
QuantiFERON[®]-CMV

Bijsluiter ∇_{Σ} 2 x 96

De interferon-gammatest voor volledig bloed die reacties meet op peptideantigenen van het humaan cytomegalovirus

IVD

CE

REF 0350-0201



Cellestis, een bedrijf van QIAGEN

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australië

Telefoon: (Australië) +613-9840-9800, (Europa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, DUITSLAND

1075110NL Rev. 01



Inhoudsopgave

Beoogd gebruik	5
Inleiding	5
Uitgangspunten van de test	6
Benodigde tijd voor het uitvoeren van de assay	6
Reagentia en opslag	7
Benodigde materialen die niet meegeleverd zijn	8
Opslag en verwerking	8
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	9
Specimenafname en -behandeling	10
Richtlijnen voor gebruik	11
Fase 1 – Incubatie van bloed en verzamelen van plasma	11
Fase 2 – QuantiFERON-CMV ELISA voor humaan IFN- γ	12
Berekeningen en interpretatie van de test	15
Interpretatie van de resultaten	16
Beperkingen	16
Verwachte waarden	17
Kwaliteitskenmerken	18
Vergelijkend testen	18
Testdrempel	19
Klinisch onderzoek	19
Specificiteit	20
Sensitiviteit	20
Onderzoek dat klinische bruikbaarheid benadrukt	20
Internationale richtlijnen voor consensus over de beheersing van cytomegalovirus bij transplantatie van vaste organen	23
Kwaliteitskenmerken test	24
Technische informatie	26
Onbepaalde resultaten	26
Handleiding voor het oplossen van problemen	27

Literatuur	28
Technische service	29
Verkorte testprocedure	30
Fase 1 – Incubatie van bloed	30
Fase 2 – ELISA van IFN- γ	30

Beoogd gebruik

QuantIFERON-CMV (QF-CMV) is een in-vitro assay waarbij gebruikgemaakt wordt van een peptidencocktail die eiwitten van het humaan cytomegalovirus (CMV) nabootst voor de stimulatie van cellen in gehepariniseerd volledig bloed. Detectie van interferon-gamma (IFN- γ) met ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wordt gebruikt om in-vitro reacties te kwantificeren op deze peptideantigenen, die worden geassocieerd met de immuuncontrole van infectie door CMV. Het verlies van deze immuunfunctie kan verband houden met het ontstaan van cytomegalie. Het gebruik van QF-CMV is bedoeld voor het monitoren van de mate van immuniteit van een patiënt tegen CMV.

QF-CMV is geen test om CMV-infectie vast te stellen en mag niet worden gebruikt om CMV-infectie uit te sluiten.

Inleiding

CMV is een herpesvirus dat 50-85% van de volwassen populatie besmet. Het is een regelmatig optredende complicatie van immunosuppressie, met name na transplantaties, en kan de morbiditeit en mortaliteit van ontvangers van transplantaten aanzienlijk verhogen. De huidige immunosuppressietherapieën, gebruikt om het afstoten van een getransplanteerd orgaan te voorkomen, hebben schadelijke gevolgen voor de T-lymfocyten en cel-gemedieerde immuunrespons (CMI), wat leidt tot een verhoogde ontvankelijkheid voor virale infecties na de transplantatie. Het belang van de functie van de T-helpercellen bij het onderdrukken van CMV-replicatie wordt gekenmerkt door het feit dat CD8⁺ CMV-specifieke cytotoxische T-lymfocyten (CTL's) bescherming kunnen bieden tegen virus-gerelateerde pathogenese. De telling van CD8⁺ CMV-specifieke CTL's bij patiënten met immunosuppressie en de productie van IFN- γ kunnen een voorspellende waarde hebben voor de kans op het ontwikkelen van CMV-besmetting. IFN- γ productie kan een functioneel surrogaat zijn voor het identificeren van CMV-specifieke CTL's.

QF-CMV is een assay voor CMI-responsen op peptideantigenen die CMV-eiwitten nabootsen. De CMC-eiwitten zijn ontworpen om CD8⁺ T-helpercellen aan te vallen, inclusief HLA-klasse I haplotypen A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 en Cw6 (A30, B13), waaronder meer dan 98% van de menselijke populatie valt. Het bloed van met CMV geïnfecteerde personen bevat gewoonlijk CD8⁺-lymfocyten, die deze antigenen kunnen herkennen. Bij dit herkenningsproces wordt het cytokine IFN- γ aangemaakt en afgegeven. De detectie en de erop volgende kwantificering van IFN- γ vormen de grondslag voor deze test.

Uitgangspunten van de test

De QF-CMV-test wordt in twee stappen uitgevoerd. Eerst wordt bloed verzameld in de QF-CMV-bloedverzamelbuisjes, bestaande uit een buisje voor negatieve controle (Nil), een buisje voor CMV-antigenen en een mitogeenbuisje.

Het mitogeenbuisje wordt in de QF-CMV-test gebruikt als een positieve controle. Dit kan in het bijzonder gerechtvaardigd zijn als er twijfel bestaat ten aanzien van de immunestatus van de patiënt.

De buisjes dienen zo snel mogelijk bij 37 °C te worden geïncubeerd, en binnen 16 uur na het verzamelen. Na een incubatieperiode van 16 tot 24 uur worden de buisjes gecentrifugeerd, het plasma verwijderd en de hoeveelheid IFN- γ (IE/ml) gemeten met behulp van QF-CMV ELISA.

De hoeveelheid IFN- γ in plasmamonsters uit de CMV-antigeen- en mitogeenbuisjes kan vaak meer zijn dan de bovengrens voor de meeste ELISA-schalen aangeeft, ook bij personen die gematigd immunosuppressief zijn. Voor **kwantitatieve** resultaten moeten de waarden worden gebruikt die zijn berekend voor onverdund plasma. Voor **kwantitatieve** resultaten waarbij feitelijke IE-ml-waarden zijn vereist, moeten de plasmamonsters 1 op 10 worden verdund met Green Diluent en samen met onverdund plasma worden getest met ELISA.

NB: Voor monsters die zich binnen het bereik van de QF-CMV ELISA bevinden (d.w.z. max. 10 IE-ml), moeten de resultaten worden gebruikt die voor het onverdunde plasma zijn verkregen. Voor dergelijke IFN- γ -concentraties kunnen waarden die met een 1:10-verdunding van de plasmamonsters zijn verkregen, onnauwkeurig zijn.

Een test wordt als reactief voor een IFN- γ respons beschouwd als de CMV-antigeenbuis een waarde te zien geeft die aanzienlijk hoger ligt dan de waarde voor Nil IFN- γ IE/ml. Het met mitogeen gestimuleerde plasmamonster dient als een positieve controle op IFN- γ voor elk getest exemplaar. Een lage respons op mitogeen duidt op een gemiddeld resultaat wanneer een bloedmonster tevens een niet-reactieve respons te zien geeft op CMV-antigenen. Dit beeld kan optreden bij onvoldoende lymfocyten, een verminderde lymfocytenactiviteit wegens een onjuiste behandeling van de monsters, onjuist vullen of mengen van de mitogeenbuis of het feit dat de lymfocyten van de patiënt geen IFN- γ kunnen produceren, bijvoorbeeld vlak na een transplantatie. Het Nil-monster dient als ijking voor niet-specifieke of achtergrond-IFN- γ in bloedmonsters. Het IFN- γ -gehalte in de Nil-buis wordt afgetrokken van het gehalte aan IFN- γ in de CMV-antigeen- en mitogeenbuizen (raadpleeg 'Interpretatie van de resultaten' op pagina 16 van deze bijsluiters voor een overzicht van hoe de QF-CMV-resultaten moeten worden geïnterpreteerd).

Benodigde tijd voor het uitvoeren van de assay

De geschatte benodigde tijd voor het uitvoeren van de QF-CMV-assay wordt hieronder gegeven. Tevens wordt de tijd aangegeven voor het testen van meerdere gegroepeerde monsters:

Incubatie bij 37 °C van buisjes met bloed:	16 tot 24 uur
ELISA:	Circa 3 uur voor 1 ELISA-plaat
	Minder dan 1 uur werk
	10 tot 15 minuten meer voor elke extra plaat

Reagentia en opslag

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (CMV- en controlebuisjes voor verzamelen van bloed (pakket voor één patiënt))	
Catalogusnr.:	0192-0301
Aantal preparaten	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON Nil-controle) (grijze dop)	1 buisje
CMV Antigen (CMV-antigeen) (blauwe dop)	1 buisje
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON mitogeencontrole) (paarse dop)	1 buisje
Bijsluiter	1
QuantiFERON-CMV ELISA, onderdelen	
Catalogusnr.:	0350-0201
Strips microplaten	Strips met 24 x 8 putjes
Human IFN- γ Standard (Humaan IFN- γ , standaard), gevriesdroogd	1 flacon
Green Diluent	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (QuantiFERON-conjugaat, concentraat 100 x), gevriesdroogd	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (QuantiFERON-spoelbuffer, concentraat 20 x)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON-enzymsubstraatoplossing)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON-enzymremmingsoplossing)	1 x 15 ml

Benodigde materialen die niet meegeleverd zijn

- 37 °C-incubator; CO₂ niet vereist
- Gekalibreerde pipetten met variabel volume voor toedienen van 10 tot 1000 µl, met wegwerptips
- Gekalibreerde meerkanaalspipetten voor toedienen van 50 tot 100 µl, met wegwerptips
- Schudder voor microplaten
- Gedeïoniseerd of gedestilleerd water, 2 liter
- Microplaatwasser (automatische wasser aanbevolen)
- Microplaatlezer met 450 nm-filter en referentiefilter van 620 tot 650 nm

Opslag en verwerking

Bloedverzamelbuisjes

- Bloedverzamelbuisjes bewaren bij 4 tot 25 °C.
- De houdbaarheid van de QuantiFERON-CMV-bloedverzamelbuisjes bedraagt maximaal 15 maanden vanaf de productiedatum en indien opgeslagen bij 4 tot 25 °C.

Reagentia van ELISA-kit

- Kit opslaan bij 2 °C tot 8 °C.
- De enzymsubstraatoplossing nooit in direct zonlicht opslaan.

Gereconstitueerde en niet-gebruikte reagentia

Zie 'Richtlijnen voor gebruik – Fase 2' (stap 3 en 5 op pagina 12 en 13) voor instructies over het reconstitueren van de reagentia.

- De gereconstitueerde Kit-standaard kan tot 3 maanden bewaard blijven indien opgeslagen bij 2 tot 8 °C.

Let op de datum waarop de Kit-standaard is gereconstitueerd.

- Zodra het niet-gebruikte QuantiFERON-conjugaat, concentraat 100 x, is gereconstitueerd, moet het opnieuw worden opgeslagen bij 2 tot 8 °C en binnen 3 maanden worden gebruikt.

Let op de datum waarop het conjugaat is gereconstitueerd.

- Gebruiksklaar conjugaat moet binnen 6 uur na bereiden worden gebruikt.
- Gebruiksklare spoelbuffer kan gedurende 2 weken bij kamertemperatuur (17 tot 27 °C) worden opgeslagen.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik.

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) voor meer informatie. Deze zijn als handige en compacte PDF beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook de VIB voor elke QIAGEN-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrukken.



VOORZICHTIG: Behandel menselijk bloed alsof het besmet zou kunnen zijn. Houd u aan de relevante richtlijnen voor behandeling.

De volgende risico- en veiligheidszinnen zijn van toepassing op de onderdelen van de QF-CMV ELISA-kit.

QuantifERON-enzymremmingsoplossing



Bevat zwavelzuur: Irriterend. Risico- en veiligheidszinnen:* R36/38, S26-36/37/39

- **Green Diluent** bevat normaal muizenserum en caseïne, wat tot allergische reacties kan leiden. Vermijd contact met de huid.

Bij noodgevallen met chemicaliën

Morsen, lekken, blootstelling of ongeluk

Bel CHEMTREC (24 uur per dag)

In de VS en Canada: 1-800-424-9300

Buiten de VS en Canada: +1-703-527-3887 (collect calls worden geaccepteerd)

Overige informatie

Veiligheidsinformatiebladen: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Irriterend voor de ogen en de huid; S26: Bij aanraking met de ogen onmiddellijk met overvloedig water afspelen en deskundig medisch advies inwinnen; S36/37/39: Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en een bescherming voor de ogen/voor het gezicht.

Specimenafname en -behandeling

Wat u moet weten voor u begint:

Indien wordt afgeweken van de QF-CMV-bijsluiter kan dit leiden tot foutieve resultaten. Lees voor gebruik zorgvuldig de instructies.

- Gebruik de kit niet als een flesje met reagens vóór gebruik tekenen van schade of lekkage vertoont.
- Meng of gebruik geen ELISA-reagentia uit partijen van andere QF-CMV ELISA-kits.
- Gooi niet-gebruikte reagentia en biologische monsters weg volgens de plaatselijke of nationale regelgeving.
- Gebruik geen QF-CMV-bloedverzamelbuisjes of QF-CMV ELISA-kits waarvan de vervaldatum is verstreken.

Voor QF-CMV worden de volgende bloedverzamelbuisjes gebruikt:

1. Nil-controle (grijze dop)
2. CMV-antigeen (blauwe dop)
3. Mitogeencontrole (paarse dop)

De binnenzijde van de bloedverzamelbuisjes is bedekt met gedroogd antigeen. Het is dus van belang dat de inhoud van de busjes goed met bloed wordt gemengd. De busjes dienen zo snel mogelijk in een incubator van 37 °C te worden geplaatst, en binnen 16 uur na het verzamelen.

Voor optimale resultaten dienen de volgende procedures te worden gevolgd:

1. **Verzamel d.m.v. venapunctie van elke patiënt 1 ml bloed rechtstreeks in elk van de QF-CMV-bloedverzamelbuisjes.**
 - Het verzamelen van 1 ml bloed gaat relatief langzaam. Houd het busje daarom gedurende 2-3 seconden op de naald als het busje helemaal vol lijkt te zijn om er zeker van te zijn dat het juiste volume is bereikt.
De zwarte markering op de zijkant van de busjes geeft een volume van 1 ml aan. QF-CMV-bloedverzamelbuisjes zijn gevalideerd voor volumes van 0,8 tot 1,2 ml. Als het bloedniveau in een busje niet dichtbij de indicatorstreep staat, wordt aanbevolen een ander bloedmonster te nemen.
 - QF-CMV-bloedverzamelbuisjes zijn gevalideerd voor bloedvolumes van 0,8 en 1,2 ml op hoogten tussen zeeniveau en 810 meter. Hierboven moet de gebruiker ervoor zorgen dat het bloed binnen deze grenzen wordt verzameld. Als er te weinig bloed wordt verzameld, kan gebruikgemaakt worden van een injectiespuit en kan 1 ml in elk van de 3 busjes worden overgebracht. Vanwege de veiligheid kan dit het beste geschieden door de injectienaald te verwijderen (met inachtneming van de juiste veiligheidsprocedures), de doppen van de drie QF-CMV-buisjes te halen en 1 ml bloed aan elk busje toe te voegen (tot aan de zware markering op het etiket aan de zijkant van het busje). Bevestig de doppen weer stevig op de busjes en meng zoals hieronder beschreven.
 - Als voor het verzamelen van het bloed een vliedernaald wordt gebruikt, moet een afnamebusje worden gebruikt om ervoor te zorgen dat het slangetje met bloed is gevuld voordat de QF-CMV-bloedverzamelbuisjes worden gebruikt.

2. **Zodra de buisjes zijn gevuld, moeten deze minstens tien (10) maal net krachtig genoeg worden geschud om ervoor te zorgen dat de gehele binnenwand van de buisjes met bloed wordt bedekt en het antigeen op de binnenwand is opgelost.**
 - Tijdens het vullen moeten de buisjes op een temperatuur van 17 tot 25 °C worden gehouden.
 - Te krachtig schudden kan tot afbraak van de gel en derhalve afwijkende resultaten leiden.
3. **Voorzie de buisjes van passende etiketten.**
4. **De buisjes dienen zo snel mogelijk in een incubator van 37 °C (± 1 °C) te worden geplaatst, en binnen 16 uur na het verzamelen. Zet de bloedmonsters niet in de koelkast en vries ze niet in.**

Richtlijnen voor gebruik

Fase 1 – Incubatie van bloed en verzamelen van plasma

1. **Als het bloed niet onmiddellijk na het verzamelen wordt geïncubeerd, moet het schudden van de buisjes onmiddellijk voorafgaand aan de incubatie worden herhaald, zoals beschreven in Stap 2 van de vorige sectie.**
2. **Incubeer de buisjes RECHTOP gedurende 16 tot 24 uur bij 37 °C. Voor de incubator is geen CO₂ of bevochtiging nodig.**
3. **Na de incubatie kunnen de bloedverzamelbuisjes maximaal 3 dagen bij 2 tot 27 °C worden bewaard voorafgaand aan de volgende stap. Na incubatie van de buisjes bij 37 °C dienen de buisjes gedurende 15 minuten bij een RCF van 2000 tot 3000 g te worden gecentrifugeerd. De cellen worden door een gelprop van het plasma gescheiden. Als de gelprop niet verschijnt, moeten de buisjes opnieuw worden gecentrifugeerd bij hogere snelheid.**
 - Het is mogelijk het plasma zonder centrifugeren te verzamelen, maar extra zorg is geboden om het plasma te scheiden zonder de cellen te verstoren.
4. **Na het centrifugeren en voorafgaand aan het verzamelen moet op en neer bewegen van de pipet of mengen van het plasma te allen tijde worden vermeden. Zorg er altijd voor het materiaal aan het oppervlak van de gel niet te verstoren.**
 - Plasmamonsters mogen alleen met een pipet worden verzameld.
 - Plasmamonsters kunnen rechtstreeks vanuit de gecentrifugeerde bloedverzamelbuisjes worden overgebracht op de QF-CMV ELISA-plaat, ook als geautomatiseerde ELISA-werkstations worden gebruikt.
 - Plasmamonsters kunnen maximaal 28 dagen bij 2 tot 8 °C worden bewaard, of, indien verzameld, gedurende langere perioden bij -20 °C (bij voorkeur bij minder dan -70 °C) in buisjes of containers voor opslag van plasma.

Fase 2 – QuantiFERON-CMV ELISA voor humaan IFN- γ

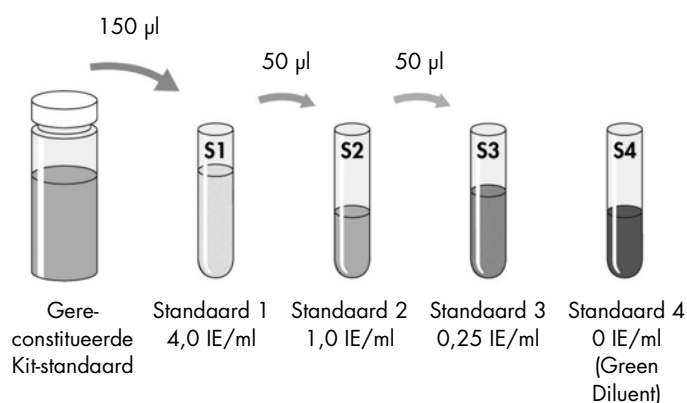
1. Alle plasmamonsters en reagentia, behalve conjugaat, concentraat 100 x, dienen vóór gebruik op kamertemperatuur (17 tot 27 °C) te worden gebracht. Laat minimaal 60 minuten staan om evenwicht te bereiken.
2. Verwijder strips die niet nodig zijn van het frame, verzegel ze opnieuw in de folieverpakking en zet deze terug in de koelkast voor later gebruik.

Reserveer ten minste één strip voor de QF-CMV ELISA-standaarden en voldoende strips voor het aantal te testen patiënten. Bewaar na gebruik het frame en het deksel om later met de resterende strips te gebruiken.

3. Reconstitueer de gevriesdroogde Kit-standaard met de hoeveelheid gedeïoniseerd of gedestilleerd water zoals aangegeven op het etiket van de standaard-flacon. Meng voorzichtig om schuimvorming zoveel mogelijk tegen te gaan en zorg dat volledige heroplossing plaatsvindt. Reconstitutie van de standaard naar het betreffende volume geeft een oplossing met een concentratie van 8,0 IE/ml.
4. De standaardcurve wordt gemaakt met behulp van 3 verdunde oplossingen van de Kit-standaard met Green Diluent alleen als standaard 4 (0 IE/ml).

Gebruik de gereconstitueerde Kit-standaard om een verdunningsreeks te maken van 3 IFN- γ -concentraties. Verdun in Kit Green Diluent (GD) (zie afbeelding). De standaarden dienen ten minste in duplo te worden getest. De volgende stappen zorgen voor voldoende volume hiervoor.

- a. Geef 4 buisjes de etiketten 'S1', 'S2', 'S3' en 'S4'.
- b. Voeg 150 μ l Green Diluent toe aan de 4 buisjes (S1-S4).
- c. Voeg 150 μ l Kit-standaard toe aan S1 en meng goed.
- d. Breng 50 μ l uit S1 over in S2 en meng goed.
- e. Breng 50 μ l uit S2 over in S3 en meng goed.
- f. Green Diluent alleen dient als de nulstandaard (S4).



Afbeelding 1. Maken van de standaardcurve. Maak voor elke ELISA-sessie verse verdunningen van de Kit-standaard.

5. **Reconstitueer gevriesdroogde QuantiFERON-conjugaat, concentraat 100 x, met 0,3 ml gedeïoniseerd of gedestilleerd water. Meng voorzichtig om schuimvorming zoveel mogelijk tegen te gaan en zorg dat volledige heroplossing van het conjugaat plaatsvindt.**
6. **Gebruiksklaar conjugaat wordt bereid door de vereiste hoeveelheid gereconstitueerd conjugaat, concentraat 100 x, te verdunnen met Green Diluent, zoals beschreven in Tabel 1 – Bereiding conjugaat.**
 - Meng goed maar voorzichtig om schuimvorming tegen te gaan.
 - Sla onmiddellijk na gebruik eventueel niet-gebruikt conjugaat, concentraat 100 x, weer op bij een temperatuur van 2 tot 8 °C.
 - Gebruik alleen Green Diluent.

Tabel 1. Bereiding conjugaat

Aantal strips	Hoeveelheid conjugaat, concentraat 100 x	Hoeveelheid Green Diluent
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

7. **Voorafgaand aan de assay moeten de plasma's worden gemengd om ervoor te zorgen dat IFN-γ in elk monster regelmatig verdeeld is. Verdun ook de CMV- en mitogeenplasma's 1 op 10 in Green Diluent (10 µl plasma mengen met 90 µl GD) als kwantitatieve resultaten nodig zijn. Het Nil-plasma mag niet worden verdund.**

Het wordt aanbevolen de volgende monsters te testen:

- Nil, CMV-antigeen, mitogeen, CMV-antigeen (1:10), mitogeen (1:10)

De volgende opties voor patiëntmonsters worden echter ook ondersteund door de analysesoftware van QuantiFERON-CMV:

- Nil, CMV-antigeen, mitogeen
- Nil, CMV-antigeen (1:10), mitogeen (1:10)
- Nil, CMV-antigeen, mitogeen, CMV-antigeen (1:10)
- Nil, CMV-antigeen (1:10), mitogeen

8. **Voeg met behulp van een multikanaalspipet 50 µl vers bereid, gebruiksklaar conjugaat toe aan de betreffende ELISA-putjes.**
9. **Voeg met behulp van een multikanaalspipet 50 µl monsters testplasma toe aan de betreffende putjes. Voeg ten slotte 50 µl toe van elk van de standaarden 1 t/m 4.**
10. **Meng het conjugaat met de plasmamengsels/standaarden gedurende 1 minuut goed met behulp van een microplaatschudder.**
11. **Dek elke plaat af met een deksel en incubeer gedurende 120 ± 5 minuten bij kamertemperatuur (17 tot 27 °C).**
 - Tijdens het incuberen mogen de platen niet aan direct zonlicht worden blootgesteld.
12. **Verdun tijdens het incuberen één deel spoelbuffer, concentraat 20 x, met 19 delen gedeïoniseerd of gedestilleerd water en meng goed. Er is voldoende spoelbuffer, concentraat 20 x, aanwezig om 2 liter gebruiksklare spoelbuffer te maken.**

Spoel de putjes minstens gedurende 6 cycli met **400 µl** met gebruiksklare spoelbuffer. Er wordt een geautomatiseerde plaatspoeler aanbevolen.

 - Zorgvuldig spoelen is erg belangrijk voor het uitvoeren van de test. Zorg dat elk putje voor elke wascyclus tot aan de rand **volledig is gevuld** met spoelbuffer. Er wordt een inweektijd van minstens 5 seconden tussen de cycli aanbevolen.
 - Er dient een standaard desinfecterend middel voor laboratoria te worden toegevoegd aan het uitstroomreservoir en er moeten algemeen aanvaarde procedures worden gevolgd voor het ontsmetten van potentieel besmet materiaal.
13. **Houd de platen omgekeerd boven een absorberende doek en tik erop om resterende spoelbuffer te verwijderen. Voeg 100 µl enzymsubstraatoplossing toe aan elk putje en meng goed met behulp van een microplaatschudder.**
14. **Dek elke plaat af met een deksel en incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur (17 tot 27 °C).**
 - Tijdens het incuberen mogen de platen niet aan direct zonlicht worden blootgesteld.
15. **Voeg na een incubatie van 30 minuten 50 µl enzymremmingsoplossing toe aan elk putje en meng goed.**
 - De enzymremmingsoplossing dient in dezelfde volgorde en in het ongeveer hetzelfde tempo aan de putjes te worden toegevoegd als het substraat in stap 13.
16. **Meet binnen 5 minuten na het stoppen van de reactie de absorptie of optische dichtheid (OD) van elk putje met een microplaatlezer die is voorzien van een 450 nm-filter en een referentiefilter van 620 tot 650 nm. OD-waarden worden gebruikt om de resultaten te berekenen.**

Berekeningen en interpretatie van de test

QuantiFERON-CMV-analysesoftware, voor de analyse van oorspronkelijke gegevens en de berekening van resultaten, is verkrijgbaar bij QIAGEN op www.QuantiFERON.com.

De software stelt een kwaliteitscontrole voor de assay vast, genereert een standaardcurve en geeft voor elke patiënt een testresultaat, zoals verder is uitgewerkt in de sectie 'Interpretatie van de resultaten'.

In plaats van met de analysesoftware van QF-CMV kunnen de resultaten ook worden bepaald met de volgende methode:

Genereren van de standaardcurve

Bepaald de gemiddelde OD-waarden van de Kit-standaardreplicaten op elke plaat.

Construeer een dubbellogaritmische standaardcurve door de $\log_{(e)}$ van de gemiddelde OD (y-as) af te zetten tegen de $\log_{(e)}$ van de IFN- γ -concentratie van de standaarden in IE/ml (x-as), waarbij de nulstandaard niet bij deze berekeningen moet worden betrokken. Bereken de best passende lijn voor de standaardcurve met behulp van regressieanalyse.

Gebruik de standaardcurve om de IFN- γ -concentratie (IU/ml) vast te stellen voor elk testplasmamonster met behulp van de OD-waarde van elk monster.

Deze berekeningen kunnen worden uitgevoerd met softwarepakketten die bij microplaatlezers worden geleverd en een standaardspreadsheet of statistische software (zoals Microsoft® Excel®). Het wordt aanbevolen deze pakketten te gebruiken voor het berekenen van de regressieanalyse, de variatiecoëfficiënt (%CV) van de standaarden en de correlatiecoëfficiënt (r) van de standaardcurve.

Kwaliteitscontrole van de test

De nauwkeurigheid van de testresultaten hangt af van het genereren van een accurate standaardcurve. Resultaten die van de standaarden worden afgeleid, dienen dus nader te worden bekeken voordat de resultaten van de testmonsters kunnen worden geïnterpreteerd.

De ELISA is geldig als aan het volgende is voldaan:

- De gemiddelde OD-waarde voor standaard 1 moet $\geq 0,600$ zijn.
- De %CV voor de OD-waarden van de replicaten van standaard 1 en standaard 2 dienen $< 15\%$ te zijn.
- De OD-waarden van de replicaten van standaarden 3 en 4 mogen niet meer van het gemiddelde afwijken dan 0,040 eenheden optische dichtheid.
- De correlatiecoëfficiënt (r) van de gemiddelde absorptiewaarden van de standaarden dient $\geq 0,98$ te zijn.

Als aan bovenstaande criteria niet wordt voldaan, is de assay ongeldig en moet deze worden herhaald.

De gemiddelde OD-waarde van de nulstandaard (Green Diluent) dient $\leq 0,150$ te zijn. Als de gemiddelde OD-waarde $> 0,150$ is, dient de plaatwasprocedure te worden gecontroleerd.

Interpretatie van de resultaten

QuantiFERON-CMV-resultaten worden geïnterpreteerd aan de hand van de volgende criteria:

CMV minus Nil (IE/ml)*	Mitogeen minus Nil (IE/ml)	QF-CMV-resultaat	Rapport/Interpretatie
< 0,2	≥ 0,5	Niet-reactief	Anti-CMV-immuniteit NIET gedetecteerd
≥ 0,2	Elke waarde	Reactief	Anti-CMV-immuniteit gedetecteerd
< 0,2	< 0,5	Onbepaald†	Resultaat onbepaald voor CMV-activiteit

* IFN- γ -reactiviteit op CMV-antigeen en mitogeen (positieve controle) kunnen vaak buiten het bereik van de microplaatlezer liggen. Dit is niet van invloed op de kwalitatieve resultaten.

† Raadpleeg de sectie 'Problemen oplossen' voor mogelijke oorzaken.

Beperkingen

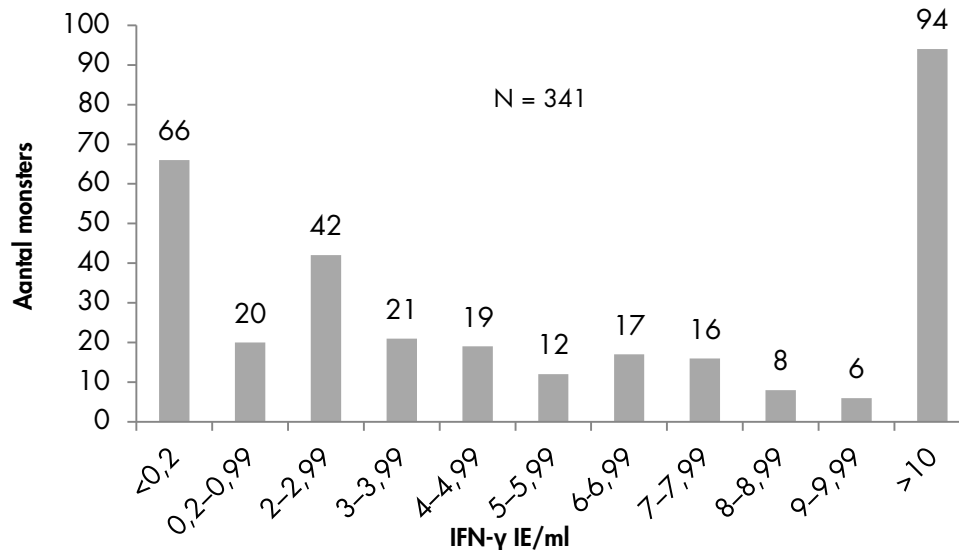
De resultaten van de QuantiFERON-CMV-test dienen te worden gebruikt in combinatie met de epidemiologische voorgeschiedenis, de huidige medische status en andere diagnostische evaluaties van elke patiënt.

Onbetrouwbare of onbepaalde resultaten kunnen het gevolg zijn van:

- Afwijkingen van de in de bijsluiter beschreven procedure.
- Buitensporige IFN- γ -niveaus in het Nil-buisje.
- Een periode van meer dan 16 uur tussen het afnemen van het bloedmonster en de incubatie bij 37 °C.

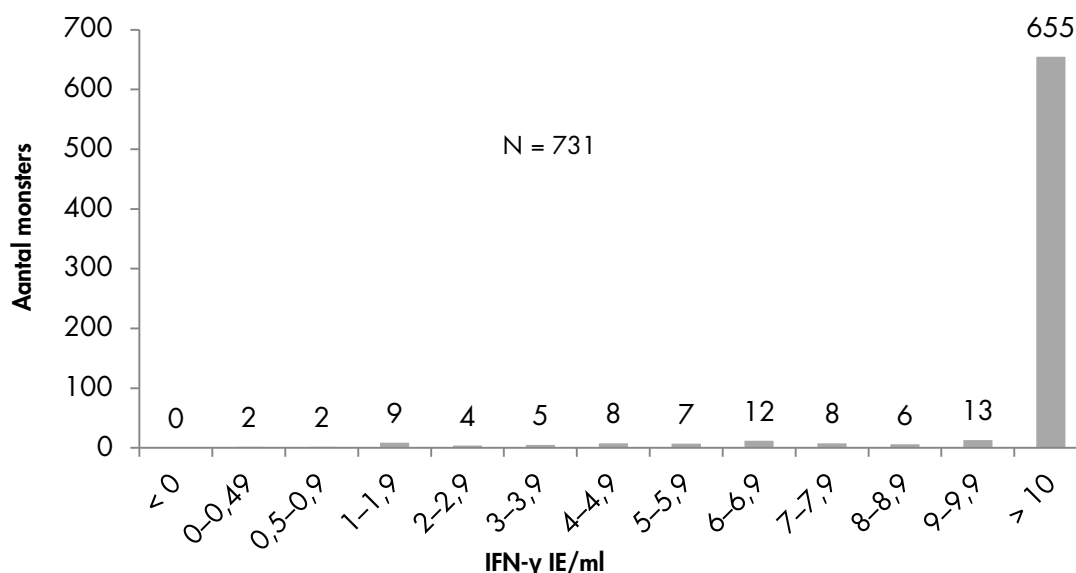
Verwachte waarden

Verwachte IFN- γ -waarden met behulp van QuantiFERON-CMV werden verkregen door 591 monsters van gezonde volwassenen te testen. Hiervan waren er 341 CMV-seropositief en 250 seronegatief. Van de 250 gezonde, volwassen proefpersonen zonder CMV-infectie, zoals vastgesteld door anti-CMV-serologie (CMV-seronegatief), gaf 100% van de proefpersonen een IFN- γ -reactie te zien van $< 0,2$ IE/ml op het CMV-antigeen (minus Nil). De verdeling van de CMV-antigeenbuisjes (minus Nil) voor de 341 gezonde proefpersonen met CMV-infectie, zoals vastgesteld anti-CMV-serologie (CMV-seronegatief), is weergegeven in afbeelding 2.



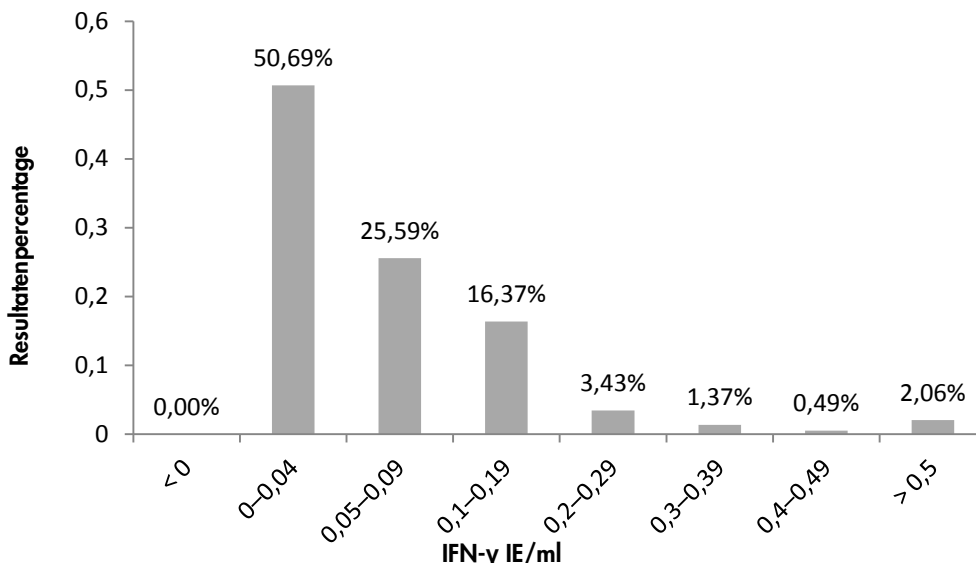
Afbeelding 2. Verdeling van CMV-Nil IFN- γ -reacties bij seropositieve, gezonde proefpersonen (n = 341).

De verdeling van mitogeen (minus Nil-achtergrond) resulteert in 731 monsters normaal bloed van gezonde, volwassen proefpersonen (ongeacht eventuele CMV-infectie), is weergegeven in afbeelding 3. Een resultaat van minder dan 0,5 IE/ml mitogeen (minus Nil) duidt ofwel op een mislukte test, ofwel dat de proefpersoon immunogecompromitteerd is. Bij een gezonde populatie valt slechts 2/731 deel in deze categorie.



Afbeelding 3. Verdeling van mitogeen-Nil IFN- γ -reacties bij gezonde, volwassen proefpersonen (n = 731).

De verwachte waarden voor Nil-buisjes worden weergegeven in afbeelding 4. De gegevens zijn afkomstig van 1020 plasmamonsters van gezonde, volwassen proefpersonen die zijn getest met behulp van QuantiFERON-CMV ELISA.



Afbeelding 4. Verdeling (uitgedrukt als percentage van de populatie) van Nil IFN- γ -reacties bij gezonde, volwassen proefpersonen (n = 1020).

Kwaliteitskenmerken

Vergelijkend testen

Een testdrempel voor de detectie van eerdere blootstelling aan CMV met behulp van QF-CMV werd bepaald na analyse van de resultaten van een groep gezonde proefpersonen (n = 223), waarbij de QF-CMV-resultaten werden vergeleken met de serologische resultaten voor CMV. Met behulp van ROC-analyse werd vastgesteld dat een testdrempel van 0,04 IE/ml (na aftrek van nil) optimale positieve en negatieve voorspellende waarden te zien gaf voor QF-CMV (oppervlak onder de curve = 0,9679 [95% BI = 0,9442 tot 0,9915, $p < 0,0001$]). Dit leverde de drempelwaarde waarbij deze assay het meest efficiënt werd uitgevoerd voor een gezonde populatie.

In de vergelijkende tests werd de kwaliteit van QF-CMV vergeleken met de SeraQuest CMV IgG-serologietest (Quest International). De QF-CMV-assay was voor 95% (294/310 personen) in overeenstemming met de vergelijkende test voor anti-HCMV-serologie bij gezonde personen, waarbij geen van 149 seronegatieve donoren reactiviteit vertoonden met QF-CMV, en 145 van de 161 seropositieve donoren een IFN- γ -reactie vertoonden. Er was een algemene positieve overeenstemming van 90%, met een negatieve overeenstemmingswaarde van 100%. De mate van overeenstemming tussen IFN- γ -reacties op CMV-peptiden, zoals gemeten door QF-CMV bij gezonde vrijwilligers, en de anti-CMV-serologiestatus van deze proefpersonen met behulp van de SeraQuest CMV IgG-serologietest zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Overeenstemming tussen QuantiFERON-CMV- en CMV IgG-serologietest bij gezonde proefpersonen.

		CMV-serologie		Totaal
		Positief	Negatief	
QuantiFERON-CMV	Reactief	145	0	145 (46,8%)
	Niet-reactief	16	149	165 (53,2%)
	Totaal	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Testdrempel

De aanbevolen klinische testdrempelwaarde voor deze assay is 0,2 IE/ml voor het CMV-antigeenbuisje (minus Nil), hoewel er verschillende drempelwaarden kunnen worden gevalideerd onder andere klinische omstandigheden. Dit komt voort uit de fundamentele immunologische verschillen tussen een normale testpopulatie en populaties waarbij de test als klinisch nuttig wordt beschouwd, met name bij personen die immunosuppressief zijn en als gevolg daarvan kans lopen op symptomatische CMV-infectie en/of ziek worden. Bij dergelijke personen met hoog risico ligt de klinische bruikbaarheid van QF-CMV in het nauwkeurig detecteren van de mate van anti-CMV-immuniteit bij deze proefpersonen, omdat de afwezigheid van immuniteit geassocieerd kan zijn met de ontwikkeling van CMV-besmetting (1-5, 7, 8, 11-16).

Klinisch onderzoek

Aangezien er geen definitieve standaard is om een infectie met cytomegalovirus te bevestigen of uit te sluiten, kan een schatting van de spoelbuffer en specificiteit van QF-CMV feitelijk niet worden geëvalueerd. De specificiteit en de spoelbuffer van QF-CMV werd geschat door de mate van overeenkomst te evalueren tussen IFN- γ -reacties op CMV-peptiden, zoals gemeten met QF-CMV bij gezonde vrijwilligers, en de anti-CMV-serologiestatus van deze proefpersonen met behulp van een CMV IgG-serologietest.

De specificiteit van QF-CMV werd geschat door de fout-positieven (reactie met QF-CMV) te evalueren bij gezonde vrijwilligers waarvan niet bekend was dat ze eerder aan CMV waren blootgesteld (CMV-seronegatieve personen). De spoelbuffer werd geschat door gezonde vrijwilligers waarvan wel bekend was dat ze eerder aan CMV waren blootgesteld (CMV-seropositieve personen), te evalueren. Hoewel QF-CMV gebruikmaakt van een groot aantal CMV-specifieke epitopen van verschillende CMP-eiwitten en zodoende een brede klinische toepassing biedt voor een groot deel van de populatie met diverse haplotypen van HLA-klasse I, is de dekkinggraad van deze peptiden geen 100%. Omdat de HLA-haplotypen van de tegen CMV-serologie geteste proefpersonen onbekend waren, wordt van een klein percentage seropositieve personen verwacht dat ze niet reageren op de QF-CMV-buisjes.

Specificiteit

In een onderzoek uitgevoerd onder gezonde proefpersonen waarvan niet bekend was dat ze eerder aan CMV waren blootgesteld (CMV-seronegatieve personen, waarbij $n = 250$), werd een overeenstemming van 100% gevonden tussen IFN- γ -reacties op CMV-peptiden, zoals gemeten door QF-CMV, en gegevens van anti-CMV-serologie.

In alle andere evaluaties op specificiteit, uitgevoerd bij ontvangers van vaste organen (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), ontvangers van hemapoëtische stamceltransplantaten (7, 13) en met hiv geïnficeerde patiënten (2), is elke keer een overeenstemming vastgesteld van 100% tussen IFN- γ -reacties op CMV-peptiden, zoals gemeten door QF-CMV, en gegevens van anti-CMV-serologie.

Sensitiviteit

In een onderzoek uitgevoerd onder gezonde proefpersonen waarvan bekend was dat ze eerder aan CMV waren blootgesteld (CMV-seropositieve personen, waarbij $n = 341$), werd een overeenstemming gevonden van 80,6% (275/341) tussen IFN- γ -reacties op CMV-peptiden, zoals gemeten door QF-CMV, en anti-CMV-serologie. Het waargenomen verschil kan geweten worden aan het gebruik van de hogere testdrempelwaarde (0,2 IE/ml), fout-positieve CMV-serologie, of het feit dat de proefpersonen niet reageerden op de CMV-peptiden in de test.

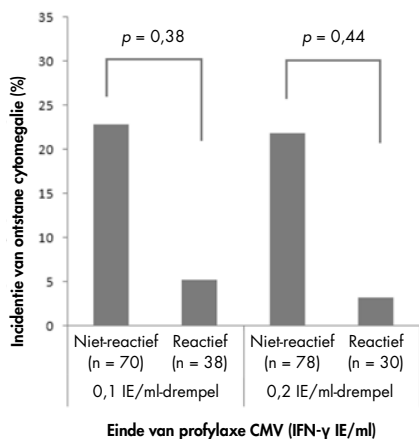
In evaluaties op sensitiviteit, uitgevoerd bij ontvangers van vaste organen (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), ontvangers van hemapoëtische stamceltransplantaten (7, 13) en met hiv geïnficeerde patiënten (2), is enkele malen een enigszins lagere mate van overeenstemming gevonden tussen IFN- γ -reacties op CMV-peptiden, zoals gemeten door QF-CMV, en seropositieve CMV-reacties bij deze patiënten. De lagere mate van overeenstemming kan het gevolg zijn van een fout-positieve CMV-serologie, het feit dat de proefpersonen niet reageerden op de CMV-peptiden in de assay of de afwezigheid van reactieve T-helpercellen in deze patiënten vanwege het feit dat ze immunosuppressief waren.

Onderzoek dat klinische bruikbaarheid benadrukt

Het beoogd gebruik van zowel serologie als QF-CMV is het detecteren van immuniteit voor CMV. Bij transplantaties wordt CMV-serologie op grote schaal gebruikt voorafgaand aan de transplantatie om het risico op complicaties met CMV voor de ontvanger na de transplantatie vast te stellen. De waarde na de transplantatie op zich is beperkt. QF-CMV kan ook worden gebruikt bij ontvangers van transplantaten om de mate van CMV-immuniteit vast te stellen bij die patiënten die kans lopen op symptomatische CMV-infectie en/of ziek worden omdat ze immunosuppressief zijn (6, 9-11).

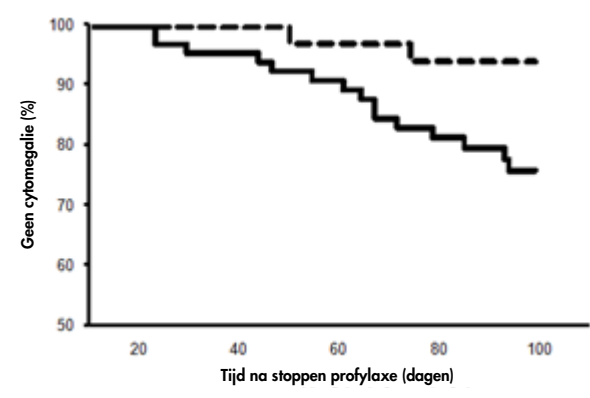
In een aantal gepubliceerde klinische onderzoeken met diverse transplantatiecohorten is de bruikbaarheid van QuantiFERON-CMV aangetoond (1-5, 7, 8, 11-16).

In een groot onderzoek onder 108 ontvangers van vaste organen (4), bleken patiënten met een reactief QF-CMV-resultaat na voltooiing van anti-CMV-profylaxe, een significant lagere kans te hebben op latere leeftijd ziek te worden in vergelijking met degenen die een niet-reactief QF-CMV-resultaat hadden (resp. 5,3% en 22,9%), $p = 0,044$ (afbeelding 5).



Afbeelding 5. Voorkomen van cytomegalie op latere leeftijd bij patiënten met een reactief QuantiFERON-CMV-resultaat versus een niet-reactief QuantiFERON-CMV-resultaat na profylaxe. Gegevens afkomstig uit Kumar et al.(4)

Verder bleken patiënten met een reactieve QF-CMV-test na voltooiing van de profylaxe vaker gevrijwaard van cytomegalie, en gedurende langere tijd (afbeelding 6), wat erop wijst dat QF-CMV kan worden gebruikt om personen te identificeren met een risico op het ontwikkelen van CMV-ziekte op latere leeftijd.

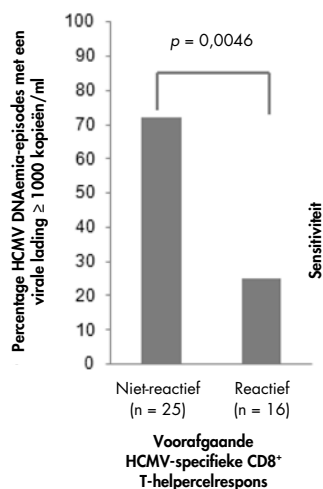


Afbeelding 6. Tijd tot ontwikkelen van cytomegalie bij patiënten met een reactief QuantiFERON-CMV-resultaat (onderbroken lijn) versus niet-reactief QuantiFERON-CMV-resultaat (ononderbroken lijn) aan eind van profylaxe. Gegevens afkomstig uit Kumar et al.(4)

Het onderzoek toonde bovendien aan dat in het cohort transplantatiepatiënten met de hoogste kans op het ontwikkelen van cytomegalie (CMV-seronegatieve ontvangers die een orgaan kregen van een CMV-seropositieve donor, d.w.z. D+/R-) een reactief QF-CMV-resultaat op een willekeurig tijdstip na profylaxe, was geassocieerd met een kans van 90% dat ze gevrijwaard bleven van cytomegalie.

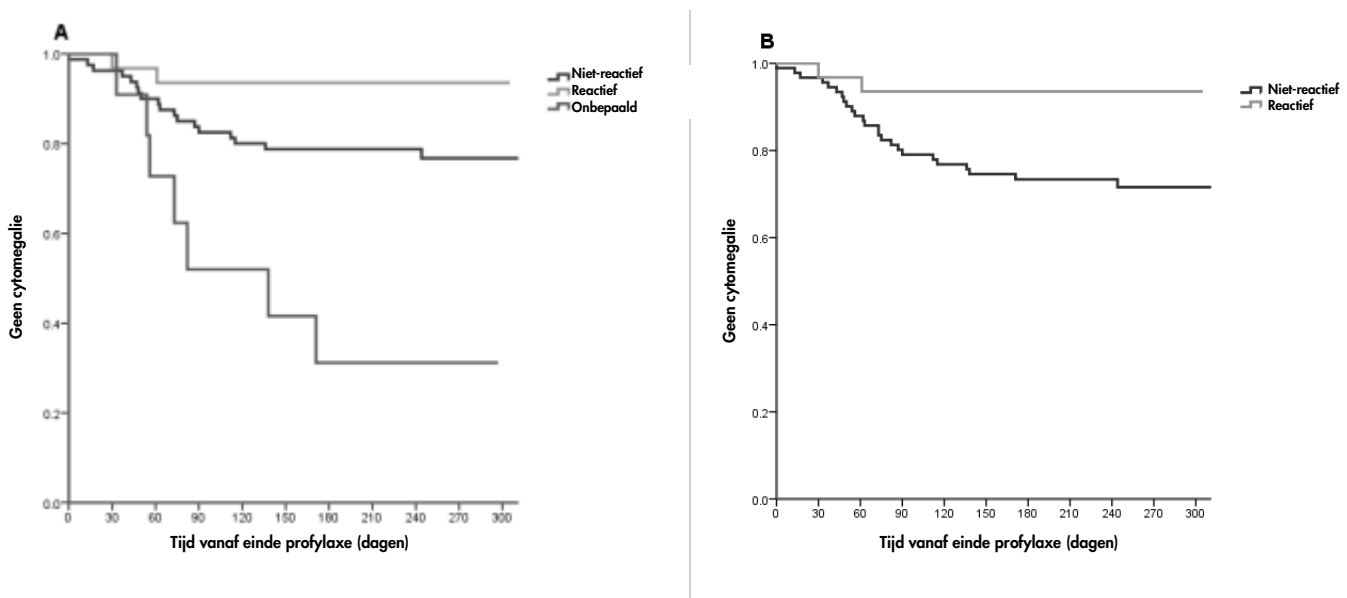
In een onderzoek bij 37 patiënten die vaste organen kregen (12), was het vaststellen van CMV-specifieke CD8⁺ T-helpercelreacties door QF-CMV behulpzaam bij het voorspellen van het spontaan verdwijnen van virus in vergelijking met de progressie van cytomegalie, na verhoogde CMV-viremie. In dit onderzoek verdween bij 24 van de 26 patiënten (92,3%) met een reactief QF-CMV-resultaat het CMV-virus spontaan, terwijl hetzelfde resultaat optrad bij slechts 5 van de 11 patiënten (45,5%) met een niet-reactief QF-CMV-resultaat.

In een onderzoek bij 67 ontvangers van longtransplantaten om na de transplantatie CMV-viremia-episoden vast te stellen (14), werd waargenomen dat 18 van de 25 (72%) CMV-viremia-episoden vooraf werden gegaan door een niet-reactief QF-CMV-resultaat, versus 4 van de 16 (25%) episodes die vooraf werden gegaan door een reactief QF-CMV-resultaat (Fisher's exact-toets, $p = 0,0046$, zie afbeelding 7).



Abeelding 7. Statistische analyse van CMV-specifieke CD8⁺ T-helpercelreacties, zoals gedetecteerd met QuantiFERON-CMV en de ontwikkeling van CMV-viremie (Fisher's exact-toets, $p = 0,0046$). Gegevens afkomstig uit Weseslindtner et al (14).

In een prospectief, multicenter onderzoek bij 127 D+/R- ontvangers van vaste organen (15), waarvan alle antivirale profylaxe hadden gekregen, hadden patiënten met een reactief QF-CMV-resultaat (met een testdrempel van 0,1 IE/ml) op enig tijdstip na de voltooiing van anti-CMV-profylaxe een significant lagere kans op het ontwikkelen van ziekte 12 maanden na de transplantatie in vergelijking met degenen met een niet-reactief QF-CMV-resultaat en een onbepaald resultaat (resp. 6,4%, 22,2% en 58,3%; $p < 0,001$). Als onbepaalde resultaten ook als 'niet-reactief' worden geclassificeerd, is het optreden van cytomegalie 6,4% versus 26,8%; $p = 0,024$ (zie afbeelding 8). De positieve en negatieve voorspellende waarden van QF-CMV voor bescherming tegen cytomegalie waren respectievelijk 0,90 (95% BI 0,74-0,98) en 0,27 (95% BI 0,18-0,37), wat erop wijst dat een reactief QuantiFERON-CMV-resultaat na profylaxe is geassocieerd met een kans van 90% dat men gevrijwaard blijft van cytomegalie. In het onderzoek is gevonden dat QF-CMV gebruikt kan worden om te voorspellen dat patiënten een laag, gemiddeld of hoog risico hebben om na profylaxe cytomegalie te ontwikkelen.



Afbeelding 8. Kaplan-Meiercurves voor de incidentie van cytomegalie volgens de resultaten van de QF-CMV-test.

A Reactieve versus niet-reactieve versus onbepaalde QF-CMV-resultaten (logrank toets, $p < 0,001$).

B Reactieve versus niet-reactieve, waarbij onbepaalde resultaten als 'niet-reactief' worden beschouwd (logrank-toets, $p = 0,024$).

In een prospectief onderzoek bij 55 ontvangers van vaste organen (16), waar de relatie tussen QF-CMV-resultaten vóór de transplantatie en de CMV-replicatie-episoden na transplantatie werden geanalyseerd, werd gevonden dat een hogere incidentie van CMV-replicatie na transplantatie werd gevonden in R(+)-ontvangers met een niet-reactief QF-CMV-resultaat vóór transplantatie (7/14, of 50%), in vergelijking met R(+)-ontvangers met een reactief QF-CMV-resultaat (4/30, ofwel 13,3%).

In dit onderzoek werd gevonden dat ontvangers met niet-reactieve QF-CMV-resultaten vóór transplantatie die een orgaan hadden ontvangen van een CMV-seropositieve donor, een tienvoudig verhoogde kans hadden op CMV-replicatie in vergelijking met ontvangers met reactieve QF-CMV-resultaten vóór transplantatie (aangepaste odds ratio 10,49, 95% BI 1,88-58,46), en dat een QF-CMV-assay vóór transplantatie gebruikt kan worden voor het voorspellen van het risico op CMV-replicatie na transplantatie en dus infectiebeheersing van CMV op individuele basis mogelijk maakt na transplantatie van vaste organen.

Er zijn een aantal onderzoeken voltooid naar het detecteren van CMV-specifieke CD8⁺ T-helpercelreacties door QF-CMV in een cohort ontvangers van orgaantransplantaten (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) of deze zijn momenteel gaande.

Internationale richtlijnen voor consensus over de beheersing van cytomegalovirus bij transplantatie van vaste organen

Het belang van CMV-specifieke immuuncontrole is onderkend en gepubliceerd in de International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplant'' (6). Deze internationale richtlijnen, ontwikkeld door een panel van deskundigen op het gebied van CMV en transplantatie van vaste organen, in een vergadering van de 'The Infectious Diseases Section' van 'The Transplantation Society', ontwikkelen bewijs en deskundige richtlijnen voor consensus over beheersing van CMV, waaronder diagnostiek, immunologie, preventie en behandeling.

In deze richtlijnen wordt geconcludeerd dat 'Immune monitoring of CMV-specific T-cell responses may predict individuals at risk of CMV disease posttransplant and may be useful in guiding prophylaxis and pre-emptive therapies' (Immuuncontrole van CMV-specifieke T-celreacties kan voorspellen welke personen risico lopen op cytomegalie na transplantatie en kan gebruikt worden als richtlijn voor profylaxe en preventieve therapieën) (6).

De richtlijnen bieden tevens aanbevelingen voor de eigenschappen van de ideale immuuncontroletest. Hieronder vallen:

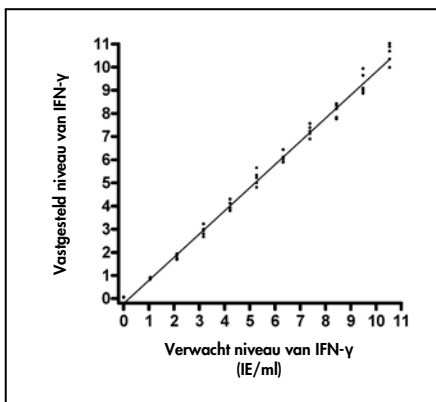
- Mogelijkheid tot vaststellen van de kwantiteit en functie van de CD4⁺ en CD8⁺ T-helpercellen van de ontvanger van een transplantaat
- Mogelijkheid tot het meten van IFN- γ
- Eenvoudig uit te voeren, kosten-efficiënt, reproduceerbaarheid
- Snelle doorlooptijd
- Gemakkelijk exemplaren te verzenden naar gespecialiseerde laboratoria

QF-CMV voldoet aan nagenoeg alle criteria die door deze richtlijnen worden gespecificeerd en is de enige gestandaardiseerde immuuncontroleassay die in staat is IFN- γ te detecteren, specifiek voor CMV.

Kwaliteitskenmerken test

Er is aangetoond dat de meetmethode voor de IFN- γ -concentratie door QF-CMV ELISA lineair is van 0 tot 10 IE/ml (afbeelding 9). Het onderzoek naar de lineariteit werd uitgevoerd door 5 replicaten uit 11 plasmagroepen van bekende IFN- γ -concentraties willekeurig over de ELISA-plaat te verdelen.

QF-CMV ELISA vertoont geen 'high-dose hook' (prozone)-effect met IFN- γ -concentraties van maximaal 100.000 IE/ml.



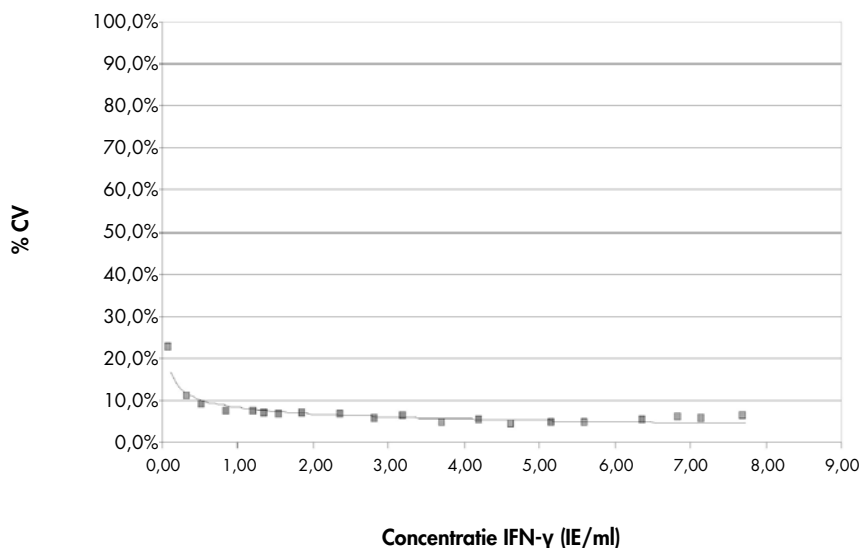
Afbeelding 9. Lineariteitsprofiel van QF-CMV ELISA vastgesteld door testen van 5 replicaten uit 11 plasmamonsters van bekende IFN- γ -concentraties. De lineaire regressielijn heeft een helling van $1,002 \pm 0,011$ en een correlatiecoëfficiënt van 0,99.

De intra-assay en inter-assay-variatie (%CV) van QF-CMV ELISA werd geschat door 20 plasmamonsters te testen met variërende IFN- γ -concentraties in replicaten van 3, in 3 laboratoria, op 3 niet opeenvolgende dagen en door 3 operators. Elk monster werd zodoende 27 maal getest in 9 onafhankelijke uitvoeringen van de assay. Eén monster was een Nil-controle waarvoor een IFN- γ -concentratie van 0,08 (95% BI 0,07-0,09) IE/ml werd bepaald. Van de resterende 19 plasmamonsters bedroeg het concentratiebereik 0,33 (0,31-0,34) tot 7,7 IE/ml (7,48-7,92).

De intra-assay-variatie werd geschat door het gemiddelde te nemen van de %CV's voor elk testplasma met IFN- γ voor elke plaat (n = 9). De waarden liepen uiteen van 4,1 tot 9,1 %CV. De gemiddelde intra-assay %CV ($\pm 95\%$ BI) bedroeg 6,6% \pm 0,6%. De nulwaarde voor IFN- γ -plasma was gemiddeld 14,1 %CV.

Totale of inter-assay-variatie werd bepaald door de 27 berekende IFN- γ -concentraties voor elk plasmamonster te vergelijken. Deze liep uiteen van 6,6 tot 12,3 %CV. De totale gemiddelde %CV ($\pm 95\%$ BI) was 8,7% \pm 0,7%. De nulwaarde voor IFN- γ -plasma liet een %CV zien van 26,1. Deze mate van variatie is te verwachten omdat de berekende concentratie van IFN- γ laag is en de variatie rond een lage schatting van de concentratie groter zal zijn dan die bij hogere concentraties.

Het nauwkeurighedsprofiel voor QF-CMV ELISA staat weergegeven in afbeelding 10 en dit wijst erop dat de onnauwkeurigheid niet toeneemt met hogere IFN- γ -concentraties.



Afbeelding 10. Nauwkeurighedsprofiel van QF-CMV ELISA bepaald door testen van 20 plasmamonsers in triplo, op 3 niet opeenvolgende dagen, in 3 laboratoria, door 3 operators. De trendlijn is de best passende lijn, berekend met de kleinste-kwadratenmethode.

Er werd een onderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid vast te stellen van de QF-CMV-test aan de hand van bloedmonsters van 8 proefpersonen met onbekende CMV-status. Er werd bloed van elke proefpersoon verzameld in drie sets QF-CMV-buisjes (3 x Nil, 3x CMV, and 3x mitogeen). De drie buizensets werden vervolgens geïncubeerd op drie verschillende locaties (één set Nil, CMV en mitogeen per locatie), zoals beschreven in de bijsluiter. Na een incubatie van 16 tot 24 uur werden de buisjes gecentrifugeerd en het plasma verzameld.

Vervolgens werden driemaal ELISA-tests uitgevoerd op de drie locaties, wat per locatie drie QF-CMV-resultaten opleverde voor elke proefpersoon (in totaal 9 resultaten). Elke locatie had een eigen operator. De voor het onderzoek gebruikte platen hadden niet noodzakelijkerwijs hetzelfde partijnummer, maar ze werden alle gebruikt vóór de vervaldatum.

De reproduceerbaarheid, in termen van zowel de diagnostische status (reactief, niet-reactief of onbepaald) als de numerieke waarde, werd voor elk bloedmonster vastgesteld. De reproduceerbaarheid van de numerieke waarde kon alleen worden vastgesteld in reactieve monsters (uitgedrukt in %CV), omdat het IFN- γ -niveau in 'niet-reactieve' monsters te laag was om een zinvolle schatting van de nauwkeurigheid te kunnen geven.

In het algemeen was de diagnostische reproduceerbaarheid 100% waar de diagnostische status van QF-CMV van alle 8 vrijwilligers werd gereproduceerd op alle locaties en in alle gevallen. Er werden geen onbepaalde monsters gerapporteerd. De reproduceerbaarheid van de reactieve monsters was zowel op de locaties als tussen de locaties acceptabel. De gemiddelde %CV's per testlocatie bedroegen 4,5% (locatie 1), 5,9% (locatie 2) en 7,3% (locatie 3). De %CV tussen locaties bedroeg 5,9% voor alle 5 reactieve monsters. Percentages van minder dan 10% voor de variatiecoëfficiënt worden als uitstekend beschouwd.

Technische informatie

Onbepaalde resultaten

Onbepaalde resultaten kunnen verband houden met de immuniteitstatus van de geteste proefpersoon, maar kunnen ook verband houden met enkele technische factoren:

- Een periode van meer dan 16 uur tussen het afnemen van het bloed en de incubatie bij 37 °C.
- Opslag van bloed buiten het aanbevolen temperatuurbereik (17 tot 27 °C).
- Onvoldoende mengen van het bloed in de verzamelbuisjes.

Indien technische problemen worden vermoed bij het verzamelen of behandelen van bloedmonsters, dient de gehele QF-CMV-test te worden herhaald met nieuwe bloedmonsters. Herhaling van de ELISA-test van gestimuleerde plasma's kan worden uitgevoerd als procedurele afwijkingen van de ELISA-test worden vermoed. Onbepaalde resultaten (van lage mitogeenwaarden) zullen naar verwachting bij herhaling niet wijzigen, tenzij er een fout met de ELISA-test is opgetreden.

Handleiding voor het oplossen van problemen

Deze handleiding kan nuttig zijn bij het oplossen van allerlei voorkomende problemen. Raadpleeg voor meer informatie tevens de technische informatie op: www.QuantiFERON.com. Zie pagina 29 en de achterzijde voor contactgegevens.

Oplossen van problemen met ELISA

Aflezingen van lage optische dichtheden voor standaarden

Mogelijke oorzaak	Oplossing
a) Fout met standaardverduunning	Zorg dat de verduunningen van de Kit-standaard volgens de bijsluiter worden gemaakt.
b) Pipetteerfout	Zorg dat pipetten worden gekalibreerd conform de instructies van de fabrikant.
c) Te lage incubatietemperatuur	Incubatie met ELISA moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (17 tot 27 °C).
d) Te korte incubatietijd	De incubatietijd van de plaat met het conjugaat, de standaarden en monsters is 120 ± 5 minuten. De enzymsubstraatoplossing wordt gedurende 30 minuten op de plaat geïncubeerd.
e) Verkeerd filter voor plaatlezer gebruikt	De plaat moet bij 450 nm worden afgelezen met een referentiefilter tussen 620 en 650 nm.
f) Reagentia zijn te koud	Alle reagentia, met uitzondering van het conjugaat, concentraat 100 x, moeten voor het begin van de assay op kamertemperatuur worden gebracht. Dit duurt ongeveer 1 uur.
g) Kit/Onderdelen over de vervaldatum	Zorg dat de kit vóór de vervaldatum wordt gebruikt. Zorg dat gereconstitueerde standaard en conjugaat, concentraat 100 x, binnen 3 maanden na de reconstitutedatum worden gebruikt.

Niet-specifieke kleurontwikkeling/hoge achtergrond

Mogelijke oorzaak	Oplossing
a) Plaat is onvoldoende gewassen	Spoel de plaat minstens 6 maal met 400 µl spoelbuffer per putje. Er kunnen meer dan 6 spoelcycli nodig zijn, afhankelijk van de gebruikte spoelbuffer. Er dient een inweektijd van minstens 5 seconden tussen de cycli te worden aangehouden.
b) Te hoge incubatietemperatuur	Incubatie met ELISA moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (17 tot 27 °C).
c) Kit/Onderdelen over de vervaldatum	Zorg dat de kit vóór de vervaldatum wordt gebruikt. Zorg dat gereconstitueerde standaard en conjugaat, concentraat 100 x, binnen drie maanden na de reconstitutedatum worden gebruikt.
d) Enzymsubstraatoplossing is besmet	Gooi het substraat weg indien blauwkleuring optreedt. Zorg voor schone reservoirs voor de reagentia.
e) Plasma in centrifugebuisjes is gemengd voordat het is verzameld	Zorg dat de plasmamonsters voorzichtig worden verzameld van boven de gel zonder de pipet op en neer te bewegen en dat het materiaal aan het geloppervlak niet wordt verstoord.

Literatuur

1. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* **9**, 165.
2. Singh, K.P., Howard, J.L., Wild, S.P., Jones, S.L., Hoy, J., Lewin, S.R. (2007) Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of HCMV disease despite CD4+ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* **124**, 200.
3. Westall, G.P., Mifsud, N., Kotsimbos, T. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* **8**, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* **9**, 1214.
5. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**, 76.
6. Kotton, C.N., et al. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* **82**, 433.
8. Lachmanova, A.I., et al. (2010) Quantiferon-CMV Test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **42(9)**, 3574.
9. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 26 October 2010; doi:10.1038/nrneph.2010.
10. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **29(10)**, 735, 11.
11. Giulieri, S, Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11(1)**, 17.
12. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E., Humar, A. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93(2)**, 195.
13. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detecting and estimating the magnitude and functionality of the CMV-specific IFN- γ CD8+ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* Online ahead of print 29 February 2012; doi: 10.1128/CVI.05633-111.
14. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8+ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **12(8)**, 2172.
15. Manuel, O., et al. (2012) Assessment of cytomegalovirus specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* (Manuscript accepted November 2012).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Manuscript accepted November 2012).

Technische service

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ■ techservice-ap@qiagen.com

Europe ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

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

USA/Canada ■ techservice-na@qiagen.com

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

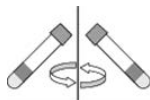
Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

Verkorte testprocedure

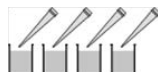
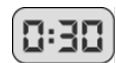
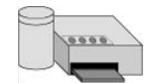
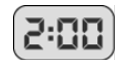
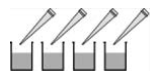
Fase 1 – Incubatie van bloed

1. Verzamel bloed van patiënt in bloedverzamelbuisjes en meng door ze minstens tien (10) maal net krachtig genoeg te schudden om te zorgen dat de gehele binnenwand van de buisjes met bloed wordt bedekt en het antigeen op de binnenwand is opgelost.
2. Incubeer de buisjes rechtop gedurende 16 tot 24 uur bij $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.
3. Centrifugeer de buisjes na incubatie gedurende 15 minuten bij een RCF van 2000 tot 3000 g om het plasma en de rode bloedcellen te scheiden.
4. Na het centrifugeren en voorafgaand aan het verzamelen moet op en neer bewegen van de pipet of mengen van het plasma te allen tijde worden vermeden. Zorg er altijd voor het materiaal aan het oppervlak van de gel niet te verstoren.



Fase 2 – ELISA van IFN- γ

1. Equilibreer de ELISA-onderdelen, met uitzondering van het conjugaat, concentraat 100 x, minstens 60 minuten bij kamertemperatuur.
2. Reconstituteer de Kit-standaard op 8,0 IE/ml met gedestilleerd of gedeïoniseerd water. Maak vier (4) standaardverduunningen.
3. Reconstituteer gevriesdroogd conjugaat, concentraat 100 x, met gedestilleerd of gedeïoniseerd water.
4. Bereid gebruiksklare conjugaat in Green Diluent en voeg 50 μl aan alle putjes toe.
5. Voeg 50 μl testplasmamonster en 50 μl standaard aan de betreffende putjes toe. Meng met behulp van de schudder.
6. Incubeer gedurende 120 minuten bij kamertemperatuur.
7. Spoel de putjes minstens 6 maal met 400 μl spoelbuffer per putje.
8. Voeg 100 μl enzymsubstraat-oplossing aan alle putjes toe. Meng met behulp van de schudder.
9. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur.
10. Voeg 50 μl enzymremmings-oplossing aan alle putjes toe. Meng met behulp van de schudder.
11. Lees de resultaten af bij 450 nm met een referentiefilter van 620 tot 650 nm.
12. Analyseer de resultaten.



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

Beperkte licentieovereenkomst voor de QuantiFERON-CMV ELISA-kit

Door dit product te gebruiken verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocols die bij het product zijn meegeleverd en deze handleiding, en voor gebruik met onderdelen die zich alleen in de kit bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze kit te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de kit zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocols die bij het product zijn geleverd, deze handleiding, en aanvullende protocols die verkrijgbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocols zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocols zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert de protocols niet en garandeert evenmin dat ze geen inbreuk maken op de rechten van derden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen inbreuk maakt op de rechten van anderen.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat hij geen stappen onderneemt of niemand anders toestaat stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoeks- en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie www.qiagen.com voor bijgewerkte licentievoorwaarden.

© 2012 Cellestis, een bedrijf van QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

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

