


Navodila za uporabo QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA

 2 × 96

Test IFN- γ polne krvi za merjenje reakcij na stimulanse
prirojene in pridobljene imunosti

Različica 1

IVD Za diagnostično uporabo *in vitro*

CE

REF 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, ZDA

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NEMČIJA

1079024SL Razl. 03

 www.QuantiFERON.com



Vsebina

Namen uporabe	4
Povzetek in obrazložitev testa	4
Princip testa	5
Trajanje testa	5
Sestavni deli in shranjevanje	6
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo	8
Shranjevanje in ravnanje	8
Previdnosti ukrepi in opozorila	10
Opozorila	10
Varnostni ukrepi	11
Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi	13
Navodilo za uporabo	16
Izračunavanje in interpretacija rezultatov	22
Izdelava standardne krivulje	22
Kontrola kakovosti	23
Interpretacija rezultatov	23
Omejitve postopka	24
Značilnosti	25
Klinične študije	25
Značilnosti izvedbe testa	30
Tehnične informacije	31
Vzorci strjene plazme	31
Navodila za odpravljanje težav	32
Reference	34
Simboli	35
Kontaktne podatki	35
Skrajšani testni postopek	36

Namen uporabe

Test QuantiFERON Monitor (QFM) je diagnostični test in vitro za zaznavanje celično posredovane imunske funkcije z merjenjem interferona gama (IFN- γ) v plazmi, ki se izvaja z encimsko imunsko metodo (ELISA) po inkubaciji heparinizirane polne krvi s stimulansi prirojenega in pridobljenega imunskega odziva. Test se uporablja za zaznavanje celično posredovanega imunskega odziva pri populaciji s presajenimi organi, ki prejema imunosupresivno terapijo.

Test QFM je namenjen za uporabo v kombinaciji z oceno tveganja ter drugimi zdravstvenimi in diagnostičnimi ocenami.

Povzetek in obrazložitev testa

Značilnost imunske pomanjkljivosti je zmanjšana sposobnost imunskega odziva. Oslabljen ali neobstoječ odziv je lahko posledica primarne ali pridobljene (sekundarne) imunske pomanjkljivosti (1).

Primarne imunske pomanjkljivosti so genetsko podedovane in se kažejo kot pomanjkljivosti različnih delov pridobljenega ali prirojenega imunskega sistema (1). Večina imunskih pomanjkljivosti je sicer pridobljenih (sekundarnih) in jih lahko povzročijo patogeni, zdravila (kot je imunosupresivna terapija po presaditvi organov), bolezenska stanja (kot je rak, npr. levkemija in limfom) ali onesnaževalci okolja (1).

Molekularna osnova imunske pomanjkljivosti je raznolika, vendar je celično posredovana imunost glavni povzročitelj številnih opaženih kliničnih znakov. Trenutno sta diagnoza in obvladovanje sindromov imunske pomanjkljivosti odvisna od povzročitelja (2, 3).

Ad hoc obvladovanje je na primer norma pri spremljanju stanja celično posredovane imunske pomanjkljivosti pri osebah, ki so prestale presaditev organov (SOT) in prejemajo zdravila za zaviranje imunskega sistema. Na splošno se stanje imunskega odziva osebe izmeri s spremljanjem farmakoloških ravni zdravil in klinično/patološko oceno funkcije presadka (2, 3).

S številnimi funkcijskimi testi T-celic se izmeri celično posredovana imunost na mitogene, kot so fitohemaglutinin (PHA), mitogen barvilne jagode in konkavalin A (ConA), vendar je z njimi mogoče izmeriti le funkcijsko zmožnost T-celic in so podskupina celic, vključenih v celično posredovano imunost. Vse bolj je znano, da mehanizmi prirojene imunosti močno prispevajo k obrambi gostitelja, bodisi samostojno bodisi z izboljšanjem določenih odzivov T-celic. Funkcijski odzivi celic prirojenega (naravna celica ubijalka [NK]) in pridobljenega (T-celica) imunskega sistema zato skupaj predstavljajo obsežnejšo analizo celično posredovane imunosti (2, 3).

QFM je diagnostični test in vitro, pri katerem se uporablja kombinacija stimulansov (v obliki tabletko LyoSphere™), ki posebej stimulirajo različne vrste celic, vključene tako v prirojenem kot pridobljenem imunskem sistemu. Funkcijsko stanje imunskega sistema osebe se oceni z merjenjem reakcije

na stimulacijo prirojenega in pridobljenega imunskega sistema z agonisti makrofagnih receptorjev (TLR) oziroma agonisti T-celičnih receptorjev (TCR). Zaznavanje interferona gama (IFN- γ) z metodo ELISA omogoča kvalitativno in kvantitativno meritev celično posredovane imunske funkcije.

Princip testa

Pri testu QFM se uporabljajo liofilizirani stimulansi (QFM LyoSpheres™), ki se dodajo heparinizirani polni krvi. Kri se najprej od 16 do 24 ur inkubira, nato se odvzame plazma, ki se testira za prisotnost IFN- γ , ki nastaja kot reakcija na stimulanse.

Test QFM se izvaja v fazah. Najprej se v epruveto za odvzem krvi QFM odvzame polna kri. Nato se v epruveto doda tabletko QFM LyoSphere, ki se nato čim prej, obvezno pa v 8 urah po odvzemu, inkubira pri 37 °C. Po 16- do 24-urnem obdobju inkubacije se epruvete centrifugirajo, odvzame se plazma in s pomočjo metode ELISA se ugotovi količina IFN- γ (posredovana v mednarodnih enotah na mililiter oz. IE/ml), ki se nato primerja z razponom pričakovanih vrednosti za določitev imunskega odziva osebe.

Test QFM omogoča kvalitativno in kvantitativno meritev imunske funkcije. Rezultati QFM morda ne določajo neposredno stopnje oslabiljenosti imunskega sistema.

Količina IFN- γ v vzorcih plazme je lahko pogosto nad zgornjo mejo večine metod ELISA, tudi če imajo posamezniki zmerno oslabiljen imunski sistem. Vzorce plazme je priporočeno razredčiti v razmerju 1 : 10 in/ali 1 : 100 z zeleno raztopino in testirati po metodi ELISA skupaj s čisto plazmo.

Opomba: prag testa QFM se lahko razlikuje glede na stopnjo oslabiljenosti imunskega sistema osebe in posamezne značilnosti presaditve.

Za pojasnila glede interpretacije rezultatov QFM glejte poglavje „Interpretacija rezultatov“ na strani 23 teh navodil za uporabo.

Trajanje testa

V nadaljevanju besedila so navedeni podatki o ocenjenem trajanju testa QFM in o času, ki je potreben za testiranje več vzorcev v seriji.

Inkubacija epruвет z vzorci pri 37 °C: od 16 do 24 ur

ELISA: približno 3 ure za eno ploščo ELISA
(do 88 vzorcev)

< 1 ura dela

še od 10 do 15 minut za vsako dodatno ploščo

Sestavni deli in shranjevanje

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Kataloška številka	0650-0701
Število pripravkov	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 vial
<i>Navodila za uporabo QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
Epruvete za odvzem krvi QuantiFERON Monitor	
Kataloška številka	0650-0101
Število pripravkov	100
Epruvete za odvzem krvi QuantiFERON Monitor (bel pokrovček, bel obroč)	100 epruвет
<i>Navodila za uporabo epruвет za odvzem krvi QuantiFERON Monitor</i>	1

Sestavine kompleta 2 plošč QuantiFERON Monitor ELISA	Komplet 2 plošč ELISA
Kataloška številka	0650-0201
Trakovi mikroplošče, 12 × 8 jamic (prekriti z glodalskim nečloveškim monoklonskim protitelesom IFN- γ)	2 kompleta po 12 × 8-vdolbinskih trakov mikroplošč
IFN- γ Standard, lyophilized (standardni IFN- γ , liofiliziran) (vsebuje rekombinantni človeški IFN- γ , goveji kazein, 0,01 % w/v tiomersala)	1 × steklenička (8 IE/ml ob rekonstituciji)
Green Diluent (zelena raztopina) (vsebuje goveji kazein, normalni mišji serum, 0,01 % w/v tiomersala)	1 × 30 ml steklenička
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (koncentrat konjugata 100×, liofiliziran) (glodalski nečloveški HRP IFN- γ , vsebuje 0,01 % w/v tiomersala)	1 × 0,3 ml ob rekonstituciji
Wash Buffer 20× Concentrate (koncentrat pralnega pufra 20×) (pH 7,2, vsebuje 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (raztopina encimskega substrata) (vsebuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (raztopina za blokiranje encimov) (vsebuje 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
Navodila za uporabo QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Vsebuje žveplovo kislino. Varnostni ukrepi so navedeni na strani 11.

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Inkubator 37 °C; CO₂ ni potreben
- Kalibrirane pipete s spremenljivim volumnom*
- Kalibrirane večkanalne pipete† za oddajanje od 50 do 100 µl s konicami za enkratno uporabo
- Vibrator za mikroplošče†
- Deionizirana ali destilirana voda, 2 litra
- Pralni aparat za mikroplošče (priporočen je avtomatski)
- Bralnik mikroplošč† s filtrom 450 nm in referenčnim filtrom od 620 do 650 nm
- Merilni valj
- Vpojne brisače brez kosmov

Shranjevanje in ravnanje

Epruvete za odvzem krvi

Epruvete za odvzem krvi QFM shranjujte pri temperaturi od 4 do 25 °C. Epruvete morajo imeti v času polnjenja s krvjo in mešanja temperaturo od 17 do 25 °C.

LyoSpheres

Tabletke QFM LyoSpheres shranjujte pri temperaturi od 2 do 8 °C.

Reagenti kompleta ELISA

Reagente kompleta ELISA shranjujte pri temperaturi od 2 do 8 °C.

Raztopine encimskega substrata ne izpostavljajte neposredni sončni svetlobi.

* Zagotovite, da so vsi instrumenti preverjeni in kalibrirani v skladu s priporočili proizvajalca.

Rekonstituirani in odvečni reagenti ELISA

Navodila za rekonstitucijo reagentov ELISA si lahko ogledate v poglavju „2. faza – IFN- γ ELISA“ na strani 17.

- Rok uporabnosti rekonstituiranega standarda kompleta je 3 mesece pri shranjevalni temperaturi od 2 do 8 °C.

Zabeležite si datum rekonstitucije standarda kompleta.

- Po rekonstituciji je treba preostali koncentrat konjugata 100× znova uskladiščiti pri temperaturi od 2 do 8 °C in porabiti v 3 mesecih.

Zabeležite si datum rekonstitucije konjugata.

- Konjugat, pripravljen za uporabo, je treba porabiti v 6 urah po pripravi (glejte preglednico 1).
- Rok uporabe pralnih pufrov, pripravljenih za uporabo in shranjenih pri sobni temperaturi (22 ± 5 °C), je največ 2 tedna.

Previdnosti ukrepi in opozorila

Za diagnostično uporabo *in vitro*

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih. Ti so v priročni in kompaktni obliki PDF na voljo v spletu na naslovu www.qiagen.com/safety, kjer lahko najdete, preberete in natisnete varnostne liste za vse komplete QIAGEN in njihove sestavne dele.

Opozorila

- Test QFM omogoča kvalitativno in kvantitativno meritev imunske funkcije. Rezultati QFM morda ne določajo neposredno stopnje oslabiljenosti imunskega sistema.
- Pri ugotavljanju imunskega stanja pacienta je treba rezultate testa QFM obravnavati v kombinaciji s klinično sliko, zdravstveno anamnezo in drugimi kliničnimi znaki.
- Prag testa QFM se lahko razlikuje glede na stopnjo oslabiljenosti imunskega sistema osebe in posamezne značilnosti presaditve.

Varnostni ukrepi

Le za diagnostično uporabo *in vitro*.



POZOR: s človeško krvjo in plazmo ravnajte, kot da sta kužni. Upoštevajte ustrezna navodila za ravnanje s krvjo in krvnimi pripravki. Vzorce in materiale, ki so bili v stiku s krvjo ali krvnimi pripravki, zavržite v skladu z lokalnimi in nacionalnimi predpisi.

Za sestavne dele QuantiFERON Monitor ELISA veljajo naslednje izjave o tveganju in varnostnih ukrepih.

Izjave o tveganju



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (raztopina za blokiranje encimov QuantiFERON)

Vsebuje: sulfuric acid. Pozor! Lahko je jedko za kovine. Povzroča draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Nositi zaščitne rokavice/ zaščitno obleko/ zaščito za oči/ zaščito za obraz.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (raztopina encimskega substrata QuantiFERON)

Pozor! Povzroča rahlo razdraženost kože. Nositi zaščitne rokavice/ zaščitno obleko/ zaščito za oči/ zaščito za obraz.



QuantiFERON Green Diluent (zelena raztopina QuantiFERON)

Vsebuje: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Vsebuje: tartrazine. Pozor! Lahko povzroči alergijski odziv kože. Nositi zaščitne rokavice/ zaščitno obleko/ zaščito za oči/ zaščito za obraz.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (Pralni pufer (dvajsetkrat koncentriran))

Vsebuje: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki. Preprečiti sproščanje v okolje.

Dodatne informacije

Varnostni listi: www.qiagen.com/safety

- Odmiki od *navodil za uporabo QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* lahko povzročijo nepravilne rezultate. Pred uporabo pozorno preberite navodila.
- **Pomembno:** Pred uporabo preglejte vial. Ne uporabljajte vial Conjugate, IFN- γ Standard ali OQM LyoSphere, ki kažejo znake poškodb ali če gumijasta zaporka ni v brezhibnem stanju. S poškodovanimi vialami ne rokujte. Za odstranjevanje vial upoštevajte primerne varnostne ukrepe. Priporočilo: Uporabite klešče za odtegotanje vial za odpiranje vial Conjugate, IFN- γ Standard ali QFM LyoSphere, da zmanjšate tveganje poškodb zaradi kovinskega navoja.
- Komplet ELISA ne uporabljajte, če steklenica reagenta pred uporabo kaže znake poškodb ali puščanja.
- Ne mešajte ali uporabljajte trakov mikroplošč, standardnega IFN- γ , zelene raztopine ali koncentrata konjugata 100 \times iz različnih serij kompletov QFM ELISA. Ostale reagente (koncentrat pralnega pufra 20 \times , raztopina encimskega substrata in raztopina za blokiranje encimov) lahko uporabljate z več kompleti, če imajo veljavni rok uporabnosti in zabeležene podrobnosti o seriji.
- Reagente in biološke vzorce, ki jih ne potrebujete več, zavržite v skladu z lokalnimi in nacionalnimi varnostnimi in okoljskimi predpisi.
- Uporaba epruвет za odvzem krvi QFM, tabletk QFM LyoSpheres oziroma kompleta QFM ELISA po preteku roka uporabnosti ni dovoljena.
- Preverite, ali je bila laboratorijska oprema pred uporabo kalibrirana/potrjena za uporabo.

Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi

Test QFM se lahko izvaja samo s polno krvjo, odvzeto v epruveto za odvzem krvi z litijevim heparinom ali neposredno v epruveto za odvzem krvi QFM (potreben je 1 ml polne krvi na test). Epruvete za odvzem krvi je treba ustrezno označiti in zabeležiti čas odvzema krvi.

Pomembno: stimulacijo vzorcev krvi QFM (tj. dodana tabletko QFM LyoSphere v enakomerni delež krvi po 1 ml) in njihovo inkubacijo pri 37 °C je treba izvesti v 8 urah po odvzemu krvi.

Do začetka inkubacije je treba vzorec krvi hraniti na sobni temperaturi (22 ± 5 °C).

Optimalni rezultati bodo doseženi ob upoštevanju naslednjih navodil.

1. Epruvete opremite z napisi.

Vsako epruveto za odvzem krvi QFM obvezno opremite s podatki o pacientu in časom odvzema krvi.

2. Vsaki osebi odzemite po 1 ml venozne krvi neposredno v epruveto za odvzem krvi QFM. Ta postopek mora opraviti usposobljeni flebotomist.

Pomembno: epruvete morajo imeti v času polnjenja s krvjo temperaturo 17–25 °C.

Epruvete za odvzem krvi QFM se lahko uporablja na nadmorskih višinah do 810 metrov.

Ker se epruveta za odvzem relativno počasi napolni z 1 ml krvi, pustite epruveto po na videz dokončanem polnjenju še 2–3 sekunde na igli. Tako zagotovite odvzem potrebne količine krvi.

Črna oznaka na stranskem robu epruvete za odvzem krvi QFM je črta polnjenja 1 ml. Epruvete za odvzem krvi QFM so izdelane za odvzem 1 ml ± 10 % krvi in v tem razponu zagotavljajo optimalne rezultate. Če je raven krvi zunaj indikatorske črte, je treba odvzeti nov vzorec krvi.

Pri uporabi metuljkov za odvzem krvi je treba s pomočjo prazne epruvete za odvzem krvi poskrbeti za to, da bo pred namestitvijo epruget za odvzem krvi QFM zagotovljena napolnjenost cevnega spoja.

Če uporabljate epruvete za odvzem krvi QFM na nadmorski višini več kot 810 metrov ali je volumen odvzete krvi premajhen, izvedite odvzem krvi z injekcijsko brizgalko in nato 1 ml takšne krvi takoj prenesite v epruveto za odvzem krvi QFM. Iz varnostnih razlogov je najbolje, če pri tem odstranite injekcijsko iglo, zagotovite običajne previdnostne ukrepe, odstranite pokrovček z epruvete za odvzem krvi QFM in jo napolnite z 1 ml krvi (do središča črne oznake na stranskem robu epruvete). Nato znova namestite pokrovček in premešajte, kot je opisano spodaj.

Če se uporablja preveza, jo je treba zrahljati takoj, ko je igla vstavljena v veno, da se preprečijo odkloni v pritisku, ki bi lahko vplivali na volumen krvi.

Kri je mogoče odvzeti tudi v generično epruveto za odvzem krvi, ki vsebuje antikoagulant litijev heparin, in jo nato prenesti v epruveto za odvzem krvi QFM. Kot krvni antikoagulant uporabite le litijev heparin, saj drugi antikoagulant ovirajo analizo. Napolnite epruveto za odvzem krvi (najmanjši volumen 3 ml) in jo nežno premešajte, tako da jo večkrat obrnete, da se heparin raztopi. Pred prenosom v epruveto za odvzem krvi QFM za stimulacijo s tabletko QFM LyoSphere je treba kri hraniti na sobni temperaturi (22 ± 5 °C). Zagotovite, da je kri temeljito premešana, tako da jo tik pred razdelitvijo nežno obrnete. V epruveto za odvzem krvi QFM razdelite enakomerni delež krvi po 1 ml. Razdelitev izvedite aseptično z upoštevanjem običajnih varnostnih postopkov – odstranite pokrovček z epruvete za odvzem krvi QFM in jo napolnite z 1 ml krvi (do središča črne oznake na stranskem robu epruvete). Nato ponovno namestite pokrovčke in premešajte, kot je opisano spodaj.

3. Takoj ko epruvete napolnite, jih večkrat nežno obrnite, da se heparin raztopi.

Pomembno: premočno stresanje lahko povzroči motnje gela in privede do napačnih rezultatov.

4. Tik pred uporabo postavite vialo QFM LyoSpheres na sobno temperaturo (22 ± 5 °C).

5. Aseptično dodajte eno tabletko QFM LyoSphere v 1 ml krvi.

Odstranite pokrovček z epruvete za odvzem krvi.

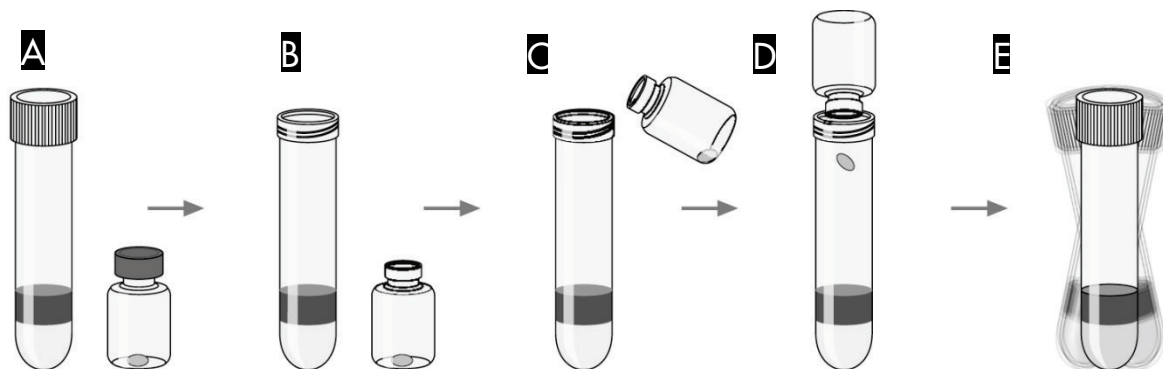
Z vialo QFM LyoSphere nežno potrkaite po trdi površini, da zagotovite, da je tabletko QFM LyoSphere na dnu vialo. Odstranite pokrovček z vialo QFM LyoSphere, tako da najprej odstranite kovinski navoj in nato še gumijasto zaporko.

Tabletko QFM LyoSphere previdno spustite v 1 ml krvi, pri čemer ustje steklene vialo poravnate z ustjem epruvete za odvzem krvi QFM, nato vialo nežno obrnite, da prenesete tabletko QFM LyoSphere v epruveto za odvzem krvi QFM (glejte sliko 1).

Pomembno: če tabletko QFM LyoSphere pade mimo epruvete za odvzem krvi QFM, jo zavržite in odprite novo vialo QFM LyoSphere.

Pomembno: vialo QFM LyoSphere ne puščajte odprte dlje časa. Tabletko QFM LyoSphere je treba dodati v kri takoj, ko odstranite pokrovček z vialo.

Če tabletko QFM LyoSpheres dodate v kri, ki je bila odvzeta v epruveto za odvzem krvi QFM, namestite pokrovčke epruвет nazaj na ustrezne vzorce.



Slika 1. Dodajanje tabletko QFM LyoSphere. **A** Epruveta za odvzem krvi QFM in viala QFM LyoSphere. **B** Odstranite pokrovček z epruvete za odvzem krvi QFM ter odstranite kovinski navoj in gumijasto zaporko z viala QFM LyoSphere. **C** Takoj dodajte tabletko QFM LyoSphere v kri, tako da ustje steklene viala poravnate z ustjem epruvete za odvzem. **D** Nato nežno obrnite vialo, da prenesete tabletko LyoSphere v epruveto za odvzem. **E** Namestite pokrovček na epruveto za odvzem krvi QFM in jo pet- (5) do desetkrat (10) pretresite.

6. Namestite pokrovček na epruveto za odvzem krvi QFM in jo pet- (5) do desetkrat (10) dovolj močno pretresite, da se tabletko QFM LyoSphere popolnoma raztopi.

Če se tabletko QFM LyoSphere prilepi na notranjo površino epruvete, jo raztopite tako, da jo prekrijete s krvjo in hkrati obračate epruveto.

Ko dodate tabletko QFM LyoSphere v epruveto, obvezno namestite pokrovček, s čimer preprečite, da bi bila v isto epruveto pomotoma dodana še ena tabletko LyoSphere.

Opomba: tabletko QFM LyoSphere je bele barve, zato po raztopitvi v krvi ni več vidna.

Pomembno: premočno stresanje lahko povzroči motnje gela in privede do napačnih rezultatov.

7. Ko dodate in raztopite tabletko QFM LyoSphere, je treba epruveto za odvzem krvi QFM čim prej, obvezno pa v 8 urah po odvzemu krvi, prenesti v inkubator (37 ± 1 °C).

Navodilo za uporabo

1. faza – inkubacija vzorca krvi in odvzem plazme

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

- Epruvete za odvzem krvi QFM (glejte poglavje „Sestavni deli in shranjevanje“, stran 6)

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Glejte poglavje „Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo“, stran 8

Postopek

1. **Epruvete za odvzem krvi QFM z enakovrednimi deleži krvi po 1 ml s tabletkami QFM LyoSphere inkubirajte v POKONČNEM položaju od 16 do 24 ur pri 37 ± 1 °C.**

Opomba: CO₂ ali vlaženje pri tem nista potrebna.

Po inkubaciji lahko epruvete za odvzem krvi QFM hranite pri temperaturi 4–27 °C največ 3 dni pred centrifugiranjem.

2. **Po inkubaciji epruvete za odvzem krvi QFM 15 minut centrifugirajte pri od 2000 do 3000 × g (RCF), s čimer se omogoči odvzem plazme. Celice se ločijo od plazme. Če se to ne zgodi, ponovite centrifugiranje epruвет.**

Odvzem plazme je mogoč tudi brez centrifugiranja, vendar je treba pri tem postopati zelo previdno, ker se lahko pri odvzemu celice vzvrtinčijo.

3. **Vzorci plazme odvezemajte le s pomočjo pipete.**

Pomembno: po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvzemanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.

Vzorci plazme je mogoče iz epruвет za odvzem krvi QFM prenesti neposredno v ploščo QFM ELISA, tudi pri uporabi avtomata ELISA.

Vzorci plazme je mogoče do 28 dni hraniti pri temperaturi 2–8 °C oziroma dalj časa pri temperaturi, nižji od –20 °C, če se plazma odvzame. Enakovredne deleže odvzetih vzorcev plazme je treba pred shranjevanjem dobro zapreti.

Odvzemite vsaj 150 µl plazme, da omogočite ponovno testiranje (če je potrebno).

Količina IFN- γ v vzorcih plazme je lahko pogosto nad zgornjo mejo večine metod ELISA, tudi če imajo posamezniki zmerno oslabilen imunski sistem. Vzorce plazme je priporočeno razredčiti v razmerju 1 : 10 in/ali 1 : 100 z zeleno raztopino in testirati po metodi ELISA skupaj s čisto plazmo (glejte „2. faza – IFN- γ ELISA“).

2. faza – IFN- γ ELISA

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

- Komplet 2 plošč QuantiFERON Monitor ELISA (glejte poglavje „Sestavni deli in shranjevanje“, stran 6)

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Glejte poglavje „Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo“, stran 8

Priprava

Količina IFN- γ v plazmi je lahko pogosto nad zgornjo mejo večine metod ELISA, tudi če imajo posamezniki zmerno oslabiljen imunski sistem.

Priporočeno: vzorce plazme razredčite v razmerju 1 : 10 in/ali 1 : 100 z zeleno raztopino in testirajte po metodi ELISA skupaj s čisto plazmo.

V primerih, ko ima pacient zelo oslabiljen imunski sistem, sta priprava in testiranje le čiste plazme lahko dovolj za pridobitev kvantitativnega rezultata.

Opomba: vzorčne rezultate, ki so v razponu metode QFM ELISA (tj. do 10 IE/ml), je treba uporabiti za interpretacijo rezultatov. Če je čista plazma nad razponom metode QFM ELISA, je treba kot posredovani rezultat (z upoštevanjem faktorja redčenja) uporabiti najnižje redčenje, ki generira rezultat v razponu metode QFM ELISA.

Postopek

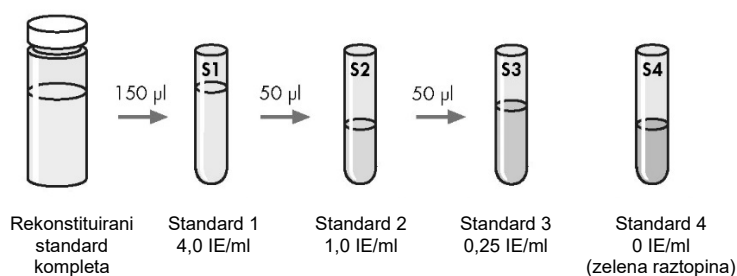
- 1. Vsi vzorci plazme in reagentov z izjemo koncentrata konjugata 100 \times morajo pred uporabo doseči sobno temperaturo (22 \pm 5 $^{\circ}$ C). Za ta proces načrtujte najmanj 60 minut.**
- 2. Iz okvira mikroplošče odstranite nepotrebne trakove, jih pospravite nazaj v folijsko embalažo in jih do uporabe shranjujte v hladilniku.**
Zagotovite vsaj en trak za standarde QFM in zadostno število trakov za število testiranih oseb. Po uporabi okvir in pokrov shranite za uporabo z ostalimi trakovi.
- 3. Rekonstituirajte liofilizirani IFN- γ s količino deionizirane ali destilirane vode, ki je navedena na etiketi stekleničke standarda. Previdno premešajte stekleničko (da se vsebina čim manj peni) in preverite, ali se je vsebina popolnoma razpustila. Rekonstruiranje standarda na navedeni volumen izkazuje raztopino s koncentracijo 8,0 IE/ml.**
Pomembno: rekonstituiran volumen standarda IFN- γ se med serijami razlikuje. Za ustrezno količino deionizirane ali destilirane vode glejte etiketo vial standarda.

Uporabite rekonstituiran standard kompleta za izdelavo 1 od 2 serij, ki ji sledi 1 od 4 serij raztopine IFN- γ v zeleni raztopini (GD) (glejte sliko 2).

S1 (standard 1) vsebuje 4,0 IE/ml, S2 (standard 2) vsebuje 1,0 IE/ml, S3 (standard 3) vsebuje 0,25 IE/ml in S4 (standard 4) vsebuje 0 IE/ml (samo GD). Standardi morajo biti analizirani podvojeno. Za vsak postopek ELISA izdelajte novo razredčilo standarda kompleta.

Priporočen postopek za podvojene standarde

- a. 4 epruvete opremite z napisi „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- b. Dodajte 150 µl GD v S1, S2, S3 in S4.
- c. Dodajte 150 µl standarda kompleta v S1 in skrbno premešajte.
- d. Prenesite 50 µl iz S1 v S2 in skrbno premešajte.
- e. Prenesite 50 µl iz S2 v S3 in skrbno premešajte.
- f. Zelena raztopina (GD) velja kot nični standard (S4).



Slika 2. Izdelava standardne krivulje.

4. Rekonstituirajte liofiliziran koncentrat konjugata 100× z 0,3 ml deionizirane ali destilirane vode. Previdno premešajte stekleničko, da je penjenja čim manj, in preverite, ali se je konjugat popolnoma razpustil.

Konjugat je pripravljen za uporabo, ko potrebno količino rekonstituiranega 100× koncentrata razredčite v zeleni raztopini za redčenje (preglednica 1. Priprava konjugata). Koncentrat konjugata 100×, ki ga ne potrebujete, takoj po uporabi shranite pri temperaturi od 2 do 8 °C. Kot razredčilo uporabljajte samo zeleno raztopino za redčenje.

Preglednica 1. Priprava konjugata

Število trakov	Količina koncentrata konjugata 100×	Količina zelene raztopine
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. Vzorce plazme, ki jih odvzamete iz epruвет za odvzem krvi in nato shranite ali zamrznete, pred dodajanjem v vdolbino ELISA premešajte.

Pomembno: če vzorce plazme dodate neposredno iz centrifugiranih epruвет QFM, kakršno koli mešanje plazme ni primerno. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.

6. Priporočeno: vzorce plazme razredčite v razmerju 1 : 10.

- Dodajte 90 µl zelene raztopine (GD) v epruветo, ki je opremljena s podatki o pacientu in razmerju „1 : 10“.
- Nato dodajte 10 µl zmešanih vzorcev plazme (podrobnosti o zmešanih vzorcih plazme v primerjavi z vzorci, ki so dodani neposredno iz centrifugiranih epruвет QFM, najdete v 5. koraku).
- Skrbno premešajte s pipeto in pri tem pazite, da se vsebina čim manj peni.

7. Priporočeno: vzorce plazme razredčite v razmerju 1 : 100.

- Pripravite raztopino v razmerju 1 : 10 (glejte 6. korak zgoraj).
- Dodajte 90 µl zelene raztopine v epruветo, ki je opremljena s podatki o pacientu in razmerju „1 : 100“.
- Dodajte 10 µl raztopine v razmerju 1 : 10.

- Skrbno premešajte s pipeto in pri tem pazite, da se vsebina čim manj peni.

Priporočeno: naslednje vzorce testirajte vzporedno in v tem zaporedju:

- Nerazredčeno, 1 : 10, 1 : 100

Programska oprema za analizo QFM podpira tudi naslednje možnosti vzorcev oseb:

- Nerazredčeno
- 1 : 10
- 1 : 100
- 1 : 10, 1 : 100
- Nerazredčeno, 1 : 10

- 8. Z večkanalno pipeto dodajte v vdolbine ELISA po 50 µl sveže pripravljenega konjugata.**
- 9. Z večkanalno pipeto dodajte v ustrezne vdolbine po 50 µl testnega vzorca plazme. Nato dodajte še po 50 µl vsakega od standardov od 1 do 4. Standarde analizirajte podvojeno.**
- 10. Vsako ploščo pokrijte s pokrovom ter konjugat in vzorce plazme/standarde 1 minuto skrbno mešajte v vibratorju za mikroplošče. Preprečite škropljenje.**
- 11. 120 ± 5 minut inkubirajte pri sobni temperaturi (22 ± 5 °C).**
- 12. Med inkubacijo razredčite 1 del koncentrata pralnega pufra 20× z 19 deli deionizirane ali destilirane vode in skrbno premešajte. Ob dobavi je priloženega dovolj koncentrata pralnega pufra 20× za izdelavo 2 litrov pralnega pufra, pripravljenega za uporabo.**

Vdolbine najmanj 6-krat operite v pralnem aparatu za mikroplošče s 400 µl pralnega pufra, pripravljenega za uporabo. Priporočamo uporabo pralnega avtomata za mikroplošče.

Temeljito pranje je zelo pomembno za učinkovitost testiranja. Pri vsakem pralnem ciklusu preverite, ali so vdolbine **popolnoma napolnjene** s pralnim pufrom. Priporočeno: če želite doseči najboljše rezultate, med vsakim ciklusom izvedite namakanje, ki naj traja vsaj 5 sekund.

V lovilno posodo za odpadno tekočino dodajte standardno razkužilo, ki se uporablja v laboratorijih, in upoštevajte navodila za dekontaminacijo potencialno kužnega materiala, ki veljajo v vašem laboratoriju.

- 13. Plošče z vdolbinami, obrnjenimi navzdol, potresite nad brisačo z malo bombažnih vlaken in tako odstranite ostanke pralnega pufra. V vsako vdolbino nato dodajte 100 µl raztopine za blokiranje encimov, pokrijte vsako ploščo s pokrovom in premešajte ploščo v vibratorju.**
- 14. 30 minut inkubirajte pri sobni temperaturi (22 ± 5 °C).**
Med inkubacijo morajo biti plošče zaščitene pred neposrednimi sončnimi žarki.
- 15. Po inkubaciji v vsako vdolbino dodajte 50 µl raztopine za blokiranje encimov in ploščo dobro premešajte vibratorju.**
Raztopino za blokiranje encimov dodajajte v vdolbine v enakem zaporedju in približno enako hitro kot raztopino encimskega substrata v 13. koraku.
- 16. Z bralnikom mikroplošč izmerite optično gostoto (OD) v 5 minutah po dodajanju raztopine za blokiranje – pri tem uporabljajte filter s 450 nm in tudi referenčni filter z od 620 do 650 nm. Za izračunavanje rezultatov se uporabijo vrednosti OD.**

Izračunavanje in interpretacija rezultatov

Programska oprema za analizo QuantiFERON Monitor se uporablja za analizo surovih podatkov in za izračun rezultatov. Na voljo je na spletnem mestu www.QuantiFERON.com. Uporabite najnovejšo različico programske opreme QuantiFERON Monitor za analizo.

Programska oprema izvaja kontrolno oceno kakovosti testiranja, izdelava standardno krivuljo in za vsako testirano osebo posreduje rezultat, kot je opisano v poglavju „Interpretacija rezultatov“.

Če je čista plazma nad razponom (tj. > 10 IE/ml) metode QFM ELISA, programska oprema za analizo QuantiFERON Monitor posreduje najnižje redčenje, ki generira rezultat v razponu metode QFM ELISA (z upoštevanjem faktorja redčenja).

Alternativno uporabi programske opreme QuantiFERON Monitor za analizo podatkov se lahko rezultati izračunavajo tudi po spodaj opisani metodi.

Izdelava standardne krivulje

(Če ne uporabljate programske opreme za analizo QuantiFERON Monitor)

Ugotovite srednje vrednosti OD pri ponovitvah standarda kompleta na vsaki plošči.

Izdelajte standardno krivuljo $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ z grafičnim prikazom srednje vrednosti OD $\log_{(e)}$ (y-os) proti $\log_{(e)}$ koncentracije standarda IFN- γ v IE/ml (x-os); nični standard pri tem izpustite. S pomočjo regresivne analize izračunajte linijo, ki se oblikovno najbolj prilagaja standardni krivulji.

S pomočjo standardne krivulje izračunajte koncentracije IFN- γ (IE/ml) za vsak testirani vzorec plazme, pri čemer uporabite vrednost OD vsakega vzorca.

Za te izračune lahko uporabljate pakete programske opreme, ki so v ponudbi za bralnike mikroplošč, oziroma standardne programe z razpredelnicami ali statistične programe (na primer Microsoft® Excel®). Uporabo teh paketov programske opreme priporočamo za izračunavanje regresijske analize in variacijskih koeficientov (% CV) za standard ter korelacijskih koeficientov (r) za standardno krivuljo.

Če je čista plazma nad razponom metode QFM ELISA, je treba kot posredovani rezultat uporabiti najnižje redčenje, ki generira rezultat v razponu metode QFM ELISA (z upoštevanjem faktorja redčenja).

Kontrola kakovosti

Pravilnost testnih rezultatov je odvisna od izdelave pravilne standardne krivulje. Zato je treba rezultate, ki so pridobljeni s standardi, preveriti pred interpretiranjem testnih rezultatov.

ELISA velja, če so izpolnjeni vsi naslednji kriteriji:

- Srednja vrednost OD standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.
- % CV repliciranih vrednostih OD standarda 1 in standarda 2 mora biti $\leq 15\%$.
- Replicirane vrednosti OD standarda 3 in standarda 4 ne smejo za več kot 0,040 enote OD odstopati od srednje vrednosti vsakega od njiju.
- Korelacijski koeficient (r), izračunan iz srednjih absorpcijskih vrednosti, mora biti $\geq 0,98$.

Programska oprema za analizo QuantiFERON Monitor izračuna parametre kontrole kakovosti in o njih poroča.

Če ti kriteriji niso izpolnjeni, je test neveljaven in ga je treba ponoviti.

Srednja vrednost OD ničnega standarda (zelena raztopina) mora biti $\leq 0,150$. Če je srednja vrednost OD $> 0,150$, priporočamo, da preverite postopek za pranje plošč.

Interpretacija rezultatov

Rezultati QFM se interpretirajo na podlagi reakcije IFN- γ na stimulanse prirojene in pridobljene imunosti. Test QFM omogoča kvalitativno in kvantitativno meritev imunske funkcije. Rezultati QFM morda ne določajo neposredno stopnje oslabiljenosti imunskega sistema.

Pomembno: pri ugotavljanju imunskega stanja osebe je treba izmerjeno stopnjo IFN- γ obravnavati v kombinaciji s klinično sliko, zdravstveno anamnezo in drugimi diagnostičnimi ocenami (preglednica 2). Prag testa QFM se lahko razlikuje glede na stopnjo oslabiljenosti imunskega sistema osebe in posamezne značilnosti presaditve.

Preglednica 2. Interpretacija rezultatov

Rezultat QFM za IFN- γ (IE/ml)	Klasifikacija	Interpretacija
< 15	Majhna	Oseba ima majhno reakcijo IFN- γ na stimulanse prirojene in pridobljene imunosti
15–1000	Zmerna	Oseba ima zmerno reakcijo IFN- γ na stimulanse prirojene in pridobljene imunosti
> 1000	Velika	Oseba ima veliko reakcijo IFN- γ na stimulanse prirojene in pridobljene imunosti

Če je izmerjena stopnja IFN- γ vzorca čiste plazme manj kot 0,1 IE/ml:

- Prepričajte se, da je bila tabletko QFM LyoSphere dodana v vzorec krvi in epruveta inkubirana v skladu s temi navodili za uporabo.
- Prepričajte se, da se rezultat IFN- γ ujema s trenutnim zdravstvenim stanjem osebe.

Pri domnevnih tehničnih težavah pri odvzemu krvi ali med rokovanjem z vzorci je treba celoten test QFM ponoviti z novim vzorcem krvi. Če sumite na odstopanje prvega testa od postopka, ki je opisan v teh navodilih za uporabo (za podrobnosti glejte razdelek Kontrola kakovosti), ponovite test ELISA za stimulirane vzorce plazme.

Če rezultati niso skladni s trenutnim zdravstvenim stanjem osebe, bo zdravnik morda želel test ponoviti.

Omejitve postopka

Rezultate testa QFM je treba obravnavati v kombinaciji z zdravstveno anamnezo vsakega pacienta, njegovim trenutnim zdravstvenim stanjem in drugimi diagnostičnimi ocenami. Posamezni laboratoriji bodo morda določili lastne razpone za analizo.

Poleg tega bo v laboratorijih vzporedno z vzorci pacienta morda pregledan ločen kontrolni vzorec, odvzet zdravi osebi.

Vzroki za nezanesljive ali nejasne rezultate so lahko naslednji:

- Neustrezen krvni antikoagulant – uporabite le litijev heparin, saj drugi antikoagulanti ovirajo analizo.
- Odstopanja od postopka, ki je opisan v navodilih za uporabo.

- Čezmerne ravni kroženja IFN- γ ali prisotnost heterofilnih protiteles.
- Prekoračenje 8-urnega roka med odvzemom vzorca krvi in inkubacijo pri 37 °C.
- Premalo ali preveč napolnjene epruvete za odvzem krvi QFM (tj. zunaj razpona od 0,9 do 1,1 ml).

Značilnosti

Klinične študije

Izvedeni sta bili dve klinični študiji za ocenitev reakcij navidezno zdravih oseb (n = 114) v primerjavi s prejemniki presadkov (n = 30). Od prejemnikov presadkov jih je bilo 18 v skupini zgodnjega obdobja po presaditvi (Early Post-Tx, v 3 mesecih po presaditvi) in 12 v skupini poznega obdobja po presaditvi oziroma stabilnega stanja (Late Post-Tx, več kot 12 mesecev po presaditvi).

- Vsakemu pacientu v kategoriji Early Post-Tx (skupina 3-mesečnega obdobja po presaditvi, n = 64 vzorcev) so bili vzorci odvzeti do največ petkrat.
- Vsakemu pacientu v kategoriji Late Post-Tx (skupina poznega obdobja po presaditvi, n = 12 vzorcev) so bili vzorci odvzeti enkrat.
- Vsakemu pacientu v skupini navidezno zdravih oseb (n = 114 vzorcev) so bili vzorci odvzeti enkrat.

V vzorcih kategorije Early Post-Tx (zgodnje obdobje po presaditvi) in kategorije Late Post-Tx (pozno obdobje po presaditvi) so bile opažene majhne in zmerne reakcije na test QFM. V kategoriji Early Post-Tx (zgodnje obdobje po presaditvi) sta bila opažena višji odstotek majhnih reakcij (93,8 %) in nižji odstotek zmernih reakcij (6,3 %) v primerjavi z reakcijami v kategoriji Late Post-Tx (pozno obdobje po presaditvi), v kateri je bilo opaženih 25 % majhnih reakcij in 66,7 % zmernih reakcij (preglednica 3). V kategoriji Early Post-Tx (zgodnje obdobje po presaditvi) ni bila opažena nobena velika reakcija, v vzorcih kategorije Late Post-Tx (pozno obdobje po presaditvi) pa le ena velika reakcija (8,3 %). V skupini navidezno zdravih oseb so bile večinoma opažene zmerne (83,3 %) in velike (15,8 %) reakcije na test QFM (preglednica 3).

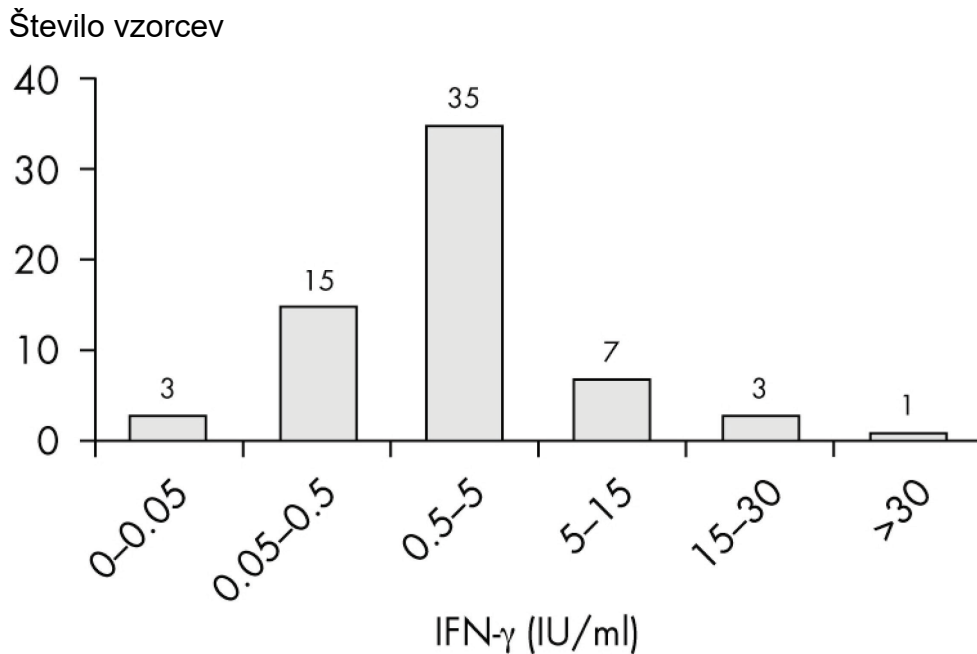
Preglednica 3. Razpon reakcij QFM pri navidezno zdravih osebah v primerjavi s prejemniki presadkov

IFN- γ (IE/ml)	Kategorija rezultatov	Zgodnje obdobje po presaditvi (%)* 95 % CI n	Pozno obdobje po presaditvi (%)* 95 % CI n	Navidezno zdrave osebe (%)* 95 % CI n	Skupni rezultati
< 15	Majhna	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	Zmerna	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	Velika	0,0 % 0–5,7 n = 0	8,3 % 1,5–35,4 n = 1	15,8 % 10,2–23,6 n = 18	19
Skupno št. vzorcev		64	12	114	190

* Odstotki označujejo delež vzorcev v posamezni skupini darovalcev, ki so znotraj določenega razpona reakcij.

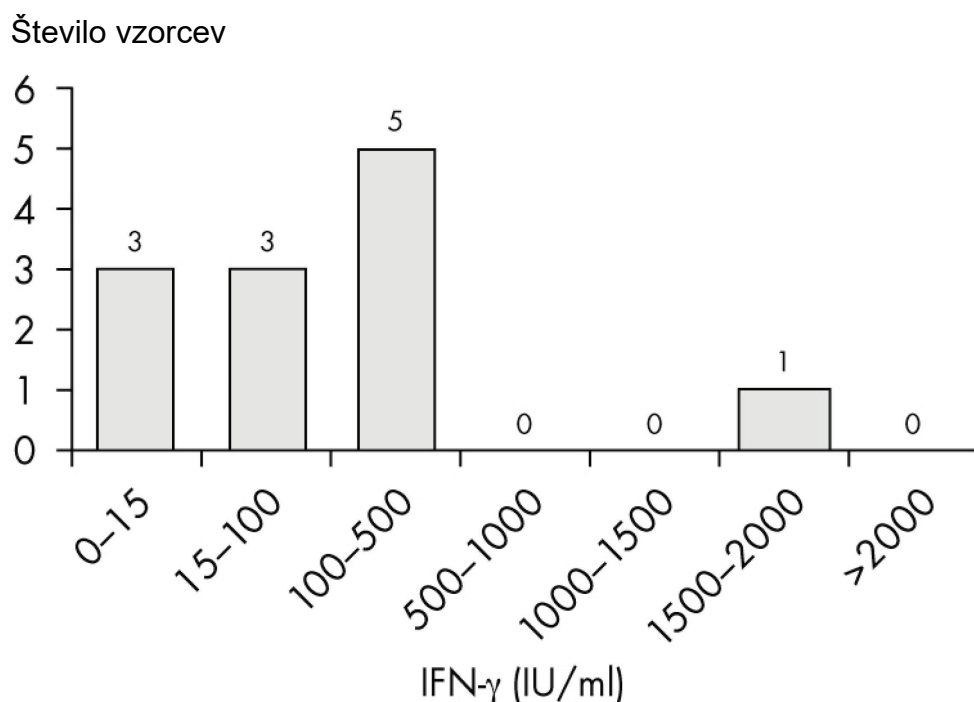
Pričakovane vrednosti

Porazdelitev reakcij IFN- γ na test QFM pri pacientih v zgodnjem obdobju po presaditvi (do 3 mesece po presaditvi) je bila ugotovljena iz 64 vzorcev, odvzetih 18 prejemnikom presadkov z metodo QFM ELISA (slika 3).



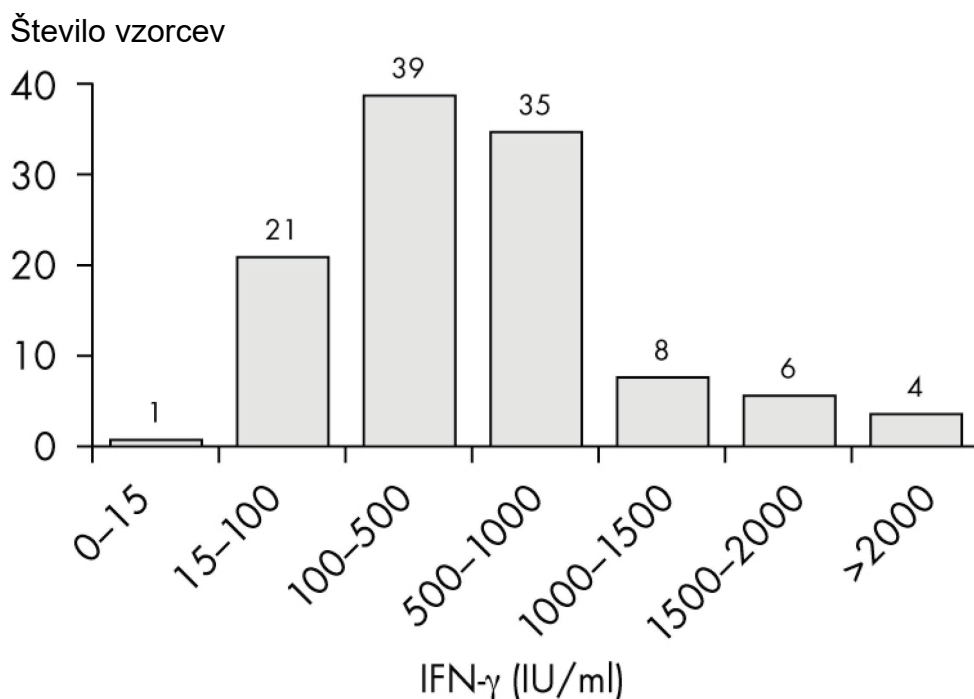
Slika 3. Porazdelitev reakcij IFN- γ na test QFM pri pacientih v zgodnjem obdobju po presaditvi (n = 64; mediana = 1,5 IE/ml).

Porazdelitev reakcij IFN- γ na test QFM pri pacientih v poznem obdobju po presaditvi (več kot 12 mesecev po presaditvi) je bila ugotovljena iz 12 vzorcev z metodo QFM ELISA (slika 4).



Slika 4. Porazdelitev reakcij IFN- γ na test QFM pri pacientih v poznem obdobju po presaditvi (n = 12; mediana = 98,8 IE/ml).

Porazdelitev reakcij IFN- γ na test QuantiFERON Monitor pri navidezno zdravih osebah je bila ugotovljena iz 114 vzorcev z metodo QFM ELISA (slika 5).



Slika 5. Porazdelitev reakcij IFN- γ na test QFM pri navidezno zdravih osebah (n = 114; mediana = 400,5 IE/ml).

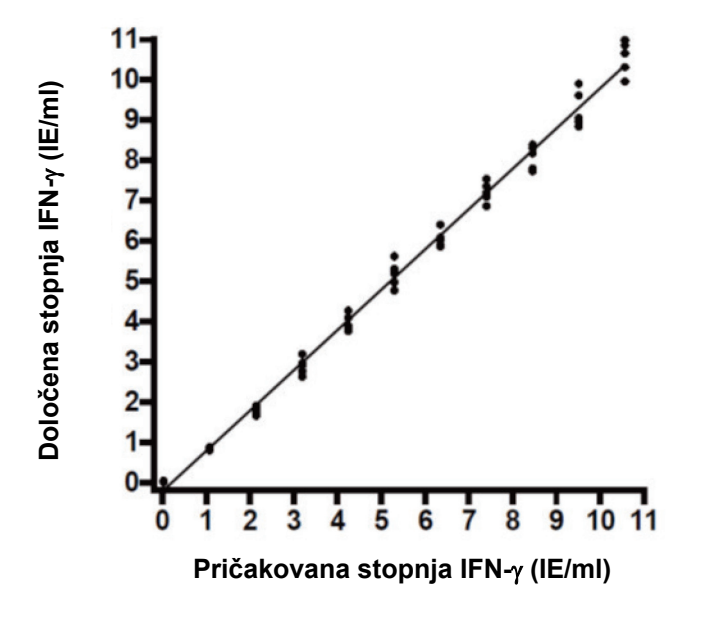
Reakcije QFM pri pacientih s presajenimi organi

Test QFM je bil ocenjen v opazovalni, presečni študiji pacientov s presajenimi organi (4). V študijo je bilo vključenih: 212 zdravih oseb s kontrolno podskupino 30 oseb, razvrščenih glede na starost in spol, 30 pacientov v obdobju pred presaditvijo, 18 pacientov v zgodnjem obdobju po presaditvi (66 vzorcev; povprečen čas po presaditvi = 21 dni) in 11 pacientov v poznem obdobju po presaditvi (povprečen čas po presaditvi = 2290 dni). Povprečna produkcija IFN- γ je bila 555,2 IE/ml v kontrolnih skupinah zdravih oseb in 614,6 IE/ml v kontrolnih skupinah oseb, razvrščenih glede na starost in spol. Povprečna produkcija IFN- γ je bila izrazito manjša pri pacientih v obdobju pred presaditvijo (IFN- γ = 89,3 IE/ml) in pacientih v zgodnjem obdobju po presaditvi (IFN- γ = 3,76 IE/ml) v primerjavi s kontrolnimi skupinami oseb, razvrščenih glede na starost in spol ($p < 0,001$). Pri pacientih v poznem obdobju po presaditvi (povprečje IFN- γ = 256,1 IE/ml) je bilo mogoče opaziti izrazito večjo povrnitev imunske funkcije kot pri pacientih v zgodnjem obdobju po presaditvi ($p < 0,05$). Podatki iz te študije kažejo, da se lahko test QFM uporablja za ocenitev celično posredovane imunske funkcije pri populaciji s presajenimi organi, ki prejema imunosupresivno terapijo.

Značilnosti izvedbe testa

QFM ELISA je dokazano linearna z naključno postavitvijo 5 replikacij 11 skupin znanih koncentracij IFN- γ na ploščo ELISA. Linearna črta regresije ima nagib $1,002 \pm 0,011$ in koeficient korelacije 0,99 (slika 6).

Meja zaznavanja QFM ELISA je 0,065 IE/ml in ni opaziti krivulje zaradi visoke koncentracije (prozonski učinek) pri koncentracijah IFN- γ do 10.000 IE/ml.



Slika 6. Profil linearnosti QFM ELISA, določen pri testiranju 5 reprodukcij 11 vzorcev plazme z znanimi koncentracijami IFN- γ .

Zmožnost reprodukcije testa QFM (1. faza) je bila določena z vzorci krvi 20 zdravih oseb. Ocenjeni so bili trije različni ponudniki, serije QFM LyoSphere in paketi opreme. Povprečen variacijski koeficient stopenj reakcij IFN- γ , določen z metodo QFM ELISA v vseh treh serijah QFM LyoSpheres in vseh treh testiranih pogojih, je bil 22,22 % (95 % CI: 17,20–27,25).

Zmožnost ponovitve testa QFM (1. faza) je bila ocenjena z merjenjem variabilnosti 5–6 ponovitev stimulacije krvi s tabletko QFM LyoSphere pri istem darovalcu v skupini 14 oseb. Povprečen variacijski koeficient v skupini 14 testiranih oseb je bil 14,7 % (95 % CI: 10,2–19,2). Koeficient % CV posameznih oseb je bil manj kot 30 %.

Zmožnost reprodukcije metode QFM ELISA (2. stopnja) je bila ocenjena s testiranjem 20 vzorcev plazme z različnimi koncentracijami IFN- γ s 3 replikacijami, v 3 laboratorijih, v 3 ne-zaporednih dneh in pri 3 ponudnikih. Vsak vzorec je bil tako testiran 27-krat, v 9 neodvisnih testiranjih. En vzorec je bil nična kontrola z izračunano koncentracijo IFN- γ 0,08 IE/ml (95 % CI: 0,07–0,09). Od preostalih 19 vzorcev plazme so bile koncentracije v razponu od 0,33 (95 % CI: 0,31–0,34) do 7,7 IE/ml (95 % CI: 7,48–7,92).

Intra-testna nenatančnost ali nenatančnost znotraj testiranja je bila izračunana s povprečkom % CV za vsako testno plazmo z IFN- γ v vsakem testiranju (n = 9) v razponu nenatančnosti od 4,1 do 9,1 % CV. Povprečje znotraj testiranja %CV (\pm 95 % CI) je bilo $6,6 \pm 0,6$ %. Povprečje ničelne IFN- γ plazme je bilo 14,1 % CV.

Skupna nenatančnost ali nenatančnost med testi je bila določena s primerjavo 27 izračunanih koncentracij IFN- γ za vsak vzorec plazme. Nenatančnost med testi je bila v razponu od 6,6 do 12,3 % CV. Skupno povprečje %CV (\pm 95 % CI) je bilo $8,7 \pm 0,7$ %. Povpreček ničelne IFN- γ plazme je bil 26,1 %CV. Ta stopnja odklona je pričakovana, ker je izračunana koncentracija IFN- γ nizka, tako da bo odklon okoli nizke ocenjene koncentracije večji kot pri višjih koncentracijah.

Tehnične informacije

Vzorci strjene plazme

Če se med dolgotrajnim shranjevanjem vzorcev plazme pojavijo fibrinski strdki, vzorce centrifugirajte do usedline strjenega materiala in s tem olajšajte pipetiranje plazme.

Navodila za odpravljanje težav

Ta navodila za odpravljanje težav vam lahko pomagajo pri odpravljanju morebitnih težav. Več lahko izveste v okviru tehničnih informacij, ki so na voljo na spletnem mestu www.QuantiFERON.com. Kontaktne informacije najdete na hrbtni platnici.

ELISA – odpravljanje težav

Razvoj nespecifične barve

Možen vzrok	Rešitev
a) Ne zadostno pranje plošče	Ploščo operite najmanj 6-krat s 400 µl pufru na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebnih več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje.
b) Navzkrižna kontaminacija vdolbin ELISA	Med pipetiranjem in mešanjem vzorcem ravnajte previdno, da zmanjšate tveganje.
c) Pretečen rok uporabnosti kompleta/ sestavin kompleta	Komplet uporabite, preden mu poteče rok. Rekonstituirani standard in koncentrat konjugata 100× morate porabiti v 3 mesecih po datumu rekonstitucije.
d) Kontaminirana raztopina encimskega substrata	Modrikasto obarvan substrat zavržite. Poskrbite, da bodo uporabljeni čisti rezervoarji reagentov.
e) Mešanje plazme v epruveh QFM pred odvzemom	Po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvzemanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.

Nizke vrednosti optične gostote za standarde

Možen vzrok	Rešitev
a) Napaka pri redčenju standarda	Redčenje kompleta standarda opravite natančno po priloženih navodilih.
b) Napaka pri pipetiranju	Preverite, ali so pipete kalibrirane in uporabljene točno v skladu z navodili proizvajalca.
c) Prenizka inkubacijska temperatura	Inkubacija za metodo ELISA mora biti opravljena pri sobni temperaturi (17–27 °C).

ELISA – odpravljanje težav

- | | |
|---|--|
| d) Prekratek čas inkubacije | Čas inkubacije plošče s konjugatom, standardi in vzorci naj bo 120 ± 5 minut. Čas inkubacije raztopine encimskega substrata na plošči naj bo 30 minut. |
| e) Napačen filter plošče | Plošča se mora odčitati pri 450 nm z referenčnim filtrom od 620 do 650 nm. |
| f) Prehladni reagenti | Vsi reagenti (razen koncentrata konjugata 100×) morajo biti pred začetkom testa segreti na sobno temperaturo. To traja približno eno uro. |
| g) Pretečen rok uporabnosti kompleta/ sestavin kompleta | Komplet uporabite, preden mu poteče rok. Rekonstituirani standard in koncentrat konjugata 100× morate porabiti v 3 mesecih po datumu rekonstitucije. |

Visoko ozadje

- | Možen vzrok | Rešitev |
|---|---|
| a) Ne zadostno pranje plošče | Ploščo operite najmanj 6-krat s 400 µl pufru na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebnih več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje. |
| b) Previsoka temperatura inkubacije | Inkubacija za metodo ELISA naj po opravljena pri sobni temperaturi (17–27 °C). |
| c) Pretečen rok uporabnosti kompleta/ sestavin kompleta | Komplet uporabite, preden mu poteče rok. Rekonstituirani standard in koncentrat konjugata 100× morate porabiti v treh mesecih po datumu rekonstitucije. |
| d) Kontaminirana raztopina encimskega substrata | Modrikasto obarvan substrat zavržite. Poskrbite, da bodo uporabljeni čisti rezervoarji reagentov. |

ELISA – odpravljanje težav

Nelinearna standardna krivulja in spremenljivost podvojenega vzorca

Možen vzrok	Rešitev
a) Ne zadostno pranje plošče	Ploščo operite najmanj 6-krat s 400 µl pufru na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebnih več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje.
b) Napaka pri redčenju standarda	Redčenje standarda opravite natančno po priloženih navodilih.
c) Slabo mešanje	Skrbno premešajte reagente z obračanjem na glavo ali z nežnim vrtenjem, preden jih dodate na ploščo.
d) Nedosledna tehnika pipetiranja ali motnje med pripravo analize	Dodajanje vzorcev in standardov se mora izvajati neprekinjeno. Vsi reagenti morajo biti pripravljeni pred začetkom analize.

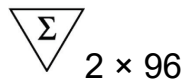
Informacije o izdelku in tehnični vodiči so brezplačno na voljo pri družbi QIAGEN, prek vašega distributerja oziroma na spletnem mestu www.QuantiFERON.com.

Reference

Celoten seznam sklicevanj na teste QFM najdete v knjižnici sklicev QuantiFERON, ki je na voljo na spletnem mestu Gnowee na naslovu 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.

Simboli



Zadostuje za 2 × 96 pripravkov vzorca



Zakonit proizvajalec



Simbol z oznako CE-IVD



Za diagnostično uporabo *in vitro*



Koda serije



Kataloška številka



Rok uporabnosti



Omejitev temperature



Glejte navodila za uporabo



Neprimerno za ponovno uporabo



Ne izpostavljajte sončni svetlobi



Pooblaščen zastopnik v Evropski skupnosti

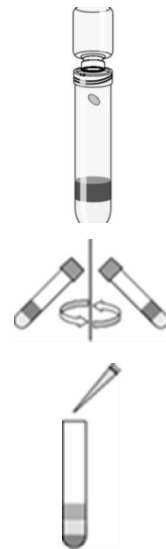
Kontaktne podatke

Za tehnično pomoč in dodatne informacije pokličite brezplačno številko 00800-22-44-6000, obiščite naš center za tehnično podporo na naslovu www.qiagen.com/contact ali se obrnite na enega od oddelkov za tehnične storitve družbe QIAGEN (glejte hrbtno platnico ali obiščite www.qiagen.com).

Skrajšani testni postopek

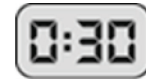
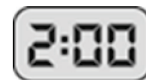
1. faza – inkubacija krvi

1. Kri pacienta odzemetite v epruveto za odvzem krvi QFM ali epruveto za odvzem krvi z litijevim heparinom. Epruvete opremite s podatki o pacientih in časom odvzema krvi ter jih nato v 8 urah po odvzemu prenesite v laboratorij pri sobni temperaturi.
 - a. Če je bila kri odvzeta v epruveto z litijevim heparinom, prenesite enakomerni delež krvi po 1 ml v epruveto za odvzem krvi QFM ter jo opremite s podatki o pacientu in časom odvzema krvi.
2. Dodajte 1 tabletko QFM LyoSphere v vsako epruveto za odvzem krvi QFM, ki vsebuje po 1 ml krvi, jo raztopite in nato epruvete čim prej, obvezno pa v 8 urah po odvzemu krvi, inkubirajte v **pokončnem** položaju od 16 do 24 ur pri 37 °C.
3. Po inkubaciji epruvete 15 minut centrifugirajte pri 2000 do 3000 × g (RCF), da ločite plazmo in rdeče krvničke.
4. Po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvzemanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.



2. faza – IFN- γ ELISA

1. Sestavine ELISA z izjemo koncentrata konjugata 100 \times postavite na sobno temperaturo za vsaj 60 minut.
2. Rekonstituirajte standard kompleta na 8,0 IE/ml z destilirano ali deionizirano vodo. Pripravite 4 raztopine standarda.
3. Rekonstituirajte suho zamrznjen koncentrat konjugata 100 \times z destilirano ali deionizirano vodo.
4. V zeleni raztopini za redčenje pripravite konjugat za uporabo in dodajte 50 μ l v vse vdolbine.
5. Dodajte 50 μ l testnih vzorcev plazme (nerazredčenih ali raztopin v razmerju 1 : 10 oziroma 1 : 100, kot je ustrezno) in 50 μ l standardov v ustrezne odprtine. Premešajte v vibratorju.
6. Inkubirajte 120 \pm 5 minut pri sobni temperaturi.
7. Vdolbine operite najmanj 6-krat s 400 μ l puфра na vsako vdolbino.
8. V vdolbine dodajte 100 μ l raztopine encimskega substrata. Premešajte v vibratorju.
9. Inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi.
10. V vse vdolbine dodajte 50 μ l raztopine za blokiranje encimov. Premešajte v vibratorju.
11. Rezultate odčitajte pri 450 nm z referenčnim filtrom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



Opombe

Večje spremembe

Večje spremembe v tej izdaji navodil za uporabo QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA Package Insert so povzete v spodnji preglednici:

Poglavje	Stran	Sprememba
Varnostni ukrepi	11	Nove informacije GHS
Varnostni ukrepi	12	Dodana varnostna navodila povezana z vialami, ki imajo navoje.

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

Sporazum o omejeni licenci za komplet QuantiFERON Monitor

Kupec ali uporabnik izdelka z njegovo uporabo soglaša z naslednjimi pogoji:

1. Izdelek se lahko uporablja zgolj v skladu s protokoli, ki so priloženi izdelku, in s to knjižico ter skupaj s sestavnimi deli v kompletu. QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo ali vključitev priloženih sestavnih delov tega kompleta s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu kompletu, kot je opisano v protokolih, ki so priloženi izdelku, temu priročniku in dodatnimi protokoli, ki so na voljo na www.qiagen.com. Nekatere od teh dodatnih protokolov so ustvarili uporabniki QIAGEN za uporabnike QIAGEN. Družba QIAGEN teh protokolov ni temeljito testirala ali optimizirala. QIAGEN ne ponuja garancije ali jamstva, da ti ne kršijo pravic drugih strank.
2. Razen izrecno navedenih licenc QIAGEN ne jamči, da ta komplet in/ali njegova uporaba ne krši pravic drugih strank.
3. Ta komplet in njegovi sestavni deli so licencirani za enkratno uporabo in jih ni dovoljeno ponovno uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej.
4. QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
5. Kupec in uporabnik tega kompleta se strinjata, da ne bosta ukrepala ali dovolila drugim, da ukrepajo v smeri, ki bi vodila v ali omogočala katero od zgoraj prepovedanih dejanj. QIAGEN lahko prepovedi iz tega Sporazuma o licenčnih omejitvah uveljavlja na katerem koli sodišču ter dobi povrnjene vse svoje stroške za preiskavo in sodišče, vključno s stroški za odvetnika, pri katerem koli dejanju za uveljavitev tega Sporazuma o licenčnih omejitvah ali pravice intelektualne lastnine v povezavi s tem kompletom in/ali njegovimi sestavnimi deli.

Za posodobljene licenčne pogoje glejte www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN. Vse pravice pridržane.

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

