


Bijsluiter QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA 2 x 96

De volbloed IFN- γ -test voor het meten van reacties van het aangeboren en adaptieve immuunsysteem op stimulanen

Versie 1

 Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

CE

 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, VS

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, DUITSLAND

1079024NL Rev. 03

 www.QuantiFERON.com



Inhoud

| | |
|--|----|
| Beoogd gebruik | 4 |
| Samenvatting en uitleg van de test | 4 |
| Uitgangspunten van de assay | 5 |
| Benodigde tijd voor het uitvoeren van de assay | 6 |
| Onderdelen en opslag | 6 |
| Benodigde maar niet meegeleverde materialen | 8 |
| Opslag en verwerking | 8 |
| Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen | 10 |
| Waarschuwingen | 10 |
| Vorzorgsmaatregelen | 11 |
| Specimenafname en -verwerking | 13 |
| Richtlijnen voor gebruik | 17 |
| Berekeningen en interpretatie van de test | 24 |
| Genereren van de standaardcurve | 24 |
| Kwaliteitscontrole van de test | 25 |
| Interpretatie van de resultaten | 25 |
| Beperkingen | 27 |
| Kwaliteitskenmerken | 27 |
| Klinische onderzoeken | 27 |
| Kwaliteitskenmerken assay | 32 |
| Technische informatie | 33 |
| Gestolde plasmamonsters | 33 |
| Problemen oplossen | 34 |
| Referenties | 37 |
| Symbolen | 38 |
| Contactgegevens | 38 |
| Verkorte testprocedure | 39 |

Beoogd gebruik

De QuantiFERON Monitor-assay (QFM) is een diagnostische in-vitrotest bedoeld voor de detectie van de celgemedieerde immuunfunctie door het meten van interferongamma (IFN- γ) in plasma aan de hand van ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) na incubatie van gehepariniseerd volbloed met stimulansen voor het aangeboren en adaptieve immuunsysteem. De assay wordt gebruikt om celgemedieerde immuniteitsreacties te detecteren in de immuon-suppressieve populatie die een orgaantransplantaat heeft ontvangen.

QFM is bedoeld voor gebruik met risicobeoordeling en andere medische en diagnostische onderzoeken.

Samenvatting en uitleg van de test

Immunodeficiëntie wordt gekenmerkt door een verminderd vermogen een immuunreactie in gang te zetten. Deze verminderde of afwezige reactie kan het resultaat zijn van een primaire of verworven (secundaire) immunodeficiëntie (1).

Primaire immunodeficiënties zijn genetisch bepaald en worden gekenmerkt door deficiënties van afzonderlijke componenten van het adaptieve of aangeboren immuunsysteem (1). De meeste immunodeficiënties zijn echter verworven (secundair) en kunnen worden opgewekt door ziekteverwekkers, geneesmiddelen (zoals een immuon-suppressiebehandeling na een orgaantransplantatie), ziekten (kanker, zoals leukemie en lymfoom) of door milieucontaminanten (1).

De moleculaire basis van een immunodeficiëntie is divers. Celgemedieerde immuniteit speelt echter een belangrijke rol bij veel van de waargenomen klinische symptomen. Op dit moment is de diagnose en beheersing van immunodeficiëntiesyndromen afhankelijk van het veroorzakend agens (2, 3).

Een voorbeeld: ad hoc-beheersing is de standaard bij het controleren van de cellulaire immunodeficiëntiestatus van proefpersonen die een orgaantransplantatie hebben ondergaan en die medicatie krijgen om hun immuunsysteem te onderdrukken. De status van de immuunreactie van de proefpersoon wordt doorgaans gemeten door het peil van farmacologische geneesmiddelen te controleren en door klinische/pathologische evaluatie van de transplantaatfunctie (2, 3).

Met een aantal tests voor de functie van T-helpercellen wordt de celgemedieerde immuniteit voor mitogenen gemeten, zoals fytohemagglutinine (PHA), mitogeen van de westerse karmozijnbes en concanavale A (ConA). Deze tests meten echter alleen het functionele vermogen van T-helpercellen en er is een subset cellen betrokken bij celgemedieerde immuniteit. Het is steeds duidelijker

geworden dat aangeboren immuunmechanismen een grote bijdrage leveren aan de afweer, door afzonderlijk op te treden of door reacties van specifieke T-helpercellen te versterken. Daarom vormen de functionele reacties van cellen van het aangeboren (NK-cellen [natural killer]) en adaptieve (T-helpercellen) immuunsysteem een alomvattendere analyse van celgemedieerde immuniteit (2, 3).

QFM is een diagnostische in-vitrotest waarbij een combinatie van stimulansen (in de vorm van een LyoSphere™-pellet) wordt gebruikt voor het specifiek stimuleren van verschillende celtypen die zijn betrokken bij zowel het aangeboren als adaptieve immuunsysteem. De functionele immunestatus van een proefpersoon wordt beoordeeld door het meten van de reactie op stimulering van het aangeboren en adaptieve immuunsysteem met respectievelijk TLR- (Toll Like Receptor) en TCR-agonisten (T-helpercel). De detectie van interferongamma (IFN- γ) door ELISA biedt zowel een kwalitatieve als kwantitatieve meting van de celgemedieerde immunfunctie.

Uitgangspunten van de assay

Voor de QFM-assay wordt gebruikgemaakt van gelyofiliseerde stimulansen (QFM LyoSpheres™) die worden toegevoegd aan gehepariniseerd volbloed. De incubatie van het bloed duurt 16 tot 24 uur. Daarna wordt het plasma geëxtraheerd en getest op de aanwezigheid van IFN- γ dat is gevormd als reactie op de stimulansen.

De QFM-test wordt in fasen uitgevoerd. Eerst wordt het volbloed verzameld in het QFM-bloedafnamebuisje. Vervolgens wordt een QFM LyoSphere aan het busje toegevoegd, welke vervolgens bij 37 °C wordt geïncubeerd zodra dit mogelijk is en uiterlijk 8 uur na afname. Na de incubatieperiode van 16 tot 24 uur worden de busjes gecentrifugeerd, wordt het plasma verwijderd en de hoeveelheid IFN- γ (gerapporteerd in internationale eenheden per ml; IE/ml) gemeten met ELISA en vergeleken met een set verwachte waarden om de immunreactie van de proefpersoon in kaart te brengen.

QFM is een assay die zowel een kwalitatieve als kwantitatieve meting van de immunfunctie biedt. Met de QFM-resultaten kan het niveau van immunosuppressie mogelijk niet direct worden gekwantificeerd.

De hoeveelheid IFN- γ in plasmamonsters kan vaak meer zijn dan de bovengrens voor de meeste ELISA-schalen aangeeft, ook bij personen die gematigd immunosuppressief zijn. Het wordt aanbevolen om plasmamonsters 1 op 10 en/of 1 op 100 te verdunnen met groene verdunningsoplossing en samen met onverdund plasma te testen met ELISA.

Opmerking: De drempel van de QFM-assay kan variëren afhankelijk van het niveau van immunosuppressie van de proefpersoon en het afzonderlijke transplantaat.

Zie "Interpretatie van de resultaten" op pagina 25 van deze bijsluiter voor een overzicht van hoe QFM-resultaten worden geïnterpreteerd.

Benodigde tijd voor het uitvoeren van de assay

De geschatte benodigde tijd voor het uitvoeren van de QFM-assay wordt hieronder gegeven. Tevens wordt de tijd aangegeven voor het testen van meerdere monsters in partijen.

Incubatie bij 37 °C van buisjes met bloed: 16 tot 24 uur

ELISA: Ongeveer 3 uur voor één ELISA-plaat
(maximaal 88 monsters)

<1 uur arbeidstijd

10 tot 15 minuten toevoegen voor elke extra plaat

Onderdelen en opslag

| | |
|--|-------------|
| QuantiFERON Monitor LyoSpheres | |
| Catalogusnr. | 0650-0701 |
| Aantal preparaten | 10 |
| QuantiFERON Monitor LyoSpheres | 10 flacons |
| <i>Bijsluiter QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i> | 1 |
| QuantiFERON Monitor-bloedafnamebuisjes | |
| Catalogusnr. | 0650-0101 |
| Aantal preparaten | 100 |
| QuantiFERON Monitor-bloedafnamebuisjes (witte dop, witte ring) | 100 buisjes |
| <i>Bijsluiter voor QuantiFERON Monitor-bloedafnamebuisjes</i> | 1 |

| | |
|--|---|
| Onderdelen van QuantiFERON Monitor 2-plaatset ELISA | ELISA-kit met 2 platen |
| Catalogusnr. | 0650-0201 |
| Strips voor microtiterplaten, 12 × 8 putjes (voorzien van een laagje murine anti-menselijk IFN- γ monoklonaal antilichaam) | 2 sets van strips voor microtiterplaten met 12 × 8 putjes |
| IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ standaard, gelyofiliseerd) (bevat recombinant menselijk IFN- γ , bovine caseïne, 0,01% vol. Thimerosal) | 1 × flacon (8 IE/ml indien gereconstitueerd) |
| Green Diluent (groene verdunningsoplossing) (bevat bovine caseïne, normaal muizenserum, 0,01% vol. Thimerosal) | 1 × 30 ml flacon |
| Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (conjugaatconcentraat 100×, gelyofiliseerd) (murine anti-menselijk IFN- γ HRP, bevat 0,01% vol. Thimerosal) | 1 × 0,3 ml indien gereconstitueerd |
| Wash Buffer 20× Concentrate (spoelbuffer 20× geconcentreerd) (pH 7,2 bevat 0,05% vol. ProClin® 300) | 1 × 100 ml |
| Enzyme Substrate Solution (enzymsubstraatoplossing) (bevat H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidine) | 1 × 30 ml |
| Enzyme Stopping Solution (enzymremmingsoplossing) (bevat 0,5 M H ₂ SO ₄)* | 1 × 15 ml |
| Bijsluiters QuantiFERON Monitor ELISA | 1 |

* Bevat zwavelzuur. Zie pagina 11 voor voorzorgsmaatregelen.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

- 37 °C-incubator*; CO₂ niet vereist
- Gekalibreerde pipetten met variabel volume*
- Gekalibreerde meerkanaalspipetten† voor toediening van 50 µl tot 100 µl, met wegwerptips
- Schudapparaat voor microtiterplaten†
- Gedeïoniseerd of gedestilleerd water, 2 liter
- Spoelinstallatie voor microtiterplaten (automatische spoeler aanbevolen)
- Microtiterplaatlezer† die is voorzien van een 450 nm-filter en referentiefilter van 620 nm tot 650 nm
- Maatcilinder
- Niet-pluizende absorberende doeken

Opslag en verwerking

Bloedafnamebuisjes

Bewaar QFM-bloedafnamebuisjes bij 4 °C tot 25 °C. QFM-bloedafnamebuisjes moeten een temperatuur van 17–25 °C hebben op het moment dat deze worden gevuld en gemengd.

LyoSpheres

Bewaar QFM LyoSpheres bij 2 °C tot 8 °C.

Reagentia van ELISA-kit

Bewaar reagentia van ELISA-kit bij 2 °C tot 8 °C.

Sla de enzymsubstraatoplossing nooit in direct zonlicht op.

* Zorg ervoor dat instrumenten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

Gereconstitueerde en niet-gebruikte ELISA-reagentia

Voor instructies voor het reconstitueren van de ELISA-reagentia, zie "Fase 2 – ELISA van IFN- γ ", pagina 18.

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

Let op de datum waarop de kitstandaard is gereconstitueerd.

- Zodra het niet-gebruikte conjugaatconcentraat 100x is gereconstitueerd, moet het opnieuw worden opgeslagen bij 2 °C 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 bereiding worden gebruikt (zie tabel 1).
- Gebruiksklare spoelbuffer kan gedurende 2 weken bij kamertemperatuur (22 ± 5 °C) worden bewaard.

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 afdrucken.

Waarschuwingen

- QFM is een assay die zowel een kwalitatieve als kwantitatieve meting van de immuunfunctie biedt. Met de QFM-resultaten kan het niveau van immunosuppressie mogelijk niet direct worden gekwantificeerd.
- Resultaten van de QFM-assay moeten samen met klinische symptomen, medische voorgeschiedenis en andere klinische indicatoren worden gebruikt bij het vaststellen van de immuunstatus van een patiënt.
- De drempel van de QFM-assay kan variëren afhankelijk van het niveau van immunosuppressie van de proefpersoon en het afzonderlijke transplantaat.

Voorzorgsmaatregelen

Uitsluitend voor in-vitrodiagnostisch gebruik.



VOORZICHTIG: Behandel menselijk bloed en plasma alsof het besmettelijk zou kunnen zijn. Houd u aan de relevante richtlijnen voor de verwerking van bloed en bloedproducten. Werp monsters en materialen die in contact zijn gekomen met bloed of bloedproducten weg volgens de plaatselijke of nationale regelgeving.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de onderdelen van de QuantiFERON Monitor ELISA.

Opmerkingen over gevaren



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON-enzymremmingsoplossing)

Bevat: zwavelzuur. Waarschuwing! Kan bijtend zijn voor metalen. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming dragen.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON-enzymsubstraatoplossing)

Waarschuwing! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming dragen.



QuantiFERON groene verdunningsoplossing

Bevat: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Bevat: tartrazine. Waarschuwing! Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming dragen.



QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate (QuantiFERON-spoelbuffer, concentraat 20x)

Bevat: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen. Voorkom lozing in het milieu.

Overige informatie

Veiligheidsinformatiebladen: www.qiagen.com/safety

- Afwijkingen van de *bijsluiter van de QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* kunnen tot onjuiste resultaten leiden. Lees voor gebruik zorgvuldig de instructies.
- **Belangrijk:** Controleer de flacons vóór gebruik. Gebruik conjugaat-, IFN- γ standaard- of QFM LyoSphere-flacons niet als deze tekenen van schade vertonen of als de rubberen afsluiting is beschadigd. Pak gebroken flacons niet vast. Neem geschikte veiligheidsmaatregelen om flacons veilig af te voeren. Advies: Gebruik een ontdopper voor flacons om de conjugaat-, IFN- γ standaard- of QFM LyoSphere-flacons te openen om de kans op letsel van de metalen rand tot een minimum te beperken.
- Gebruik de ELISA-kit niet als een flesje met reagens vóór gebruik tekenen van schade of lekkage vertoont.
- Strips voor microtiterplaten, IFN- γ standaard, groene verdunningsoplossing of conjugaatconcentraat 100x uit verschillende QFM ELISA-partijen mogen niet worden gemengd of door elkaar gebruikt. Andere reagentia (spoelbuffer 20x geconcentreerd, enzymsubstraatoplossing en enzymremmingsoplossing) kunnen worden uitgewisseld tussen kits op voorwaarde dat de vervaldatum van de reagentia nog niet is verstreken en dat de partijgegevens worden geregistreerd.
- Werp niet-gebruikte reagentia en biologische monsters weg volgens de plaatselijke en nationale veiligheids- en milieuvorschriften.
- Gebruik QFM-bloedafnamebuisjes, QFM LyoSpheres of QFM ELISA niet als de vervaldatum is verstreken.
- Zorg ervoor dat laboratoriumapparatuur is gekalibreerd en gevalideerd voor gebruik.

Specimenafname en -verwerking

De QFM-assay dient alleen te worden uitgevoerd met volbloed verzameld in een lithiumheparinebuisje of rechtstreeks in een QFM-bloedafnamebuisje. Er is per test 1 ml volbloed nodig. Bloedafnamebuisjes moeten van een etiket worden voorzien waarop het tijdstip van bloedafname wordt vermeld.

Belangrijk: Zowel de stimulering van QFM-bloedmonsters (dat wil zeggen de toevoeging van een QFM LyoSphere aan een aliquot van 1 ml bloed) als de daaropvolgende incubatie bij 37 °C moet plaatsvinden binnen 8 uur na de bloedafname.

Bewaar de bloedmonsters vóór de incubatie bij kamertemperatuur (22 ± 5 °C).

Voor optimale resultaten dienen de volgende procedures te worden gevolgd:

1. Voorzie de buisjes van passende etiketten.

Zorg ervoor dat elk QFM-bloedafnamebuisje van een etiket is voorzien met de gegevens van de proefpersoon en het tijdstip van bloedafname.

2. Verzamel door middel van venapunctie van elke proefpersoon 1 ml bloed rechtstreeks in een QFM-bloedafnamebuisje. Deze procedure moet worden uitgevoerd door daartoe opgeleid personeel.

Belangrijke opmerking: Tijdens het vullen met bloed moeten de buisjes op een temperatuur van 17 °C tot 25 °C worden gehouden.

QFM-bloedafnamebuisjes kunnen worden gebruikt tot een hoogte van 810 meter boven zeeniveau.

Het verzamelen van 1 ml bloed gaat relatief langzaam. Houd het buisje daarom gedurende 2–3 seconden op de naald als het buisje helemaal vol lijkt te zijn. Dit zorgt ervoor dat het juiste volume wordt bereikt.

De zwarte markering aan de zijde van het etiket op het QFM-bloedafnamebuisje geeft een volume van 1 ml aan. QFM-bloedafnamebuisjes zijn ontworpen om 1 ml ± 10% af te nemen en optimaal binnen dit bereik te presteren. Als het bloedniveau buiten het bereik van de indicatielijn valt, moet u een nieuw bloedmonster afnemen.

Als voor het verzamelen van het bloed een vlindernaald wordt gebruikt, moet een afnamebuisje worden gebruikt om ervoor te zorgen dat het slangetje met bloed is gevuld voordat de QFM-bloedafnamebuisjes worden gebruikt.

Als QFM-bloedafnamebuisjes op een hoogte hoger dan 810 meter of bij lage testvolumes worden gebruikt, kan de gebruiker bloed afnemen met een spuit en onmiddellijk 1 ml bloed naar het QFM-bloedafnamebuisje over-

brengen. Uit veiligheidsoverwegingen kan men hiervoor het best de naald van de spuit verwijderen. Neem hierbij de gebruikelijke voorzorgsmaatregelen in acht. Verwijder de dop van het QFM-bloedafnamebuisje en voeg 1 ml bloed toe (tot aan het midden van de zwarte markering aan de zijde van het etiket). Breng vervolgens de dop weer aan en meng zoals hieronder beschreven.

Als u een tourniquet gebruikt, maakt u deze los zodra de naald in de ader is ingebracht om verschillen in de druk die van invloed kunnen zijn op het bloedvolume te voorkomen.

U kunt ook bloed afnemen in één generiek bloedafnamebuisje dat lithiumheparine als antistollingsmiddel bevat en het bloed vervolgens overbrengen naar een QFM-bloedafnamebuisje. Gebruik alleen lithiumheparine als antistollingsmiddel voor het bloed aangezien andere antistollingsmiddelen de assay kunnen verstoren. Vul een bloedafnamebuisje (minimaal volume 3 ml) en meng dit voorzichtig door het buisje meerdere keren om te draaien zodat de heparine oplost. Bewaar het bloed op kamertemperatuur ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) vóór de overdracht naar QFM-bloedafnamebuisjes voor stimulatie met een QFM LyoSphere. Zorg ervoor dat het bloed goed gemengd wordt via zachte inversie direct voorafgaand aan de pipettering. Breng een aliquot van 1 ml bloed over naar een QFM-bloedafnamebuisje. Overbrengen moet aseptisch geschieden door, met inachtneming van de juiste veiligheidsprocedures, de dop van het QFM-bloedafnamebuisje te verwijderen en 1 ml bloed toe te voegen (tot aan het midden van de zwarte markering aan de zijde van het etiket). Bevestig de doppen weer stevig op de buisjes en meng zoals hieronder beschreven.

3. Zodra het buisje is gevuld, moet u het buisje voorzichtig meerdere malen omkeren om de heparine op te lossen.

Belangrijk: Te krachtig schudden kan tot afbraak van de gel en derhalve afwijkende resultaten leiden.

4. Laat de QFM LyoSpheres vlak voor gebruik op kamertemperatuur komen ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).
5. Voeg op aseptische wijze één QFM LyoSphere toe aan 1 ml bloed.

Verwijder de dop van het bloedafnamebuisje.

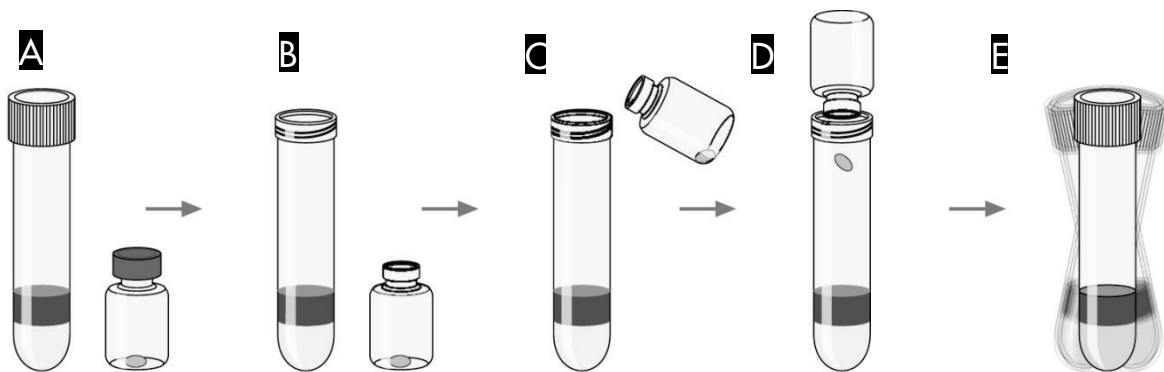
Tik de flacon met de QFM LyoSphere zachtjes op een harde ondergrond om ervoor te zorgen dat de QFM LyoSphere onder in het buisje terechtkomt. Verwijder de dop van de flacon met de QFM LyoSphere door eerst de metalen dop en vervolgens de rubberen kurk te verwijderen.

Laat de QFM LyoSphere voorzichtig in het bloedmonster van 1 ml vallen door de opening van de glazen flacon tegen de opening van het QFM-bloedafnamebuisje te plaatsen en vervolgens de flacon voorzichtig om te keren om de QFM LyoSphere over te brengen naar het QFM-bloedafnamebuisje (zie afbeelding 1).

Belangrijk: Als de QFM LyoSphere naast het QFM-bloedafnamebuisje valt, gooit u deze weg en opent u een andere flacon met een QFM LyoSphere.

Belangrijk: Laat de flacon met de QFM LyoSphere niet gedurende lange tijd geopend. De QFM LyoSphere moet aan het bloed worden toegevoegd zodra u de dop van de flacon hebt verwijderd.

Als QFM LyoSpheres worden toegevoegd aan bloed dat is afgenomen met het QFM-bloedafnamebuisje, dient u ervoor te zorgen dat de doppen van de buisjes weer op de juiste monsters worden geplaatst.



Afbeelding 1. QFM LyoSphere toevoegen. **A** QFM-bloedafnamebuisje en flacon met QFM LyoSphere. **B** Haal de dop van het QFM-bloedafnamebuisje en verwijder de metalen dop en rubberen kurk van de flacon met de QFM LyoSphere. **C** Voeg de QFM LyoSphere onmiddellijk toe aan het bloed door de opening van de glazen flacon tegen de opening van het afnamebuisje te houden. **D** Keer de flacon vervolgens voorzichtig om om de QFM LyoSphere over te brengen naar het afnamebuisje. **E** Plaats de dop weer op het QFM-bloedafnamebuisje en schud dit 5–10 keer.

6. Plaats de dop op het QFM-bloedafnamebuisje en schud dit 5–10 keer hard genoeg om ervoor te zorgen dat de QFM LyoSphere volledig oplost.

Als een QFM LyoSphere aan de binnenwand van het buisje blijft plakken, kan de LyoSphere worden opgelost door deze met bloed te bedekken door het buisje om te keren.

Zorg ervoor dat de dop op het buisje is geplaatst zodra de QFM LyoSphere is toegevoegd om te voorkomen dat er onbedoeld een tweede LyoSphere aan hetzelfde buisje wordt toegevoegd.

Opmerking: Omdat de QFM LyoSphere wit is, is de LyoSphere niet meer zichtbaar in het bloed zodra deze is opgelost.

Belangrijk: Te krachtig schudden kan tot afbraak van de gel en derhalve afwijkende resultaten leiden.

7. Na het toevoegen en oplossen van de QFM LyoSphere moeten de QFM-bloedafnamebuisjes zo snel mogelijk, maar uiterlijk binnen 8 uur na de bloedafname, in een incubator van 37 ± 1 °C worden geplaatst.

Richtlijnen voor gebruik

Fase 1 — incubatie van bloed en verzamelen van plasma

Meegeleverde materialen

- QFM-bloedafnamebuisjes (raadpleeg “Onderdelen en opslag”, pagina 6)

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

- Raadpleeg “Benodigde maar niet meegeleverde materialen”, pagina 8

Procedure

1. Incubeer de QFM-bloedafnamebuisjes met aliquots van 1 ml bloed en de QFM LyoSphere RECHTOP bij 37 ± 1 °C gedurende 16 tot 24 uur.

Opmerking: CO₂ of bevochtiging is hierbij niet vereist.

Na de incubatie kunnen de QFM-bloedafnamebuisjes maximaal 3 dagen bij 4 °C tot 27 °C worden bewaard voorafgaand aan de centrifugering.

2. Na de incubatie van de QFM-bloedafnamebuisjes worden deze voor het eenvoudiger extraheren van het plasma gedurende 15 minuten bij 2000 tot 3000 × *g* (RCF) gecentrifugeerd. De cellen worden door een gelprop van het plasma gescheiden. Als dit niet gebeurt, moet u de buisjes opnieuw centrifugeren.

Het is mogelijk het plasma zonder centrifugeren te verzamelen, maar extra zorg is geboden om het plasma te scheiden zonder de cellen te verstoren.

3. Plasmamonsters mogen alleen met een pipet worden verzameld.

Belangrijk: 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 dat het materiaal aan het oppervlak van de gel niet wordt verstoord.

Plasmamonsters kunnen rechtstreeks vanuit de gecentrifugeerde QFM-bloedafnamebuisjes worden overgebracht op de QFM ELISA-plaat, ook als geautomatiseerde ELISA-werkstations worden gebruikt.

Plasmamonsters kunnen maximaal 28 dagen bij 2 °C tot 8 °C worden bewaard. Na extractie van het plasma kunnen ze bij -20 °C of lager nog langer worden bewaard. Aliquots verkregen plasmamonsters moeten worden afgesloten voordat deze worden opgeslagen.

Als u plasmamonsters gaat verzamelen, moet u ten minste 150 µl plasma verzamelen zodat een test indien nodig kan worden herhaald.

De hoeveelheid IFN- γ in plasmamonsters kan vaak meer zijn dan de bovengrens voor de meeste ELISA-schalen aangeeft, ook bij personen die gematigd immunosuppressief zijn. Het wordt aanbevolen om plasmamonsters 1:10 en/of 1:100 te verdunnen met groene verdunningsoplossing en samen met onverdund plasma te testen met ELISA (zie "Fase 2 – ELISA van IFN- γ ").

Fase 2 – ELISA van IFN- γ

Meegeleverde materialen

- QuantiFERON Monitor 2-plaatset ELISA (raadpleeg "Onderdelen en opslag", pagina 6)

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

- Raadpleeg "Benodigde maar niet meegeleverde materialen", pagina 8

Vorbereiding

De hoeveelheid IFN- γ in plasma kan vaak meer zijn dan de bovengrens voor de meeste ELISA-schalen aangeeft, ook bij personen die gematigd immunosuppressief zijn. Aanbevolen: verdun plasmamonsters 1:10 en/of 1:100 met groene verdunningsoplossing en test deze samen met onverdund plasma met ELISA.

Het voorbereiden en testen van slechts een onverdund plasmamonster kan voldoende zijn voor het verkrijgen van een kwantitatief resultaat bij patiënten die zwaar immunosuppressief zijn.

Opmerking: Monsterresultaten die binnen het bereik van de QFM ELISA vallen (dat wil zeggen tot 10 IE/ml), moeten worden gebruikt voor het interpreteren van de resultaten. Het minst verdunde monster dat een resultaat genereert binnen het bereik van de QFM ELISA moet worden gebruikt als het gerapporteerde resultaat (waarbij rekening wordt gehouden met de verdunningsfactor) als onverdund plasma boven het bereik van de QFM ELISA valt.

Procedure

1. Alle plasmamonsters en reagentia, behalve conjugaatconcentraat 100x, dienen vóór gebruik op kamertemperatuur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) te worden gebracht. Laat minimaal 60 minuten staan om de monsters op kamertemperatuur te laten komen.
2. Verwijder strips die niet nodig zijn van het frame voor microtiterplaten, verzegel deze opnieuw in de folieverpakking en zet de platen terug in de koelkast voor later gebruik.

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

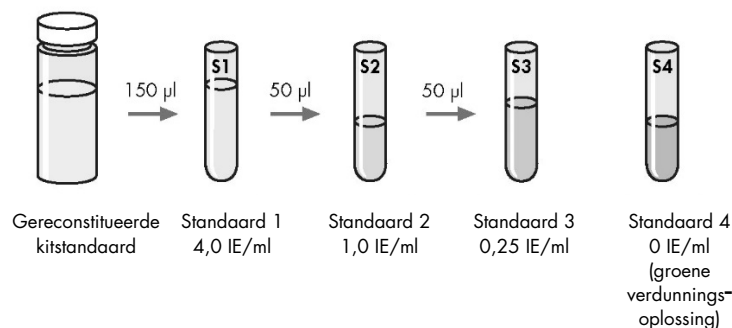
3. Reconstitueer de gelyofiliseerde IFN- γ -standaard met de hoeveelheid gedeïoniseerd of gedestilleerd water zoals aangegeven op het etiket van de standaardflacon. Meng voorzichtig om schuimvorming zoveel mogelijk tegen te gaan en zorg dat volledige oplossing plaatsvindt. Reconstitutie van de standaard naar het betreffende volume geeft een oplossing met een concentratie van 8,0 IE/ml.

Belangrijk: Het reconstitutievolume van de IFN- γ -standaard verschilt van partij tot partij. Raadpleeg het etiket van de standaardflacon om ervoor te zorgen dat u het juiste volume gedeïoniseerd of gedestilleerd water gebruikt.

Gebruik de gereconstitueerde kitstandaard om een 1 op 2 verdunning te produceren, gevolgd door een 1 op 4 verdunningsreeks van IFN- γ in groene verdunningsoplossing (GD) (zie afbeelding 2). S1 (standaard 1) bevat 4,0 IE/ml, S2 (standaard 2) bevat 1,0 IE/ml, S3 (standaard 3) bevat 0,25 IE/ml en S4 (standaard 4) bevat 0 IE/ml (alleen GD). De standaarden moeten dubbel worden getest. Maak voor elke ELISA-bewerking nieuwe verdunningen van de kitstandaard.

Aanbevolen procedure voor dubbele standaarden

- a. Geef 4 buisjes de etiketten "S1", "S2", "S3" en "S4".
- b. Voeg 150 μ l GD toe aan S1, S2, S3 en S4.
- c. Voeg 150 μ l kitstandaard 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. Groene verdunningsoplossing (GD) alleen dient als de nulstandaard (S4).



Afbeelding 2. Maken van de standaardcurve.

4. Reconstitueer gelyofiliseerd conjugaatconcentraat 100x met 0,3 ml gedeïoniseerd of gedestilleerd water. Meng voorzichtig om schuimvorming zoveel mogelijk tegen te gaan en zorg dat volledige oplossing van het conjugaat plaatsvindt.

Gebruiksklaar conjugaat wordt bereid door de vereiste hoeveelheid gereconstitueerd conjugaatconcentraat 100x te verdunnen met groene verdunningsoplossing (Tabel 1. Bereiding conjugaat). Sla onmiddellijk na gebruik eventueel niet-gebruikt conjugaatconcentraat 100x weer op bij een temperatuur van 2 °C tot 8 °C. Gebruik alleen groene verdunningsoplossing.

Tabel 1. Bereiding conjugaat

| Aantal strips | Hoeveelheid conjugaatconcentraat 100x | Hoeveelheid groene verdunningsoplossing |
|---------------|--|--|
| 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. Plasmamonsters die zijn verkregen uit bloedafnamebuisjes en vervolgens zijn opgeslagen of bevroren, moeten worden gemengd alvorens te worden toegevoegd aan het ELISA-putje.

Belangrijk: Als plasmamonsters rechtstreeks vanuit de gecentrifugeerde QFM-buisjes moeten worden toegevoegd, dient vermenging van het plasma te worden vermeden. Zorg er altijd voor dat het materiaal aan het oppervlak van de gel niet wordt verstoord.

6. Aanbevolen: Verdun plasmamonsters 1:10.

- Voeg 90 µl groene verdunningsoplossing (GD) toe aan een buisje dat is voorzien van een etiket met de gegevens van de patiënt en "1:10".
- Voeg vervolgens 10 µl gemengde plasmamonsters toe (zie stap 5 voor details over gemengde plasmamonsters en monsters die rechtstreeks zijn toegevoegd vanuit gecentrifugeerde QFM-buisjes).
- Meng goed met behulp van een pipet en ga schuimvorming zoveel mogelijk tegen.

7. Aanbevolen: Verdun plasmamonsters 1:100.
- Bereid een verdunning van 1:10 (zie bovenstaande stap 6).
 - Voeg 90 µl groene verdunningsoplossing toe aan een buisje dat is voorzien van een etiket met de gegevens van de patiënt en "1:100".
 - Voeg 10 µl van de verdunning van 1:10 toe.
 - Meng goed met behulp van een pipet en ga schuimvorming zoveel mogelijk tegen.

Aanbevolen: Test de volgende monsters tegelijkertijd en in deze volgorde:

- Onverdund, 1:10, 1:100

De volgende opties voor proefpersoonmonsters worden ook ondersteund door de QFM-analysesoftware:

- Onverdund
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Onverdund, 1:10

8. Voeg met behulp van een meerkanaalspipet 50 µl vers bereid, gebruiksklaar conjugaat toe aan de benodigde ELISA-putjes.
9. Voeg 50 µl testplasmamonster toe aan de betreffende putjes met behulp van een meerkanaalspipet. Voeg vervolgens 50 µl toe van elk van de standaarden 1 t/m 4. Test de standaarden dubbel.
10. Dek elke plaat af met een deksel en meng het conjugaat met de plasmamengsels/standaarden gedurende 1 minuut goed met behulp van een schudapparaat voor microtiterplaten. Vermijd spatten.
11. Incubeer bij kamertemperatuur (22 ± 5 °C) gedurende 120 ± 5 minuten. Tijdens het incuberen mogen de platen niet aan direct zonlicht worden blootgesteld.
12. Verdun tijdens het incuberen 1 deel spoelbuffer, concentraat 20x, met 19 delen gedeïoniseerd of gedestilleerd water en meng goed. Er is voldoende spoelbuffer, concentraat 20x, aanwezig om 2 liter gebruiksklare spoelbuffer te maken.

Spoel de putjes gedurende minstens 6 cycli met 400 µl gebruiksklare spoelbuffer in een spoelinstallatie voor microtiterplaten. Er wordt een geautomatiseerde plaatspoeler aanbevolen.

Zorgvuldig spoelen is erg belangrijk voor het uitvoeren van de assay. Zorg ervoor dat elk putje voor elke spoelcyclus volledig is gevuld met spoelbuffer. Aanbevolen: Laat de putjes tussen cycli gedurende ten minste 5 seconden weken voor de beste resultaten.

Voeg een standaard desinfecterend middel voor laboratoria toe aan het uitstroomreservoir en volg algemeen aanvaarde procedures voor het ontsmetten van potentieel besmettelijk materiaal.

13. Houd de platen omgekeerd boven een absorberende, niet-pluizende doek en tik erop om resterende spoelbuffer te verwijderen. Voeg 100 µl enzym-substraatoplossing toe aan elk putje, dek elke plaat af met een deksel en meng goed met behulp van een schudapparaat voor microtiterplaten.
14. Incubeer bij kamertemperatuur (22 ± 5 °C) gedurende 30 minuten.
Tijdens het incuberen mogen de platen niet aan direct zonlicht worden blootgesteld.
15. Voeg na incubatie 50 µl enzymremmingsoplossing toe aan elk putje en meng goed met behulp van een schudapparaat voor microtiterplaten.
De enzymremmingsoplossing dient in dezelfde volgorde en in ongeveer hetzelfde tempo aan de putjes te worden toegevoegd als de enzym-substraatoplossing in stap 13.
16. Meet binnen 5 minuten na het stoppen van de reactie de optische dichtheid (OD) met een microtiterplaatlezer die is voorzien van een filter van 450 nm en een referentiefilter van 620 nm tot 650 nm. OD-waarden worden gebruikt om de resultaten te berekenen.

Berekeningen en interpretatie van de test

QuantiFERON Monitor-analysesoftware wordt gebruikt voor het analyseren van de onbewerkte gegevens en het berekenen van de resultaten. Deze is verkrijgbaar op www.QuantiFERON.com. Zorg ervoor dat de meest recente versie van de QuantiFERON Monitor-analysesoftware wordt gebruikt.

De software voert een kwaliteitscontrole voor de assay uit, genereert een standaardcurve en geeft voor elke proefpersoon een testresultaat, zoals verder is uitgewerkt in het gedeelte "Interpretatie van de resultaten".

Als onverdund plasma boven het bovenste bereik (dat wil zeggen > 10 IE/ml) van de QFM ELISA valt, rapporteert de QuantiFERON Monitor-analysesoftware het minst verdunde monster dat een resultaat genereert binnen het bereik van de QFM ELISA waarbij rekening wordt gehouden met de verdunningsfactor.

In plaats van met de QuantiFERON Monitor-analysesoftware kunnen de resultaten ook worden bepaald met de volgende methode.

Genereren van de standaardcurve

(Als QuantiFERON Monitor-analysesoftware niet wordt gebruikt)

Bepaal de gemiddelde OD-waarden van de kitstandaardrePLICATEN 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 (IE/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 microtiterplaatlezers 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.

Het gerapporteerde resultaat dient het minst verdunde monster te zijn dat een resultaat genereert binnen het bereik van de QFM ELISA (waarbij rekening wordt gehouden met de verdunningsfactor) als onverdund plasma boven het bereik van de QFM ELISA valt.

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

De QuantiFERON Monitor-analysesoftware berekent deze parameters voor kwaliteitscontrole en rapporteert deze.

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

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

Interpretatie van de resultaten

QFM-resultaten worden geïnterpreteerd afhankelijk van de IFN- γ -reactie op stimulansen voor het aangeboren en adaptieve immuunsysteem. De QFM-assay biedt zowel een kwalitatieve als kwantitatieve meting van de immuunfunctie. Met de QFM-resultaten kan het niveau van immunosuppressie mogelijk niet direct worden gekwantificeerd.

Belangrijk: Bij het vaststellen van de immuunstatus van de patiënt moet het gemeten IFN- γ -niveau samen met klinische symptomen, medische voorgeschiedenis en andere diagnostische onderzoeken worden gebruikt (tabel 2). De drempel van de QFM-test kan variëren afhankelijk van het niveau van immunosuppressie van de patiënt en het individuele transplantaat.

Tabel 2. Interpretatie van de resultaten

| QFM-resultaat IFN- γ (IE/ml) | Classificatie | Interpretatie |
|--|---------------|---|
| < 15 | Laag | Patiënt heeft een lage IFN- γ -reactie op stimulanen voor het aangeboren en adaptieve immuunsysteem |
| 15–1000 | Gematigd | Patiënt heeft een gematigde IFN- γ -reactie op stimulanen voor het aangeboren en adaptieve immuunsysteem |
| > 1000 | Hoog | Patiënt heeft een hoge IFN- γ -reactie op stimulanen voor het aangeboren en adaptieve immuunsysteem |

Als het gemeten IFN- γ -niveau van een onverdund plasmamonster lager is dan 0,1 IE/ml:

- Zorg ervoor dat de QFM LyoSphere is toegevoegd aan het bloedmonster en dat het buisje is geïncubeerd zoals in de bijsluiter wordt aangegeven.
- Controleer of het IFN- γ -resultaat overeenkomt met de huidige klinische status van de proefpersoon.

Indien technische problemen worden vermoed bij het verzamelen of hanteren van de bloedmonsters, dient de gehele QFM-assay te worden herhaald met een nieuw bloedmonster. Herhaal de ELISA-test met gestimuleerde plasmamonsters als wordt vermoed dat bij de oorspronkelijke test is afgeweken van de procedure die in de bijsluiter wordt beschreven (zie het gedeelte Kwaliteitscontrole van de test voor details).

De arts mag de test herhalen als het resultaat niet consistent is met de huidige klinische status van de proefpersoon.

Beperkingen

De resultaten van de QFM-test dienen te worden gebruikt in combinatie met de klinische voorgeschiedenis, de huidige medische status en andere diagnostische onderzoeken van elke patiënt. Laboratoria kunnen ervoor kiezen eigen bereiken voor de assay op te stellen.

Laboratoria kunnen er ook voor kiezen tegelijkertijd met de patiëntspecimens een run uit te voeren met een extern controlespecimen die is afgenomen bij een gezonde proefpersoon.

Onbetrouwbare of onnauwkeurige resultaten kunnen het gevolg zijn van:

- Onjuist antistollingsmiddel voor bloed. Gebruik uitsluitend lithiumheparine omdat andere antistollingsmiddelen de assay kunnen verstoren.
- Afwijkingen van de in deze bijsluiter beschreven procedure.
- Zeer hoge concentraties circulerend IFN- γ of aanwezigheid van heterofiele antilichamen.
- Overschrijding van de termijn van 8 uur tussen bloedafname en incubatie bij 37 °C.
- Te weinig of te veel bloed in de QFM-bloedbuisjes buiten het bereik van 0,9 tot 1,1 ml.

Kwaliteitskenmerken

Klinische onderzoeken

Er zijn twee klinische onderzoeken uitgevoerd om de reacties van ogenschijnlijk gezonde personen (n = 114) ten opzichte van ontvangers van transplantaten (n = 30) te beoordelen. Van de ontvangers van transplantaten maakten er 18 deel uit van de vroege cohort na de transplantatie (vroeg, binnen drie maanden na de transplantatie) en 12 van de late cohort na de transplantatie of stabiele cohort (laat, > 12 maanden na de transplantatie).

- Er werden op maximaal vijf tijdstippen monsters verzameld bij elke persoon in de vroege cohort (3 maanden na de transplantatie, n = 64 monsters)
- Er werd éénmaal een monster verzameld bij elke persoon in de late cohort (late cohort na de transplantatie, n = 12 monsters)
- Er werd éénmaal een monster verzameld bij elke persoon in de ogenschijnlijk gezonde cohort (n = 114)

Reacties op QFM varieerden van laag tot gemiddeld in zowel de monsters van de vroege groep als de monsters van de later groep die zijn afgenomen na de transplantatie. Bij monsters afgenomen bij de vroege groep na de transplantatie was er een hoger percentage reacties (93,8%) binnen het lage bereik en een lager percentage reacties (6,3%) binnen het gematigde bereik vergeleken met de reacties van de monsters afgenomen bij de late groep na de transplantatie. Hierbij viel 25% van de reacties binnen het lage bereik en 66,7% in het gematigde bereik (tabel 3). Geen van de reacties van de monsters afgenomen bij de vroege groep na de transplantatie vielen in het hoge reactiebereik, terwijl slechts 1 reactie (8,3%) van de monsters afgenomen bij de late groep na de transplantatie in het hoge reactiebereik viel. QFM-reacties in de ogenschijnlijk gezonde cohort vielen met name in het gematigde bereik (83,3%) en het hoge bereik (15,8%) (tabel 3).

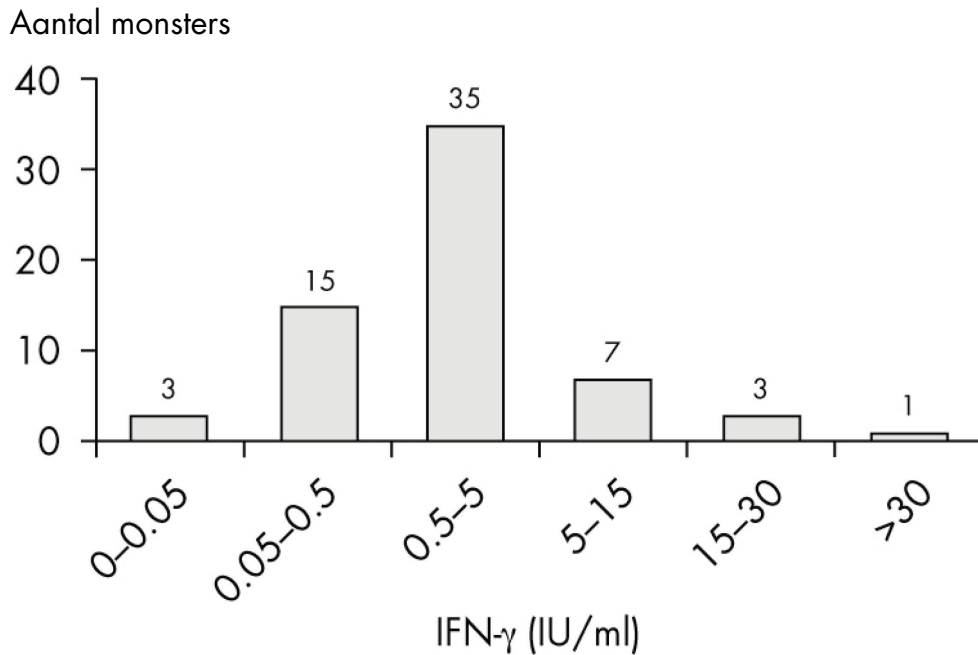
Tabel 3. QFM-reactiebereik van ogenschijnlijk gezonde proefpersonen en ontvangers van transplantaten

| IFN- γ (IE/ml) | Categorie resultaten | Vroeg, na de transplantatie %* 95% CI n | Laat, na de transplantatie %* 95% CI n | Ogen-schijnlijk gezond %* 95% CI n | Totale resultaten |
|------------------------|----------------------|---|--|--|-------------------|
| < 15 | Laag | 93,8% 85,0–97,5 n = 60 | 25,0% 8,9–53,2 n = 3 | 0,9% 0,2–4,8 n = 1 | 64 |
| 15–1000 | Gematigd | 6,3% 2,5–15,0 n = 4 | 66,7% 39,1–86,2 n = 8 | 83,3% 75,4–89,1 n = 95 | 107 |
| > 1000 | Hoog | 0,0% 0–5,7 n = 0 | 8,3% 1,5–35,4 n = 1 | 15,8% 10,2–23,6 n = 18 | 19 |
| Totaal aantal monsters | | 64 | 12 | 114 | 190 |

* Percentages geven de verhouding van de monsters binnen elke donorcohort aan die binnen het specifieke reactiebereik vallen.

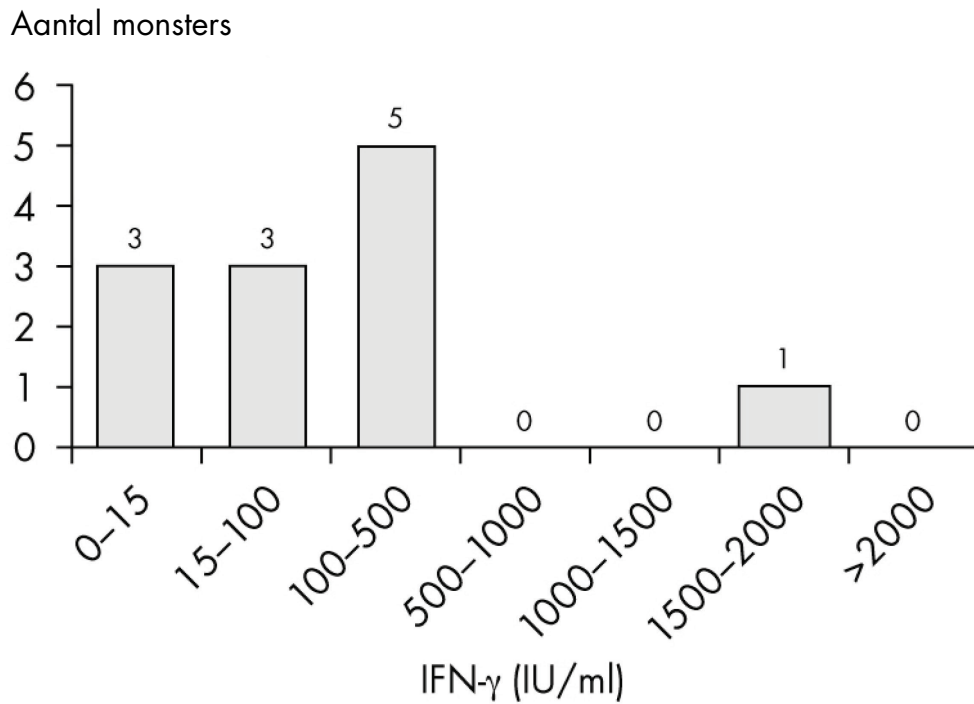
Verwachte waarden

De distributie van IFN- γ -reacties op QFM in de groep vroege patiënten (maximaal 3 maanden na de transplantatie) werd bepaald met 64 monsters die werden verzameld bij 18 ontvangers van transplantaten met de QFM ELISA (afbeelding 3).



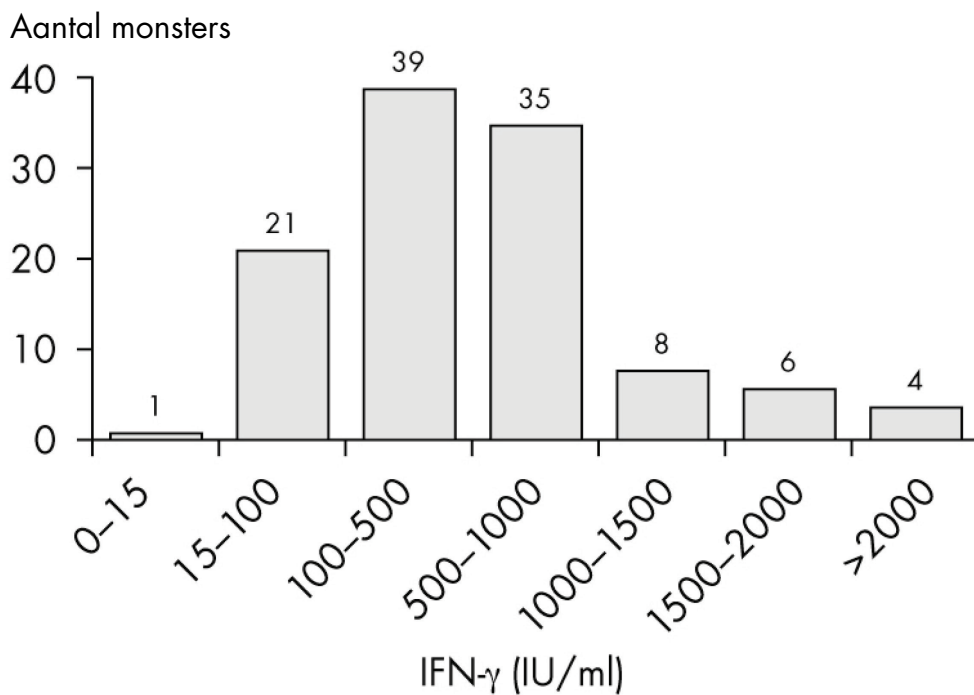
Afbeelding 3. Distributie van QFM IFN- γ -reacties in de vroege groep patiënten na de transplantatie (n = 64; mediaan = 1,5 IE/ml).

De distributie van IFN- γ -reacties op QFM in de groep late patiënten na de transplantatie (> 12 maanden na de transplantatie) werd bepaald met 12 monsters met de QFM ELISA (afbeelding 4).



Afbeelding 4. Distributie van QFM IFN- γ -reacties in de late groep patiënten na de transplantatie (n = 12; mediaan = 98,8 IE/ml).

De distributie van IFN- γ -reacties op QuantiFERON Monitor in de groep ogenschijnlijk gezonde proefpersonen werd bepaald met 114 monsters met de QFM ELISA (afbeelding 5).



Afbeelding 5. Distributie van QFM IFN- γ -reacties bij de ogenschijnlijk gezonde proefpersonen (n = 114; mediaan = 400,5 IE/ml).

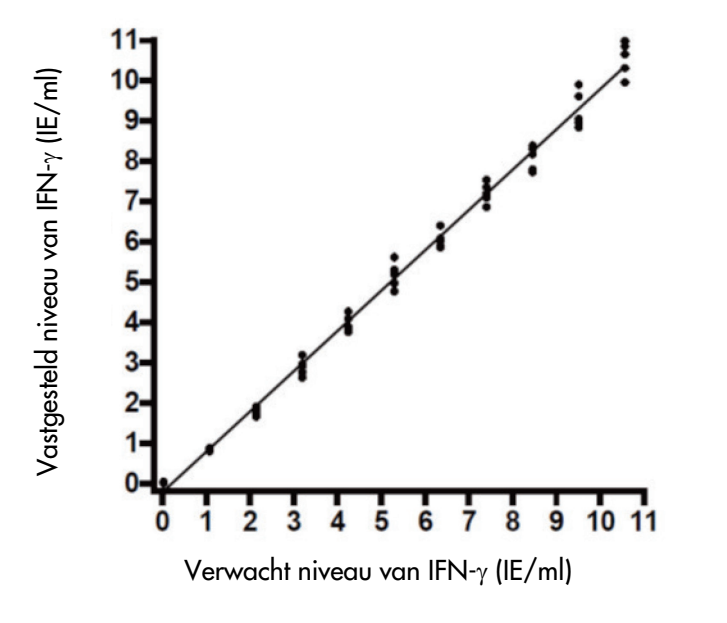
QFM-reacties bij patiënten die een orgaantransplantaat hebben ontvangen

QFM is beoordeeld in een transversaal observatieonderzoek bij patiënten die een orgaantransplantaat hebben ontvangen (4). De volgende groepen hebben aan het onderzoek deelgenomen: 212 gezonde proefpersonen met een subgroep van 30 controles van dezelfde leeftijd en hetzelfde geslacht, 30 patiënten die nog een transplantaat moesten ontvangen, 18 patiënten waarbij vroeg na de transplantatie monsters werden afgenomen (66 monsters; mediane tijd na de transplantatie = 21 dagen) en 11 patiënten waarbij laat na de transplantatie monsters werden afgenomen (mediane tijd na de transplantatie = 2290 dagen). Gemiddelde IFN- γ -productie was 555,2 IE/ml bij gezonde controles en 614,6 IE/ml bij de controles van dezelfde leeftijd en hetzelfde geslacht. Gemiddelde IFN- γ -productie bleek aanzienlijk lager te zijn in zowel de patiëntgroep vóór de transplantatie (IFN- γ = 89,3 IE/ml) en de vroege patiëntgroep na de transplantatie (IFN- γ = 3,76 IE/ml) vergeleken met de controles van dezelfde leeftijd en hetzelfde geslacht ($p < 0,001$). Het herstel van de immuunfunctie in de late groep patiënten na de transplantatie (gemiddelde IFN- γ = 256,1 IE/ml) werd waargenomen en bleek aanzienlijk groter te zijn dan bij de vroege groep patiënten na de transplantatie ($p < 0,05$). Dit onderzoek geeft aan dat QFM kan worden gebruikt om celgemedieerde immuniteitsreacties te beoordelen in de immunosuppressieve populatie die een orgaantransplantaat ontvangt.

Kwaliteitskenmerken assay

Er is aangetoond dat de QFM ELISA lineair is door 5 replicaten uit 11 plasma-groepen van bekende IFN- γ -concentraties willekeurig over de ELISA-plaat te verdelen. De lineaire regressielijn heeft een helling van $1,002 \pm 0,011$ en een correlatiecoëfficiënt van 0,99 (afbeelding 6).

De detectielimiet van de QFM ELISA is 0,065 IE/ml en er wordt geen "high-dose hook" (prozone)-effect met IFN- γ -concentraties van maximaal 10.000 IE/ml vertoond.



Afbeelding 6. Lineariteitsprofiel van QFM ELISA vastgesteld door testen van 5 replicaten uit 11 plasmamonsters van bekende IFN- γ -concentraties.

De reproduceerbaarheid van de QFM-assay (fase 1) is vastgesteld met bloedmonsters die zijn afgenomen bij 20 gezonde proefpersonen. De verschillende operators, QFM LyoSphere-partijen en sets apparatuur werden beoordeeld. De gemiddelde variatiecoëfficiënt van de IFN- γ -reactieniveaus is bepaald met de QFM ELISA voor alle drie de partijen QFM LyoSpheres en alle drie de geteste omstandigheden waren 22,22% (95% CI: 17,20–27,25).

De herhaalbaarheid van de QFM-assay (fase 1) is beoordeeld door de variabiliteit van de 5–6 maal herhaalde QFM LyoSphere-bloedstimulaties binnen dezelfde donor en bij 14 proefpersonen te meten. De gemiddelde variatiecoëfficiënt van de 14 geteste proefpersonen was 14,7% (95% CI: 10,2–19,2). De %CV van de afzonderlijke proefpersonen was minder dan 30%.

De reproduceerbaarheid van QFM ELISA (fase 2) werd geschat door 20 plasmamonsters te testen met variërende IFN- γ -concentraties in replicaten

van 3, in 3 verschillende laboratoria, op 3 niet-opeenvolgende dagen en door 3 verschillende operators. Elk monster werd zodoende 27 maal getest in 9 onafhankelijke uitvoeringen van de assay. Eén monster was een nulcontrole waarvoor een IFN- γ -concentratie van 0,08 IE/ml (95% CI: 0,07–0,09) werd bepaald. Het bereik van concentraties van de overige 19 plasmamonsters was 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) tot 7,7 IE/ml (95% CI: 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 ($n = 9$). Deze variatie liep uiteen van 4,1 tot 9,1% CV. De gemiddelde intra-assay %CV ($\pm 95\%$ CI) bedroeg $6,6\% \pm 0,6\%$. Het gemiddelde van de nulwaarde voor IFN- γ -plasma was 14,1% CV.

De totale variatie of inter-assay-variatie werd bepaald door de 27 berekende IFN- γ -concentraties voor elk plasmamonster te vergelijken. De inter-assay-variatie liep uiteen van 6,6 tot 12,3% CV. De totale gemiddelde %CV ($\pm 95\%$ CI) 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.

Technische informatie

Gestolde plasmamonsters

Indien bij een langduriger opslag van de plasmamonsters fibrinestolsels optreden, moeten de monsters worden gecentrifugeerd totdat sedimentatie heeft plaatsgevonden. Dit vereenvoudigt het pipetteren van plasma.

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van problemen. Raadpleeg voor meer informatie tevens de technische informatie op: www.QuantiFERON.com. Zie de achterzijde voor contactgegevens.

Problemen met ELISA oplossen

Niet-specifieke kleurreactie

| Mogelijke oorzaak | Oplossing |
|--|---|
| a) Onvolledige spoeling van de plaat | Spoel de plaat minstens 6 maal met 400 µl spoelbuffer per putje. Er kunnen meer dan 6 spoelcycli nodig zijn, afhankelijk van de gebruikte spoeler. Er dient een inweektijd van minstens 5 seconden tussen de cycli te worden aangehouden. |
| b) Kruisbesmetting van ELISA-putjes | Wees voorzichtig bij pipetteren en mengen van het monster om risico's te minimaliseren. |
| c) Kit/onderdelen over de vervaldatum | Zorg dat de kit vóór de vervaldatum wordt gebruikt. Zorg dat gereconstitueerde standaard en conjugaatconcentraat 100x binnen 3 maanden na de reconstitutedatum worden gebruikt. |
| d) Enzysubstraatoplossing is verontreinigd | Gooi het substraat weg indien blauwkleuring optreedt. Zorg voor schone reservoirs voor de reagentia. |
| e) Plasma in QFM-buisjes is gemengd voordat het is verzameld | 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 dat het materiaal aan het oppervlak van de gel niet wordt verstoord. |

Problemen met ELISA oplossen

Aflezingen van lage optische dichtheden voor standaarden

| Mogelijke oorzaak | Oplossing |
|---|---|
| a) Fout met standaardverduunning | Zorg dat de verdunningen van de kitstandaard volgens deze 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 | Incubeer de plaat met het conjugaat, de standaarden en monsters gedurende 120 ± 5 minuten. Incubeer de enzymsubstraatoplossing gedurende 30 minuten op de plaat. |
| 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 conjugaatconcentraat 100x, moeten voor het begin van de assay op kamertemperatuur worden gebracht. Dit duurt ongeveer één uur. |
| g) Kit/onderdelen over de vervaldatum | Zorg dat de kit vóór de vervaldatum wordt gebruikt. Zorg dat gereconstitueerde standaard en conjugaatconcentraat 100x binnen 3 maanden na de reconstitutedatum worden gebruikt. |

Sterke achtergrondkleuring

| Mogelijke oorzaak | Oplossing |
|--------------------------------------|--|
| a) Onvolledige spoeling van de plaat | Spoel de plaat minstens 6 maal met 400 μ l spoelbuffer per putje. Er kunnen meer dan 6 spoelcycli nodig zijn, afhankelijk van de gebruikte spoeler. 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). |

Problemen met ELISA oplossen

- | | |
|--|--|
| c) Kit/onderdelen over de vervaldatum | Zorg dat de kit vóór de vervaldatum wordt gebruikt. Zorg dat gereconstitueerde standaard en conjugaatconcentraat 100x binnen drie maanden na de reconstitutedatum worden gebruikt. |
| d) Enzysubstraatoplossing is verontreinigd | Gooi het substraat weg indien blauwkleuring optreedt. Zorg voor schone reservoirs voor de reagentia. |

Niet-lineaire standaardcurve en dubbele variabiliteit

- | Mogelijke oorzaak | Oplossing |
|--|---|
| a) Onvolledige spoeling van de plaat | Spoel de plaat minstens 6 maal met 400 µl spoelbuffer per putje. Er kunnen meer dan 6 spoelcycli nodig zijn, afhankelijk van de gebruikte spoeler. Er dient een inweektijd van minstens 5 seconden tussen de cycli te worden aangehouden. |
| b) Fout met standaardverduunning | Zorg dat de verdunningen van de standaard volgens deze bijsluiter worden gemaakt. |
| c) Slecht mengen | Meng de reagentia grondig door ze meermaals om te keren of licht te schudden voordat ze op de plaat worden aangebracht. |
| d) Inconsistente pipetteertechniek of onderbreking tijdens het opzetten van de assay | Het toevoegen van monsters en standaarden moet op constante wijze gebeuren. Alle reagentia moeten worden voorbereid voorafgaand aan het begin van de assay. |

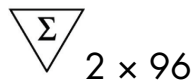
Productinformatie en technische gidsen zijn gratis verkrijgbaar bij QIAGEN of uw leverancier, of via www.QuantiFERON.com.

Referenties

Een uitgebreide lijst van QFM-referenties is te vinden op Gnowee — de QuantiFERON referentiebibliotheek die beschikbaar is op www.gnowee.net.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Sanders.
2. Fernández-Ruiz, M., Kumar, D., and Humar, A. (2014) Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin. Transl. Immunol.* 3, e12.
3. Sood, S. and Testro, A.G. (2014) Immune monitoring post liver transplant. *World J. Transplant.* 4, 30.
4. Sood, S. (2014) A novel biomarker of immune function and initial experience in a transplant population. *Transpl. J.* 97, e50.

Symbolen



Voldoende voor 2 x 96 monstervoorbereidingen



Wettelijke fabrikant



CE-IVD-markering



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik



Partijcode



Catalogusnummer



Uiterste gebruiksdatum



Temperatuurbepering



Raadpleeg Instructies voor gebruik



Niet hergebruiken



Weghouden van zonlicht



Erkende vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap

Contactgegevens

Bel voor technische ondersteuning en aanvullende informatie gratis naar 00800-22-44-6000 of neem contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via www.qiagen.com/contact of een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Verkorte testprocedure

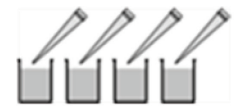
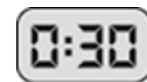
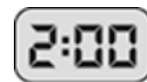
Fase 1 — incubatie van bloed

1. Verzamel bloed van de patiënt in een QFM-bloedafnamebuisje of een lithiumheparinebuisje voor bloedafname. Voorzie buisjes van een etiket met de gegevens van de patiënt en het tijdstip van bloedafname en transporteer deze vervolgens naar het laboratorium bij omgevingstemperatuur binnen 8 uur na afname.
 - a. Maak een aliquot van 1 ml in een QFM-bloedafnamebuisje en voorzie dit buisje van een etiket met de gegevens van de patiënt en het tijdstip van bloedafname als bloed is verzameld in een lithiumheparinebuisje voor bloedafname
2. Voeg 1 QFM LyoSphere toe aan elk QFM-bloedafnamebuisje dat 1 ml bloed bevat, laat de LyoSphere oplossen en incubeer de buisjes vervolgens zo snel mogelijk (binnen 8 uur na bloedafname) rechtop gedurende 16–24 uur bij 37 °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 dat het materiaal aan het oppervlak van de gel niet wordt verstoord.



Fase 2 – ELISA van IFN- γ

1. Laat de ELISA-onderdelen, met uitzondering van het conjugaatconcentraat 100x, minstens 60 minuten op kamertemperatuur komen.
2. Reconstitueer de kitstandaard naar 8,0 IE/ml met gedestilleerd of gedeïoniseerd water. Bereid 4 standaardverduunningen voor.
3. Reconstitueer gevriesdroogd conjugaatconcentraat 100x met gedestilleerd of gedeïoniseerd water.
4. Bereid gebruiksklare conjugaat in groene verdunningsoplossing voor en voeg 50 μ l aan alle putjes toe.
5. Voeg 50 μ l testplasmamonsters (onverdund, 1:10 verdund en 1:100 verdund, zoals vereist) en 50 μ l standaarden toe aan de betreffende putjes. Meng met behulp van het schudapparaat.
6. Incubeer gedurende 120 \pm 5 minuten bij kamertemperatuur.
7. Spoel de putjes minstens 6 maal met 400 μ l spoelbuffer per putje.
8. Voeg 100 μ l enzymsubstraatoplossing aan alle putjes toe. Meng met behulp van het schudapparaat.
9. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur.
10. Voeg 50 μ l enzymremmingsoplossing aan alle putjes toe. Meng met behulp van het schudapparaat.
11. Lees de resultaten af bij 450 nm met een referentiefilter van 620 tot 650 nm.
12. Analyseer de resultaten.



Opmerkingen

Belangrijke wijzigingen

Belangrijke wijzigingen in deze editie van de QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA-bijsluiter zijn samengevat in de onderstaande tabel:

| Paragraaf | Pagina | Wijziging(en) |
|----------------------|--------|---|
| Voorzorgsmaatregelen | 11 | Nieuwe GHS-informatie |
| Voorzorgsmaatregelen | 12 | Toegevoegde veiligheidsinstructies voor flacons met een metalen rand. |

Handelsmerken: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (QIAGEN Groep); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLymph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Beperkte licentieovereenkomst voor de QuantiFERON Monitor-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 protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich 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 protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die verkrijgbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
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 zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan 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 onderzoekskosten 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.

© 2014 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

