 – Beredning av konjugat.**
 - Blanda väl, men försiktigt för att undvika skumbildning.
 - Oanvänt konjugatkoncentrat (100X) ska återföras till förvaring i 2 °C till 8 °C omedelbart efter användning.
 - Använd endast grön diluent.

Tabell 1. Beredning av konjugat

Antal remsor	Volym konjugatkoncentrat (100X)	Volym grön diluent
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

7. Innan analys ska plasmaproverna blandas för att säkerställa att IFN- γ fördelas jämnt i varje prov. Späd även CMV- och mitogen-plasmaprover 1/10 i grön diluent (10 µl plasma blandad med 90 µl GD) om kvantitativa resultat behövs. Nil-plasman ska inte spädas.

Vi rekommenderar att följande prover testas:

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

Följande patientprover stöds också av QuantiFERON-CMV-analysprogrammet:

- 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. Tillsätt 50 µl nyberett working strength-konjugat i rätt ELISA-brunnar med hjälp av en flerkanalpipett.

9. Tillsätt 50 µl testplasmaprover i rätt brunnar med hjälp av en flerkanalpipett. Tillsätt slutligen 50 µl vardera av standarderna 1 till 4.

10. Blanda konjugatet och plasmaproverna/standarderna väl med en skakapparat för mikropeltor i 1 minut.

11. Täck varje platta med lock och inkubera i rumstemperatur (17 °C till 27 °C) i 120 ± 5 minuter.

- Plattorna ska inte utsättas för direkt solljus under inkubering.

12. **Under inkuberingen ska en del tvättbuffertkoncentrat (20X) spädas med 19 delar avjoniserat eller destillerat vatten och blandas väl. Tillräckligt med tvättbuffertkoncentrat (20X) medföljer för att bereda 2 l working strength-tvättbuffert.**
Tvätta brunnarna med **400 µl** working strength-tvättbuffert i minst 6 cykler. En automatisk platttvättmaskin bör användas.
- För att analysen ska bli korrekt måste brunnarna tvättas noggrant. Kontrollera att varje brunn är **helt fylld** med tvättbuffert ända upp till överkanten av brunnen under varje tvättcykel. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
 - Standarddesinfektionsmedel för laboratoriebruk ska tillsättas i avloppsbehållaren. Följ fastställda rutiner för dekontaminering av potentiellt smittfarligt material.
13. **Vänd plattorna med ovansidan nedåt på en absorberande handduk för att avlägsna rester av tvättbuffert. Tillsätt 100 µl enzymsubstratlösning i varje brunn och blanda noggrant i en skakapparat för mikroplattor.**
14. **Täck varje platta med lock och inkubera i rumstemperatur (17 °C till 27 °C) i 30 minuter.**
- Plattorna ska inte utsättas för direkt solljus under inkubering.
15. **Efter en inkubering på 30 minuter ska 50 µl enzymstopplösning tillsättas i varje brunn och blandas ut.**
- Enzymstopplösning ska tillsättas i brunnarna i samma ordning och vid ungefär samma hastighet som substratet tillsattes i steg 13.
16. **Mät den optiska densiteten (OD) för varje brunn i en läsare för mikroplattor inom 5 minuter efter att reaktionen har stoppats. Läsaren ska ha ett 450 nm-filter och ett referensfilter på 620 nm till 650 nm. OD-värden används för att beräkna resultaten.**

Beräkningar och tolkningar av testet

QuantiFERON-CMV-analysprogram för analys av rådata och beräkning av resultat kan erhållas från QIAGEN på www.QuantiFERON.com.

Programmet gör en kvalitetsbedömning av analysen, genererar en standardkurva och ger ett testresultat för varje patient (läs mer i avsnittet Tolkning av resultat).

Istället för att använda QF-CMV-analysprogram kan resultaten bestämmas enligt nedanstående metod.

Generering av standardkurva

Beräkna OD-medelvärdet för kitstandardreplikaten på varje platta.

Skapa en $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardkurva genom att rita ut $\log_{(e)}$ för OD-medelvärdet (y-axeln) mot $\log_{(e)}$ för IFN- γ -koncentrationen hos standarderna i IU/ml (x-axeln). Nollstandard tas ej med i beräkningen. Beräkna standardkurvas trendlinje med regressionsanalys.

Använd standardkurvan för att bestämma IFN- γ -koncentrationen (IU/ml) för vart och ett av plasmaproverna i testet genom att använda OD-värdet för vart och ett av proverna.

Beräkningarna kan göras med hjälp av den programvara som är tillgänglig för läsare för mikroplattor och vanliga kalkyl- och statistikprogram (t.ex. Microsoft® Excel®). Den här programvaran ska användas för att beräkna regressionsanalysen, variationskoefficienten (%CV) för standarderna och standardkurvas korrelationskoefficient (r).

Kvalitetskontroll av testet

Hur exakt testresultatet blir beror på hur exakt standardkurvan är. Av den här anledningen måste de resultat som har beräknats från standarder utvärderas innan provresultaten från testet kan tolkas.

För att ELISA ska vara giltigt:

- Det genomsnittliga OD-värdet för standard 1 måste vara $\geq 0,600$.
- %CV för replikata OD-värden för standard 1 och standard 2 måste vara $< 15 \%$.
- Replikata OD-värden för standard 3 och standard 4 får inte variera mer än 0,040 OD-enheter från medelvärdet.
- Korrelationskoefficienten (r) som beräknas utifrån de genomsnittliga absorbansvärdena för standarderna måste vara $\geq 0,98$.

Om körningen inte uppfyller de ovanstående kriterierna är den ogiltig och måste göras om.

Det genomsnittliga OD-värdet för nollstandard (grön diluent) bör vara $\leq 0,150$. Om det genomsnittliga OD-värdet är $> 0,150$ bör plattrengöringsproceduren ses över.

Tolkning av resultat

QuantiFERON-CMV-resultat ska tolkas med hjälp av följande kriterier:

CMV minus Nil (IU/ml)*	Mitogen minus Nil (IU/ml)	QF-CMV-resultat	Rapport/tolkning
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Icke-reaktiv	Anti-CMV-immunitet har INTE detekterats
$\geq 0,2$	Alla	Reaktiv	Anti-CMV-immunitet har detekterats
$< 0,2$	$< 0,5$	Indeterminant†	Resultatet är indeterminant för CMV-mottaglighet

* IFN- γ -responserna på CMV antigen- och mitogen-positivkontrollen kan ofta ligga utanför mikroplattläsarens mätområde. Detta påverkar inte testresultaten.

† Se avsnittet Felsökning för sannolika orsaker.

Begränsningar

Resultaten av QuantiFERON-CMV-testerna måste användas tillsammans med den enskilda patientens epidemiologiska historik, aktuella medicinska status och andra diagnostiska bedömningar.

Ej tillförlitliga eller indeterminanta resultat kan bero på:

- Den procedur som beskrivs i bipacksedeln har inte följts.
- Onormalt höga nivåer IFN- γ i Nil-röret.
- Det tog mer än 16 timmar från det att blodprovet togs tills det inkuberades vid 37 °C.

Förväntade värden

Förväntade IFN- γ -värden med QuantiFERON-CMV erhöles genom testning av 591 prover från friska vuxna, av vilka 341 var CMV-seropositiva och 250 var seronegativa. Hos de 250 friska vuxna personerna utan CMV-infektion, vilket bestämdes med hjälp av anti-CMV-serologi (CMV-seronegativ), genererade 100 % av personerna IFN- γ responser på < 0,2 IU/ml för CMV-antigenröret (minus Nil). Fördelningen för CMV-antigenröret (minus Nil) för de 341 friska personerna med CMV-infektion, vilket bestämdes med hjälp av anti-CMV-serologi (CMV-seropositiv), visas i bild 2.

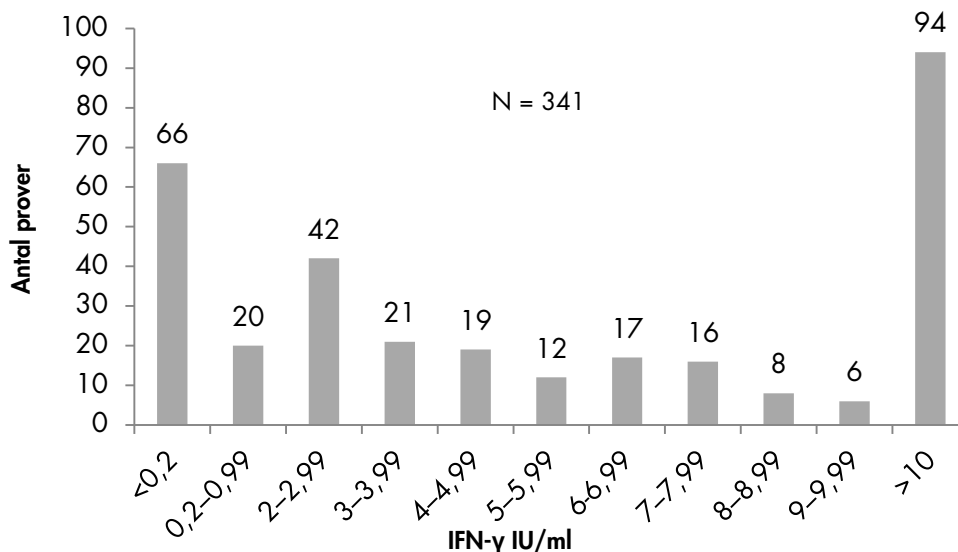


Bild 2. Distribution för CMV-Nil IFN- γ -responser hos seropositiva friska personer (n=341).

Fördelningen för mitogenresultat (minus Nil-bakgrund) i 731 normala blodprover från friska vuxna personer (oavsett om känd CMV-infektion förekommer eller inte) visas i bild 3. Mitogenresultat (minus Nil) på mindre än 0,5 IU/ml indikerar antingen att testet har misslyckats eller att personen har ett försvagat immunsystem. Hos en frisk population hamnade endast 2 av 731 resultat inom den här kategorin.

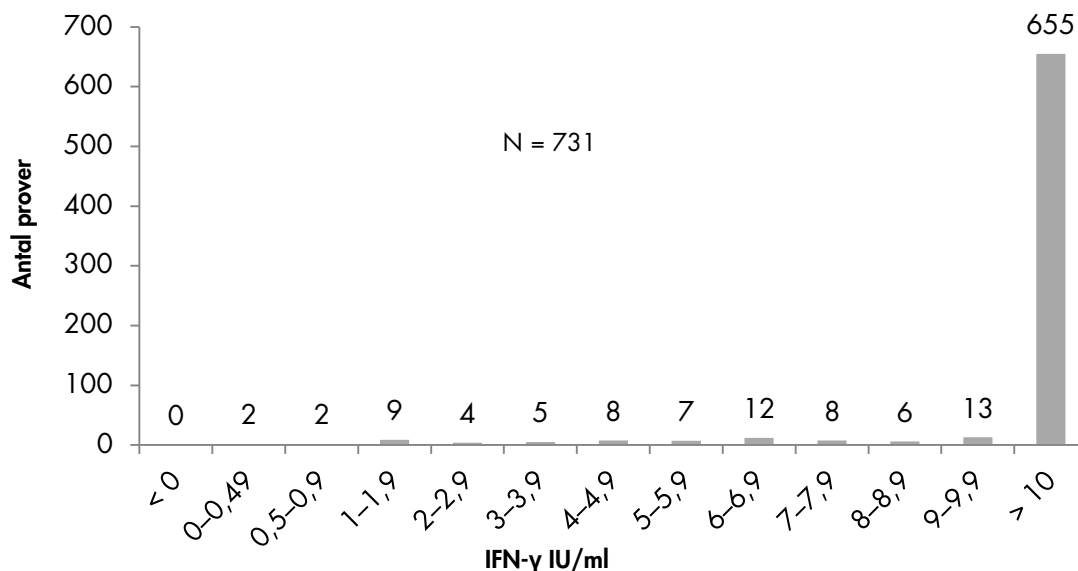


Bild 3. Fördelning av Mitogen-Nil IFN- γ -responser hos friska vuxna personer (n = 731).

Förväntade värden för Nil-rör visas i bild 4. Data härleddes från 1020 plasmaprover från friska vuxna personer som testats med QuantiFERON-CMV ELISA.

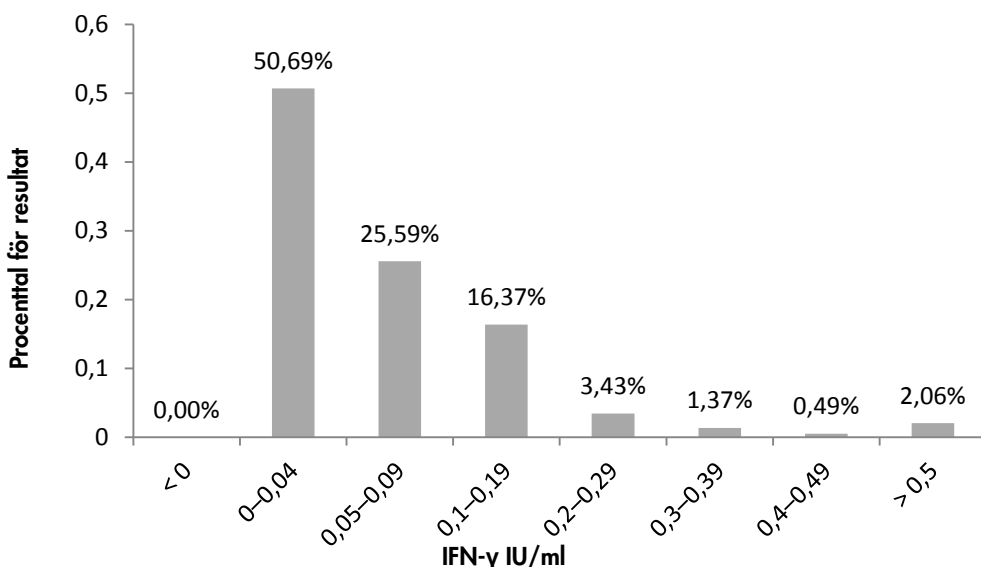


Bild 4. Fördelning (uttryckt som % av populationen) för Nil IFN- γ -responser hos friska vuxna personer (n = 1020).

Testets egenskaper

Jämförande testning

En testtröskel för detektering av tidigare CMV-exponering med hjälp av QF-CMV skapades efter analys av resultaten från en grupp friska personer (n = 223), där QF-CMV-resultaten jämfördes med CMV-serologiska resultat. En ROC-analys fastställde att en testtröskel på 0,04 IU/ml (efter nil-subtrahering) gav optimala positiva och negativa prediktiva värden för QF-CMV (område under kurvan = 0,9679 [95 %CI = 0,9442 till 0,9915, $p < 0,0001$]), och därför representerade den tröskel vid vilken den här analysen presterade som mest effektivt för en frisk befolkning enligt den avsedda användningen.

I jämförande testning jämfördes QF-CMV:s prestanda med prestandan hos SeraQuest CMV IgG-serologitestet (Quest International). QF-CMV-analysen visade 95 % (294/310 personer) överensstämmelse med det jämförande anti-HCMV-serologitestet för friska personer, där ingen av de 149 seronegativa blodgivarna uppvisade någon reaktivitet med QF-CMV, och där 145 av 161 seropositiva blodgivare uppvisade en reaktiv IFN- γ -respons. Den totala positiva överensstämmelsen var 90 % med ett värde för negativ överensstämmelse på 100 %. Överensstämmelsenivån mellan IFN- γ -responser på CMV-peptider enligt mätning med QF-CMV hos friska frivilliga och anti-CMV-serologistatusen hos de här personerna enligt serologitestet SeraQuest CMV IgG visas i tabell 2.

Tabell 2. Överensstämmelse mellan QuantiFERON-CMV och CMV IgG-serologitestet hos friska personer.

		CMV-serologi		Totalt
		Positiva	Negativa	
QuantiFERON-CMV	Reaktiva	145	0	145 (46,8 %)
	Icke-reaktiva	16	149	165 (53,2 %)
	Totalt	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Analysröskel

Den rekommenderade kliniskt test-tröskeln för den här analysen är 0,2 IU/ml i CMV-antigenröret (minus Nil), men olika trösklar kan också valideras för olika kliniska inställningar. Detta beror på de grundläggande immunologiska skillnaderna mellan en normal testpopulation och populationer där testet anses som kliniskt användbart – gäller särskilt immunsupprimerade personer som på grund av immunsuppressering löper risk att utveckla symptomatisk CMV-infektion och/eller sjukdom. Hos sådana högriskpersoner ligger den kliniska nyttan hos QF-CMV i att göra en korrekt detektering av nivån på anti-CMV-immuniteten hos personerna, eftersom avsaknaden av immunitet kan vara associerad med utveckling av CMV-sjukdom (1–5, 7, 8, 11–16).

Kliniska studier

Eftersom det inte finns en bestämd standard för att bekräfta eller utesluta diagnos på cytomegalovirus-infektion kan uppskattningar av sensitivitet och specificitet för QF-CMV inte utvärderas praktiskt. Specificiteten och sensitiviteten för QF-CMV har uppskattats genom att bedöma överensstämmelsenivån mellan IFN- γ -responser på CMV-peptider, enligt mätning med QF-CMV hos friska frivilliga och anti-CMV-serologistatusen hos de här personerna enligt ett CMV IgG-serologitest.

Specificiteten för QF-CMV uppskattades genom att bedöma falskt positiva bestämningar (QF-CMV-reaktiv respons) hos friska frivilliga utan tecken på tidigare CMV-exponering (CMV-seronegativa personer). Sensitiviteten uppskattades genom att bedöma friska frivilliga utan tecken på tidigare CMV-exponering (CMV-seropositiva personer). Fastän QF-CMV använder ett stort antal CMV-specifika epitoper från olika CMV-proteiner, och därmed ger en bred klinisk tillämpning på ett brett urval av befolkningen med olika HLA-haplotyper i klass I, är inte täckningen av de här peptiderna 100 %. Eftersom HLA-haplotyperna hos personer som testats med CMV-serologi inte är kända, förväntades en liten procentandel av de serologipositiva personerna inte uppvisa respons på QF-CMV-rören.

Specificitet

I en studie som genomfördes med friska personer utan tecken på tidigare CMV-exponering (CMV-seronegativa personer där $n = 250$) var överensstämmelsenivån mellan IFN- γ -responser på CMV-peptider (enligt mätning med QF-CMV) och anti-CMV-serologi 100 %.

I alla andra utvärderingar av specificitet som genomförts hos mottagare av transplanterade fasta organ (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), mottagare av transplanterade hematopoetiska stamceller (7, 13) och HIV-infekterade patienter (2), har överensstämmelsenivån mellan IFN- γ -responser på CMV-peptider (enligt mätning med QF-CMV) och anti-CMV-serologi konsekvent visat sig vara 100 %.

Sensitivitet

I en studie som genomfördes med friska personer med tecken på tidigare CMV-exponering (CMV-seropositiva personer där $n = 341$) var överensstämmelsenivån mellan IFN- γ -responser på CMV-peptider (enligt mätning med QF-CMV) och anti-CMV-serologi 80,6 % (275/341). Den observerade avvikelserna kan bero på användning av den högre tröskeln för testet (0,2 IU/ml), falskt positiv CMV-serologi eller att personen inte är mottaglig för de CMV-peptider som ingår i analysen.

I utvärderingar av sensitivitet som genomförts hos mottagare av transplanterade fasta organ (1, 3, 4, 8, 12, 14–16), mottagare av transplanterade hematopoetiska stamceller (7, 13) och HIV-infekterade patienter (2) har vissa något lägre överensstämmelsenivåer påvisats mellan IFN- γ -responser på CMV-peptider (enligt mätning med QF-CMV) och CMV-seropositiva responser hos de här patienterna. Den lägre överensstämmelsenivån kan vara ett resultat av antingen falskt positiv CMV-serologi, patientens icke-mottaglighet för de CMV-peptider som ingår i analysen, eller frånvaro av reaktiva T-celler hos de här patienterna på grund av att de är immunsupprimerade.

Studier som påvisar klinisk nytta

Den avsedda användningen för både serologi och QF-CMV är att detektera immunitet mot CMV. I en transplantationssituation används CMV-serologi ofta innan transplantationen för att fastställa risken för CMV-komplikationer som kan uppstå hos mottagaren efter transplantationen. Testet har begränsat värde efter transplantationen. Alternativt kan QF-CMV användas för transplantationsmottagare för att bedöma nivån på CMV-immuniteten hos patienter som löper risk att utveckla symptomatisk CMV-infektion och/eller sjukdom på grund av immunsupprimering (6, 9–11).

Ett antal publicerade kliniska studier utförda på ett flertal transplantationskohorter har påvisat nyttan av QuantiFERON-CMV (1–5, 7, 8, 11–16).

I en stor studie av 108 mottagare av transplanterade fasta organ (4) hade patienter med ett reaktivt resultat för QF-CMV vid slutförandet av anti-CMV-profylax en avsevärt lägre andel fall av sjukdom som uppträder sent jämfört med de som hade ett icke-reaktivt resultat för QF-CMV (5,3 % respektive 22,9 %, $p=0,044$) (bild 5).

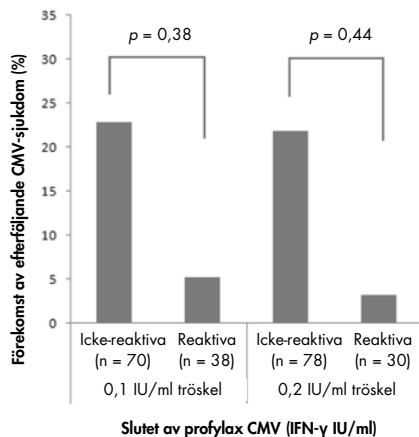


Bild 5. Andel patienter med CMV-sjukdom som uppträder sent med ett reaktivt resultat för QuantiFERON-CMV jämfört med ett icke-reaktivt resultat för QuantiFERON-CMV i slutskedet av profylax. Data reproducerade från Kumar et al.(4)

Dessutom var patienter med ett reaktivt QF-CMV-test vid slutförande av profylax oftare fria från CMV-sjukdom och under längre tid (bild 6), vilket indikerar att QF-CMV kan användas för att identifiera personer som löper risk att utveckla CMV-sjukdom som uppträder sent.

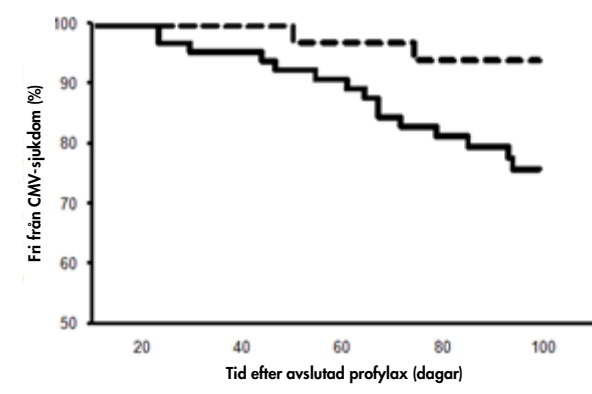


Bild 6. Tid för att utveckla CMV-sjukdom hos patienter med ett reaktivt resultat för QuantiFERON-CMV (markeras med en streckad linje) jämfört med ett icke-reaktivt resultat för QuantiFERON-CMV (markeras med en heldragen linje) i slutskedet av profylax. Data reproducerade från Kumar et al.(4)

Den här studien visade också att i en kohort med transplantationspatienter som löpte allra störst risk att utveckla CMV-sjukdom (CMV-seronegativa transplantationsmottagare som får ett organ från en CMV-seropositiv donator, dvs. D+/R-) var ett reaktivt resultat för QF-CMV när som helst efter profylax associerat med en 90-procentig chans att inte drabbas av CMV-sjukdom.

I en studie av 37 patienter med transplanterade fasta organ (12) hjälpte bedömningen av CMV-specifika CD8⁺ T-cell-responser med QF-CMV till med att förutse spontan eliminering av virus jämfört med progression för CMV-sjukdom efter ökning av CMV-viremi. I den här studien eliminerade 24/26 patienter (92,3 %) med reaktivt resultat för QF-CMV spontant CMV-virus medan endast 5/11 (45,5 %) patienter med ett icke-reaktivt resultat för QF-CMV hade samma utfall.

I en studie av 67 mottagare av transplanterad lunga där CMV-viremiepisoder efter transplantation bedömdes (14) observerades att 18/25 (72 %) CMV-viremiepisoder föregicks av ett icke-reaktivt QF-CMV-resultat, jämfört med 4/16 (25 %) episoder som föregicks av en reaktiv QF-CMV-respons (Fishers exakta test, $p = 0,0046$, se bild 7).

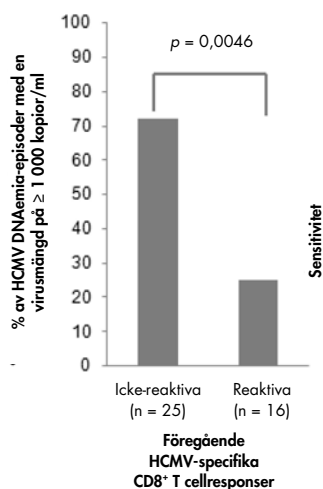


Bild 7. Statistisk analys av CMV-specifika CD8⁺ T- cellresponser enligt detektering med QuantiFERON-CMV och utveckling av CMV-viremi (Fishers exakta test, $p = 0,0046$). Data reproducerade från Weseslindtner et al (14).

I en stor prospektiv multicenterstudie av 127 mottagare av transplanterade fasta organ av typen D+/R- (15), som alla genomgick antiviral profylax, hade patienter med ett reaktivt resultat för QF-CMV (testat med en testtröskel på 0,1 IU/ml) vid samtliga tidpunkter efter slutförande av anti-CMV-profylax en avsevärt lägre andel fall av sjukdom som uppträder sent (mätt fram till 12 månader efter transplantationen), jämfört med de som hade ett icke-reaktivt resultat för QF-CMV och ett indeterminant resultat (6,4 %, 22,2 % respektive 58,3 %, $p < 0,001$).

När indeterminanta resultat också klassificerades som "Icke-reaktiva" var förekomsten av efterföljande CMV-sjukdom 6,4 % jämfört med 26,8 %, $p = 0,024$ (se bild 8). De positiva och negativa prediktiva QF-CMV-värdena för skydd mot CMV-sjukdom var 0,90 (95 % CI 0,74–0,98) respektive 0,27 (95 % CI 0,18–0,37), vilket indikerade att ett reaktivt resultat för QuantiFERON-CMV när som helst efter profylax associerades med en 90-procentig chans att inte drabbas av CMV-sjukdom. I den här studien visades att QF-CMV kan vara användbart för att förutse om patienter löper liten, medelhög eller hög risk att utveckla efterföljande CMV-sjukdom efter profylax.

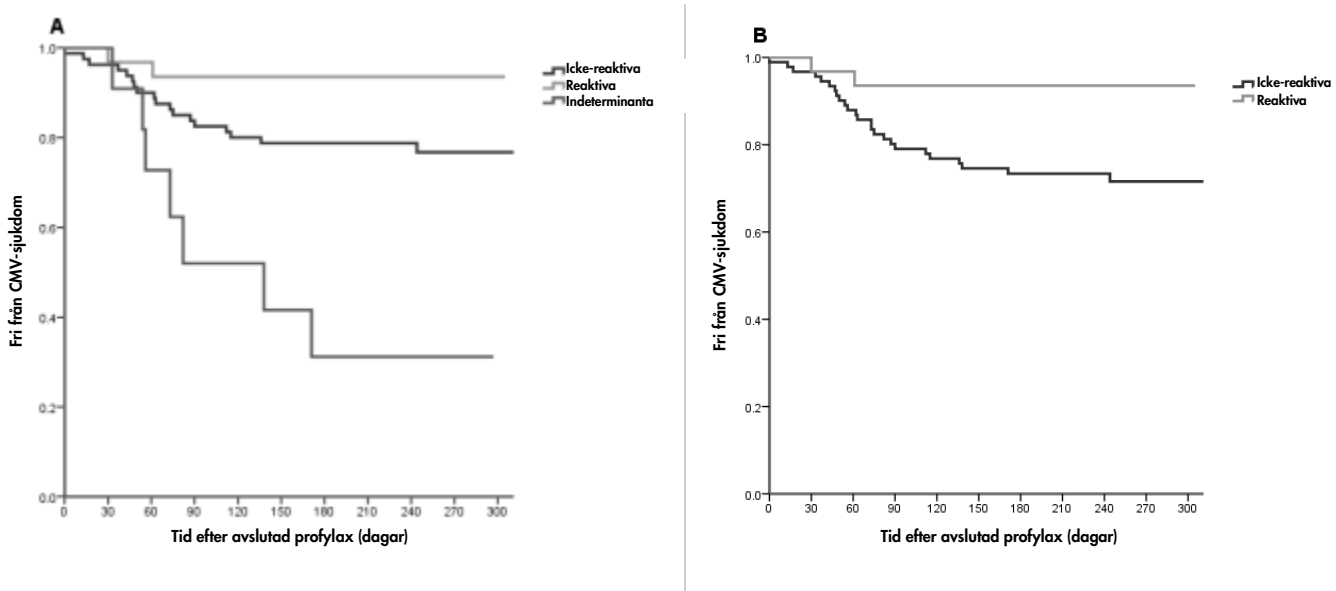


Bild 8. Kaplan-Meier-kurvor över förekomsten av CMV-sjukdom enligt resultatet för QF-CMV-analysen.

- A** Reaktiva jämfört med icke-reaktiva jämfört med indeterminanta QF-CMV-resultat (logrank-test, $p < 0,001$).
- B** Reaktiva jämfört med icke-reaktiva, där indeterminanta resultat betraktades som "icke-reaktiva" (logrank-test, $p = 0,024$).

I en prospektiv studie av 55 mottagare av transplanterade fasta organ (16) där förhållandet mellan QF-CMV-resultat före transplantation och episoder med CMV-replikation efter transplantation analyserades fann man att en högre förekomst av CMV-replikation efter transplantation observerades hos R(+)-mottagare med ett icke-reaktivt resultat för QF-CMV före transplantation (7/14 eller 50 %), jämfört med R(+)-mottagare med ett reaktivt resultat för QF-CMV (4/30 eller 13,3 %).

I den här studien fann man att mottagare med ett icke-reaktivt resultat för QF-CMV före transplantation som fick ett organ från en CMV-seropositiv donator hade tio gånger större risk att drabbas av CMV-replikation jämfört med de mottagare som var QF-CMV-reaktiva före transplantation (justerad OR 10,49, 95 % CI 1,88–58,46), och att QF-CMV-analys före transplantation kan vara användbart för att förutse risken för CMV-replikation efter transplantation och därmed kan ge möjlighet till individuell behandling av CMV-infektion efter transplantation av fasta organ.

Ett antal andra studier som undersöker detektion av CMV-specifika CD8⁺ T-cell-responser med QF-CMV i en kohort med transplantationsmottagare har genomförts (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) eller pågår för närvarande på olika platser i världen.

Internationella konsensusriktlinjer för hantering av cytomegalovirus vid transplantation av fasta organ

Den stora betydelsen av CMV-specifik immunövervakning har fastställts och dokumenterats i "International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation" (6). De här internationella riktlinjerna som har tagits fram av en grupp experter på CMV och transplantation av fasta organ, sammankallad av The Infectious Diseases Section på The Transplantation Society, utgör evidens och expert-baserade konsensusriktlinjer för hur CMV ska hanteras gällande diagnos, immunologi, förebyggande och behandling.

I de här riktlinjerna sägs att "Immunövervakning av CMV-specifika T-cell-responser kan identifiera personer som löper risk att drabbas av CMV-sjukdom efter transplantation och kan vara användbart vid genomförande av profylax och förebyggande behandling" (6).

Dessutom ger riktlinjerna rekommendationer om vad som bör ingå i en idealisk analys av immunövervakning, och här ingår:

- Förmåga att bedöma kvantitet och funktion hos en transplantationsmottagares CD4⁺- och CD8⁺ T-celler
- Förmåga att mäta IFN- γ
- Ska vara enkel att genomföra och reproducera samt vara kostnadseffektiv
- Ska gå snabbt att genomföra
- Det ska vara enkelt att skicka prover till specialiserade referenslaboratorier

QF-CMV uppfyller praktiskt taget alla kriterier som anges i de här riktlinjerna och utgör den enda standardiserade immunövervakningsanalysen med kapacitet för att detektera IFN- γ , specifikt för CMV.

Analyseffektens egenskaper

Metoden för mätning av IFN- γ -koncentration med QF-CMV ELISA har visat sig vara linjär från noll till 10 IU/ml (bild 9). Linjäritetsstudien utfördes genom att placera 5 replikat av 11 plasmapooler med kända IFN- γ -koncentrationer slumpvis på ELISA-plattan.

QF-CMV ELISA visar inga tecken på någon hög dos hookeffekt (prozone) med koncentrationer av IFN- γ på upp till 100 000 IU/ml.

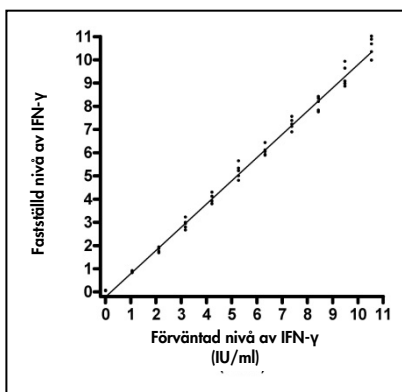


Bild 9. Linjäritetsprofil för QF-CMV ELISA fastställd genom testning av 5 replikat av 11 plasmaprover med kända IFN- γ -koncentrationer. Den linjära regressionslinjen har en lutning på $1,002 \pm 0,011$ och en korrelationskoefficient på 0,99.

Variationer inom och mellan analyser (%CV) för QF-CMV ELISA uppskattades genom att testa 20 plasmaprover med varierande IFN- γ -koncentrationer i 3 exemplar, i 3 laboratorier, under 3 dagar (ej i följd) av 3 operatörer. Varje prov har således testats 27 gånger i 9 oberoende analyskörningar. Ett prov var en Nil-kontroll och hade en beräknad IFN- γ -koncentration på 0,08 (95 % CI 0,07–0,09) IU/ml. Av resterande 19 plasmaprover låg koncentrationerna mellan 0,33 (0,31–0,34) och 7,7 IU/ml (7,48–7,92).

Variationer inom körning eller inom analys uppskattades genom att ta medelvärde för %CV för varje testplasma innehållande IFN- γ från varje plattkörning (n=9) och låg mellan 4,1 och 9,1 %CV. Medelvärdet inom körning %CV (\pm 95 % CI) var 6,6 % \pm 0,6 %. Noll-IFN- γ -plasma hade medelvärdet 14,1 %CV.

Variationer totalt eller mellan analyser bestämdes genom att jämföra de 27 beräknade koncentrationerna av IFN- γ för varje plasmaproov och låg mellan 6,6 och 12,3 %CV. Det generella medelvärdet %CV (\pm 95 % CI) var 8,7 % \pm 0,7 %. Noll-IFN- γ -plasma visade 26,1 %CV. Den här variationsnivån kan förväntas eftersom den beräknade koncentrationen av IFN- γ är låg och variationen kring en låg koncentrationssuppskattning är större än den kring högre koncentrationer.

Precisionsprofilen för QF-CMV ELISA visas i bild 10 och indikerar att variation inte ökar med högre koncentrationer av IFN- γ .

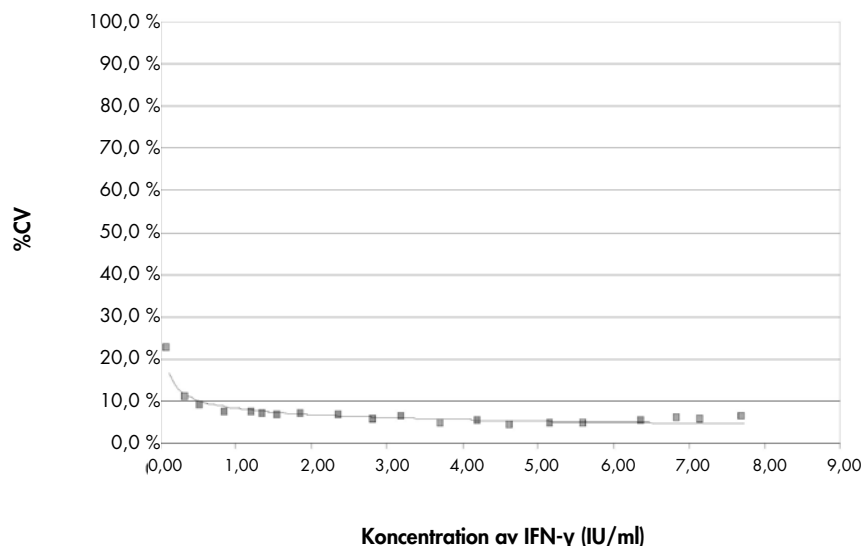


Bild 10. Precisionsprofil för QF-CMV ELISA fastställd genom testning av 20 plasmaprover i 3 exemplar, i 3 dagar (ej i följd), i 3 laboratorier och av 3 operatörer. Trendlinjen är en beräkning av minsta kvadratanpassning.

En studie genomfördes för att fastställa reproducerbarheten hos QF-CMV-test med hjälp av blodprover från 8 personer med okänd CMV-status. Blod från varje person samlades i tre uppsättningar med QF-CMV-rör (3x Nil, 3x CMV och 3x mitogen). De tre röruppsättningarna inkuberades på tre olika testplatser (ett set med Nil, CMV och mitogen per testplats) enligt beskrivningen i bipacksedeln. Efter 16–24 timmars inkubering centrifugerades rören och plasman samlades in.

ELISA utfördes därefter tre gånger på var och en av de tre testplatserna, vilket genererade tre QF-CMV-resultat för varje person per testplats (9 resultat totalt för alla testplatser). Varje testplats hade en oberoende operatör. Plattor som användes i studien var inte nödvändigtvis inom samma lotnummer, men de var alla inom sina respektive bäst före-datum.

Reproducerbarhet, både vad gäller diagnostisk status (reaktiv, icke-reaktiv eller indeterminant) och numeriskt värde, bestämdes för varje blodprov. Reproducerbarheten för numeriskt värde bedömdes endast i reaktiva prover (uttryckt som %CV), eftersom IFN- γ -nivåerna i icke-reaktiva prover var för låga för att ge någon meningsfull uppskattning av precision.

Generellt var den diagnostiska reproducerbarheten 100 % där den QF-CMV-diagnostiska statusen hos alla 8 frivilliga reproducerades på alla testplatser vid samtliga tillfällen, och inga indeterminanta prover rapporterades. Reproducerbarheten för reaktiva prover var acceptabel såväl på den enskilda testplatsen som mellan testplatser. Genomsnittligt %CV för var och en av testplatserna var 4,5 % (testplats 1), 5,9 % (testplats 2) och 7,3 % (testplats 3). Generellt var %CV mellan testplatserna 5,9 % för samtliga 5 reaktiva prover. Variationskoefficient med procentvärden under 10 % anses som utmärkt.

Teknisk information

Indeterminanta resultat

Indeterminanta resultat kan vara relaterade till immunstatus hos den enskilda personen som testas, men kan även sättas i samband med ett antal tekniska faktorer:

- Det tog mer än 16 timmar från det att blodprovet togs tills det inkuberades vid 37 °C.
- Blodprovet har förvarats över eller under det rekommenderade temperaturområdet (17 °C till 27 °C).
- Provtagningsrören har inte blandats tillräckligt.

Om det finns misstanke om tekniska problem i samband med provtagning eller hantering av blodprover ska hela QF-CMV-testet göras om med nya blodprover. ELISA-testet för stimulerad plasma kan göras om i det fall misstankar finns om att proceduren för ELISA-test inte har följts. Indeterminanta resultat (från låga mitogen-värden) förväntas inte ändras om testet görs om, såvida inte ett fel uppstod under ELISA-testet.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns också i den tekniska informationen på: www.QuantiFERON.com. Kontaktinformation finns på sidan 28 och på baksidan.

Felsökning av ELISA

Låga avläsningar av optisk densitet i standarder

Möjlig orsak	Lösning
a) Spädningsfel i standard	Kontrollera att spädnings av kitstandarderna bereds enligt bipacksedeln.
b) Pipetteringsfel	Kontrollera att pipetter kalibreras och används i enlighet med tillverkarens instruktioner.
c) För låg inkuberingstemperatur	Inkubering av ELISA ska utföras i rumstemperatur (17 °C till 27 °C).
d) För kort inkuberingstid	Inkubering av plattan med konjugat, standarder och prover ska ske i 120 ± 5 minuter. Enzymsubstratlösningen inkuberas på plattan i 30 minuter.
e) Ett felaktigt filter används i plattläsaren	Plattan ska läsas vid 450 nm med ett referensfilter på mellan 620 och 650 nm.
f) Reagenserna är för kalla	Alla reagenser, med undantag för konjugatkoncentrat (100X), måste ha antagit rumstemperatur innan analysen påbörjas. Detta tar ungefär 1 timme.
g) Kitets/komponenternas utgångsdatum har passerats	Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100X) används inom 3 månader efter rekonstituering.

Icke-specifik färgutveckling/hög bakgrund

Möjlig orsak	Lösning
a) Bristfällig rengöring av plattan	Tvätta plattan minst 6 gånger med 400 µl tvättbuffert per brunn. Det kan krävas fler än 6 tvättcykler beroende på vilken tvättmaskin som används. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
b) För hög inkuberingstemperatur	Inkubering av ELISA ska utföras i rumstemperatur (17 °C till 27 °C).
c) Kitets/komponenternas utgångsdatum har passerats	Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100X) används inom 3 månader efter rekonstituering.
d) Enzymsubstratlösningen är kontaminerad	Kassera substratet om det är blåfärgat. Kontrollera att reagenserna endast förvaras i rena behållare.
e) Blandning av plasma i centrifugrör före insamling	Se till att samla in plasmaprover försiktigt ovanför gelen utan att pipettera upp och ned och var försiktig så att material i gelens yta inte skadas.

Referenser

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. Transplant.* **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).

Teknisk support

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

Den här sidan har avsikligt lämnats tom.

Förkortad testprocedur

Steg 1 – blodinkubering

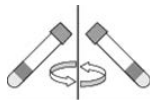
1. Samla upp blod i provtagningsrör och blanda genom att skaka dem tio (10) gånger så att hela den invändiga ytan är täckt med blod. Detta görs för att lösa upp antigenerna som finns på ytorna inuti röret.



2. Inkubera rören stående i $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 16 till 24 timmar.



3. Efter inkubering ska rören centrifugeras i 15 minuter i 2 000 till 3 000 RCF (g) för att plasman och de röda blodkropparna ska separeras.

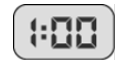


4. Efter centrifugering ska du undvika att pipettera upp och ned eller blanda plasman på något sätt före insamling. Var alltid försiktig så att material i gelens yta inte skadas.

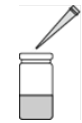


Steg 2 – IFN- γ ELISA

1. Ekvilibrera ELISA-komponenterna, med undantag för konjugatkoncentrat (100X), i rumstemperatur i minst 60 minuter.



2. Rekonstituera kitstandarden till 8,0 IU/ml med destillerat eller avjoniserat vatten. Bered fyra (4) standardspädningar.

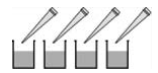


3. Rekonstituera frystorkat konjugatkoncentrat (100X) med destillerat eller avjoniserat vatten.

4. Bered working strength-konjugat i den gröna diluentsen och tillsätt 50 μ l i alla brunnar.



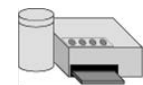
5. Tillsätt 50 μ l av plasmaproverna och 50 μ l standard i lämpliga brunnar. Blanda med en skakapparat.



6. Inkubera i 120 minuter i rumstemperatur.



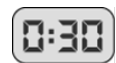
7. Tvätta brunnarna minst 6 gånger med 400 μ l tvättbuffert per brunn.



8. Tillsätt 100 μ l enzymsubstratlösning i brunnarna. Blanda med en skakapparat.



9. Inkubera i 30 minuter i rumstemperatur.



10. Tillsätt 50 μ l enzymstopplösning i brunnarna. Blanda med en skakapparat.



11. Läs av resultaten vid 450 nm med ett 620 till 650 nm referensfilter.



12. Analysera resultaten.



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

Avtal om begränsad licens för QuantiFERON-CMV ELISA Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kiten och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kiten godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser kiten och/eller någon av deras komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, med ensamrätt.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

