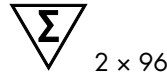


Helmikuu 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Pakkauseloste



Kokoveren interferoni-gammatesti (IFN- γ) sytomegalovirus-peptidien antigeenien mittaamiseen

IVD In vitro -diagnostiikkaan



REF 0350-0201



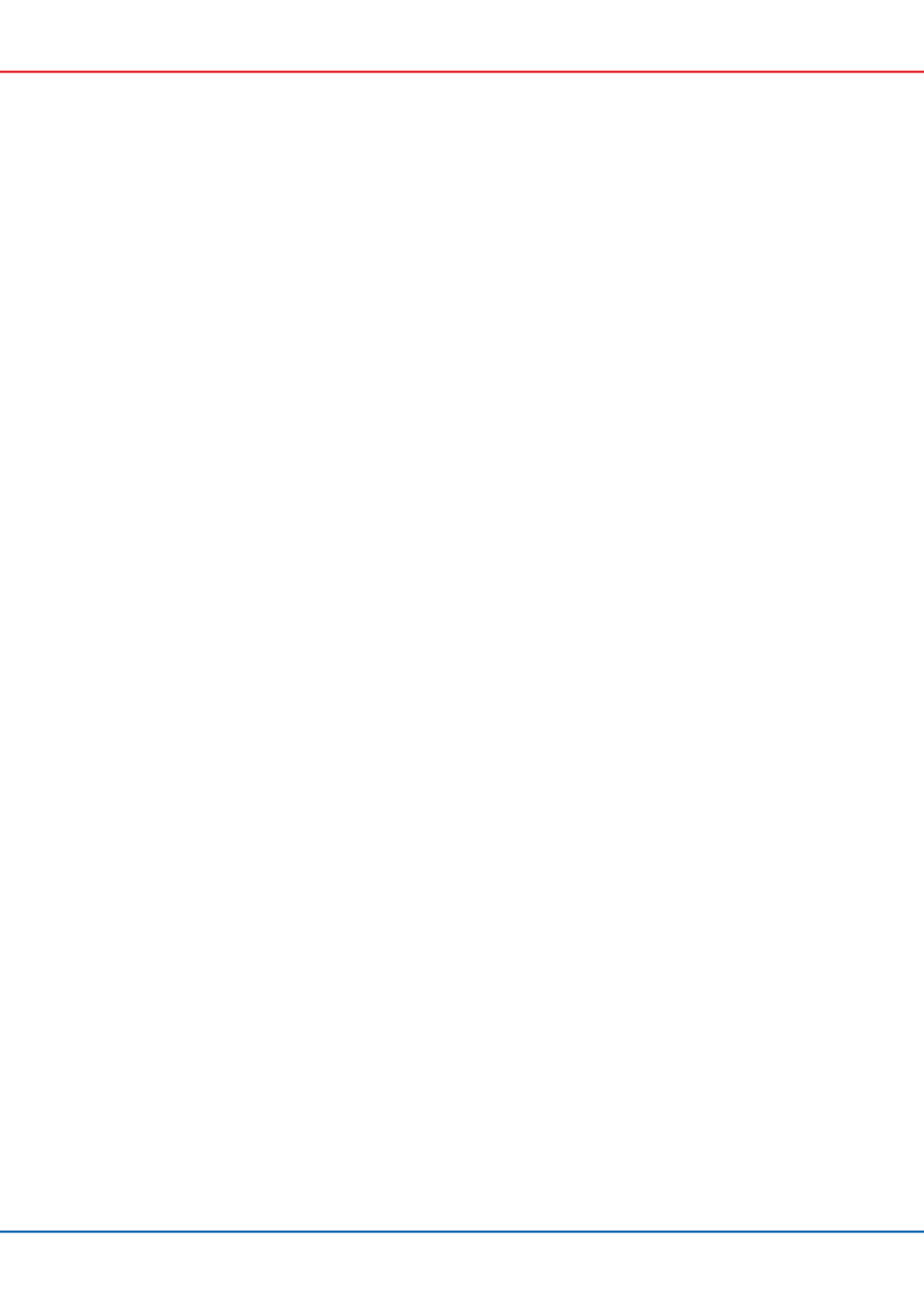
QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, USA +1-800-426-8157

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

1075110FI Päiv. 05



www.QuantiFERON.com



Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Yhteenveto ja selitykset.....	5
Menetelmän toimintaperiaate.....	6
Testin suorittamiseen vaadittava aika	7
Toimitetut materiaalit.....	8
Sarjan sisältö	8
Tarvitavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen).....	9
Varoitukset ja varotoimet.....	10
Turvallisuustiedot	12
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	13
Näytteen ottaminen ja käsittely.....	14
Toimenpide.....	17
Vaihe 1: Veren inkubointi ja plasman kerääminen	17
Vaihe 2: QuantiFERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN-γ	18
Laskennat ja testien tulkinta.....	23
Standardisuoran laatiminen (jos QF-CMV-analyysiohjelmistoa ei käytetä)	23
Testin laadunvarmistus	24
Tulosten tulkitseminen.....	25
Rajoitukset.....	26
Odotusarvot.....	26
Suorituskykyominaisuudet.....	29
Kliininen suorittaminen	29

Testin kynnysarvot	30
Kliiniset tutkimukset	30
Spesifisyys	30
Herkyys	31
Kliinistä käytettävyyttä valottavat tutkimukset	31
Kansainväliset ohjeet elinsiirtopotilaiden sytomegaloviruksen hoidosta	36
Testin suoritusarvot	37
Teknisiä tietoja	39
Määrittämättömät tulokset	39
Hyytyneet plasmanäytteet	39
Ongelmien ratkaisu	40
Lähdeviitteet	42
Merkinnät	44
Yhteystiedot	45
ELISA-testimenetelmä lyhyesti	46
Vaihe 1: Veren inkubointi	46
Vaihe 2: IFN- γ ELISA	46
Käsikirjan muutoshistoria	49

Käyttötarkoitus

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) on in vitro -testi, joka käyttää ihmisen cytomegaloviruksen (cytomegalovirus, CMV) proteiinia simuloivaa peptidisekoitusta, joka stimuloi soluja heparinoidussa kokoveressä. Interferoni-gamman (interferon-gamma, IFN- γ) tunnistamiseen käytetään entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) kvantifioimaan in vitro -vasteita peptidiantigeeneihin, jotka liittyvät CMV-infektion immuunikontrolliin. Tämän immuunifunktion puuttuminen voi liittyä CMV-taudin kehittymiseen. QF-CMV on tarkoitettu seuraamaan potilaan anti-CMV-immuunitasoa.

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

Yhteenveto ja selitykset

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

QF-CMV:lla testataan CMI-vastetta peptidiantigeeneille, jotka simuloivat CMV-proteiineja. CMV-peptidit kohdistetaan CD8⁺ -T-soluihin, mukaan lukien A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 ja Cw6 (A30, B13) HLA Luokan I haplotyyppit, jotka kattavat > 98 % maailman väestöstä. CMV:n saaneilla on yleensä veressään CD8⁺ -lymfosyyttejä, jotka tunnistavat nämä antigeenit. Tämä tunnistusprosessi koostuu sytokiinin, gammainterferonin (IFN- γ), muodostumisesta ja erittymisestä. Gammainterferonin (IFN- γ) havaitseminen ja sitä seuraava kvantifiointi muodostaa testin perustan.

Menetelmän toimintaperiaate

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

Mitogeeniputkea käytetään QF-CMV-testissä positiiviseen kontrolliin. Sitä suositellaan erityisesti, jos potilaan immunistatuksesta ei ole varmuutta. Mitogeeniputken avulla voidaan myös valvoa veren asianmukaista käsittelyä ja inkubointia.

Putket on inkuboitava 37 °C:n lämpötilassa mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä verinäytteen ottamisesta. 16–24 tunnin inkubointijakson jälkeen putket lingotaan sentrifugissa, plasma erotetaan ja gammainterferonin (IFN- γ) (IU/ml) määrä mitataan QF-CMV ELISA -menetelmällä.

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

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

Testi katsotaan reaktiiviseksi IFN- γ -vastauksen suhteen, kun CMV-antigeeniputken lukema on merkittävästi suurempi kuin Nil IFN- γ IU/ml-arvo. Mitogeenisimuloitu plasmanäyte toimii IFN- γ -positiivisena kontrollina jokaiselle testatulle näytteelle. Alhainen mitogeenivaste merkitsee epävarmaa tulosta, kun verinäytteen vaste on ollut ei-reaktiivinen CMV-antigeneille. Tämä tilanne saattaa tulla esiin lymfosyytien määrän ollessa riittämätön tai kun niiden aktiivisuus on laskenut virheellisen näytteen käsittelyn vuoksi, mitogeeniputken väärän täyttämisen tai sekoittamisen takia tai jos potilaan lymfosyytit eivät kykene muodostamaan IFN- γ :a, kuten on asia kudossiirtopotilailla. Nolla-näyte säätyy taustakorjauksen mukaan tai ei-spesifisesti IFN- γ :n mukaan verinäytteissä. IFN- γ -taso nolla-putkessa saadaan IFN- γ -tasosta CMV-antigeeniputkelle ja mitogeeniputkelle (lue kohta Tulosten tulkitseminen tämän pakkausselosteen sivulta 25, jossa kerrotaan, kuinka QF-CMV-tuloksia tulkitaan).

Testin suorittamiseen vaadittava aika

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

Verinäyteputkien inkubaatio 37 °C:ssa:	16–24 tuntia
ELISA:	noin kolme tuntia yhdelle ELISA-levylle
	Alle tunnin työ
	Kutakin levyä kohti lisätään 10–15 minuuttia

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
Luettelonumero	0192-0301
Preparaatioiden määrä	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON-nollakontrolli, harmaa korkki)	1 putki
QuantiFERON CMV Antigen (QuantiFERON-CMV-antigeeni, sininen korkki)	1 putki
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON-mitogeenikontrolli, punainen korkki)	1 putki
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (QF-CMV-verinäyteputkien pakkausseloste)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	2 ELISA-levyn sarja
Luettelonumero	0350-0201
Microplate strips (12 x 8 wells) coated with murine anti-human IFN- γ monoclonal antibody .(Hiiren monoklonalisella anti-ihmis-IFN- γ -vastaaineella päällystetyt mikrolevyliuskat [12 x 8 kuoppaa])	2 sarjaa 12 x 8 kuopan mikrolevyliuskoja
Human IFN γ Standard, lyophilized (lyofilisoitu ihmisen gammainterferonistandardi, sisältää ihmisen rekombinanttigammainterferonia (IFN- γ), naudan kaseiinia, 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x pullo (8 IU/ml käyttövalmiiksi saatettuna)
Green Diluent (vihreä laimennusliuos; sisältää naudan kaseiinia, normaalia hiiriseerumia, 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (konjugaatti 100x tiiviste, lyofilisoitu) (hiiren anti-ihmis-IFN- γ HRP, sisältää 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (pesupuskuri 20x tiiviste; pH 7,2; sisältää 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (entsyymisubstraattiliuos; sisältää H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' -tetrametylibentsidiiniä)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (entsyyminpäätysliuos; sisältää 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (QF-CMV ELISA -pakkausseloste)	1

* Sisältää rikkihappoa. Katso varotoimet sivulta 10.

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

- 37 °C:n inkubaattori, CO₂:a ei tarvita
- Kalibroidut, muuttuvan tilavuuden pipetit 10 – 1 000 µl, kertakäyttökärjet
- Kalibroituja monikanavaisia pipettejä, joilla voidaan annostella 50 µl ja 100 µl, kertakäyttöiset kärjet
- Levyn ravistelija
- Deionisoitu tai tislattu vesi, 2 litraa
- Levyn pesin (suosittelemme automaattista pesintä)
- Mikrolevyn lukulaite, johon on kiinnitetty 450 nm:n suodatin ja 620–650 nm:n referenssisuodatin.

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedotteista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voi tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedotteita.

HUOMIO



Käsittele ihmisverta mahdollisesti tartuntavaarallisena. Noudata asianmukaisia verenkäsittelyohjeita.

Seuraavat varoitukset ja varotoimet koskevat QuantiFERON-CMV ELISA -komponentteja.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sisältää: sulfuric acid. Varoitus! Voi syövyttää metalleja. Ärsyttää ihoa. Ärsyttää voimakkaasti silmiä. Käytä suojakäsineitä/ suojavaatetusta/ silmiensuojainta/ kasvonsuojainta.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Varoitus! Ärsyttää ihoa lievästi. Käytä suojakäsineitä/ suojavaatetusta/ silmiensuojainta/ kasvonsuojainta.

QuantiFERON Green Diluent



Sisältää: trinitrium-5-hydroksi-1-(4-sulfofenyyli)-4-(4-sulfofenyyliatso)pyratsoli-3-karbolyksaattia. Sisältää: tartrazine. Varoitus! Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Käytä suojakäsineitä/ suojavaatetusta/ silmiensuojainta/ kasvonsuojainta.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Sisältää: ProClin 300. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Vältettävä päästämistä ympäristöön.

Turvallisuustiedot

Lisätietoja

- QF-CMV-pakkausselosteen ohjeista poikkeaminen voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Lue ohjeet huolellisesti ennen käyttöä.
- Älä käytä sarjaa, jos yhdessäkään reagenssipullossa on merkkejä vaurioista tai vuodosta ennen käyttöä.
- Tärkeää: Tarkista pullot ennen käyttöä. Älä käytä kontrollin tai IFN- γ Standard -valmisteen pulloja, joissa on havaittavissa vaurioita tai joiden kumitiiviste näyttää vaurioituneelta. Älä käsittele rikkoutuneita pulloja. Hävitä pullot turvallisesti asianmukaisia varotoimia noudattaen.

Suositus: Vähennä metallikorkin avaamiseen liittyviä loukkaantumisriskejä käyttämällä konjugaatin tai IFN- γ -standardin pullojen avaamiseen pullonavauspihtejä.

- Älä sekoita tai käytä eri QF-CMV-sarjaeristä peräisin olevia mikrolevyliuskoja, ihmisen gammainterferonistandardia (IFN- γ), vihreää laimennusainetta tai konjugaatti 100x - tiivistettä. Muita eri sarjaeristä peräisin olevia reagensseja (pesupuskuri 20x konsentraatti, entsyymisubstraattiliuos ja entsyyminpysäytysliuos) voidaan käyttää yhdessä edellyttäen, että reagenssien viimeinen käyttöpäivämäärä ei ole umpeutunut ja että erän tiedot on merkitty muistiin.
- Hävitä käyttämättömät reagenssit ja biologiset näytteet paikallisten viranomaismääräysten mukaisesti.
- Älä käytä QF-CMV-verinäyteputkia tai QF-CMV ELISA -sarjoja niiden viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
- Varmista, että laboratoriovälineet, kuten levyn pesimet ja levyn lukulaitteet on kalibroitu/hyväksytty käyttöön.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Verinäyteputket

- Säilytä QF-CMV-verinäyteputkia 4–25 °C:n lämpötilassa.
- QF-CMV-verinäyteputkien lämpötilan on oltava täytön aikana 17–25 °C.
- QF-CMV-verinäyteputkien käyttöaika on enintään 15 kuukautta valmistuspäivästä säilytettyinä 4–25 °C:n lämpötilassa.

ELISA-reagenssisarjat

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

Käyttövalmiit ja käytetyt reagenssit

Ohjeet reagenssien sekoittamisesta on annettu kohdassa Vaihe 2: QuantiFERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN- γ (vaiheet 3 ja 5 sivuilla 18 ja 20).

- Valmiiksi saatettuna ihmisen IFN- γ -standardia voidaan säilyttää enintään kolme kuukautta, jos säilytys tapahtuu 2–8 °C:n lämpötilassa.

Merkitse ihmisen IFN- γ -standardin valmiiksisäätämispäivä muistiin.

- Uudelleenliuotuksen jälkeen käyttämätön konjugaatti 100 \times -tiiviste on säilytettävä 2–8 °C:n lämpötilassa ja käytettävä kolmen kuukauden kuluessa.

Merkitse konjugaatin uudelleenliuotuspäivä muistiin.

- Käytövahvuinen konjugaatti on käytettävä 6 tunnin kuluessa valmistamisesta.
- Käytövahvuinen pesupuskuri voidaan varastoida huoneenlämpöön (22 \pm 5 °C) enintään 2 viikoksi.

Näytteen ottaminen ja käsittely

QF-CMV käyttää seuraavia verinäyteputkia:

- Nil Control (nollakontrolli) (harmaa korkki)
- CMV Antigen (CMV-antigeeni) (sininen korkki)
- Mitogen Control (mitogeenikontrolli) (punainen korkki)

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

Seuraavia toimenpideohjeita on noudatettava optimaalisten tulosten saavuttamiseksi:

1. Ota kultakin potilaalta 1 ml verta laskimopistoksella suoraan jokaiseen QF-CMV-verinäyteputkeen. Tämä toimenpide on annettava flebotomiaan erikoistuneen pätevän henkilön suoritettavaksi.

QF-CMV-verinäyteputkia voidaan käyttää korkeintaan 810 metrin korkeudella merenpinnasta.

Jos QF-CMV-verinäyteputkia käytetään yli 810 metrin korkeudessa tai jos otettu verinäyte on liian pieni, käyttäjä voi ottaa verta ruiskulla ja siirtää sitä välittömästi 1 ml kuhunkin kolmeen putkeen. Turvallisuussyistä se tapahtuu parhaiten poistamalla ruiskun neula ja varmistamalla, että käytössä ovat asianmukaiset turvatoimet, irrottamalla korkit kolmesta QF-CMV-verinäyteputkesta ja lisäämällä 1 ml verta jokaiseen niistä (putken sivulla olevaan mustaan merkkiin asti). Kiinnitä putkien korkit kunnolla ja sekoita alla annettujen ohjeiden mukaan. Koska veren ottaminen 1 ml:n putkella käy suhteellisen hitaasti, pidä putkea neulalla 2 - 3 sekuntia, kun putki näyttää olevan täynnä. Näin varmistat, että putkeen saadaan oikea määrä verta.

Putken sivulla oleva musta merkki osoittaa 1 ml:n täyttömäärän. QF-CMV-verinäyteputket on validoitu 0,8–1,2 ml:n määriille. Jos verimäärä missä tahansa putkessa ei ole lähellä merkkiä, on otettava uusi verinäyte.

Jos näytteen ottoon käytetään siipineulaa, on käytettävä ”tyhjennysputkea” sen varmistamiseksi, että putki on täytetty verellä ennen QF-CMV-verinäyteputkien käyttöä.

Verinäyte voidaan ottaa vaihtoehtoisesti myös yksittäisellä geneerisellä verinäyteputkella, joka sisältää antikoagulanttina litiumhepariinia, ja siirtää se sitten QF-CMV-verinäyteputkiin. Käytä veren hyytymisen estoaineena ainoastaan litiumhepariinia, sillä muut antikoagulantit aiheuttavat testissä häiriöitä. Täytä verinäytteen keräysputki (vähimmäistilavuus 5 ml) ja sekoita varovasti kääntelemällä putkea useita kertoja, jotta hepariini liukenee. Tämä toimenpide on annettava flebotomiaan erikoistuneen pätevän henkilön suoritettavaksi. Verinäytettä on säilytettävä huoneenlämpötilassa ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) ennen sen siirtämistä QF-CMV-verinäyteputkiin, mikä on aloitettava 16 tunnin kuluessa verinäytteen ottamisesta.

2. QF-CMV-verinäyteputkia sekoitetaan heti täytön jälkeen kymmenen (10) kertaa juuri niin voimakkaasti, että voidaan varmistaa, että putken koko sisäpinta on peittynyt verellä. Näin putken seinämien antigeenit liukenevat vereen.

Putkien on oltava $17\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa täytön aikana.

Liian voimakas sekoittaminen saattaa aiheuttaa geelin vaurioitumisen ja johtaa poikkeaviin tuloksiin.

Jos verinäyte on otettu litiumhepariiniputkeen, näytteet on sekoitettava tasaisesti ennen niiden siirtämistä QF-CMV-verinäyteputkiin. Varmista juuri ennen siirtoa varovasti kääntelemällä, että veri on sekoittunut hyvin. Annostele 1 ml alikvoottia (yksi jokaista QF-CMV-verinäyteputkea kohti) asianmukaiseen nollavertailu-, CMV-antigeeni- ja mitogeeniputkeen. Tämä on parasta suorittaa aseptisesti varmistaen, että noudatetaan asianmukaisia turvatoimenpiteitä. Poista korkit kolmesta QF-CMV-verinäyteputkesta ja lisää 1 ml verta jokaiseen putkeen (putken etiketin sivulla olevaan mustaan merkkiin saakka). Kiinnitä putkien korkit tiukasti paikalleen ja sekoita edellä kuvatulla tavalla.

3. Putket on merkittävä asianmukaisesti.

Varmista, että jokainen putki (nollavertailu-, CMV-antigeeni- ja mitogeeniputki) tunnistetaan etiketistä tai muulla tavoin.

4. Täytön, ravistelun ja merkitsemisen jälkeen putket on siirrettävä inkubaattoriin 37 ± 1 °C:n lämpötilaan mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä näytteen ottamisesta. Pidä putkia huoneenlämpötilassa ennen inkubointia (22 ± 5 °C). Verinäytteitä ei saa viedä jääkaappiin tai pakastaa.

Toimenpide

Vaihe 1: Veren inkubointi ja plasman kerääminen

1. Inkuboi putkia PYSTYASENNOSSA $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilassa 16–24 tuntia. Inkubaattorissa ei tarvita hiilidioksidia (CO_2) tai kostutusta.

Tärkeää: Jos verta ei inkuboida välittömästi näytteen ottamisen jälkeen, putket on sekoitettava kääntämällä ne kymmenen kertaa ylösalaisin ennen inkubointia.

Kun inkubointi on suoritettu, verinäyteputkia voidaan säilyttää enintään kolme vuorokautta $4\text{--}27\text{ °C}$:n lämpötilassa ennen linkousta sentrifugissa

2. Kun putkia on inkuboitu 37 °C :n lämpötilassa, plasman keräämistä edistetään linkoamalla putkia 15 minuutin ajan 2 000–3 000 RCF:n (g) voimalla. Geelitulppa erottelee solut plasmasta. Jos niin ei tapahdu, putket on lingottava uudelleen.

Plasman talteenotto on mahdollista ilman linkoamista, mutta tällöin plasman keräämisessä on oltava erityisen huolellinen, etteivät solut rikkoudu.

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

Tärkeää: Plasmanäytteitä voidaan kerätä ainoastaan pipetin avulla.

Plasmanäytteet voidaan ladata suoraan lingotuista näyteputkista QF-CMV ELISA -levylle, myös silloin, kun käytössä on automaattinen ELISA-työasema.

Plasmanäytteitä voidaan säilyttää sentrifugissa lingotuissa QF-CMV-verinäyteputkissa enintään 28 vuorokautta $2\text{--}8\text{ °C}$:n lämpötilassa, tai keräämisen jälkeen pitkiä aikoja alle -20 °C :n (mieluummin korkeintaan -70 °C :n) lämpötilassa.

Jotta testinäytteet ovat riittävät, kerää vähintään 150 µl plasmaa.

Vaihe 2: QuantiFERON-CMV ELISA ja ihmisen IFN- γ

Katso kohdista Sarjan sisältö sivulla 8 ja Tarvitavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen) sivulla 9 ELISA-testin suorittamiseen tarvittavat materiaalit.

1. Kaikki plasmanäytteet ja reagenssit, paitsi konjugaatti 100x -tiiviste, on tuotava huoneenlämpötilaan ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) ennen käyttöä. Anna tasoittua vähintään 60 minuuttia.
2. Irrota ylimääräiset ELISA-levyn liuskat kehuksesta, sulje ne takaisin foliopussiin ja vie jääkaappiin myöhempää tarvetta varten.

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

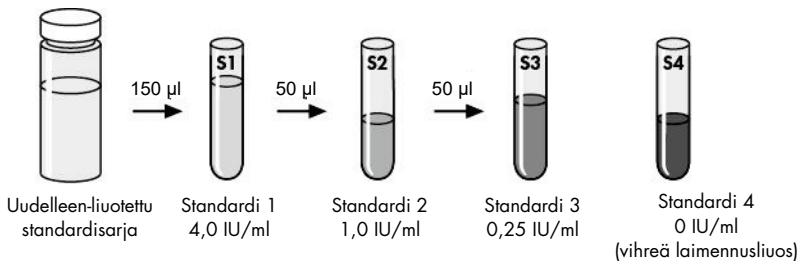
3. Saata ihmisen IFN- γ -standardi käyttökuntoon laimentamalla sitä pulloon merkityllä määrällä deionisoitua tai tislattua vettä. Sekoita varovasti vaahtoaminen minimoiden ja varmista täydellinen liukeneminen. IFN- γ -standardin liuottaminen uudelleen merkittyyn tilavuuteen saa aikaan liuksen, jonka pitoisuus on 8,0 IU/ml.

Huomautus: Ihmisen gammainterferonin IFN- γ -standardisarjan valmiiksi saatettu tilavuus vaihtelee erän mukaan.

Käytä valmiiksi saatettua standardia ja valmistele liuotussarja neljälle IFN- γ -konsentraatille vihreään liuotusaineeseen (Green Diluent, GD) (Kuva 1, seuraava sivu) S1 (standardi 1) sisältää 4,0 IU/ml, S2 (standardi 2) sisältää 1,0 IU/ml, S3 (standardi 3) sisältää 0,25 IU/ml ja S4 (standardi 4) sisältää 0 IU/ml (vain vihreää liuotusainetta). Standardit on testattava vähintään kahtena otoksena. Valmistelet kutakin ELISA-testiä varten standardisarjasta vastalaimennetut liuokset.

Esimerkki toistotestisarjan toimintatavasta

Esimerkki toistotestisarjan toimintatavasta	
A	Merkitään neljä putkea: S1, S2, S3, S4.
B	Lisätään 150 µl vihreää laimennusainetta putkiin S1, S2, S3 ja S4.
C	Lisätään 150 µl standardisarjaa putkeen S1 ja sekoitetaan huolellisesti.
D	Siirretään 50 µl putkesta S1 putkeen S2 ja sekoitetaan huolellisesti.
E	Siirretään 50 µl putkesta S2 putkeen S3 ja sekoitetaan huolellisesti.
F	Pelkkä vihreä laimennusliuos toimii nollastandardina (S4).



Kuva 1. Standardisuoran valmistelu sarjassa käytettävillä liuoksilla.

4. Sekoita lyofilisoitua konjugaatti 100x -tiivistettä 0,3 millilitraan deionisoitua tai tislattua vettä. Sekoitetaan varovasti vaahtoamisen minimoimiseksi ja konjugaatin täydellisen liukenemisen varmistamiseksi.

Työskentelyvahvuinen konjugaatti valmistetaan laimentamalla riittävä määrä käyttövalmiiksi saatettua konjugaatti 100x -tiivistettä vihreällä laimennusliuoksella (katso Taulukko 1 seuraavalla sivulla)

Sekoita huolellisesti, varo vaahtoamista.

Palauta käyttämätön konjugaatti 100x -tiiviste välittömästi käytön jälkeen 2–8 °C:n lämpötilaan.

Käytä vain vihreää laimennusliuosta.

Taulukko 1. Käyttövahvuisen konjugaatin valmistaminen

Liuskojen määrä	Konjugaatti 100x -tiivisteiden määrä	Vihreän laimennusliuoksen määrä
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Verinäyteputkista kootut plasmanäytteet, jotka on myöhemmin pakastettu tai joita on säilytetty yli 24 tuntia ennen testiä, on sekoitettava huolellisesti ennen niiden lisäämistä ELISA-kuoppaan.

Tärkeää: Jos plasmanäytteet lisätään suoraan sentrifugissa lingotuista QF-CMV-verinäyteputkista, plasman sekoittumista on vältettävä. Varo aina rikkomasta geelin pinnalla olevaa materiaalia.

6. Laimenna myös CMV- ja mitogeeniplasmat vihreään laimennusnesteeseen suhteessa 1/10 (10 µl plasmata ja 90 µl GD), jos kvantitatiivisia tuloksia edellytetään. Nolla-plasmata ei saa laimentaa.

Suosittellemme testaamaan seuraavat näytteet rinnakkain:

Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni (1/10)

QuantiFERON-CMV-analyysohjelmisto tukee kuitenkin myös seuraavia potilasnäytteitä:

Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni

Nolla, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni (1/10)

Nolla, CMV-antigeeni, mitogeeni, CMV-antigeeni (1/10)

Nolla, CMV-antigeeni (1/10), mitogeeni

7. Lisää 50 µl juuri valmistettua, työskentelyvahvuista konjugaattia ELISA-kuoppiin käyttämällä monikanavapipettiä.
8. Lisää 50 µl testiplasmanäytteitä asianmukaisesti kuoppiin. Lisää lopuksi 50 µl standardeista 1–4 asianmukaisesti kuoppiin. Standardit on testattava vähintään kahtena otoksena.
9. Peitä ELISA-levy ja sekoita konjugaattia sekä plasmanäytteitä/standardeja huolellisesti 1 minuutin ajan nopeudella 500–1000 rpm mikrolevyn ravistelijassa. Vältä läikyttämistä.
10. Peitä levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) 120 ± 5 minuutin ajan.
Levyt eivät saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana. Suositelluista lämpötiloista poikkeaminen voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia.
11. Valmistele inkuboinnin aikana työskentelyvahvuinen pesupuskuri. Laimenna yksi osa pesupuskurin 20x konsentraattia 19 osaan deionisoitua tai tislattua vettä ja sekoita huolellisesti. Pesupuskuri 20x konsentraattia on toimitettu riittävä määrä, jotta voidaan valmistaa kaksi litraa työskentelyvahvuista pesupuskuria.
12. Kun ELISA-levyn inkubointi on valmis, pese kuopat 400 µl:lla työskentelyvahvuista pesupuskuria vähintään kuudesti. Suosittelemme automaattista levyn pesintä.
Tärkeää: Huolellinen peseminen on erittäin tärkeää testin onnistumisen kannalta. Varmista, että jokainen kuoppa täytetään kokonaan pesupuskurilla kuopan yläreunaan saakka kunkin pesujakson aikana. Suosittelemme vähintään 5 sekunnin liotusta jaksojen välissä.
Jätevesisäiliöön on lisättävä laboratoriodesinfiointiainetta, ja vakiintuneita käytäntöjä on noudatettava mahdollisesti infektoivan materiaalin dekontaminaatiossa.
13. Taputa levyjä alaspäin imukykyisellä nukkaamattomalla liinalla pesupuskurijäämien poistamiseksi. Lisää 100 µl entsyymisubstraattiliuosta kuhunkin kuoppaan, peitä levy kannella ja sekoita huolellisesti 1 minuutin ajan 500 – 1 000 rpm:n nopeudella mikrolevyn ravistelijalla.
14. Peitä jokainen levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) 30 minuutin ajan.
Levyt eivät saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana.

-
15. Lisää 30 minuuttia kestäneen inkuboinnin jälkeen 50 µl entsyymipysäytysliuosta jokaiseen kuoppaan samassa järjestyksessä kuin substraattia lisättiin. Sekoita huolellisesti 500 – 1 000 rpm:n nopeudella mikrolevyn ravistelijalla.
16. Mittaa kunkin kuopan optinen tiheys (Optical Density, OD) 5 minuutin kuluessa reaktion pysäytyksestä mikrolevyn lukulaitteella, johon on asennettu 450 nm:n suodatin ja 620–650 nm:n referenssisuodatin. Optisen tiheyden arvoja käytetään tulosten laskennassa.

Laskennat ja testien tulkinta

QuantiFERON-CMV-analyysiohjelmisto raakadatan analysointiin ja tulosten laskentaan on saatavilla QIAGENin verkkosivuilta osoitteesta www.QuantiFERON.com. Varmista, että käytössä on QF-CMV-analyysiohjelmiston uusin versio.

Ohjelmisto suorittaa testin laadunvarmistusarvion, luo standardisuoran ja antaa kunkin potilaan testituloksen Tulosten tulkitseminen -luvussa sivulla 25 kuvatulla tavalla. Ohjelmisto raportoi miedoimman luoksen, jolla on saatu aikaan QF-CMV ELISA -testin sallitulla alueella oleva tulos ottaen huomioon laimennussuhteen.

Vaihtoehtona QF-CMV-analyysiohjelmistolla tehtävälle analyysille tulokset voidaan määrittää seuraavan menetelmän mukaisesti.

Standardisuoran laatiminen (jos QF-CMV-analyysiohjelmistoa ei käytetä)

Määrittele standardien OD-arvojen keskiarvo jokaiselta levyltä.

Laaditaan $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardisuora muodostamalla keskiarvoisen optisen tiheyden (y-akseli) $\log_{(e)}$ suhteessa standardien IFN- γ konsentraatioon IU/ml:ina (x-akseli) $\log_{(e)}$ jättäen nollassandardi pois näistä laskelmista. Laske standardisuora regressioanalyysillä.

Standardisuoraa käytetään määritettäessä IFN- γ -konsentraatiopitoisuutta (IU/ml) kussakin testiplasmanäytteessä käyttämällä apuna kunkin näytteen optisen tiheyden arvoa.

Nämä laskelmat voidaan tehdä mikrolevyn lukulaitteiden mukana toimitettavilla ohjelmistoilla tai esimerkiksi standarditaulukkolaskennalla tai tilastointiohjelmistolla (esim. Microsoft® Excel®). Suosituksena on, että näitä ohjelmistoja käytetään regressioanalyysin, standardien variaatiokerrointen (coefficient of variation, %CV) ja standardisuoran korrelaatiokerroimen (r) laskentaan.

Raportoitava tulos on otettava miedoimmasta liuoksesta, jolla on saatu aikaan QF-CMV ELISA -testin sallitulla alueella oleva tulos ottaen huomioon laimennussuhteen.

Testin laadunvarmistus

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

ELISAa koskee seuraava:

- Standardin 1 keskimääräisen optisen tiheyden on oltava $\geq 0,600$.
- Standardin 1 ja 2 toistettujen optisten tiheyksien arvojen %CV-arvon on oltava $< 15 \%$.
- Toistettavat OD-arvot standardeille 3 ja 4 eivät saa poiketa enempää kuin 0,040 optista tiheysyksikköä keskiarvosta.
- Keskimääräisistä imeytymisarvoista laskettujen korrelaatiokerrointen (r) on oltava $\geq 0,98$.

QF-CMV-analyysiohjelma laskee ja raportoi nämä laadunvalvontaparametrit. Jos yllä mainitut kriteerit eivät täyty, ajo on virheellinen ja testi on tehtävä uudelleen.

Nollastandardin (vihreän laimennusaineen) keskimääräisen optisen tiheyden on oltava $\leq 0,150$. Jos keskimääräinen optisen tiheyden arvo on $> 0,150$ levyjen pesuprosessi on tarkastettava.

Tulosten tulkitseminen

QuantiFERON-CMV-tulokset tulkitaan kohdassa Taulukko 2 esitettyjen kriteerien avulla.

Taulukko 2. QuantiFERON-CMV-tulosten tulkinta

Nolla (IU/ml)	CMV miinus nolla (IU/ml)	Mitogeeni miinus nolla (IU/ml)*	QF-CMV-tulos	Raportti/Tulkinta
≤ 8,0	≥ 0,20 ja ≥ 25 prosenttia nolla-arvosta	Mikä tahansa	Reaktiivinen [†]	Anti-CMV-immuniteetti havaittu
	<0,20 TAI ≥0,20 ja <25 prosenttia nolla-arvosta	≥ 0,5	Ei-reaktiivinen	Anti-CMV-immuniteettia EI havaittu
		< 0,5	Määrittämätön [‡]	CMV-vasteen tuloksia ei voida määritellä
> 8,0 [§]	Mikä tahansa	Mikä tahansa	Määrittämätön [‡]	CMV-vasteen tuloksia ei voida määritellä

* Vasteet mitogeenin positiiviseen vertailuun (ja toisinaan myös CMV-antigeeneihin) ovat usein mikrolevyn lukulaitteen alueen ulkopuolella. Tällä ei ole vaikutusta testituloksiin.

[†] Silloin, kun sytomegalovirusinfektiota ei epäillä, alustavat positiiviset tulokset voidaan vahvistaa testaamalla alkuperäiset plasmanäytteet uudelleen toisintoina QF-CMV ELISA -menetelmällä. Jos toistetun testin yksi tai molemmat toisinnot ovat positiivisia, henkilön testitulos on katsottava reaktiiviseksi.

[‡] Lue ongelman mahdollisista syistä kohdasta Ongelmien ratkaisu (sivulla 40).

Kliinissä tutkimuksissa (1) epävarma tulos on todettu kliinisesti merkittäväksi elinsiirtopotilailla, joiden luovuttaja on CMV-reaktiivinen, mutta mitogeenikontrolli on alle 0,5 IU/ml. Näillä potilailla on suurin riski CMV:n kehitymiseen.

[§] Kliinissä tutkimuksissa alle 0,25 prosentilla potilaista oli > 8,0 IU/ml IFN- γ -tasoja nollakontrollissa.

Huomautus: Mitattua IFN- γ -tasoa on käytettävä yhdessä kliinisen tilanteen, aikaisempien sairauksien ja muun diagnostisten arvioinnin kanssa arvioitaessa potilaan immunologista vastetta CMV-antigeeneille. QF-CMV ei ole CMV-infektiota selvittävä testi, eikä sitä saa käyttää CMV-infektion poissulkemiseen.

Rajoitukset

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

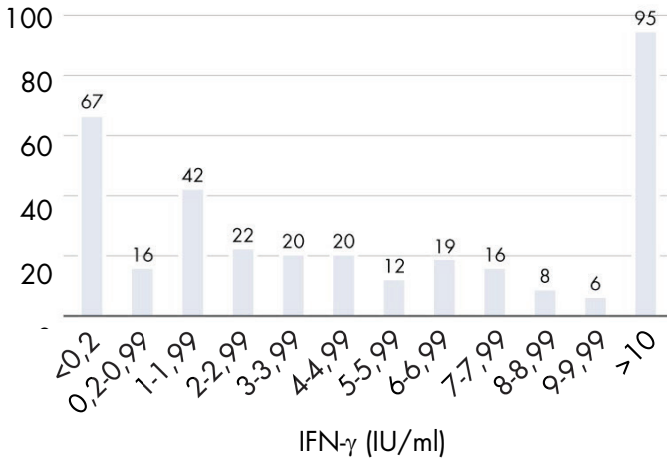
Epäluotettavat tai määrittelemättömät tulokset voivat johtua seuraavasta:

- poikkeaminen QuantiFERON-CMV ELISA -pakkauselosteessa kuvatusta toimenpiteestä
- liian suuri IFN γ -taso kontrolliputkessa
- verinäytteen ottamisesta on kulunut yli 16 tuntia ennen inkubointia 37 °C:n lämpötilassa.

Odotusarvot

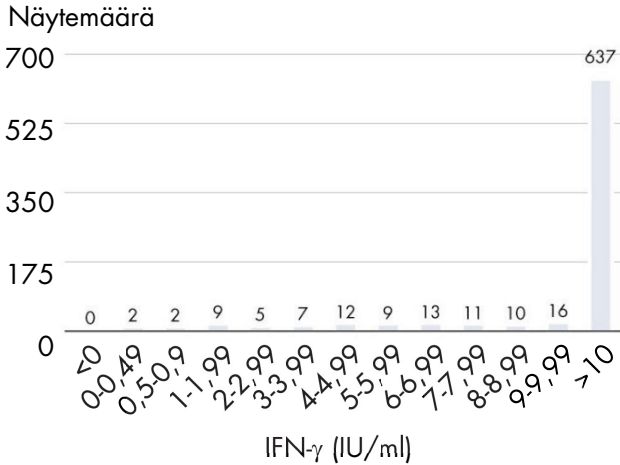
IFN- γ :n odotusarvot QuantiFERON-CMV-testille saatiin terveiltä tutkittavilta otettujen 591 näytteen testeistä. 343 näytteistä oli seroposiitivisia ja 248 näytteistä oli seronegatiivisia CMV IgG:lle. CMV-serologinen status oli tuntematon QF-CMV-testin suoritushetkellä. CMV-seronegatiivisilta tutkittavilta otetusta 248 testatusta näytteestä 100 % (248/248) oli ei-reaktiivisia, ja QF-CMV ELISA tuotti IFN- γ -vasteen, joka oli < 0,2 IU/ml CMV-antigeeniputkessa (nolla-arvo vähennettynä). IFN- γ -vasteet CMV-antigeeniputkelle (nolla-arvo vähennettynä) 343 CMV-seroposiitiviselle tutkittavalle on esitetty kuvassa (Kuva 2).

Näytemäärä



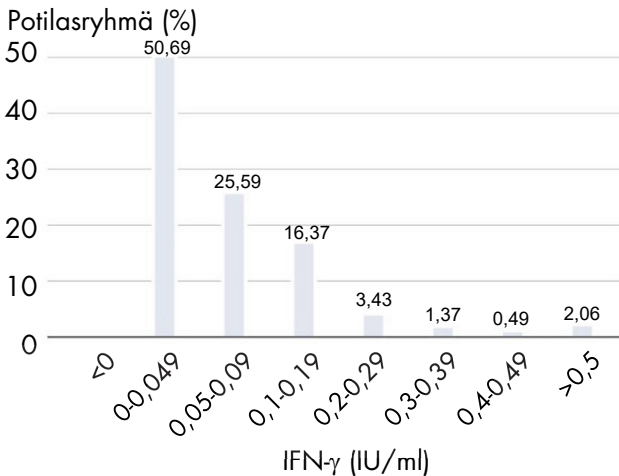
Kuva 2. QF-CMV IFN- γ -vasteiden jakauma (nolla-arvo vähennettynä) terveillä seropositiivisilla tutkittavilla (n = 343).

Mitogeenin IFN- γ -vasteiden jakauma (nolla-arvo vähennettynä) määritettiin terveiltä tutkittavilla otetun 733 näytteen avulla QF-CMV ELISA -testiä käyttäen riippumatta CMV IgG -serologiasta (Kuva 3). Mitogeenin (nolla-arvo vähennettynä) tulos, joka on alle 0,5 IU/ml osoittaa joko testin epäonnistuneen tai tutkittavan olevan immuunipuutteinen. Terveessä väestössä vain 2 tulosta 733:n joukosta osuu tähän luokkaan.



Kuva 3. Mitogeeni-IFN- γ -vasteiden jakauma (nolla-arvo vähennettynä) terveillä tutkittavilla (n = 733).

Nollavertailuputkien IFN- γ -vasteiden jakauma määritettiin terveiltä tutkittavilta otetun 1 020 näytteen avulla QF-CMV ELISA -testiä käyttäen riippumatta CMV IgG -serologiasta (Kuva 4).



Kuva 4. Nolla-arvojen IFN- γ -vasteiden jakauma terveillä tutkittavilla (n = 1 020) ilmaistuna prosentuaalisena osuutena potilasryhmästä.

Suorituskykyominaisuudet

Kliininen suorittaminen

Testikynnys ennen CMV-altistusta QF-CMV-testiä käyttämällä on määritelty seuraavan tulosanalyysin perusteella terveiden potilaiden ryhmästä (n = 223), jossa QF-CMV-tuloksia verrattiin CMV IgG -serologisiin tuloksiin. A ROC -analyysi määritti testin raja-arvoksi 0,04 IU/ml (nolla-arvo vähennettynä), asetti optimaaliset positiiviset ja negatiiviset oletusarvot QF-CMV:lle (käyrän alapuolinen alue = 0,9679 [95 %:n CI: 0,9442–0,9915, p<0,0001]), ja näin esitti raja-arvon, jolla tämä testi toimii käyttötarkoituksensa mukaisesti kaikkein tehokkaimmin tervettä populaatiota testatessa.

QF-CMV-suoritus tasoa verrattiin SeraQuest™ CMV IgG -serologiatestiin (Quest International). QF-CMV-testi osoitti 95 %:n (294/310 henkilön) yhtäpitävyyden CMV IgG -serologiatestiin terveillä potilailla, joista kukaan 149 seronegatiivisesta luovuttajasta ei osoittanut mitään reaktiivisuutta QF-CMV-testissä. 145 seropositiivista luovuttajaa 161 luovuttajan joukosta antoi reaktiivisen QF-CMV-vasteen. Yleisesti ottaen positiivinen yhtäpitävyys oli 90 % negatiivisen yhtäpitävyyden arvolla ollessa 100 %. Yhtäpitävyyden taso terveillä potilailla QF-CMV-vasteiden ja CMV IgG -serologisen statuksen välillä on esitetty oheisessa taulukossa, Taulukko 3.

Taulukko 3. Yhtäpitävyys QuantiFERON-CMV- ja CMV IgG-serologiatestien välillä terveillä tutkittavilla

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

Testin kynnyсарvot

Suosittelу klininen testiarvo tälle testille on 0,2 IU/ml CMV-antigeeniputkessa (nolla-arvo vähennettynä), vaikka eri kynnyksiä voidaan validoida eri klinisiin ympäristöihin.

Kliiniset tutkimukset

Koska sytomegalovirusinfektion vahvistamisesta tai poissulkemisesta ei ole olemassa tarkkaa standardia, QF-CMV-sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä ei voida käytännössä arvioida. QF-CMV-testin sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä likimääräistettiin arvioimalla yhtäpitävyyttä terveillä potilailla mitatun QF-CMV-vasteen ja CMV Ig -serologisen statuksen välillä.

QF-CMV-testin spesifisyys likimääräistettiin arvioimalla virheellisten positiivisten määrää (QF-CMV-testin reaktiivinen vaste) terveillä potilailla, joilla ei ole todettu aiempaa CMV-altistusta (CMV IgG -seronegatiiviset potilaat). Sensitiivisyys likimääräistettiin arvioimalla QF-CMV-vastetta terveillä potilailla, joiden kohdalla oli todisteita aiemmasta CMV-altistuksesta (CMV IgG -seropositiiviset henkilöt). QF-CMV hyödyntää suurta CMV-spesifisten epitoppien määrää eri CMV-proteiineista ja tarjoaa näin laajan kattavuuden potilasryhmästä, joilla on erilaisia HLA-luokan I haplotyyppеjä (noin 98 % potilasryhmästä). Koska CMV-serologiatestattujen HLA-haplotyyppеjä ei ollut tiedossa, pienen prosentin seropositiivisista henkilöistä odotetaan jäävän ilman vastetta QF-CMV-verinäyteputkissa.

Spesifisyys

Tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin terveiltä tutkittavilta otettua 591 näytettä, QF-CMV-testissä ei ilmennyt virheellisiä positiivisia tuloksia tutkittavilla, jotka oli todettu CMV IgG -seropositiivisiksi tarkasteltaessa 248/248 näytettä, jotka oli todettu ei-reaktiivisiksi QF-CMV ELISA -testissä ja negatiivisiksi CMV IgG -serologiatestissä. Tästä syystä QF-CMV-testissä saatujen tulosten ja CMV IgG -serologiatestissä saatujen tulosten yhdenmukaisuus oli 100 %.

Kaikissa muissa spesifisyysarvioissa, jotka tehtiin elinsiirtopotilailla (1-8), hematopoeettisen kantasolusiirron saaneilla potilailla (9,10) ja HIV-potilailla (11), yhteneväisyys QF-CMV-testillä ja CMV IgG -testillä saatujen tulosten välillä oli myös 100 %.

Herkkyyys

Tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin 343 näytettä, jotka oli otettu CMV IgG -seroposiivisiksi todetuilta terveiltä tutkittavilta, tarkasteltaessa yhteneväisyyttä QF-CMV-testissä ja CMV IgG -serologiatestissä saatujen vasteiden välillä tuloksena oli 80,5 %, 276/343 näytteestä osoittautui QF-CMV-testissä reaktiiviseksi ja CMV IgG -serologiatestissä positiiviseksi. Havaittu eroavaisuus saattaa johtua väärästä positiivisesta CMV-serologiasta tai siitä, että potilailla ei havaittu vastetta HLA-tyypeille.

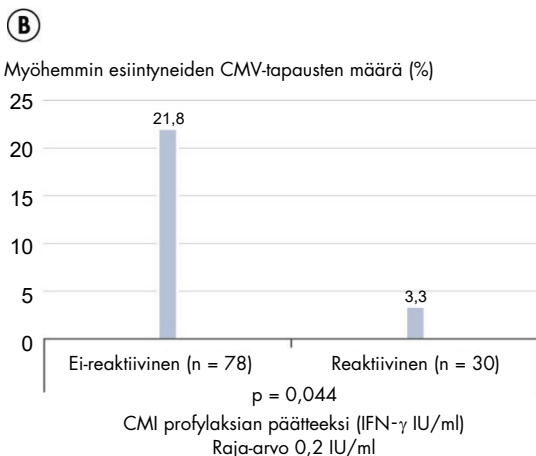
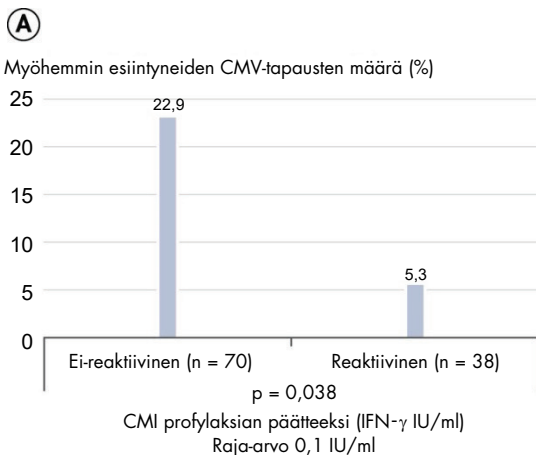
Sensitiivisyyden yhtäpitävyyden arviointi tehtiin elinsiirtopotilailla (1–8), hematopoeettisen kantasolusiirron saaneilla potilailla (9, 10) ja HIV-positiivisilla potilailla (11). Havaittu eroavaisuus saattaa johtua väärästä positiivisesta CMV-serologiasta, tai siitä, että henkilöillä ei havaittu vastetta HLA-tyypeille tai reaktiivisten T-solujen puuttumisesta näillä potilailla heidän immuunivajeensa vuoksi.

Kliinistä käytettävyyttä valottavat tutkimukset

Sekä CMV IgG -serologia että QF-CMV ilmoittavat käyttötarkoituksensa olevan CMV-immuniteetin havaitseminen. Kudossiirroissa CMV-serologia on laajalti käytetty ennen siirtoa kartoitettaessa potilaan CMV-komplikaatioiden riskiä siirron jälkeen, mutta sen arvo on rajallinen kudossiirtojen jälkeen. QF-CMV:lla voidaan testata myös kudossiirtojen saajat arviotaessa CMV-immuunitasoa potilailla, jotka ovat vaarassa saada oireellisen CMV-infektion ja/tai taudin immuunivajeensa vuoksi (12–15).

QuantIFERON-CMV:n teho on osoitettu useissa eri ikäluokkia koskevissa kliinisissä tutkimuksissa (1–11, 15, 16).

Laajassa tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin 108 elinsiirtopotilasta (4), havaittiin, että niiden potilaiden, joiden kohdalla QF-CMV-tulos oli reaktiivinen anti-CMV-profylaksian päätteeksi, myöhemmin esiintyneiden CMV-tapausten määrä oli merkittävästi pienempi (3,3 % tai 1/30; käytettäessä kynnyksarvoa 0,2 IU/ml) verrattuna henkilöihin, joiden QF-CMV-tulos oli ei-reaktiivinen (21,8 % tai 17/78, $p = 0,044$) (Kuva 5).



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

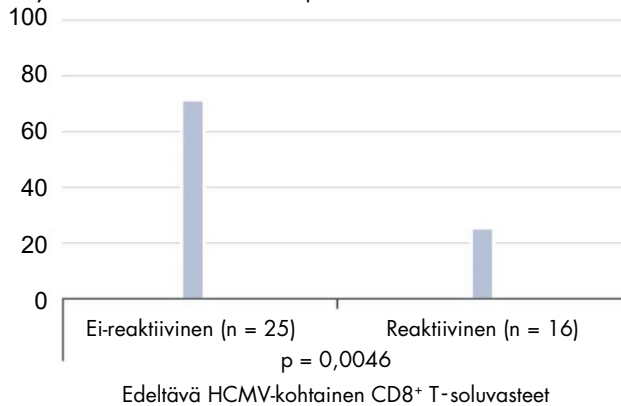
Lisäksi CMV-seronegatiiviselta luovuttajalta eli (D+/R-) siirteen saaneilla potilailla, joiden QF-CMV-testi oli reaktiivinen profylaksian päätteeksi, jäivät ilman CMV-tautia useammin ja pidempään. Tämä osoittaa, että QF-CMV soveltuu myös niiden potilaiden tunnistamiseen, jotka ovat vaarassa saada CMV-taudin myöhemmin.

Tämä tutkimus osoitti myös, että siirrännäispotilaiden ryhmässä suurimmassa CMV-taudin riskiryhmässä (D+/R-) reaktiiviseen tulokseen koska tahansa profylaksian jälkeen liittyi suurempi mahdollisuus olla saamatta CMV-tautia.

Tutkimuksessa, joka kattoi 37 elinsiirtopotilasta (6), arvio CMV-spesifisistä CD8⁺ T-soluvasteista QF-CMV:lla myötävaikuttii spontaaniin virusten poistumisen ennustamiseen verrattuna CMV-taudin etenemiseen ja CMV-virusten myöhäisempään esiintymiseen veressä. Tässä tutkimuksessa 24/26 potilaalla (92,3 %), joiden QF-CMV-tulos oli reaktiivinen (käytettäessä kynnyksarvoa IFN- γ \geq 0,2 IU/ml), CMV-virukset poistuivat, ja vain 5/11 (45,5 %) potilaista, joiden QF-CMV-tulos oli ei-reaktiivinen, saivat saman tuloksen.

Tutkimus, jossa 67 keuhkosiirrepotilaalla arvioitiin CMV-virustartuntojen määrää siirteen jälkeen (7), havaittiin että 18/25 (72 %) CMV-virustartuntaa edelsi ei-reaktiivinen QF-CMV-tulos vs. 4/16 (25 %) tapausta, joita edelsi reaktiivinen QF-CMV-vaste (Fisherin eksakti testi, $p = 0,0046$, Kuva 6).

% HCMV DNAemia -tartunnoista, joihin
liittyi virusmäärä > 1 000 kopiota/ml



Kuva 6. Tilastollinen CMV-spesifinen CD8⁺ T-solvasteen analyysi QuantiFERON-CMV:n tunnistamana ja CMV-viruskannan kehitys (Fisherin eksakti testi, p = 0,0046). Taustatiedot teoksessa Weseslindner et al (7).

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

Ennakoivassa tutkimuksessa otanta oli 55 elinsiirtopotilasta (8), jossa suhde ennen siirrettä saatujen QF-CMV-tulosten ja siirteen jälkeen todettujen CMV-tapausten välillä analysoitiin, todettiin, että suurempi CMV-esiintyvyys havaittiin CMV-seropositiivisilla potilailla, joiden ennen siirtoa antama QF-CMV-vaste (7/14 tai 50 %) oli ei-reaktiivinen (käytettäessä kynnysarvoa 0,2 IU/ml) verrattuna niihin CMV-seropositiivisiin potilaisiin, joiden QF-CMV-vaste ennen siirtoa oli reaktiivinen (4/30 tai 13,3 %, $p = 0,021$).

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

Monia muita tutkimuksia CMV-spesifisen CD8⁺ T -soluvasteen tunnistamisesta QF-CMV:lla elinsiirtopotilaiden ryhmässä on tehty (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) tai niitä ollaan tekemässä eri puolilla maailmaa.

Kansainväliset ohjeet elinsiirtopotilaiden sytomegaloviruksen hoidosta

CMV-spesifisen immuunivalvonnan merkitys on tunnistettu, ja aiheesta on annettu julkaisu *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Päivitetyt kansainväliset ohjeet elinsiirtopotilaiden sytomegaloviruksen hoidosta) (12). Nämä kansainväliset ohjeet, jotka ovat CMV- ja elinsiirtoasiantuntijaryhmän Infectious Diseases Section of The Transplantation Society -yhdistyksen valvonnan alaisuudessa laatimat, edustavat asiantuntijamielipiteiden pohjalta laadittuja yhteisiä ohjeita CMV-valvonnassa diagnostiikka, immunologia, ehkäisy ja hoito mukaan lukien.

Ohjeissa todetaan, että "immunteetin valvonta CMV-spesifisen T-soluvasteen osalta saattaa ennustaa CMV-riskiryhmät elinsiirron jälkeen, ja se saattaa olla hyödyllinen työkalu profylaksian ja ennakoidun hoidon kohdalla" (12).

Lisäksi ohjeissa annetaan suosituksia immuunivasteen testauksesta, johon kuuluu:

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

QF-CMV vastaa käytännössä kaikkia ohjeissa määriteltyjä kriteereitä, ja se on ainoa standardoitu immunteetin valvontatesti, joka pystyy tunnistamaan IFN- γ :n, joka viittaa erityisesti CMV:hen.

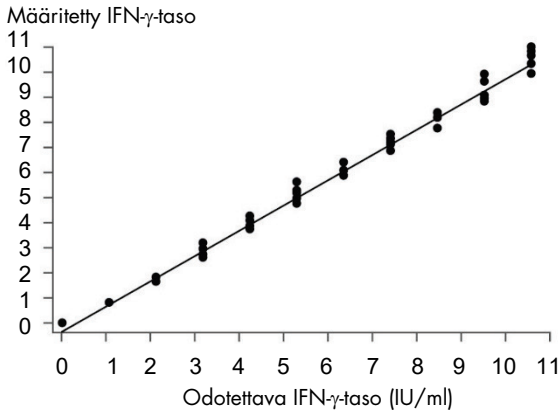
Testin suoritusarvot

QF-CMV ELISA -testissä käytetään ihmisen rekombinanttigammainterferonistandardia (IFN- γ standardi), jonka määrittely on tehty referenssi IFN- γ -valmistetta vasten (NIH Ref: Gxg01-902-535). Testinäytteitä koskevat tulokset on raportoitu kansainvälisinä yksiköinä (International Units, IU) suhteessa testisarjan mukana toimitetusta sekundaarisesta standardista valmistetun testiliuoksen avulla laadittuun standardisuoraan.

Heterofiilisten vasta-aineiden (esim. neutraloivien vasta-aineiden) esiintymisen seerumissa tai plasmassa tiedetään tietyillä yksilöillä aiheuttavan häiriöitä immunomäärityksessä. Heterofiilisten vasta-aineiden vaikutus QF-CMV ELISA -testissä voidaan minimoida lisäämällä vihreään laimennusliuokseen normaalia hiiriseerumia ja käyttämällä F(ab')₂-monoklonaalista vasta-ainevalmistetta IFN- γ -vasta-aineena, jolla levyn kuopat päällystetään.

QF-CMV ELISA-testin tunnistusraja on 0,065 IU/ml, eikä testi ole osoittanut merkkejä suurten annosten (protsooni) vaikutuksesta IFN- γ -pitoisuuteen 10 000 IU/millilitraan asti. Tutkimuksissa on osoitettu, että QF-CMV ELISA -vasta-aineet eivät reagoi ristiin testattujen sytokiinien kanssa (kuten IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 ja IL12).

QF-CMV ELISA:n lineaarisuus on todistettu asettamalla ELISA-levylle sattumanvaraisesti viisi toisintoa 11 plasmapoolista, joiden IFN- γ -pitoisuus tunnetaan. Linearisessa regressiolinjassa on $1,002 \pm 0,011$ pudotus, ja korrelaatiokerroin on 0,99 (kuva 7).



Kuva 7. QF-CMV ELISAn lineaarisuusprofiili määriteltiin testaamalla viisi plasmanäytettä 11 joukosta, joiden IFN- γ -pitoisuus oli tiedossa.

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

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

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

Teknisiä tietoja

Määrittämättömät tulokset

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

- inkubointi 37 °C:ssa on tapahtunut myöhemmin kuin 16 tuntia näytteenotosta
- Verinäytteen säilyttäminen suositusalueen (22 ± 5 °C) ulkopuolella
- Verinäyteputkien sekoittaminen on riittämätöntä
- ELISA-levyä ei ole pesty kyllin huolellisesti.

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

Hyytyneet plasmanäytteet

Jos plasmanäytteitä kauan säilytettäessä syntyy fibrinihiyytymiä, näytteet on lingottava hyytyneen aineksen saostamiseksi ja plasman pipetoinnin helpottamiseksi.

Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisupuos voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmisssa. Lisätietoja on myös seuraavassa osoitteessa olevissa teknisissä tiedoissa: www.QuantiFERON.com. Katso yhteystiedot takakannesta.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Standardien lukemien alhainen optinen tiheys

- | | |
|--|---|
| a) Standardin laimennusvirhe | Varmista, että standardisarjan liuokset valmistetaan oikein QF-CMV ELISA -pakkausselosteen mukaisesti. |
| b) Pipetointivirhe | Varmista, että pipetit on kalibroitu ja niitä käytetään valmistajan ohjeiden mukaan. |
| c) Inkubointilämpötila on liian matala | ELISA-testin inkubointi on suoritettava huoneenlämpötilassa ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$). |
| d) Inkubointiaika on liian lyhyt | Konjugaatin, standardit ja näytteet sisältävän levyn inkubointiajan on oltava 120 ± 5 minuuttia. Entsyymi-substraattiliuosta inkuboidaan levyssä 30 minuutin ajan. |
| e) On käytetty virheellistä levyn lukulaitteen suodatinta | Levy on luettava 450 nm:n suodattimella, ja referenssisuodattimen on oltava 620–650 nm. |
| f) Reagenssit ovat liian kylmiä | Kaikki reagenssit lukuun ottamatta konjugaatti 100x -tiiviste -reagenssia on tuotava huoneenlämpöön ennen testin aloittamista. Se vie noin 1 tunnin. |
| g) Sarjan/komponenttien viimeinen käyttöpäivämäärä on umpeutunut | Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaatti 100x -tiiviste käytetään 3 kuukauden kuluessa uudelleenliuotuspäivämäärästä. |

Epämääräinen värin kehittyminen

- | | |
|--|---|
| a) Levy ei ole täysin pesty | Pese levy pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Käytettävän pesimen mukaan saatetaan tarvita enemmän kuin 6 pesujaksoa. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liuotusjakso. |
| b) ELISA-kuoppien ristikontaminaatio | Pipetoinnissa ja näytteen sekoituksessa on oltava huolellinen riskin vähentämiseksi minimiin. |
| c) Sarja/komponentit ovat vanhentuneet | Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaatti 100x -tiiviste käytetään 3 kuukauden kuluessa uudelleenliuotuspäivämäärästä. |

Huomautuksia ja ehdotuksia

- | | |
|--|--|
| d) Entsyymisubstraattiliuos on kontaminoitunut. | Heitä substraatti pois, jos sinistä väriä on havaittavissa. Varmista, että käytössä olevat reagenssisäiliöt ovat puhtaat. |
| e) Plasma on sekoittunut sentrifugiputkissa ennen keräämistä | Varmista, että plasmanäytteet kerätään huolellisesti yllä olevasta geelistä ilman pipetin ylös ja alas suuntautuvaa liikettä, ja huolehdi siitä, että et koske geelin pinnalla olevaan materiaaliin. |

Korkea tausta

- | | |
|---|---|
| a) Levy ei ole täysin pesty | Pese levy pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Käytettävän pesimen mukaan saatetaan tarvita enemmän kuin 6 pesujaksoa. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liuotusjakso. |
| b) Inkubointilämpötila on liian korkea | ELISA-testin inkubointi on suoritettava huoneenlämpötilassa (22 ± 5 °C). |
| c) Sarja/komponentit ovat vanhentuneet | Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaatti 100x -tiiviste käytetään 3 kuukauden kuluessa uudelleenliuotuspäivämäärästä. |
| d) Entsyymisubstraattiliuos on kontaminoitunut. | Heitä substraatti pois, jos sinistä väriä on havaittavissa. Varmista, että käytössä olevat reagenssisäiliöt ovat puhtaat. |

Epälineaarinen standardisuora ja rinnakkaisotoksen vaihtelu

- | | |
|--|---|
| a) Levy ei ole täysin pesty | Pese levy pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Käytettävän pesimen mukaan saatetaan tarvita enemmän kuin 6 pesujaksoa. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liuotusjakso. |
| b) Standardin liuotusvirhe | Varmista, että standardisarjan laimennukset on tehty oikein tämän pakkauselosteen ohjeiden mukaan. |
| c) Huono sekoitus | Sekoita reagenssit huolellisesti kääntelemällä putkia tai pyöräyttämällä niitä kevyesti ennen niiden lisäämistä levyille. |
| d) Epäjohdonmukainen pipetointiteknikka tai keskeytys testin suorituksessa | Näytteen ja standardin lisääminen on suoritettava yhtäjaksoisesti. Kaikki reagenssit on valmistettava ennen testin aloittamista. |

Tuotetiedot ja tekniset oppaat ovat saatavilla veloitusetta QIAGEN-yhtiöltä jälleenmyyjän välityksellä tai vierailemalla osoitteessa www.QuantiFERON.com.

Lähdeviitteet

1. Manuel, O., et al. (2013) Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8⁺ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* 8, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* 9, 1214.
5. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8⁺ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* 82, 433.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

-
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4⁺ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
 12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
 13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
 14. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 735.
 15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
 16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

Merkinnät

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Merkintä

Symbolin määritelmä



Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon



Viimeinen käyttöpäivämäärä



CE-merkintä



Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte



Luettelonumero



Eränumero



Materiaalinumero



GTIN-numero



Lämpötilarajoitus



Ei saa käyttää uudelleen



Säilytettävä auringonvalolta suojattuna



Katso käyttöohjeet



Valmistaja



Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support, soita ilmaisnumeroomme 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

ELISA-testimenetelmä lyhyesti

Vaihe 1: Veren inkubointi

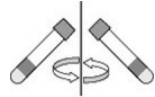
1. Ota potilaalta verinäyte ja ravista putkia välittömästi niiden täytön jälkeen kymmenen (10) kertaa juuri sen verran, että putken koko sisäpinta on veren peitossa niin, että putken seinämillä olevat antigeenit pääsevät liukenemaan vereen.



2. Inkuboi putkia pystyasennossa $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilassa 16–24 tuntia.



3. Inkuboinnin jälkeen putkia lingotaan 15 minuuttia 2 000 – 3 000 RCF (g) plasman erottamiseksi punasoluista.



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



Vaihe 2: IFN- γ ELISA

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



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



3. Sekoita kylmäkuivattu konjugaatti 100x -tiiviste sekä tislattu tai deionisoitu vesi.

4. Valmista käyttöpitoinen liuos konjugaattia vihreään laimennusliuokseen ja lisää sitä 50 µl kaikkiin kuoppiin.



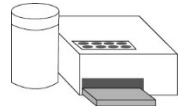
5. Lisää 50 µl testiplasmanäytettä ja 50 µl standardia asianomaisiin kuoppiin. Sekoita käyttämällä ravistelijaa.



6. Inkuboi 120 minuuttia huoneenlämpötilassa.



7. Pese kuopat pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään kuusi kertaa.



8. Lisää 100 µl entsyymisubstraattiliuosta kuoppiin. Sekoita käyttämällä ravistelijaa.



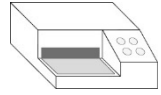
9. Inkuboi 30 minuuttia huoneenlämpötilassa.



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



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



12. Analysoi tulokset.



Käsikirjan muutoshistoria

Asiakirja	Muutokset	Päivämäärä
L1075110-R5	Lisätty rikkinäisiä pulloja koskevia turvallisuustietoja Päivitykset taulukkoon 2, QF-CMV-tulosten tulkinta, sivu 25.	Helmikuu 2018
L1075110-R5	Päivitetty GHS-tietoja, sivu 11	Helmikuu 2018

Tämä sivu on tarkoituksella jätetty tyhjäksi.

Tämä sivu on tarkoituksella jätetty tyhjäksi.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.); SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

QuantiFERON-CMV ELISA -testin rajoitettu lisenssisopimus

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

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaalimaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut asianajajan palkkiot mukaan lukien, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneelin ja/tai sen osien osalta.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Feb-18 © 2018 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com