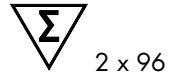


Huhtikuu 2022

QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 ELISA Kit -sarjan käyttöohjeet



Versio 1

IVD

In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes
-putkien kanssa



REF

626420



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

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Saksa

R3 **MAT**

1124420FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä.....	6
Kuvaus ja toimintaperiaate	7
Yhteenveto ja selitykset.....	7
Toimitetut materiaalit	9
Sarjan sisältö.....	9
Sarjan komponentit.....	10
Alusta ja ohjelmisto	10
Tarvitavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	11
Lisäreagenssit	11
Välineet.....	11
Varoitukset ja varotoimet	12
Turvallisuustiedot	12
Varotoimet.....	13
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	16
Käytöstabiilius	16
Käyttövalmiit ja käytetyt reagenssit	16
Näytteiden säilytys ja käsittely.....	17
Toimenpide: ELISA-testaus.....	18
Protokolla: IFN- γ ELISA	18
Tulokset (laskelmat)	23
Standardikäyrän laatiminen ja näytteiden arvot	23

Testin laadunvarmistus	25
Tulosten tulkitseminen	27
Rajoitukset	28
Testin suorituskykyominaisuudet	29
Analyttinen suoritus	29
Kliininen suorituskyky	38
Lähdeviitteet	45
Vianmääritysopas	50
Symbolit	53
Yhteystiedot	54
Liite A: Teknisiä tietoja	55
Määrittämättömät tulokset	55
Hyytyneet plasmanäytteet	55
Lipeemiset plasmanäytteet	55
Liite B: ELISA-testimenetelmä lyhyesti	56
Tilautiedot	58
Asiakirjan muutoshistoria	59

Käyttötarkoitus

QuantiFERON SARS-CoV-2 -määritys on in vitro -diagnostinen testi, joka on kehitetty interferoni- γ :n (IFN- γ), jota T-solut CD4+ ja CD8+ tuottavat SARS-CoV-2-peptidiseoksen stimulaation vaikutuksesta, kvalitatiiviseen havaitsemiseen heparinisoidusta kokoverestä. Tuotetun IFN- γ :n määrä mitataan entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

QuantiFERON SARS-CoV-2 -määritys on tarkoitettu avustamaan soluvälitteisen immuunivasteen (Cell-mediated Immune, CMI) arvioinnissa henkilöillä, joilla ei ole ollut SARS-CoV-2-infektiota ja jotka ovat saaneet COVID-19-rokotteen, joka kohdistuu SARS-CoV-2-viruksen piikkiproteiiniin (S-proteiiniin).

QuantiFERON SARS-CoV-2 -määritystä on käytettävä yhdessä muiden laboratoriotestien ja epidemiologisten/kliinisten arvioiden kanssa, kun yksittäisen henkilön COVID-19-rokotteesta johtuvaa immuunivastetta arvioidaan.

T-solujen immuunivasteiden kehittämisessä rokotuksen jälkeen voi kulua useita päiviä. Selvää luonteenomaista aikaa T-solujen immuunivasteiden kestolle ei rokotetuilla ole.

Ei-reaktiiviset tulokset eivät sulje pois aktiivisen SARS-CoV-2-infektion mahdollisuutta tai määritä COVID-19-rokotteiden tehokkuutta. Jos aktiivista infektiota epäillään, tulos on vahvistettava toisella SARS-CoV-2-virusta testaavalla molekyyli- tai antigeenitestillä. Määrityksen tuloksia on aina käytettävä kliinisen tutkimuksen, potilaan aikaisempien sairauksien ja muiden löydösten valossa.

In vitro -diagnostiikkaan.

Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

Tuotetta saavat käyttää vain asianmukaisesti opastetut, molekyylibiologian tekniikoihin koulutetut ja tämän nimenomaisen tekniikan tuntevat henkilöt.

Kuvaus ja toimintaperiaate

Yhteenveto ja selitykset

QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) on kvalitatiivinen määrittely, jonka kanssa käytetään erityisiä verinäyteputkia, joissa on SARS-CoV-2-spesifien proteiinien ansiosta immuunisoluja stimuloivia peptidiantigeenejä. Verta inkuboidaan putkissa 16–24 tunnin ajan, minkä jälkeen plasma kerätään ja siitä testataan peptidiantigeenien aiheuttama IFN- γ -vaste. Spesifejä T-soluvälitteisiä vasteita SARS-CoV-2-infektioon on raportoitu eri tyyppisten piikkiproteiineihin kohdistuvien rokotteiden saamisen jälkeen [1–34].

Ensin kokoverta kerätään kuhunkin QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes -putkeen: Nil-putkeen, Ag1-putkeen, Ag2-putkeen ja Mitogen-putkeen. Vaihtoehtoisesti verinäyte voidaan ottaa yksittäiseen verinäyteputkeen, joka sisältää antikoagulanttina litiumhepariinia tai natriumhepariinia, ja siirtää se sitten QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes -putkiin.

QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes -putkia on ravistettava, jotta antigeeni sekoittuu vereen, sekä inkuboitava 37 °C:n \pm 1 °C lämpötilassa mahdollisimman pian, viimeistään 16 tunnin sisällä verinäytteen ottamisesta. 16–24 tunnin inkubointijakson jälkeen putket sentrifugoidaan, plasma käsitellään ja IFN- γ -määrä (IU/ml) mitataan ELISA-menetelmällä. QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA -testissä käytetään ihmisen rekombinanttia IFN- γ -standardia, jonka määrittely on tehty IFN- γ -viitevalmisteeseen vertaamalla (NIH Ref: Gxg01-902-535). Testinäytteitä koskevat tulokset on raportoitu kansainvälisinä yksiköinä (International Units, IU/ml) suhteessa standardikäyrään, joka on valmistettu testaamalla sarjan mukana tulevan standardin laimennuksia.

Heterofiilisten vasta-aineiden (esim. neutraloivien vasta-aineiden) esiintymisen seerumissa tai plasmassa tiedetään tietyillä yksilöillä aiheuttavan häiriöitä immunomäärityksessä. Heterofiilisten vasta-aineiden vaikutus QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA -määritykseen

voidaan minimoida lisäämällä vihreään laimennusaineeseen normaalia hiiriserumia ja käyttämällä F(ab')₂-monoklonaalista vasta-ainevalmistetta IFN- γ -vasta-aineena, jolla mikrolevyn kuopat päällystetään.

Mitogen-putken plasmanäyte toimii kunkin testatun näytteen IFN- γ -positiivisena kontrollina. Nil-putki sopeutuu taustaan (esim. liiallisiin verenkierron IFN- γ -tasoihin ja heterofiilisten vasta-aineiden läsnäoloon). Nil-putken IFN- γ -taso vähennetään Ag1-, Ag2- ja Mitogen-putkien IFN- γ -tasosta.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

ELISA-komponentit	2 levyn sarja
Tuotenumero	626420
Microplate strips (mikrolevyliuskat) (12 x 8 kuoppaa), päällystetty monoklonaalisella hiiren anti-ihmis-IFN- γ -vastaaineella	2 sarjaa 12 x 8 mikrolevyliuskoja
IFN- γ Standard (IFN- γ -standardi), kylmäkuivattu (sisältää ihmisen rekombinantti-IFN- γ :aa, naudan kaseiinia, 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x pullo (8 IU/ml käyttövalmiiksi saatettuna)
Green Diluent (vihreä laimennusaine) (sisältää naudan kaseiinia, normaalia hiiriseerumia, 0,01 % w/v timerosaalia)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (konjugaatin 100x-konsentraatti), kylmäkuivattu (hiiren anti-ihmis-IFN- γ HRP, sisältää 0,01 % timerosaalia)	1 x 0,3 ml (käyttövalmiiksi saatettuna)
Wash Buffer 20x Concentrate (pesupuskurin 20x-konsentraatti) (pH 7,2; sisältää 0,05 % v/v ProClin® 300:a)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (entsyymin substraattiliuos) (sisältää H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' -tetrametyyliibentsidiiniä)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (entsyyminpysäytysliuos; sisältää 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
<i>QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit -sarjan käyttöohjeet</i>	1

* Sisältää rikkihappoa

Sarjan komponentit

Kontrollit ja kalibraattorit

QFN SARS ELISA -testissä käytetään ihmisen rekombinanttia IFN- γ -standardia, jonka määrittäminen on tehty IFN- γ -viitevalmisteeseen vertaamalla (NIH Ref: Gxg01-902-535).

Alusta ja ohjelmisto

QFN SARS -analyysiohjelmiston käyttö on valinnaista, mutta sitä voidaan käyttää raakadatan analysointiin ja tulosten laskentaan. Ohjelmisto on ladattavissa osoitteesta www.qiagen.com.

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Lisäreagenssit

- Deionisoitu tai tislattu vesi, 2 litraa

Välineet*

- 37 ± 1 °C:n inkubaattori (CO₂ tai ilman sitä)
- Kalibroituja tilavuudeltaan vaihtelevia pipettejä 10 µl:n – 1 000 µl:n annosteluun, kertakäyttöiset kärjet
- Kalibroituja monikanavaisia pipettejä, joilla voidaan annostella 50 µl ja 100 µl, kertakäyttöiset kärjet
- Mikrolevyravistin, jolla voidaan käyttää nopeuksia väliltä 500 – 1 000 r/min
- Mikrolevyepesuri (plasmanäytteiden käsittelyturvallisuuden parantamiseksi suositellaan automaattista levypesuria)
- Mikrolevyn lukulaite, johon on kiinnitetty 450 nm:n suodatin ja 620–650 nm:n referenssisuodatin
- Vaihtelevanopeuksinen vortex-laite
- Sentrifugi, jolla voidaan lingota verinäyteputkia vähintään voimalla 3 000 RCF (g)
- Asteikollinen mittalasi, 1 litra tai 2 litraa
- Levyn kansi
- Nukkaamattomia imukykyisiä liinoja

* Varmista ennen käyttöä, että laitteet on tarkistettu ja kalibroitu valmistajan suositusten mukaan.

Varoitukset ja varotoimet

Jos olet Euroopan unionissa sijaitseva asiakas, huomaa, että sinun voi olla tarpeen raportoida laitteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista valmistajalle ja käyttäjän ja/tai potilaan oleskelumaan toimivaltaiselle viranomaiselle.


Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina Internet-osoitteessa www.qiagen.com/safety. Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-tarvikesarjojen ja niiden osien käyttöturvatiedotteet.

- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.
- Hävitä näyte- ja määritysjäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- Näytteet voivat olla tartuntavaarallisia. Hävitä näyte- ja määritysjäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- QFN SARS -määritystä on käytettävä yhdessä muiden laboratoriotestien ja epidemiologisten/kliinisten arvioiden kanssa, kun yksittäisen henkilön COVID-19-rokotteesta johtuvaa immuunivastetta arvioidaan.
- Ei-reaktiivinen QFN SARS -tulos ei sulje pois SARS-CoV-2-infektion mahdollisuutta tai määritä COVID-19-rokotteiden tehokkuutta. Virheellisesti ei-reaktiiviset tulokset voivat johtua verinäyteputkien virheellisestä käsittelystä laskimopunktion jälkeen, määrityksen virheellisestä suorittamisesta tai muista immunologisista muuttujista, kuten komorbiditeetteihin liittyvistä muuttujista. Heterofiiliset vasta-aineet tai muista tulehdustilastoista johtuva epäspesifi IFN- γ -tuotanto voivat naamioida SARS-CoV-2-peptideille spesifit vasteet.

- Reaktiivinen QFN SARS -tulos ei saa olla ainoa tai ratkaiseva syy COVID-19-rokotteen tehokkuuden määrittämiselle. Määrityksen virheellinen suorittaminen saattaa aiheuttaa virheellisesti reaktiivisia QFN SARS -tuloksia.
- Virheellisesti reaktiivinen QFN SARS -tulos voi johtua virheellisestä verinäytteen ottamisesta tai virheellisestä näytteen käsittelystä, joka vaikuttaa lymfosyyttien toimintaan. Katso ohjeet verinäytteiden oikeanlaiseen käsittelyyn kohdasta Toimenpide: ELISA-testaus sivulta 18. Inkuboinnin viivästyminen voi aiheuttaa virheellisesti ei-reaktiivisia tai määrittämättömiä tuloksia, ja muut tekniset parametrit voivat vaikuttaa merkitsevän IFN- γ -vasteen tunnistamiskykyyn.
- Heikko Mitogen-vaste ($< 0,5$ IU/ml) viittaa epäselvään tulokseen, jos verinäytteessä on lisäksi ei-reaktiivinen vaste SARS-CoV-2-proteiineille. Tämä malli saattaa ilmetä riittämättömien lymfosyyttien, näytteen epäasianmukaisen käsittelyn aiheuttaman vähentyneen lymfosyyttiaktiivisuuden, Mitogen-putken täytön tai sekoittamisen tai potilaan IFN- γ :n tuotantoon kykenemättömien lymfosyyttien vuoksi. Nil-näytteen kohonneita IFN- γ -tasoja voi esiintyä heterofiilisten vasta-aineiden tai sisäisen IFN- γ -erityksen yhteydessä.

Varotoimet

<p>HUOMIO</p> 	<p>Käsittele ihmisverta mahdollisesti tartuntavaarallisena.</p> <p>Noudata asianmukaisia verenkäsittelyohjeita. Hävitä veren tai verituotteiden kanssa kosketuksissa olleet näytteet ja materiaalit kansallisten, alueellisten ja paikallisten säädösten mukaisesti.</p>
--	--

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sisältää rikkihappoa. Varoitus! Voi syövyttää metalleja. Aiheuttaa ihoärsytystä. Aiheuttaa vakavaa silmien ärsytystä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Varoitus! Aiheuttaa vähäistä ihoärsytystä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

QuantiFERON Green Diluent



Sisältää tartratsiinia. Varoitus! Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia vaikutuksia. Vältettävä päästämistä ympäristöön.

Lisätietoja

Käyttöturvatiiedotteet (Safety Data Sheets, SDS): www.qiagen.com/safety

- Timerosaalia käytetään säilöntäaineena joissain QFN SARS -reagensseissa. Se voi olla myrkyllistä nieltynä, hengitettynä tai päästessään ihokontaktiin.
- *Quantiferon ELISA -sarjan käyttöohjeista* poikkeaminen saattaa tuottaa virheellisiä tuloksia. Lue ohjeet huolellisesti ennen käyttöä.
- Älä käytä sarjaa, jos yhdessäkin reagenssipullossa on merkkejä vaurioista tai vuodosta ennen käyttöä.
- **Tärkeää:** Tarkista pullo ennen käyttöä. Älä käytä konjugaattia tai IFN- γ -standardin pulloja, joissa on havaittavissa vaurioita tai joiden kumitiiviste näyttää vaurioituneelta. Älä käsittele rikkoutuneita pulloja. Hävitä pullo turvallisesti asianmukaisia varotoimia noudattaen. Metallikorkin avaamiseen liittyviä loukkaantumisriskejä suositellaan vähentämään käyttämällä konjugaatin tai IFN- γ -standardin pullojen avaamiseen pullonavauspihtejä.
- Älä sekoita tai käytä eri QFN SARS -sarjaeristä peräisin olevia mikrolevyliuskoja, IFN- γ -standardeja, vihreää laimennusainetta tai konjugaatin 100x-konsentraattia. Muita eri

sarjaeristä peräisin olevia reagensseja (pesupuskurin 20x-konsentraatti, entsyymien substraattiliuos ja entsyyminpysäytysliuos) voidaan käyttää yhdessä edellyttäen, että reagenssien viimeinen käyttöpäivämäärä ei ole umpeutunut ja että erän tiedot on merkitty muistiin.

- Hävitä käyttämättömät reagenssit ja biologiset näytteet paikallisten viranomaismääräysten mukaisesti.
- QFN SARS ELISA -sarjaa ei saa käyttää viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
- Asianmukaisia laboratoriokäytäntöjä on noudatettava kaikkina aikoina.
- Varmista, että laboratoriovälineet, kuten levyn pesimet ja levyn lukulaitteet on kalibroitu/hyväksytty käyttöön.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivämäärää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Käyttöstabiilius

- Säilytä ELISA-sarjaa 2–8 °C:ssa.
- Suojaa ensyymien substraattiliuos suoralta auringonvalolta.

Käyttövalmiit ja käytetyt reagenssit

- Katso reagenssien käyttökuntoon saattamista koskevat ohjeet kohdasta Toimenpide: ELISA-testaus sivulta 18.
- Valmiiksi saatettuna sarjan standardia voidaan säilyttää enintään kolme kuukautta, jos säilytys tapahtuu 2–8 °C:n lämpötilassa.
Merkitse sarjan standardin käyttövalmiiksi saattamisen päivämäärä muistiin.
- Käyttövalmiiksi saatettu konjugaatin 100X-konsentraatti on säilytettävä 2–8 °C:n lämpötilassa ja myös käytettävä kolmen kuukauden kuluessa.
Merkitse konjugaatin käyttövalmiiksi saattamisen päivä muistiin.
- Käyttövahvuinen konjugaatti on käytettävä 6 tunnin kuluessa valmistamisesta.
- Käyttövahvuista pesupuskuria voidaan säilyttää huoneenlämpötilassa enintään kaksi viikkoa.

Näytteiden säilytys ja käsittely

Katso tiedot verinäytteen ottamisesta QFN SARS -testiä varten *QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes* -putkien käyttöohjeista (1124422).

Toimenpide: ELISA-testaus

Protokolla: IFN- γ ELISA

Tärkeää huomioitavaa

- Katso kohdista Sarjan sisältö sivulla 9 ja Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen sivulla 11 ELISA-testin suorittamiseen tarvittavat materiaalit.

Valmistelu (määrityksen suorittamiseen tarvittava aika)

Jotta QFN SARS -määrityksestä voidaan saada päteviä tuloksia, käyttäjän on suoritettava tietyt vaiheet annetussa ajassa. Käyttäjän kannattaa suunnitella kaikki määrityksen vaiheet huolellisesti ennen määrityksen käyttöä, jotta vaiheet saadaan hoidettua riittävän nopeasti. Tarvittava aika on arvioitu jäljempänä. Useamman näytteen testaus eräkohtaisesti on myös arvioitu.

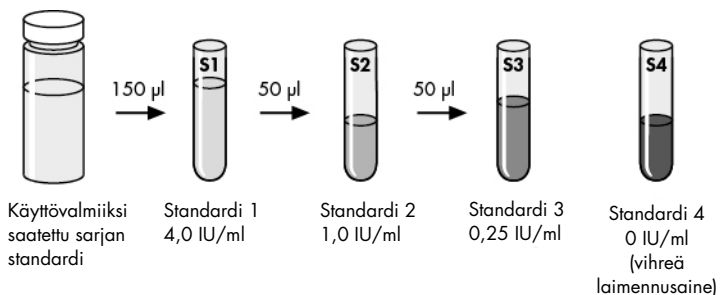
- Noin kolme tuntia per ELISA-levy
- < 1 työtunti
- Kutakin ylimääräistä levyä kohti lisätään 10–15 minuuttia

Menetelmä

1. Kaikki plasmanäytteet ja reagenssit, paitsi konjugaatin 100x-konsentraatti, on tuotava huoneenlämpötilaan (22 °C \pm 5 °C) ennen käyttöä. Tasaantumiselle on jätettävä aikaa vähintään 60 minuuttia.
2. Irrota ylimääräiset ELISA-levyn liuskat kehuksesta, sulje ne takaisin foliopussiin ja vie jääkaappiin myöhempää tarvetta varten.
3. Varaa vähintään yksi liuska QFN SARS -standardeille ja riittävä määrä liuskoja kutakin testattavaa potilasta kohti (katso suositeltu levyasettelu kuvasta 2). Palauta kehys ja kansi käytön jälkeen jäljellä olevien liuskojen käyttöön.

- 3a. Saata IFN- γ -standardi käyttökuntoon lisäämällä pulloon merkitty määrä deionisoitua tai tislattua vettä. Voit minimoida vaahtoamisen ja varmistaa pullon koko sisällön liukenemisen sekoittamalla varovasti. IFN- γ -standardin liuottaminen uudelleen merkittyyn tilavuuteen saa aikaan liuoksen, jonka pitoisuus on 8,0 IU/ml.
- 3b. Käytä valmiiksi saatettua standardia ja valmistele laimennussarja neljälle IFN- γ -konsentraatille (katso kuva 1).
- 3c. Standardikäyrä tehdään seuraavilla IFN- γ -pitoisuuksilla:
- S1 (standardi 1) sisältää 4,0 IU/ml
 - S2 (standardi 2) sisältää 1,0 IU/ml
 - S3 (standardi 3) sisältää 0,25 IU/ml
 - S4 (standardi 4) sisältää 0 IU/ml (pelkkä vihreä laimennusaine [Green Diluent, GD]).
- 3d. Standarditestit on testattava vähintään kahtena otoksena.
- 3e. Valmistele kutakin ELISA-testiä varten sarjan standardista vastalaimennetut laimennukset.

Menetelmä	
A	Merkitään 4 putkea: S1, S2, S3, S4.
B	Lisätään 150 μ l vihreää laimennusainetta putkiin S1, S2, S3 ja S4.
C	Lisätään 150 μ l standardisarjaa putkeen S1 ja sekoitetaan huolellisesti.
D	Siirretään 50 μ l putkesta S1 putkeen S2 ja sekoitetaan huolellisesti.
E	Siirretään 50 μ l putkesta S2 putkeen S3 ja sekoitetaan huolellisesti.
F	Pelkkä vihreä laimennusliuos toimii nollastandardina (S4).



Kuva 1. Standardikäyrän laimennussarjan valmistelu.

4. Sekoita kylmäkuivattua konjugaatin 100x-konsentraattia 0,3 millilitraan deionisoitua tai tislattua vettä. Voit minimoida vaahtoamisen ja varmistaa pullon koko sisällön liukenemisen sekoittamalla varovasti.
 - 4a. Konjugaatin työskentelyvahvuus valmistetaan laimentamalla riittävä määrä käyttövalmiiksi saatettua konjugaatin 100x-konsentraattia vihreään laimennusaineeseen (taulukko 1).
 - 4b. Käyttövahvuinen konjugaatti on käytettävä 6 tunnin kuluessa valmistamisesta.
 - 4c. Palauta käyttämätön konjugaatin 100x-konsentraatti välittömästi käytön jälkeen 2–8 °C:n lämpötilaan.

Taulukko 1. Konjugaatin valmistaminen (työskentelyvahvuus)

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

5. Verinäyteputkista kootut plasmanäytteet, jotka on kokoamisen jälkeen varastoitu (kylmään tai pakkaseen), on sekoitettava ennen kuin ne lisätään ELISA-kuoppaan.

Plasmanäytteitä voi säilyttää sentrifugoiduissa QFN SARS Blood Collection Tubes -putkissa korkeintaan 28 vuorokautta 2–8 °C:n lämpötilassa tai kerättyjä plasmanäytteitä voi säilyttää korkeintaan 28 vuorokautta 2–8 °C:n lämpötilassa. Kerättyjä plasmanäytteitä voi säilyttää myös alle –20 °C:ssa (ei mielellään kylmemmässä kuin –70 °C:ssa) korkeintaan 24 kuukautta.

Plasmanäytteet voidaan käyttää/ladata suoraan lingotuista verinäyteputkista QFN SARS ELISA -levylle mittausta varten.

Tärkeää: Jos plasmanäytteet siirretään suoraan sentrifugissa lingotuista QFN SARS Blood Collection Tubes -putkista, plasman sekoittumista on vältettävä. Varo aina rikkomasta geelin pinnalla olevaa materiaalia.

6. Lisää 50 µl juuri valmistettua, työskentelyvahvuista konjugaattia jokaiseen ELISA-levyn kuoppaan.
7. Lisää 50 µl testiplasmanäytettä asianmukaisesti kuoppiin (katso ELISA-levyn asettelusuositus kuvasta 2).
8. Lisää lopuksi 50 µl standardeista 1–4 vastaaviin levyn kuoppiin (katso ELISA-levyn asettelusuositus kuvasta 2). Standardit on testattava vähintään kahtena otoksena.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 Ag1	3 Ag1	5 Ag1	7 Ag1	9 Ag1	S2	S2	13 Ag1	15 Ag1	17 Ag1	19 Ag1	21 Ag1
C	1 Ag2	3 Ag2	5 Ag2	7 Ag2	9 Ag2	S3	S3	13 Ag2	15 Ag2	17 Ag2	19 Ag2	21 Ag2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 Ag1	4 Ag1	6 Ag1	8 Ag1	10 Ag1	11 Ag1	12 Ag1	14 Ag1	16 Ag1	18 Ag1	20 Ag1	22 Ag1
G	2 Ag2	4 Ag2	6 Ag2	8 Ag2	10 Ag2	11 Ag2	12 Ag2	14 Ag2	16 Ag2	18 Ag2	20 Ag2	22 Ag2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Kuva 2. **ELISA-levyn suositeltu asettelu.** S1 (standardi 1), S2 (standardi 2), S3 (standardi 3), S4 (standardi 4). 1N (näyte 1. Nil (kontrolliplasma), 1 Ag1 (näyte 1. Ag1-plasma), 1 Ag2 (näyte 1. Ag2-plasma), 1M (näyte 1. Mitogen-plasma).

9. Peitä ELISA-levy ja sekoita konjugaattia sekä plasmanäytteitä/standardeja huolellisesti 1 minuutin ajan nopeudella 500–1 000 rpm mikrolevyravistimessa. Vältä läikyttämistä.

10. Peitä ELISA-levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) 120 ± 5 minuutin ajan. ELISA-levy ei saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana. Suositellulta lämpötila-alueelta poikkeaminen voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia.
11. Valmistele ELISA-levyn inkuboinnin aikana työskentelyvahvuinen pesupuskuri. Laimenna yksi osa pesupuskurin 20x-konsentraattia 19 osaan deionisoitua tai tislattua vettä ja sekoita huolellisesti. Pesupuskurin 20x-konsentraattia on toimitettu riittävä määrä, jotta voidaan valmistaa kaksi litraa työskentelyvahvuista pesupuskuria.
12. Kun ELISA-levyn inkubointi on valmis, pese ELISA-levyn kuopat 400 μ l:lla työskentelyvahvuista pesupuskuria. Suorita pesuvaihe ainakin kuusi kertaa. Plasmanäytteitä käsiteltäessä suositellaan käyttämään automaattista levypesuria turvallisuussyistä.

Huolellinen peseminen on erittäin tärkeää testin onnistumisen kannalta. Varmista, että jokainen kuoppa täytetään kokonaan pesupuskurilla kuopan yläreunaan saakka kunkin pesujakson aikana. Suosittelemme vähintään 5 sekunnin liotusta jaksojen välissä.

Jätevesisäiliöön on lisättävä laboratoriodesinfointiainetta, ja vakiintuneita käytäntöjä on noudatettava mahdollisesti infektoivan materiaalin dekontaminaatiossa.
13. Taputa ELISA-levyä alaspäin käännettynä imukykyisen (vähänukkaisen) liinan päällä pesupuskurijäämien poistamiseksi. Lisää 100 μ l entsyymin substraattiliuosta kuhunkin levyn kuoppaan, peitä levy ja sekoita huolellisesti 1 minuutin ajan nopeudella 500 – 1 000 r/min mikrolevyristimessä.
14. Peitä ELISA-levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) 30 minuutin ajan. ELISA-levy ei saa olla suorassa auringonvalossa inkuboinnin aikana.
15. Lisää 30 minuuttia kestäneen inkuboinnin jälkeen 50 μ l entsyyminpysäytysliuosta jokaiseen levyn kuoppaan samassa järjestyksessä kuin substraattia lisättiin. Sekoita huolellisesti 500–1 000 rpm:n nopeudella mikrolevyristimessä.
16. Mittaa ELISA-levyn kuoppien optinen tiheys (Optical Density, OD) viiden minuutin kuluessa reaktion pysäytyksestä mikrolevyn lukulaitteella, johon on asennettu 450 nm:n suodatinväli ja 620–650 nm:n referenssisuodatinväli. Optisen tiheyden arvoja käytetään tulosten laskennassa.

Tulokset (laskelmat)

QFN SARS -analyysiohjelmistoa voidaan käyttää raakadatan analysointiin ja tulosten laskentaan. Ohjelmisto on saatavilla osoitteessa www.qiagen.com. Varmista, että käytössä on QFN SARS -analyysiohjelmiston uusin versio.

Ohjelmisto suorittaa testin laadunvarmistusarvion, luo standardikäyrän ja antaa kunkin potilaan testituloksen kohdassa Tulosten tulkitseminen sivulla 27 kuvatulla tavalla. Ohjelmisto raportoi kaikki yli 10 IU/ml:n pitoisuudet arvona ">10", koska ne ylittävät ELISA-testin hyväksytyyn lineaariseen alueeseen.

QFN SARS -analyysiohjelmiston käytön sijasta tulokset voidaan määrittää myös seuraavan menetelmän mukaisesti.

Standardikäyrän laatiminen ja näytteiden arvot

Jos QFN SARS -analyysiohjelmistoa ei käytetä

Standardikäyrän ja näytteiden IU/ml-arvojen määrittämiseen tarvitaan taulukkolaskentaohjelma, kuten Microsoft® Excel®, jos QFN SARS -analyysiohjelmistoa ei käytetä.

Taulukkolaskentaohjelman käyttö

1. Määritetään sarjan standardin toisintojen optisen tiheyden arvot kussakin levyssä.
2. Laaditaan $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardikäyrä muodostamalla keskiarvoisen optisen tiheyden (y-akseli) $\log_{(e)}$ suhteessa standardien IFN- γ -konsentraation $\log_{(e)}$ -arvoihin (x-akseli) IU/ml:ina jättäen nollastandardi pois näistä laskelmista. Laske standardikäyrä regressioanalyysillä.
3. Standardikäyrää käytetään määrittäessä IFN- γ -pitoisuus (IU/ml) kussakin testiplasmanäytteessä käyttämällä apuna kunkin näytteen optisen tiheyden arvoa.

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

Näytteiden arviointi

Jos standardeille saataisiin seuraavat optisen tiheyden lukemat, $\log_{(e)}$ -laskelmat tehtäisiin kuten taulukossa 2.

Taulukko 2. Standardikäyrä

Standardi	IU/ml	OD-arvot a ja b	Keskimääräinen OD	%CV	$\log_{(e)}$ IU/ml	$\log_{(e)}$ - keskiarvo (Optical Density, OD)
Standardi 1	4	1,089; 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Standardi 2	1	0,357; 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Standardi 3	0,25	0,114; 0,136	0,125	NA	-1,386	-2,079
Standardi 4	0	0,034; 0,037	0,036	NA	NA	NA

Käyrän yhtälö on $y = 0,7885(X) - 0,9837$, missä $m = 0,7885$ ja $c = -0,9837$. Näillä arvoilla ratkaistaan X yhtälössä $X = (Y-c)/m$. Standardikäyrän perusteella laskettu korrelaatiokerroin (r) = 1,000. NA: ei olennainen.

Määrityksen pätevyys arvioidaan kohdassa Testin laadunvarmistus sivulla 25 esitetyillä kriteereillä.

Standardikäyrän (taulukko 2) avulla antigeenien optisen tiheyden vasteet muunnetaan kansainvälisiin yksiköihin (IU/ml).

Taulukko 3. Näytteiden arviointi

Antigeeni	OD-arvo	Log _(e) OD-arvo	X	e ^x (IU/ml)	Antigeeni – Nil (IU/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	-
Ag1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,15
Ag2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Ag1-, Ag2- ja Mitogen-antigeenien IFN- γ -arvot (yksikössä IU/ml) taustakorjataan vähentämällä saatu IU/ml-arvo vastaavasta Nil-kontrollista. Näitä korjattuja arvoja käytetään testitulosten tulkintaan.

Testin laadunvarmistus

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

ELISAa koskee seuraava:

- Standardin 1 keskimääräisen optisen tiheyden on oltava $\geq 0,600$.
- Standardin 1 ja 2 toistettujen arvojen %CV-arvon on oltava $\leq 15\%$.
- Standardien 3 ja 4 rinnakkaisotosten optisten tiheyksien arvo ei saa poiketa yli 0,040 optisen tiheyden yksikköä niiden keskiarvosta.
- Keskimääräisistä imeytymisarvoista laskettujen korrelaatiokerrointen (r) on oltava $\geq 0,98$.
- Jos yllä mainitut kriteerit eivät täyty, ajo on virheellinen ja testi on tehtävä uudelleen.
- Nollastandardin (vihreä laimennusaine) keskimääräisen optisen tiheyden on oltava $\leq 0,150$. Jos keskimääräinen optisen tiheyden arvo on $> 0,150$, levyn pesuprosessi on tarkastettava.

QFN SARS -analyysiohjelmisto laskee ja raportoi nämä laadunvalvontaparametrit.

Jokaisessa laboratoriossa on määritettävä soveltuvat kontrollimateriaalien tyypit ja testaustiheys paikallisten viranomaismääräysten tai akkreditointijärjestöjen ohjeiden mukaisesti. Ulkoista laadunarviointia ja vaihtoehtoisia tarkastusmenetelmiä on harkittava.

Huomautus: Plasmanäytteissä, joihin on lisätty rekombinantti-IFN- γ :aa, on ilmennyt jopa 50 %:n pitoisuuslaskuja, kun näytteitä on säilytetty joko 2–8 °C:n tai –20 °C:n lämpötilassa. Rekombinantti-IFN- γ :aa ei suositella kontrollistandardien tekemiseen plasmanäytteitä käytettäessä.

Tulosten tulkitseminen

QFN SARS -tulokset tulkitaan seuraavien kriteerien mukaisesti (taulukko 4).

Tärkeää: QFN SARS -määrittystä on käytettävä yhdessä muiden laboratoriotestien ja epidemiologisten/kliinisten arvioiden kanssa, kun yksittäisen henkilön COVID-19-rokotteesta johtuvaa immuunivastetta arvioidaan.

Taulukko 4. QFN SARS -testitulosten tulkitseminen

Nil (IU/ml)	Ag1-antigeeni miinus Nil (IU/ml)	Ag2-antigeeni miinus Nil (IU/ml)	Mitogen miinus Nil (IU/ml)*	QFN SARS -tulos	Raportti/tulkinta
≤ 8,0	≥ 0,15 ja ≥ 25 % Nil-arvosta	Mikä tahansa	Mikä tahansa	Reaktiivinen	SARS-CoV-2-vaste havaittu
	Mikä tahansa	≥ 0,15 ja ≥ 25 % Nil-arvosta			
	< 0,15 tai ≥ 0,15 ja < 25 % Nil-arvosta	< 0,15 tai ≥ 0,15 ja < 25 % Nil-arvosta	≥ 0,50	Ei-reaktiivinen	SARS-CoV-2-vastetta Ei havaittu
	< 0,15 tai ≥ 0,15 ja < 25 % Nil-arvosta	< 0,15 tai ≥ 0,15 ja < 25 % Nil-arvosta	< 0,50	Määrittämätön [‡]	SARS-CoV-2-vastetta ja Mitogen-kontrollia ei voi havaita
> 8,0 [§]	Mikä tahansa				

*Vasteet positiiviseen Mitogen-kontrolliin (ja toisinaan myös Ag-antigeenin vasteet) voivat olla mikrolelyn lukulaitteen alueen ulkopuolella. Tällä ei ole vaikutusta testituloksiin. Kun arvot ovat > 10 IU/ml, QFN SARS -ohjelmisto raportoi tulokseksi > 10 IU/ml.

[‡] Katso mahdolliset syyt kohdasta Vianmäärittäminen sivulta 50.

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

Rajoitukset

QFN SARS -testissä saatuja tuloksia on käytettävä yhdessä kunkin henkilön epidemiologisen historian, nykyisen lääketieteellisen tilan ja muiden diagnostisten arviointien kanssa.

Henkilöt, joiden Nil-arvot ovat suuremmat kuin 8 IU/ml, luokitellaan määrittämättömiksi, koska 25 % korkeampi vaste Ag-antigeeneihin saattaa olla määrityksen mittausalueen ulkopuolella.

- Ei-reaktiivisen tuloksen kohdalla on huomioitava henkilön hoito- ja taustatiedot, jotka viittaavat rokotuksesta johtuvan immuunivasteen todennäköisyyteen, erityisesti silloin, kun henkilön immuunitoiminta on heikentynyt.
- QFN SARS -määritystä on käytettävä yhdessä muiden laboratoriotestien ja epidemiologisten/kliinisten arvioiden kanssa, kun yksittäisen henkilön COVID-19-rokotteesta johtuvaa immuunivastetta arvioidaan.

Epäluotettavat tai määrittelemättömät tulokset voivat johtua seuraavasta:

- Prosesissa on poikettu käyttöohjeista.
- Verinäytteitä on kuljetettu/käsitelty virheellisesti.
- Verenkierrossa on kohonneita IFN- γ -määriä tai kehossa on heterofiilisiä vasta-aineita.
- Verinäytteille hyväksytyt ajat niiden ottamisen ja inkuboinnin välillä on ylitetty. Katso *QFN SARS Blood Collection Tubes -putkien käyttöohjeet* (1124422).

Testin suorituskykyominaisuudet

Analyttinen suoritus

Määrittelyn raja-arvo

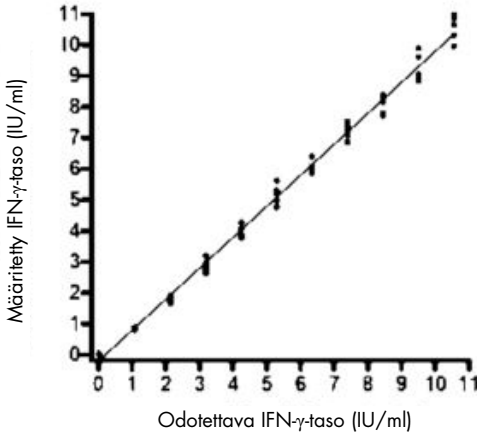
QFN SARS -määrittelyn raja-arvo määritettiin tiedoista, jotka saatiin kahdestakymmenestä (20) tutkittavasta, joilla SARS-CoV-2 oli ei-reaktiivinen RT-PCR-testissä tai serologiatestissä, ja kahdestakymmenestä (20) luovuttajasta, jotka oli täysin rokotettu (2–16 viikkoa täyden rokotuksen saamisesta) Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (Food and Drug Administration, FDA) EUA-hyväksynnän saaneella rokotteella. Herkkyyss- ja spesifisyyssiedot sekä tarkat kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit (Confidence Interval, CI) analysoitiin, ja ne osoittivat ELISA-sarjan optimaalisen raja-arvon olevan 0,15 IU/ml (katso taulukko 5).

Taulukko 5. QFN SARS -määrityksen raja-arvot (IU/ml) ja vastaava herkkyys ja spesifisyys tarkalla kaksipuolisella 95 %:n luottamuvälillä

Raja-arvo	Herkkyyys			Spesifisyys		
	Arvo	Matalampi 95 %:n CI	Korkeampi 95 %:n CI	Arvo	Matalampi 95 %:n CI	Korkeampi 95 %:n CI
0,1	1,000	0,940	1,000	0,933	0,838	0,982
0,15	0,983	0,911	1,000	1,000	0,940	1,000
0,2	0,900	0,795	0,962	1,000	0,940	1,000
0,25	0,733	0,603	0,839	1,000	0,940	1,000
0,3	0,717	0,586	0,825	1,000	0,940	1,000
0,35	0,650	0,516	0,769	1,000	0,940	1,000
0,4	0,600	0,465	0,724	1,000	0,940	1,000
0,45	0,567	0,432	0,694	1,000	0,940	1,000
0,5	0,467	0,337	0,600	1,000	0,940	1,000
0,55	0,433	0,306	0,568	1,000	0,940	1,000
0,6	0,400	0,276	0,535	1,000	0,940	1,000
0,65	0,333	0,217	0,467	1,000	0,940	1,000
0,7	0,317	0,203	0,450	1,000	0,940	1,000
0,75	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000
0,8	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000

Lineaarisuus

QFN SARS ELISA -testin lineaarisuus on todistettu asettamalla ELISA-levylle sattumanvaraisesti 5 toisintoa 11 plasmapoolista, joiden IFN- γ -pitoisuus tunnetaan. Lineaarisen regressiosuoran kulmakerroin on $1,002 \pm 0,011$, ja korrelaatiokerroin on 0,99 (kuva 3).



Kuva 3. Kuva lineaarisuustutkimuksen regressioanalyysistä.

Uusittavuus

QFN SARS -määrityksen suorituskyky eri laboratorioissa ja eri käyttäjien käytössä on arvioitu usean laboratorion uusittavuustutkimuksella. Tutkimus tehtiin kolmessa QIAGENin laboratorioissa. Tutkimukseen osallistui yhteensä kolme (3) SARS-CoV-2-reaktiivista ja kolme (3) ei SARS-CoV-2-reaktiivista tutkittavaa (reaktiivisuus määritetty RT-PCR-testillä tai serologiatestillä).

Jokaiselta tutkittavalta otettiin verta neljään (4) litiumhepariinia sisältävään verinäyteputkeen. Litiumhepariinia sisältävät verinäyteputket siirrettiin sitten yhteen testilaboratorioista, missä veri alikvoitiin kolmeen (3) sarjaan QFN SARS Blood Collection Tubes -putkia (QFN SARS -putket Ag1, Ag2, Mitogen ja Nil). Yksi sarja QFN SARS Blood Collection Tubes (BCT) -putkia

siirrettiin sitten kuhunkin testilaboratorioon ja testattiin niissä QFN SARS -määritysmenetelmällä. Jokainen tutkittava testattiin kymmenellä (10) toisinnolla (viisi [5] toisintoa Ag1-putkilla ja viisi [5] toisintoa Ag2-putkilla) kussakin laboratoriossa. Jokaisessa laboratoriossa yksi (1) käyttäjä suoritti QFN SARS -testin itsenäisesti. Käyttäjät sokkoutettiin muiden käyttäjien saamien tulosten osalta sekä tutkittavan saamien RT-PCR- tai serologiatestitulosten osalta.

Jokaisesta kolmesta (3) testilaboratoriosta saatiin 30 tulosta, jolloin tietopisteitä saatiin yhteensä 90. Yhteenvedo uusittavuustutkimuksen tuloksista on taulukossa 6.

Taulukko 6. Yhteenvedo uusittavuustutkimuksen tuloksista – N = 30 potilasnäytettä

Laboratorio 1 – 1 käyttäjä	Laboratorio 2 – 1 käyttäjä	Laboratorio 3 – 1 käyttäjä
25/30 = 83 %	30/30 = 100 %	30/30 = 100 %
Kvalitatiivisten tulosten yhtäpitävyys	Kvalitatiivisten tulosten yhtäpitävyys	Kvalitatiivisten tulosten yhtäpitävyys

Kaikkien reaktiivisten ja ei-reaktiivisten näytteiden prosentuaalinen yhtäpitävyys yhteensä odotettujen kvalitatiivisten tulosten kanssa oli 94,4 % (85/90) kaikkien kolmen (3) laboratorion välillä (reaktiivisen tutkittavan näytteestä reaktiivinen tulos ja ei-reaktiivisen tutkittavan näytteestä ei-reaktiivinen tulos vertailumenetelmällä tutkittavalle saadun tuloksen perusteella).

Erien välinen toistettavuus

QFN SARS Blood Collection Tubes -putkien erien välinen vaihtelu on määritetty tutkimuksella. Tutkimuksessa testattiin yhteensä kaksi (2) SARS-CoV-2-reaktiivista ja kolme (3) ei SARS-CoV-2-reaktiivista tutkittavaa (reaktiivisuus määritetty RT-PCR-testillä tai serologiatestillä). Sekä QFN SARS Blood Collection Tubes -putkien Ag1- että Ag2-putkesta käytettiin tutkimuksessa kolmea (3) eri erää. Jokaista luovuttajaa ja jokaista verinäyteputkea kohden testattiin viisi (5) replikaattia. Yhteenvedo erien välisen tarkkuuden tuloksista on taulukossa 7.

Taulukko 7. Yhteenveto erien välisen tarkkuuden tutkimustuloksista – QFN SARS Ag1 and Ag2 Blood Collection Tubes -putkien prosentuaalinen yhtäpitävyys yhteensä; N = 25

QFN SARS BCT -putki	BCT-erän numero	Yhtäpitävien kvalitatiivisten tulosten määrä / tulokset yhteensä	Osuus	Alempi luottamusraja	Ylempi luottamusraja
Ag1	1	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	2	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	3	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
Ag2	1	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	2	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	3	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %

Kaikkien reaktiivisten ja ei-reaktiivisten näytteiden prosentuaalinen yhtäpitävyys yhteensä oli 100 % kaikkien kolmen (3) QFN SARS Ag1- ja Ag2 BCT -putkierän välillä (reaktiivisen tutkittavan näytteestä reaktiivinen tulos ja ei-reaktiivisen tutkittavan näytteestä ei-reaktiivinen tulos vertailumenetelmällä tutkittavalle saadun tuloksen perusteella).

Tyhjän raja (Limit of Blank, LoB)

QFN SARS -määrityksen tyhjän raja (Limit of Blank, LoB) on arvioitu. Neljästätoista (14) erillisestä normaalista ihmisen plasmanäytteestä (tyhjät) testattiin kaksi (2) replikaattia kahdella (2) QFN SARS ELISA -erällä niin, että käyttäjiä oli kolme (3) ja testauspäiviä kolme (3), yksi (1) käyttäjä testauspäivää kohden, jolloin kummastakin ELISA-sarjan erästä saatiin yhteensä 84 replikaattia.

ELISA-sarjan kahden (2) eri erän LoB-arvot (IU/ml) laskettiin erikseen, ja ne esitetään taulukossa 8.

Taulukko 8. Kahden (2) QFN SARS ELISA Kit -sarjan erän LoB-arvot (IU/ml)

QFN SARS ELISA Kit -sarja	Arvioitu LoB (IU/ml)
Sarja 1	0,030
Sarja 2	0,040

Lopulliseksi LoB-arvoksi ilmoitettiin QFN SARS ELISA Kit -sarjan erien LoB-arvoista suurempi, 0,040 IU/ml.

Havaitsemisraja (Limit of Detection, LoD)

QFN SARS -määrityksen havaitsemisraja (Limit of Detection, LoD) on arvioitu. Ihmisen plasmasta muodostettiin pooli yhdistämällä neljatoista (14) erillistä plasmanäytettä. Kolme (3) käyttäjää valmisteli IFN- γ -referenssistandardivaraston puskuriin laimennettuna pitoisuudella 1,0 IU/ml. Plasmasta valmisteltiin kahdeksan (8) pitoisuuden laimennussarja. Tutkimuksessa kolme (3) vaihtuvaa käyttäjää teki testin kolmena (3) päivänä kahdella (2) QFN SARS ELISA Kit -sarjan erällä. Jokaisena testauspäivänä jokaisessa sarjalaimennuksen sarjassa kutakin pitoisuutta kohden testattiin viisi (5) replikaattia, joten kummallakin QFN SARS ELISA -sarjan erällä testattiin 45 replikaattia jokaisen IFN- γ -pitoisuuden laimennuksella.

QFN SARS ELISA Kit -sarjan erien LoD-arvot laskettiin erikseen, ja ne esitetään taulukossa 9. LoD arvioitiin probiittiregressiomallilla. LoD perustui arvioituun pitoisuuteen (IU/ml), jolla saatiin 95 %:n arvioitu todennäköisyys yli 0,04 IU/ml:n osumatarkkuudelle (LoB-arvon määrittämä).

Taulukko 9. Kahden (2) QFN SARS ELISA Kit -sarjan erän arvioidut LoD-arvot (IU/ml)

QFN SARS ELISA Kit -sarja	Todennäköisyys	Pitoisuusarvio (IU/ml)	Alempi 95 %:n luottamusraja arvioissa	Ylempi 95 %:n luottamusraja arvioissa
Sarja 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Sarja 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Lopulliseksi LoD-arvoksi ilmoitettiin QFN SARS ELISA Kit -sarjan erien lasketuista LoD-arvoista suurempi, 0,065 IU/ml.

Häiritsevät aineet

Mahdollisten häiritsevien aineiden vaikutus QFN SARS ELISA -sarjan kykyyn havaita IFN- γ määritettiin tutkimuksella. Testauksessa tarkasteltiin seuraavia häiritseviä aineita: triglyseridit (kokonaisuudessaan), hemoglobiini, proteiini (koko seerumi), bilirubiini (konjugoitu), bilirubiini (konjugoitumaton), abakaviirisulfaatti, syklosporiini ja prednisoloni. Tunnettuja IFN- γ -pitoisuuksia käyttäen valmisteltiin viisi (5) plasmapoolia, joissa käytettiin häiritsevistä aineista eri pitoisuuksia. Lähtöpoolin IFN- γ -taso valmisteltiin aiemmassa vaiheessa ennalta määritetyllä IFN- γ -määrällä (noin 0,21, 0,45 ja 1,4 IU/ml). Tämän poolin avulla valmisteltiin häiritsevien aineiden poolit. Häiritsevien aineiden pitoisuuksien viisi eri tasoa testattiin, ja ne perustuivat referenssiväleihin, patologiisiin arvoihin, hoitoalueisiin ja toksisiin alueisiin tai toimittajan tai yleisten kliinisten tasojen suosituksiin. Jokaista häiritsevän aineen näytteen pitoisuustasoa kohden testattiin kuusi (6) replikaattia.

Jokaisella näytepitoisuudella tehtiin T-testi, jossa verrattiin häiritsevän aineen korkean tason (10) keskimääräisen log₁₀-arvon (IU/ml) ja kontrollin (eli häiritsevää ainetta sisältämättömän tason) eroa. Myös arvioitu ero keskimääräisessä vasteessa ja vastaavat kaksipuolet 95 %:n luottamusrajat ja p-arvo ilmoitetaan taulukossa.

Taulukko 10. Log10 IU/ml: T-testin yhteenvetotaulukko häiritsevän aineen kontrollitason ja korkean tason keskiarvojen eroista kullakin häiritsevän aineen ja IFN- γ -pitoisuuden tasolla

Häiritsevä aine	Häiritsevän aineen taso	Näytteen pitoisuus (IU/ml)	Keskiarvojen ero	Matalampi 95 %:n CI	Korkeampi 95 %:n CI	P-arvo
Triglyseridit	Korkea	1,4	0,053	-0,004	0,110	0,063
		0,45	0,039	-0,021	0,058	< 0,001
		0,21	0,034	-0,002	0,071	0,061
Hemoglobiini	Korkea	1,4	-0,001	-0,042	0,040	0,967
		0,45	0,016	-0,007	0,040	0,152
		0,21	0,014	-0,030	0,059	0,489
Proteiini	Korkea	1,4	-0,030	-0,071	0,011	0,136
		0,45	0,000	-0,046	0,046	0,992
		0,21	-0,045	-0,103	0,012	0,109
Konjugoitu bilirubiini	Korkea	1,4	0,001	-0,046	0,048	0,961
		0,45	0,012	-0,043	0,067	0,639
		0,21	0,015	-0,044	0,074	0,586
Konjugoitumaton bilirubiini	Korkea	1,4	0,015	-0,011	0,042	0,231
		0,45	0,015	-0,023	0,052	0,411
		0,21	0,012	-0,033	0,057	0,566
Abakaviiri	Korkea	1,4	0,013	-0,015	0,040	0,322
		0,45	0,015	-0,014	0,044	0,283
		0,21	0,008	-0,034	0,050	0,677

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 10. Log₁₀ IU/ml: T-testin yhteenvetotaulukko häiritsevän aineen kontrollitason ja korkean tason keskiarvojen eroista kullakin häiritsevän aineen ja IFN- γ -pitoisuuden tasolla

Häiritsevä aine	Häiritsevän aineen taso	Näytteen pitoisuus (IU/ml)	Keskiarvojen ero	Matalampi 95 %:n CI	Korkeampi 95 %:n CI	P-arvo
Syklosporiini	Korkea	1,4	0,002	-0,019	0,024	0,816
		0,45	0,007	-0,030	0,043	0,682
		0,21	0,015	-0,007	0,038	0,155
Prednisoloni	Korkea	1,4	0,007	-0,016	0,030	0,518
		0,45	-0,001	-0,034	0,033	0,964
		0,21	0,021	-0,025	0,068	0,334

Tuloksissa ei ilmennyt tilastollisesti merkitseviä eroja häiritsevän aineen korkean tason ja kontrollitason (häiritsevää ainetta sisältämättömän tason) välillä, lukuun ottamatta triglyseridiä pitoisuustasolla 0,45 IU/ml. Tämän arvon keskimääräisen eron määritettiin olevan ± 2 keskihajonnan alueella keskimääräisen kontrollitason mittauksessa, mikä osoittaa, että havaittu ero on määrittelyn odotetun vaihtelun sisällä ja että kliinisesti merkittävien triglyseriditasojen ei odoteta häiritsevän QFN SARS ELISA -testiä.

Kliininen suorituskyky

QFN SARS -määrityksen kliininen suorituskyky arvioitiin prospektiivisessa havaintotutkimuksessa, joka tehtiin kesä–lokakuussa 2021 ja johon osallistui tutkittavia, joilla ei ollut taustalla SARS-CoV-2-infektiota ja jotka olivat saaneet SARS-CoV-2-viruksen S-proteiiniin kohdistuvan COVID-19-rokotteen, sekä tutkittavia, joilla ei ollut taustalla SARS-CoV-2-infektiota ja jotka eivät olleet saaneet COVID-19-rokotetta.

Suostumuksen antaneet tutkittavat arvioitiin mukaanottamis- ja poisjättämiskriteerien mukaan, ja tutkimukseen otettiin vain tutkittavat, jotka täyttivät kaikki mukaanottamiskriteerit eivätkä yhtäkään poisjättämiskriteeriä, ja heiltä otettiin verinäyte QFN SARS -määritystä varten.

Yhteenveto tutkimukseen osallistuneista tutkittavista:

- Ryhmä 1: tutkittavilla ei ollut taustalla luonnollista SARS-CoV-2-infektioita, he eivät olleet saaneet COVID-19-rokotetta ennen QFN SARS -määritykseen käytettävän verinäytteen ottamista, he eivät olleet koskaan saaneet positiivista SARS-CoV-2-tulosta, he olivat saaneet ei-reaktiivisen serologiatestituloksen, eikä heillä ollut ilmennyt COVID-19-taudin merkkejä tai oireita neljään (4) viikkoon ennen tutkimukseen osallistumista.
- Ryhmä 2: tutkittavilla ei ollut taustalla SARS-CoV-2-infektioita, he olivat saaneet SARS-CoV-2-viruksen S-proteiiniin kohdistuvan COVID-19-rokotteen ennen QFN SARS -määritykseen käytettävän verinäytteen ottamista, eivätkä he olleet koskaan saaneet positiivista SARS-CoV-2-tulosta.
- Yksikään tutkittavista ei ollut (elin- tai solu-) siirtopotilas eikä ollut syöpähoidossa tutkimukseen osallistumisen aikaan.

Ryhmään 1 osallistui yhteensä 218 tutkittavaa ja ryhmään 2 osallistui 171 tutkittavaa. Kun QFN SARS -määritykseen tarvittavat verinäytteet oli otettu, neljän ryhmään 1 kuuluvan tutkittavan kohdalla todettiin, etteivät he voi osallistua tutkimukseen reaktiivisen serologiatestituloksen vuoksi, joten heidät jätettiin pois analyysistä. Serologiatesti tehtiin

näytteestä, joka oli otettu samalla käynnillä QFN SARS -määritykseen käytettävän verinäytteen kanssa.

Näytteet otettiin, QFN SARS -verinäyteputket käsiteltiin ja plasmaa säilytettiin ≤ -20 °C:ssa, kunnes testaus QFN SARS ELISA -sarjalla voitiin tehdä. Kaikki QFN SARS ELISA -levyjen ajot olivat hyväksyttäviä, eikä määrittämättömiä tuloksia saatu, joten ryhmään 1 saatiin 214 arvioitavaa näytettä ja ryhmään 2 taas 171 arvioitavaa näytettä.

Demografiset tiedot

Kummassakin maassa kerättyjen näytteiden määrä ja tutkimusryhmien prosentuaaliset osuudet esitetään taulukossa 11.

Taulukko 11. Näytteenottomaiden yhteenveto

Näytteenottomaa	Ryhmä 1		Ryhmä 2	
	N	%	N	%
Alankomaat	214	100,00 %	153	89,47 %
Yhdysvallat	0	0,00 %	18	10,53 %

Yhteenveto tutkittavien iästä, mukaan lukien vähimmäis- ja enimmäisikä sekä iän keskiarvo, mediaani ja keskihajonta (Standard Deviation, SD), esitetään taulukossa 12.

Taulukko 12. Yhteenveto tutkittavien iästä (vuosina)

N	Keskiarvo	Mediaani	SD	Vähintään	Enintään
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Yhteenveto tutkittavien sukupuolesta esitetään taulukossa 13.

Taulukko 13. Yhteenveto tutkittavien sukupuolesta

Sukupuoli	N	%
Nainen	234	60,78 %
Mies	151	39,22 %

Spesifisyys

Kliininen yhtäpitävyys QFN SARS -tulosten ja vertailumenetelmällä saatujen tulosten välillä esitetään taulukossa 14.

Taulukko 14. Kliininen yhtäpitävyys: QFN SARS vs. vertailumenetelmä

		Vertailumenetelmän tulos		Yhteensä
		Ryhmä 1 (ei rokotetta, ei infektiota)	Ryhmä 2 (rokote, ei infektiota)	
QFN SARS -tulos	Ei-reaktiivinen	199	34	233
	Reaktiivinen	15	137	152
Yhteensä		214	171	385

214 rokottamattomasta tutkittavasta (ryhmä 1) 199 sai QFN SARS -testistä ei-reaktiivisen tuloksen ja loput 15 reaktiivisen. 171 rokotetusta tutkittavasta (ryhmä 2) 137 sai QFN SARS -testistä reaktiivisen tuloksen ja loput 34 ei-reaktiivisen. Ryhmien 1 ja 2 ristiriitaisille tuloksille, joita oli 15 ja 34, ei tehty lisätestejä ristiriitamenetelmällä.

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Negative Percent Agreement, NPA) eli spesifisyys ja kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli (Confidence Interval, CI) laskettiin rokottamattomilta tutkittavilta (ryhmä 1), ja ne esitetään taulukossa 15.

Taulukko 15. Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (spesifisyys)

Ryhmän nro	NPA (spesifisyys)	95 %:n CI
Ryhmä 1 (ei rokotetta, ei infektiota)	92,99 % (199/214)	88,70–96,02 %

Herkkyys

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Positive Percent Agreement, PPA) eli herkkyys ja kaksipuolinen 95 %:n tarkka CI laskettiin rokotetuilta tutkittavilta (ryhmä 2), ja ne esitetään taulukossa 16.

Taulukko 16. Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (herkkyys)

Ryhmän nro	PPA (herkkyys)	95 %:n CI
Ryhmä 2 (rokote, ei infektiota)	80,12 % (137/171)	73,34–85,82 %

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys iän mukaan

Rokotettujen tutkittavien (ryhmä 2) positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys ositettiin iän mukaan < 60- ja ≥ 60-vuotiaiden ryhmiin, katso taulukko 17.

Taulukko 17. Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys < 60 ja ≥ 60 ikävuoden mukaan

Ikähaitari (vuosina)	PPA (herkkyys)	95 %:n CI
< 60	85,33 % (128/150)	78,78–90,64 %
≥ 60	42,86 % (9/21)	21,82–65,98 %

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys COVID-19-rokotteen mukaan

Rokotettujen tutkittavien (ryhmä 2) positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys ositettiin saadun COVID-19-rokotteen mukaan, katso taulukko 18.

Taulukko 18. Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys COVID-19-rokotteen mukaan

Rokote	PPA (herkkyys)	95 %:n CI
Astra Zeneca	62,50 % (5/8)	24,49–91,48 %
Janssen (Johnson & Johnson)	86,67 % (13/15)	59,54–98,34 %
Moderna	77,27 % (17/22)	54,63–92,18 %
Pfizer – BioNTech	80,95 % (102/126)	73,00–87,40 %

Rokotettujen tutkittavien ei-reaktiivisiin tuloksiin yhdistettyjä tekijöitä

län, COVID-19-rokotuksesta kuluneen ajan, saadun rokotteen ja sukupuolen yhteys rokotettujen tutkittavien (ryhmä 2) ei-reaktiivisiin tuloksiin selvitettiin yhden muuttujan logistisella regressioanalyysillä. Eri tekijöiden ja ei-reaktiivisten tulosten yhteys laskettiin vetosuhteella (Odds Ratio, OR), ja tulokset esitetään taulukossa 19.

Taulukko 19. Eri tekijöiden yhteys rokotettujen tutkittavien ei-reaktiivisiin tuloksiin

Tekijä		OR (95 %:n CI)	p-arvo
Ikä (vuosina)		1,08 (1,05–1,12)	< 0,001
Aika rokotuksesta QFN SARS -verinäytteen ottoon (päivinä)		1,02 (1,01–1,03)	< 0,001
Rokote	Pfizer – BioNTech	1	–
	Astra Zeneca	2,55 (0,57–11,42)	0,221
	Janssen (Johnson & Johnson)	0,65 (0,14–3,09)	0,592
	Moderna	1,25 (0,42–3,72)	0,689
Sukupuoli	Nainen	1	–
	Mies	1,25 (0,59–2,65)	0,565

Ainoat tekijät, joilla havaittiin merkittävä yhteys rokotettujen tutkittavien ei-reaktiivisiin tuloksiin, olivat ikä ja rokotuksesta kulunut aika.

Koska tutkimus tehtiin maissa, joissa COVID-19-rokotteita tarjottiin ensin iäkkäämmälle väestölle, iällä saattoi olla vaikutusta rokotuksesta kuluneen ajan ja ei-reaktiivisten tulosten yhteyteen. Taulukossa 20 esitetään regressioanalyysi, jossa ikä on kovariaattina.

Taulukko 20. Tekijöiden yhteys ei-reaktiivisiin tuloksiin iän suhteen hallittuna

Tekijä		OR (95 %:n CI)	p-arvo
Ikä (vuosina)		1,07 (1,03–1,11)	< 0,001
Aika rokotuksesta QFN SARS -verinäytteen ottoon (päivinä)		1,01 (1,00–1,02)	0,214

Kun ikä on huomioitu, rokotuksesta kuluneen ajan ja ei-reaktiivisten tulosten yhteys ei ole enää merkittävä, mutta iän yhteys säilyy merkitseväenä.

Lähdeviitteet

1. Goletti D., Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, et al. The potential clinical utility of measuring SARS-CoV-2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Jul [cited 2021 Jul 13];0(0). Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X21003785/fulltext>
2. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*. 2021
3. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021
4. Shrotri M., van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-Cov-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE*. 2021
5. Alessandra D’Abramo, Serena Vita, Gaetano Maffongelli, Andrea Mariano , Chiara Agrati , Concetta Castilletti ,Delia Goletti, Giuseppe Ippolito, Emanuele Nicastrì SC-19 CIT. Prolonged and severe SARS-CoV-2 infection inpatients under B-cell-depleting drug successfully treated: A tailored approach. *Int J Infect Dis*. 2021;(107):247–50
6. Soresina A, Moratto D, Chiarini M, Paolillo C, Baresi G, Focà E, et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020
7. Quinti I, Lougaris V, Milito C, Cinetto F, Pecoraro A, Mezzaroma I, et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2020

8. Geers D, Shamier MC, Bogers S, den Hartog G, Gommers L, Nieuwkoop NN, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *SciImmunol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 30];6(59). Available from: <http://immunology.sciencemag.org/>
9. Alter G, Yu J, Liu J, Chandrashekar A, Borducchi EN, Tostanoski LH, McMahan K, Jacob-Dolan C, Martinez DR, Chang A, Anioke T, Lifton M, Nkolola J, Stephenson KE, Atyeo C, Shin S, Fields P, Kaplan I, Robins H, Amanat F, Krammer F, Baric RS, Le Gars M, Sado BD. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature*. 2021
10. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Jun 30];371(6529). Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
11. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, Leruez-Ville M, Villain E, Baaziz M, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2021 Jul 1];2. Available from: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor_Anti_SARS_CoV_2_Humoral_and_T_cell_Responses.95281.aspx
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020
13. Alberto M. Borobia, Antonio J Carcas, Mayte Pérez-Olmeda, Luis Castaño, María Jesús Bertran, Javier García-Pérez, Magdalena Campins, Antonio Portolés, María González-Pérez, María Teresa García Morales, Eunáte Arana-Arri, Marta Aldea, Francisco Díez-Fuerte CSG. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S

-
- primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021
14. Mónica Martínez-Gallo, Juliana Esperalba-Esquerra, Ricardo Pujol-Borrell, Víctor Sandá, Iria Arrese-Muñoz, Candela Fernández Naval, Andrés Antón Pagarolas, Victoria Cardona, Moisés Labrador-Horrillo, Tomás Pumarola-Suñé MH-G. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in Health Care Workers
15. Van Praet JT, Vandecasteele S, De Roo A, De Vriese AS, Reynders M. Humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in nursing home residents. *Clin Infect Dis*. 2021
16. Pedersen RM, Tornby DS, Bistrup C, Johansen IS, Andersen TE JU. Negative SARS-CoV-2 antibodies, T cell response and virus neutralization following full vaccination in a renal transplant recipient: a call for vigilance. *Clin Microbiol Infect*. 2021
17. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020
18. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020
19. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021
20. Aiello A, Najafi Fard S, Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Farroni C, et al. Spike is the most recognized antigen in the whole-blood platform in both acute and convalescent COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 2021

-
21. Soumya Jaganathan, Francis Stieber, Sonia N. Rao, Vladyslav Nikolayevskyy, Nadia Allen, Jeff Boyle JH. Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals. 2021
 22. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*. 2020
 23. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. 2020
 24. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020
 25. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020
 26. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020
 27. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020
 28. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020
 29. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2020

-
30. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020
31. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020
32. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020
33. Ryu MR, Park MS, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative evaluation of quantiFERON-TB gold in-tube and quantiFERON-TB gold plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Jul 1];56(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30135226/>
34. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. 2017

Vianmääritysopas

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Katso myös usein kysytyjä kysymyksiä (Frequently Asked Questions, FAQ) teknisen tuen sivulta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat mielellään kysymyksiisi joko tähän käsikirjaan liittyvistä tiedoista ja/tai protokollista tai näyte- ja määritystekniikoista (katso yhteystiedot osoitteesta www.qiagen.com).

Huomautuksia ja ehdotuksia

ELISAn vianmääritys

Epämääräinen värin kehittyminen

- | | |
|---|--|
| a) Levy ei ole täysin pesty | Pese levy pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Käytettävän pesimen mukaan saatetaan tarvita enemmän kuin 6 pesujaksoa. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liotusjakso. |
| b) ELISA-kuoppien ristikontaminaatio | Pipetoinnissa ja näytteen sekoituksessa on oltava huolellinen riskin vähentämiseksi minimiin. |
| c) Sarja/komponentit ovat vanhentuneet | Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaatin 100X -konsentraatti käytetään kolmen kuukauden kuluessa käyttövalmiiksi saattamisen päivämäärästä. |
| d) Entsyymien substraattiliuos on kontaminoitunut. | Heitä substraatti pois, jos sinistä väriä on havaittavissa. Varmista, että käytössä olevat reagenssisäiliöt ovat puhtaat. |
| e) Plasma on sekoittunut QFN SARS Blood Collection Tubes -putkissa ennen keräämistä | Kun sentrifugointi on tehty, varo pipetin ylös ja alas suuntautuvaa liikettä tai plasman sekoittumista millään tavoin ennen sen talteenottoa. Varo aina rikkomasta geelin pinnalla olevaa materiaalia. |

Huomautuksia ja ehdotuksia

Standardien lukemien alhainen optinen tiheys

- a) Standardin laimennusvirhe Varmista, että sarjan standardin laimennukset on tehty oikein näiden käyttöohjeiden mukaan.
- b) Pipetointivirhe Varmista, että pipetit on kalibroitu ja niitä käytetään valmistajan ohjeiden mukaan.
- c) Inkubointilämpötila on liian alhainen ELISA-testin inkubointi on suoritettava huoneenlämpötilassa ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$).
- d) Inkubointiaika on liian lyhyt Konjugaatin, standardit ja näytteet sisältävän levyn inkubointiajan on oltava 120 ± 5 minuuttia. Entsyymien substraattiliuosta inkuboidaan levyssä 30 minuutin ajan.
- e) On käytetty virheellistä levyn lukulaitteen suodatinta Levy on luettava 450 nm:n suodattimella, ja referenssisuodattimen on oltava $620\text{--}650\text{ nm}$.
- f) Reagenssit ovat liian kylmiä Kaikki reagenssit lukuun ottamatta konjugaatin 100X-konsentraattia on tuotava huoneenlämpöön ennen testin aloittamista. Se vie noin 1 tunnin.
- g) Sarjan/komponenttien viimeinen käyttöpäivämäärä on umpeutunut Varmista, että sarja käytetään ennen viimeistä käyttöpäivää. Varmista, että standardi ja konjugaatin 100X-konsentraatti käytetään 3 kuukauden kuluessa käyttövalmiiksi saattamisen päivämäärästä.

Paljon taustahäiriöitä

- a) Levy ei ole täysin pesty Pese levy pesupuskurilla $400\text{ }\mu\text{l/kuoppa}$ vähintään 6 kertaa. Pesuja voidaan tarvita enemmän kuin 6. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liotusjakso.
- b) Inkubointilämpötila on liian korkea ELISA-testin inkubointi on suoritettava huoneenlämpötilassa ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$).

Huomautuksia ja ehdotuksia





- c) Sarja/komponentit ovat vanhentuneet Varmista, että sarja käytetään viimeiseen käyttöpäivään mennessä. Varmista, että standardi ja konjugaatin 100X -konsentraatti käytetään kolmen kuukauden kuluessa käyttövalmiiksi saattamisen päivämäärästä.
- d) Entsyymien substraattiliuos on kontaminoitunut. Heitä substraatti pois, jos sinistä väriä on havaittavissa. Varmista, että käytössä olevat reagenssisäiliöt ovat puhtaat.




Epälineaarinen standardikäyrä ja rinnakkaisotoksen vaihtelu

- a) Levy ei ole täysin pesty Pese levy pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään 6 kertaa. Pesuja voidaan tarvita enemmän kuin 6. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään 5 sekunnin liotusjakso.
- b) Standardin laimennusvirhe Varmista, että standardien laimennukset on tehty oikein näiden käyttöohjeiden mukaan.
- c) Huono sekoitus Sekoita reagenssit huolellisesti kääntelemällä putkia tai pyöräyttämällä niitä kevyesti ennen niiden lisäämistä levyille.
- d) Epäjohdonmukainen pipetointitekniikka tai keskeytys testin suorituksessa Näytteen ja standardin lisääminen on suoritettava yhtäjaksoisesti. Kaikki reagenssit on valmistettava ennen testin aloittamista.

Symbolit

Käyttöohjeessa tai pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Selitys
 Σ <N>	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
IVD	Diagnostinen in vitro -lääketieteellinen laite
REF	Tuotenumero
LOT	Eränumero
MAT	Materiaalinumero (ts. komponentin merkintä)
COMP	Komponentit
CONT	Sisältö
NUM	Numero
GTIN	GTIN-numero
ECREP	Valtuutettu edustaja
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versionumero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja

Symboli	Selitys
	Katso käyttöohjeet
	Säilytettävä auringonvalolta suojattuna
	Varoitus/huomio

Yhteystiedot

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

Liite A: Teknisiä tietoja

Määrittämättömät tulokset

Määrittämättömät tulokset ovat epätavallisia, ja ne saattavat johtua testattavan henkilön immunologisesta tilasta. Ne voivat kuitenkin liittyä myös useisiin teknisiin tekijöihin (kuten verinäyteputkien virheelliseen käsittelyyn/säilytykseen tai ELISA-levyn puutteelliseen pesuun), jos yllä annettuja käyttöohjeita ei noudateta.

Jos epäillään teknisiä ongelmia reagenssien varastoinnissa, verinäytteiden ottamisessa tai niiden käsittelyssä, koko QFN SARS -testi on toistettava uusilla verinäytteillä. Stimuloidun plasman ELISA-testaus voidaan toistaa, jos epäillään riittämätöntä pesua tai muuta poikkeamaa ELISA-testin toimenpiteistä. Lääkäri voi ottaa uuden näytteen tai suorittaa muita toimenpiteitä tarpeen mukaan.

Hyytyneet plasmanäytteet

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

Lipeemiset plasmanäytteet

Lipeemisiä näytteitä pipetoitaessa on oltava erityisen huolellinen, sillä rasvakertymät voivat tukkia pipettikärkiä.

Liite B: ELISA-testimenetelmä lyhyesti

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



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



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

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



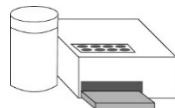
5. Lisää 50 µl testiplasmanäytettä ja 50 µl standardia asianomaisiin kaivoihin. Sekoita käyttämällä ravistelijaa.



6. Inkuboi 120 minuuttia huoneenlämpötilassa.



7. Pese kuopat pesupuskurilla 400 µl/kuoppa vähintään 6 kertaa.



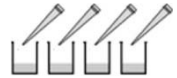
8. Lisää 100 µl entsyymiin substraattiliuosta kuoppiin. Sekoita käyttämällä ravistelijaa.



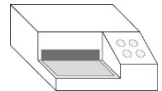
9. Inkuboi 30 minuuttia huoneenlämpötilassa.



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



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



12. Analysoi tulokset.



Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	2 levyn ELISA-sarja	626420
Liittyvät tuotteet		
QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 putkea (50 kutakin tyyppiä: Nil, Ag1, Ag2 ja Mitogen)	626725

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Päivämäärä	Kuvaus
R1, lokakuu 2021	Ensimmäinen versio
R2, marraskuu 2021	Päivitetty Suorituskykyominaisuudet- ja Kliininen suorituskyky -kohdat
R3, huhtikuu 2022	Päivitetty Häiritsevät aineet -kohdan Analyttiset suorituskykyominaisuudet

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

QuantiFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit -sarjan rajoitettu lisenssisopimus

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

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

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®, Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

