

март 2018

Листовка за QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA


 2 x 96

Тестът за IFN- γ в цяла кръв измерва отговорите
към вродени и адаптивни имунни стимуланти

Версия 1

 За in vitro диагностика



 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, САЩ

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

1079024BG Изд. 03

 www.QuantiFERON.com



www.QuantiFERON.com

Съдържание

Предназначение	4
Кратко изложение и обяснение на теста	4
Принципи на теста	5
Време, необходимо за извършване на теста	6
Компоненти и съхранение	6
Необходими, но непредоставени материали	8
Съхранение и работа	8
Предупреждения и предпазни мерки	10
Предупреждения	10
Предпазни мерки	11
Вземане и работа с проби	13
Указания за употреба	17
Изчисления и интерпретация на теста	24
Генериране на стандартна крива	24
Качествен контрол на теста	25
Интерпретация на резултатите	25
Ограничения	26
Работни характеристики	27
Клинични проучвания	27
Работни характеристики на теста	32
Техническа информация	33
Плазмени проби със съсиреци	33
Ръководство за отстраняване на проблеми	34
Литературни източници	37
Символи	38
Информация за контакти	38
Съкратена процедура на теста	39

Предназначение

Тестът QuantiFERON Monitor (QFM) представлява *in vitro* диагностичен тест, предназначен за откриване на клетъчно медирана имунна функция чрез измерване на интерферон гама (IFN- γ) в плазма чрез ензимно свързан имуносорбентен анализ (ELISA) след инкубиране на хепаринизирана цяла кръв със стимуланти на вроден и адаптивен имунен отговор. Тестът се използва за откриване на клетъчно медиран имунен отговор в имуносупресирани популация с трансплантация на солиден орган.

QFM е предназначен за съвместна употреба с оценка на риска и други медицински и диагностични изследвания.

Кратко изложение и обяснение на теста

Имунодефицитът се характеризира с намалена способност за ефективно осъществяване на имунен отговор. Този компрометиран или отсъстващ отговор може да е в резултат на първичен или придобит (вторичен) имунодефицит (1).

Първичните имунодефицити по принцип са генетично унаследени и се характеризират с дефицити на определени компоненти на адаптивната или вродената имунна система (1). Независимо от това, повечето имунодефицити са придобити (вторични) и могат да бъдат индуцирани от патогенни агенти, лекарства (като имуносупресивно лечение след органна трансплантация), болестни състояния (като рак, напр. левкемия и лимфом) или замърсители от околната среда (1).

Молекулярната основа на имунодефицита се различава, въпреки че клетъчно медираният имунитет играе важна роля при индуцирането на много от наблюдаваните клинични прояви. Понастоящем диагнозата и лечението на имунодефицитните синдроми зависят от причинителя (2, 3).

Например *ad hoc* лечението е стандартно при мониториране на клетъчния имунодефицитен статус при индивиди, на които е извършена трансплантация на солиден орган (ТСО) и които получават лекарства за потискане на имунната система. Статусът на имунния отговор на индивида обикновено се измерва чрез мониториране на нивата на фармакологични лекарства и клинична/патологична оценка на функцията на присадката (2, 3).

Няколко теста за Т-клетъчната функция измерват клетъчно медирания имунитет към митогени, като фитохемаглютинин (РНА), митоген на американския лаконос и конканавалин А (ConA); те обаче само измерват функционалната способност на Т-клетките и са подгрупа от клетки, участващи в клетъчно медирания имунитет. Става все по-ясно, че вродените имунни механизми допринасят значително за защита на гостоприемника или като действат самостоятелно, или като усилват специфични отговори на Т-клетките. Поради това функционалните

отговори на вродените (клетките естествени убийци [NK]) и адаптивните (Т-клетките) имунни клетки заедно изграждат по-задълбочен анализ на клетъчно медиацията имунитет (2, 3).

QFM представлява *in vitro* диагностичен тест, при който се използва комбинация от стимуланти (под формата на пелета LyoSphere™), които специфично стимулират различни типове клетки, участващи във вродената и адаптивната имунна система. Функционалният имунен статус на индивида се оценява чрез измерване на отговора към стимулирането на вродената и адаптивна имунна система със съответно агонисти на Toll Like рецептора (TLR) и Т-клетъчния рецептор (TCR). Откриването на интерферон гама (IFN- γ) чрез ELISA предоставя както качествено, така и количествено измерване на клетъчно медиацията имунна функция.

Принципи на теста

При теста QFM се използват лиофилизирани стимуланти (QFM LyoSpheres™), които се добавят към хепаринизирана цяла кръв. Инкубацията на кръвта се извършва в продължение на 16 до 24 часа, след което плазмата се събира и се тества за наличието на IFN- γ , произведен в отговор на стимулантите.

Тестът QFM се извършва в два етапа. Първо, цялата кръв се взема в епруветка за вземане на кръв за QFM. След това QFM LyoSphere се добавя към епруветката, която се инкубира при 37°C възможно най-скоро и в рамките на 8 часа след вземането. След периода на инкубиране от 16 до 24 часа епруветките се центрофугират, плазмата се отстранява и количеството на IFN- γ (докладвано в международни единици на ml; IU/ml) се измерва чрез ELISA и се сравнява с диапазон от очаквани стойности за характеризиране на имунния отговор на индивида.

QFM е тест, предоставящ както качествено, така и количествено измерване на имунната функция. Резултатите от QFM може да не определят директно количествено нивото на имунна супресия.

Количеството на IFN- γ в плазмените проби често може да е над горните граници на повечето четци за ELISA, дори когато имunosупресията при пациентите е умерена. Препоръчва се плазмените проби да се разреждат 1 към 10 и/или 1 към 100 със зелен разредител и да се тестват чрез ELISA заедно с неразредената плазма.

Забележка: прагът на теста QFM може да варира в зависимост от нивото на имунна супресия и условията на трансплантация на индивида.

Вижте „Интерпретация на резултатите“ на стр. 25 в тази листовка за информация относно интерпретирането на резултатите от QFM.

Време, необходимо за извършване на теста

Приблизителното време, необходимо за извършване на теста QFM, е посочено по-долу. Дадено е и времето на тестване на няколко проби в партида.

Инкубиране на епруветките с кръв при 37°C: 16 до 24 часа

ELISA: Около 3 часа за една плака за ELISA
(до 88 проби)

< 1 час работа

Добавете 10 до 15 минути за всяка допълнителна плака

Компоненти и съхранение

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Каталожен №	0650-0701
Брой елементи	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 флакона
<i>Листовка за QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
Епруветки за вземане на кръв за QuantiFERON Monitor	
Каталожен №	0650-0101
Брой елементи	100
Епруветки за вземане на кръв за QuantiFERON Monitor (бяла капачка, бял пръстен)	100 епруветки
<i>Листовка на епруветките за вземане на кръв за QuantiFERON Monitor</i>	1

Компоненти на набора за ELISA с 2 плаки за QuantiFERON Monitor	Набор за ELISA с 2 плаки 0650-0201
Каталожен №	
Ленти микроплаки, 12 × 8 ямки (покрити с мише античовешко IFN-γ моноклонално антитяло)	2 комплекта ленти микроплаки с 12 × 8 ямки
IFN-γ Standard, lyophilized (IFN-γ стандарт, лиофилизиран) (съдържа рекомбинантен човешки IFN-γ, говежди казеин, 0,01% w/v тимерозал)	1 × флакон (8 IU/ml в разтворено състояние)
Green Diluent (Зелен разредител) (съдържа говежди казеин, нормален миши серум, 0,01% w/v тимерозал)	1 × 30 ml флакон
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (Конюгат 100× концентрат, лиофилизиран) (миши античовешки IFN-γ HRP, съдържа 0,01% w/v тимерозал)	1 × 0,3 ml в разтворено състояние
Wash Buffer 20× Concentrate (Промивен буфер 20× концентрат) (pH 7,2, съдържа 0,05% v/v ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Разтвор на ензимен субстрат) (съдържа H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' тетраметилбензидин)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопиращ разтвор) (съдържа 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
Листовката за QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Съдържа сярна киселина. Вижте страница 11 относно предпазните мерки.

Необходими, но непредоставени материали

- 37°C инкубатор*; CO₂ не се изисква
- Калибрирани пипети с променлив обем*
- Калибрирани мултиканални пипети† с възможност за пипетиране на 50 µl и 100 µl с връхчета за еднократна употреба
- Шейкър за микроплаки†
- Дейонизирана или дестилирана вода, 2 литра
- Промивно устройство за микроплаки (препоръчва се автоматично промивно устройство)
- Четец за микроплаки†, снабден с филтър 450 nm и референтен филтър от 620 nm до 650 nm
- Градуиран цилиндър (цилиндър за измерване)
- Абсорбиращи салфетки без власинки

Съхранение и работа

Епруветки за вземане на кръв

Съхранявайте епруветките за вземане на кръв за QFM при 4 до 25°C. Епруветките за вземане на кръв за QFM трябва да са с температура от 17 до 25°C по време на напълването с кръв и смесването.

LyoSpheres

Съхранявайте QFM LyoSpheres при температура от 2 до 8°C.

Реагенти на набора за ELISA

Съхранявайте реагенти на набора за ELISA при температура от 2 до 8°C. Винаги предпазвайте разтвора на ензимния субстрат от пряка слънчева светлина.

* Уверете се, че апаратите са проверени и калибрирани съгласно препоръките на производителя.

Разтворени и неизползвани реагенти за ELISA

За указания как да разтворите реагентите за ELISA вижте „Етап 2 — IFN- γ ELISA“, страница 18.

- Разтвореният стандарт на набора може да се използва в срок до 3 месеца, ако се съхранява при температура от 2 до 8°C.
Запишете датата на разтваряне на стандарта на набора.
- След като бъде разтворен, неизползваният конюгат 100 \times концентрат трябва да се върне на мястото за съхранение при температура от 2 до 8°C и да се използва в срок до 3 месеца.
Запишете датата на разтваряне на конюгата.
- Конюгатът с работна концентрация трябва да използва в рамките на 6 часа от приготвянето (вижте таблица 1).
- Промивният буфер с работна концентрация трябва да се съхранява при стайна температура (22 \pm 5°C) за период до 2 седмици.

Предупреждения и предпазни мерки

За in vitro диагностика

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (SDS). Тези листове можете да намерите онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.

Предупреждения

- QFM е тест, предоставящ както качествено, така и количествено измерване на имунната функция. Резултатите от QFM може да не определят директно количествено нивото на имунна супресия.
- Резултатите от теста QFM трябва да се използват заедно с клиничните прояви, медицинската анамнеза и другите клинични индикатори при установяването на имунния статус на пациента.
- Прагът на теста QFM може да варира в зависимост от нивото на имунна супресия и условията на трансплантация на индивида.

Предпазни мерки

Само за in vitro диагностика.



ВНИМАНИЕ: Работете с човешка кръв и плазма като с потенциално заразни. Спазвайте приложимите указания за работа с кръв и кръвни продукти. Изхвърляйте пробите и материалите, които са в контакт с кръв или кръвни продукти, в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.

Следните предупреждения за опасност и безопасността се отнасят за компонентите на QuantiFERON Monitor ELISA.

Предупреждения за опасност



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопиращ разтвор QuantiFERON)

Съдържа: sulfuric acid. Внимание! Може да бъде корозивно за металите. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Използвайте предпазни ръкавици/ предпазно облекло/ предпазни очила/ предпазна маска за лице.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (Разтвор на ензимен субстрат QuantiFERON)

Внимание! Причинява слабо кожно дразнене. Използвайте предпазни ръкавици/ предпазно облекло/ предпазни очила/ предпазна маска за лице.



QuantiFERON Green Diluent (Зелен разредител QuantiFERON)

Съдържа: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Съдържа: tartrazine. Внимание! Може да причини алергична кожна реакция. Използвайте предпазни ръкавици/ предпазно облекло/ предпазни очила/ предпазна маска за лице.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (Промивен буфер 20× концентрат QuantiFERON)

Съдържа: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. Да се избягва изпускане в околната среда.

Допълнителна информация

Информационни листове за безопасност: www.qiagen.com/safety

- Отклоненията от *листовката на QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* могат да доведат до погрешни резултати. Прочетете внимателно инструкциите преди употреба.
- **Важно:** Преди употреба огледайте флаконите. Не използвайте флаконите с Conjugate, IFN- γ Standard или QFM LyoSphere, ако забележите признаци на повреда или ако гумената запушалка е повредена. Не работете със счупени флакони. Прилагайте подходящите предпазни мерки за безопасност с оглед на безопасното изхвърляне на флаконите. Препоръка: Използвайте инструмент за отстраняване на метална обкатка за отваряне на флаконите с Conjugate, IFN- γ Standard или QFM LyoSphere с цел свеждане до минимум риска от нараняване от металната обкатка.
- Не използвайте набора за ELISA, ако преди употреба някоя от бутилките е с признаци на повреда или утечка.
- Не смесвайте и не използвайте ленти микроплаки, IFN- γ стандарт, зелен разреждател или конюгат 100 \times концентрат от различни партиди на набора на QFM ELISA. Другите регенти (промивен буфер 20 \times концентрат, разтвор на ензимен субстрат и ензимен стопиращ разтвор) могат да бъдат разменяни между наборите, при условие че реагентите не са с изтекъл срок на годност и данните на партидата отговарят на регистрираните.
- Изхвърлете неизползваните реагенти и биологични проби в съответствие с местните и националните нормативни разпоредби относно безопасността и околната среда.
- Не използвайте епруветките за вземане на кръв за QFM, QFM LyoSpheres или QFM ELISA след изтичане на срока на годност.
- Уверете се, че лабораторното оборудване е калибрирано/валидирано за употреба.

Вземане и работа с проби

Тестът QFM трябва да се извършва единствено с цяла кръв, взета или в епруветка за вземане на кръв с литиев хепарин, или директно в епруветка за вземане на кръв за QFM; изисква се 1 ml цяла кръв на тест. На епруветките за вземане на кръв трябва да са поставени правилните етикети и да е посочен часът на вземане на кръвта.

Важно: както стимулирането на кръвните проби за QFM (т.е. добавянето на QFM LyoSphere към 1 ml кръвен аликвот), така и последващо инкубиране при 37°C трябва да се извършват в рамките на 8 часа от вземането на кръвта.

Преди инкубиране съхранявайте кръвните проби на стайна температура (22 ± 5°C).

За оптимални резултати трябва да се спазват следните процедури:

1. Обозначете епруветките по подходящ начин.

Уверете се, че всяка епруветка за вземане на кръв за QFM е етикетирана правилно с данните за индивида и часа на вземане на кръвта.

2. За всеки индивид вземете 1 ml кръв чрез венепункция директно в епруветка за вземане на кръв за QFM. Тази процедура трябва да се извършва от обучен флеботомист.

Важна забележка: Епруветките трябва да са с температура от 17 до 25°C по времето на напълване с кръв.

Епруветките за вземане на кръв за QFM могат да се използват при височина до 810 метра над морското равнище.

Тъй като в епруветките от 1 ml кръвта се събира относително бавно, задръжте епруветката на иглата за 2–3 секунди, след като епруветката изглежда изцяло напълнена. По този начин ще се гарантира изтеглянето на правилния обем.

Черният маркер отстрани на епруветката за вземане на кръв за QFM посочва 1 ml обем за напълване. Епруветките за вземане на кръв за QFM са произведени за вземане на 1 ml ± 10% и работните им характеристики са оптимални в този диапазон. Ако нивото на кръвта е извън диапазона на линията на индикатора, трябва да се вземе нова кръвна проба.

Ако за вземане на кръв се използва игла тип бъртерфлай, трябва да се използва епруветка за вземане на кръв за „прочистване“, за да се гарантира, че тръбичките са запълнени с кръв, преди да се използват епруветките за вземане на кръв за QFM.

Ако се използват епруветки за вземане на кръв за QFM при надморска височина над 810 метра или ако обемът на кръвта е малък, вземете кръв със спринцовка и веднага прехвърлете 1 ml кръв в епруветката за вземане на кръв за QFM. С оглед на безопасността

това се извършва най-добре чрез отстраняване на иглата на спринцовката, като се гарантират правилни процедури за безопасност, отстраняване на капачката от епруветката за вземане на кръв за QFM и добавяне на 1 ml кръв (до центъра на черния маркер отстрани на етикета на епруветката). Поставете обратно капачката плътно и смесете, както е описано по-долу.

Ако се използва турникет, разхлабете турникета веднага след въвеждане на иглата във вената, за да се избегнат вариации в налягането, които могат да окажат влияние върху обема на кръвта.

Алтернативно кръвта може да се вземе в генерична епруветка за вземане на кръв с литиев хепарин като антикоагулант и след това да се прехвърли в епруветката за вземане на кръв за QFM. Използвайте само литиев хепарин като кръвен антикоагулант, тъй като другите антикоагуланти смущават теста. Напълнете епруветка за вземане на кръв (минимален обем 3 ml) и смесете внимателно чрез няколкократно обръщане на епруветката за разтваряне на хепарина. Съхранявайте кръвта на стайна температура ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) преди прехвърляне в епруветките за вземане на кръв за QFM с цел стимулиране с QFM LyoSphere. Уверете се, че кръвта е смесена щателно чрез внимателно обръщане непосредствено преди разделянето. Разпределете 1 ml аликуот от кръвта в епруветката за вземане на кръв за QFM. Извършете разпределянето асептично, като се гарантират правилни процедури за безопасност, докато се отстранява капачката от епруветката за вземане на кръв за QFM и се добавя 1 ml кръв (до центъра на черния маркер отстрани на етикета на епруветката). Поставете обратно капачките плътно и смесете, както е описано по-долу.

3. Незабавно след напълване на епруветките обърнете внимателно няколко пъти епруветката за разтваряне на хепарина.

Важно: прекомерно енергичното разклащане може да причини нарушаване на гела и да доведе до абнормни резултати.

4. Непосредствено преди употреба темперирайте QFM LyoSpheres до стайна температура ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$).

5. Добавете асептично една QFM LyoSphere към 1 ml кръв.

Отстранете капачката на епруветката за вземане на кръв.

Почукайте леко флакона с QFM LyoSphere върху твърда повърхност, за да се гарантира, че QFM LyoSphere се намира на дъното на флакона. Отстранете капачката на флакона с QFM LyoSphere, като първо отстраните металната обкатка и след това гумения стопер.

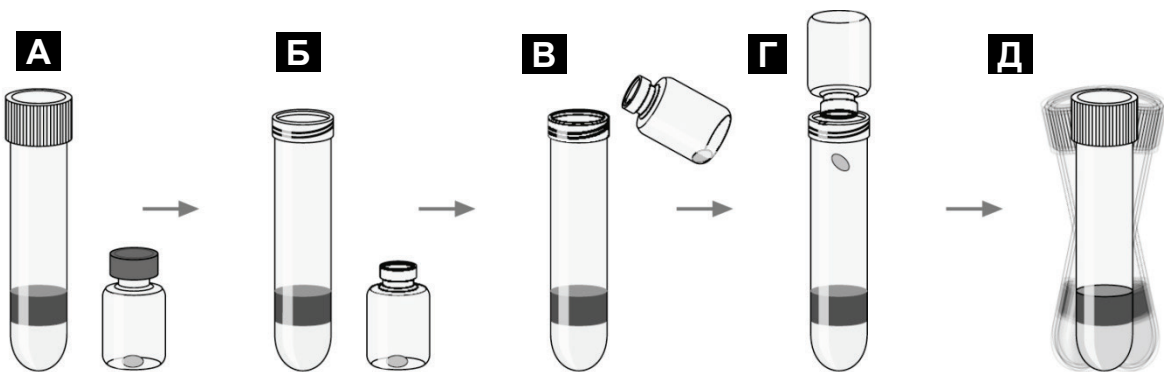
Внимателно поставете пелетата QFM LyoSphere в 1 ml кръв, като подравните ръба на стъкления флакон с ръба на епруветката за вземане на кръв за QFM, след което обърнете внимателно флакона,

за да прехвърлите QFM LyoSphere в епруетката за вземане на кръв за QFM (вижте фигура 1).

Важно: ако QFM LyoSphere падне извън епруетката за вземане на кръв за QFM, изхвърлете я и отворете друг флакон с QFM LyoSphere.

Важно: не оставяйте отворен флакона с QFM LyoSphere за продължителни периоди от време. QFM LyoSphere трябва да се добави към кръвта възможно най-скоро след отстраняване на капачката от флакона.

Ако QFM LyoSphere се добавя към кръв, взета в епруетка за вземане на кръв за QFM, непременно се уверете, че капачките на епруетките са поставени обратно на правилните проби.



Фигура 1. Добавяне на QFM LyoSphere. **А** Епруетката за вземане на кръв за QFM и флаконът с QFM LyoSphere. **Б** Отстранете капачката от епруетката за вземане на кръв за QFM, металната обкатка и гумения стопер от флакона с QFM LyoSphere. **В** Незабавно добавете QFM LyoSphere към кръвта, като подравните ръба на стъкления флакон с ръба на епруетката за вземане на кръв. **Г** След това обърнете внимателно флакона, за да прехвърлите LyoSphere в епруетката за вземане на кръв. **Д** Поставете обратно капачката на епруетката за вземане на кръв за QFM и разклатете от 5 до 10 пъти.

- 6. Поставете капачката на епруветката за вземане на кръв за QFM и я разклатете от 5 до 10 пъти достатъчно силно, за да се гарантира пълно разтваряне на QFM LyoSphere.**

Ако QFM LyoSphere прилепне към вътрешната повърхност на епруветката, тя може да бъде разтворена чрез обливане на LyoSphere с кръв при обръщането на епруветката.

Уверете се, че след добавянето капачката е поставена обратно на QFM LyoSphere, за да се избегне случайното добавяне на втора QFM LyoSphere в същата епруветка.

Забележка: тъй като QFM LyoSphere е бяла, тя вече няма да се вижда в кръвта, след като се разтвори.

Важно: прекомерно енергичното разклащане може да причини нарушаване на гела и да доведе до абнормни резултати.

- 7. След добавянето и разтварянето на QFM LyoSphere епруветките за вземане на кръв за QFM трябва да се прехвърлят в инкубатор при температура $37 \pm 1^\circ\text{C}$ възможно най-скоро и в рамките на 8 часа след вземането на кръвта.**

Указания за употреба

Етап 1 — инкубиране на кръвта и събиране на плазмата

Предоставени материали

- Епруветки за вземане на кръв за QFM (вижте „Компоненти и съхранение“, стр. 6)

Необходими (но непредоставени) материали

- Вижте „Необходими, но непредоставени материали“, стр. 8

Процедура

1. **Инкубирайте епруветките за вземане на кръв за QFM, съдържащи 1 ml кръвни аликвоти с QFM LyoSphere, ИЗПРАВЕНИ при температура $37 \pm 1^\circ\text{C}$ за 16 до 24 часа.**

Забележка: инкубаторът не изисква CO_2 или овлажняване.

След инкубиране епруветките за вземане на кръв за QFM могат да се съхраняват при температура от 4 до 27°C за период до 3 дни преди центрофугиране.

2. **След инкубиране събирането на плазмата се подпомага чрез центрофугиране на епруветките за вземане на кръв за QFM за 15 минути при 2000 до 3000 $\times g$ (RCF). Запушалката от гел ще отдели клетките от плазмата. Ако това не се случи, центрофугирайте отново епруветките.**

Събирането на плазма може да се извърши и без центрофугиране, но е необходимо допълнително внимание за отстраняване на плазмата без нарушаване на клетките.

3. **Плазмените проби трябва да се събират само чрез използване на пипета.**

Важно: след центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

Плазмените проби могат да се заредят директно от центрофугирани епруветки за вземане на кръв за QFM в плака за QFM ELISA, включително когато се използват автоматизирани работни станции за ELISA.

Плазмените проби могат да се съхраняват за период до 28 дни при температура от 2 до 8°C или, ако плазмата е събрана, под -20°C за продължителни периоди. Аликвотите от събрани плазмени проби трябва да се запечатат преди съхраняване.

Ако се извършва събиране на плазмени проби, вземете най-малко 150 µl от плазмата, за да може да се извършва повторно тестване, ако това е необходимо.

Количеството на IFN-γ в плазмените проби често може да е над горните граници на повечето четци за ELISA, дори когато имunosупресията при пациентите е умерена. Препоръчва се плазмените проби да се разреждат 1:10 и/или 1:100 в зелен разреждател и да се тестват в ELISA заедно с неразредената плазма (вижте Етап 2 — IFN-γ ELISA).

Етап 2 — IFN-γ ELISA

Предоставени материали

- Набор за ELISA с 2 плаки за QuantiFERON Monitor (вижте „Компоненти и съхранение“, стр. 6)

Необходими (но не предоставени) материали

- Вижте „Необходими, но не предоставени материали“, стр. 8

Подготовка

IFN-γ в плазмата често може да е над горните граници на повечето четци за ELISA дори когато индивидите са с умерена имunosупресия. Препоръчително: разреждете плазмените проби 1:10 и/или 1:100 в зелен разреждател и тествайте в ELISA заедно с неразредената плазма.

В ситуации, при които пациентът може да е с тежка имunosупресия, подготвянето и тестването само на неразредена плазмена проба може да е достатъчно за получаване на количествен резултат.

Забележка: резултатите за проби, които са в рамките на диапазона на QFM ELISA (т.е. до 10 IU/ml), трябва да се използват за интерпретиране на резултатите. Най-ниското разреждане, което генерира резултат в рамките на диапазона на QFM ELISA, трябва да се използва като докладван резултат (като се взема предвид коефициентът на разреждане), ако неразредената плазма е над диапазона на QFM ELISA.

Процедура

1. **Преди употреба всички плазмени проби и реагенти, с изключение на конюгат 100× концентрата, трябва да се темперират до стайна температура (22 ± 5°C). Отделете 60 минути за достигане на стайна температура.**

2. **Отстранете от рамката на микроплаката лентите, които не са необходими, затворете отново фолиевата опаковка и ги върнете обратно в хладилника за съхранение, докато ви потрябват.**

Оставете най-малко една лента за QFM стандартите и достатъчно ленти за броя на индивидите, които се тестват. След употреба запазете рамката и капака за употреба с останалите ленти.

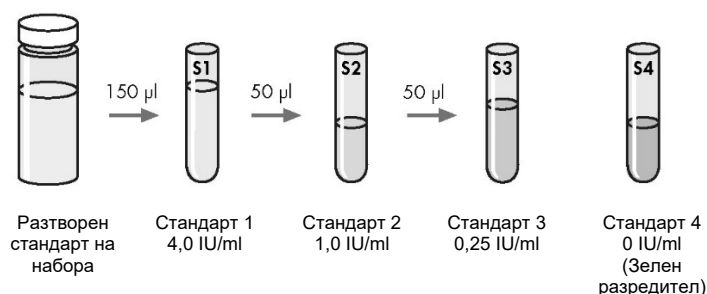
3. **Разтворете лиофилизирания IFN- γ стандарт с обема дейонизирана или дестилирана вода, посочен на етикета на флакона със стандарта. Смесвайте внимателно за избягване на образуването на пяна и гарантиране на пълно разтваряне. При разтварянето на стандарта до посочения обем ще се получи разтвор с концентрация 8,0 IU/ml.**

Важно: обемът за разтваряне на IFN- γ стандарта на набора се различава при различните партиди. Вижте етикета на флакона със стандарта, за да се уверите, че използвате правилния обем дейонизирана или дестилирана вода.

Използвайте разтворения стандарт на набора за изготвяне на разреждане 1 в 2, последвано от серия на разреждане 1 в 4 на IFN- γ в зеления разредител (GD) (вижте фигура 2). S1 (Стандарт 1) съдържа 4,0 IU/ml, S2 (Стандарт 2) съдържа 1,0 IU/ml, S3 (Стандарт 3) съдържа 0,25 IU/ml, а S4 (Стандарт 4) съдържа 0 IU/ml (GD самостоятелно). Стандартите трябва да се тестват двукратно. Подгответе пресни разреждания на стандарта на набора за всяка сесия на ELISA.

Препоръчана процедура за двойни стандарти

- а. Поставете етикети на 4 епруветки „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- б. Добавете 150 μ l от GD в S1, S2, S3 и S4.
- в. Добавете 150 μ l от стандарта на набора в S1 и смесете щателно.
- г. Прехвърлете 50 μ l от S1 в S2 и смесете щателно.
- д. Прехвърлете 50 μ l от S2 в S3 и смесете щателно.
- е. Зеленият разредител (GD) самостоятелно служи като нулев стандарт (S4).



Фигура 2. Генериране на стандартна крива.

4. **Разтворете лиофилизирания конюгат 100× концентрат с 0,3 ml дейонизирана или дестилирана вода. Смесвайте внимателно за намаляване до минимум на образуването на пяна и пълно разтваряне на конюгата.**

Конюгатът с работна концентрация се приготвя чрез разреждане на необходимото количество разтворен конюгат 100× концентрат в зелен разредител (таблица 1 – Приготвяне на конюгата). Върнете неизползвания конюгат 100× концентрат на съхранение при температура от 2 до 8°C веднага след употреба. Използвайте само зелен разредител.

Таблица 1. Приготвяне на конюгата

Брой на лентите	Обем на конюгата 100× концентрат	Обем на зеления разредител
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. Плазмените проби, събрани от епруветки за вземане на кръв и впоследствие съхранени или замразени, трябва да се смесят преди добавяне в ямката за ELISA.

Важно: ако плазмените проби се добавят директно от центрофугираните епруветки за QFM, трябва да се избягва всякакво смесване на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

6. Препоръчително: разредете плазмените проби 1:10.

- Добавете 90 µl зелен разредител (GD) към епруветката с етикет с данни за пациента и „1:10“.
- След това добавете 10 µl от смесените плазмени проби (вижте стъпка 5 за подробности относно смесените плазмени проби в сравнение с добавените директно от центрофугираните епруветки за QFM).
- Смесете щателно с пипета, като сведете до минимум образуването на пяна.

7. Препоръчително: разредете плазмените проби в съотношение 1:100.

- Подгответе разреждане 1:10 (вижте стъпка 6 по-горе).
- Добавете 90 µl зелен разредител към епруветката с етикет с данни за пациента и „1:100“.
- Добавете 10 µl от разреждането 1:10.
- Смесете щателно с пипета, като сведете до минимум образуването на пяна.

Препоръчително: тествайте следните проби паралелно и в следния ред:

- Неразредени, 1:10, 1:100

В софтуера за анализ на QFM се поддържат и следните опции за проби на индивида:

- Неразредени
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Неразредени, 1:10

- 8. Добавете 50 µl прясно приготвен конюгат с работна концентрация в необходимите ямки за ELISA, като използвате многоканална пипета.**
- 9. Добавете 50 µl от тестовата плазмена проба в съответните ямки, като използвате многоканална пипета. След това добавете 50 µl от всеки от стандартите от 1 до 4. Тествайте стандартите двукратно.**
- 10. Покрийте всяка плака с капак и смесете конюгата и плазмените проби/стандартите щателно, като използвате шейкър за микроплаки за 1 минута. Да се избягват пръски.**
- 11. Инкубирайте при стайна температура ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) за 120 ± 5 минути.**
Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.
- 12. По време на инкубирането разредете 1 част промивен буфер 20× концентрат с 19 части дейонизирана или дестилирана вода и смесете щателно. Предоставен е достатъчно промивен буфер 20× концентрат за приготвянето на 2 литра промивен буфер с работна концентрация.**

Промийте ямките с 400 µl от промивния буфер с работна концентрация за най-малко 6 цикъла в промивно устройство за микроплаки. Препоръчва се автоматизирано промивно устройство за плаки.

Щателното промиване е много важно за функционирането на теста. Уверете се, че всяка ямка е **изцяло напълнена** с промивен буфер за всеки цикъл на промиване. Препоръчително: Накиснете ямките за период от най-малко 5 секунди между всеки цикъл за получаване на най-добри резултати.

Добавете стандартен лабораторен дезинфектант в резервоара за отпадните течности и спазвайте установените процедури за деконтаминация на потенциално заразни материали.

13. Почукайте плаките с лицевата част надолу върху абсорбираща салфетка без власинки, за да отстраните остатъчния промивен буфер. Добавете 100 µl разтвор на ензимен субстрат във всяка ямка, покрийте всяка плака с капак и смесете щателно, като използвате шейкър за микроплаки.

14. Инкубирайте при стайна температура ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) за 30 минути.

Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.

15. След инкубиране добавете 50 µl разтвор на ензимен стопиращ разтвор във всяка ямка и смесете щателно, като използвате шейкър за микроплаки.

Ензимният стопиращ разтвор трябва да се добавя към ямките в същия ред и с приблизително същата скорост като добавянето на разтвора на ензимен субстрат в стъпка 13.

16. Измерете оптичната плътност (OD) в рамките на 5 минути от спирането на реакцията, като използвате четеца за микроплаки, снабден с филтър за 450 nm и с референтен филтър за 620 до 650 nm. Стойностите на OD се използват за изчисляване на резултатите.

Изчисления и интерпретация на теста

Софтуер за анализ на QuantiFERON Monitor се използва за анализиране на необработените данни и изчисляване на резултатите. Предлага се от www.QuantiFERON.com. Уверете се, че използвате най-новата версия на този софтуер за анализ на QuantiFERON Monitor.

Софтуерът извършва оценка за контрол на качеството на теста, генерира стандартна крива и предоставя резултат от теста за всеки индивид, както е описано подробно в раздела „Интерпретация на резултатите“.

Ако неразредената плазма е над горния диапазон (т.е. > 10 IU/ml) на QFM ELISA, софтуерът за анализ на QuantiFERON Monitor докладва най-ниското разреждане, което генерира резултат в рамките на диапазона на QFM ELISA, като взема предвид коефициента на разреждане.

Като алтернатива на използването на софтуера за анализ на QuantiFERON Monitor, резултатите могат да определят и по следния метод.

Генериране на стандартна крива

(Ако не се използва софтуер за анализ на QuantiFERON Monitor)

Определете средните стойности на OD на репликатите на стандарта на набора за всяка плака.

Създайте $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ стандартна крива чрез нанасяне на $\log_{(e)}$ на средната OD (оста y) спрямо $\log_{(e)}$ на IFN- γ концентрацията на стандартите в IU/ml (оста x), като пропуснете нулевия стандарт от тези изчисления.

Изчислете линията на най-добро съвпадение за стандартната крива чрез регресионен анализ.

Използвайте стандартната крива за определяне на IFN- γ концентрацията (IU/ml) за всяка от тестовите плазмени проби, като използвате OD стойността за всяка проба.

Тези изчисления могат да се извършват с помощта на софтуерните пакети, налични с четците за микроплаки, и стандартна електронна таблица или статистически софтуер (като Microsoft® Excel®). Препоръчва се тези пакети да се използват за изчисляване на регресионния анализ, коефициента на вариация (%CV) за стандартите и коефициента на корелация (r) на стандартната крива.

Докладваният резултат трябва да се получи от най-ниското разреждане, което генерира резултат в рамките на диапазона на QFM ELISA (като се взема предвид коефициентът на разреждане), ако неразредената плазма е над диапазона на QFM ELISA.

Качествен контрол на теста

Точността на резултатите от теста зависи от генерирането на точна стандартна крива. Поради това резултатите, базирани на стандартите, трябва да се проверят, преди резултатите от теста да могат да се интерпретират.

За да е валиден ELISA:

- Средната стойност на OD за стандарт 1 трябва да е $\geq 0,600$.
- Коефициентът на вариация за стойностите на OD на копията на стандарт 1 и стандарт 2 трябва да е $\leq 15\%$.
- Стойностите на OD на копията на стандарт 3 и стандарт 4 не трябва да се различават с повече от 0,040 единици оптична плътност от тяхната средна стойност.
- Коефициентът на корелация (r), изчислен от средните стойности на абсорбция на стандартите, трябва да е $\geq 0,98$.

Софтуерът за анализ на QuantiFERON Monitor изчислява и докладва тези параметри за качествен контрол.

Ако горепосочените критерии не са удовлетворени, работният цикъл е невалиден и трябва да се повтори.

Средната стойност на OD за нулевия стандарт (зелен разреждител) трябва да е $\leq 0,150$. Ако средната стойност на OD е $> 0,150$, трябва да се провери процедурата за промиване на плаката.

Интерпретация на резултатите

Резултатите от QFM се интерпретират в зависимост от IFN- γ отговора към вродени и адаптивни имунни стимуланти. Тестът QFM предоставя както качествено, така и количествено измерване на имунната функция. Резултатите от QFM може да не определят директно количествено нивото на имунна супресия.

Важно: при установяване на имунния статус на индивида измереното ниво на IFN- γ трябва да се използва заедно с клиничните прояви, медицинската анамнеза и другите диагностични изследвания (таблицы 2). Прагът на теста QFM може да варира в зависимост от нивото на имуносупресия на индивида и условията на трансплантиране на пациента.

Таблица 2. Интерпретация на резултатите

QFM резултат IFN-γ (IU/ml)	Класификация	Интерпретация
< 15	Слаб	Индивидът е със слаб IFN- γ отговор към вродени и адаптивни имунни стимуланти
15–1000	Умерен	Индивидът е с умерен IFN- γ отговор към вродени и адаптивни имунни стимуланти
> 1000	Силен	Пациентът е със силен IFN- γ отговор към естествени и адаптивни имунни стимуланти

Ако измереното IFN- γ ниво на неразредената плазмена проба е под 0,1 IU/ml:

- Уверете се, че QFM LyoSphere е добавена към кръвната проба и епруветката е инкубирана съгласно указанията в листовката.
- Уверете се, че резултатът за IFN- γ съответства на текущия клиничен статус на индивида.

При подозрения за технически проблеми при вземането или работата с кръвните проби повторете целия тест QFM с нова кръвна проба. Повторете ELISA тестването на стимулираните плазмени проби при подозрения, че първоначалният тест се отклонява от процедурата, описана в настоящата листовка (за подробности вижте раздела „Качествен контрол на теста“).

Лекарят може да желае да повтори теста, ако резултатите не съответстват на клиничния статус на индивида.

Ограничения

Резултатите от теста QFM трябва да се използват заедно с анамнеза на отделните индивиди, текущия медицински статус и други диагностични изследвания. Лабораториите може да изберат да установят свои собствени диапазони за теста.

Те също така може да изберат да изследват външна контролна проба, взета от здрав индивид, паралелно с пробите на пациентите.

Ненадеждни или неточни резултати могат да се получат поради:

- Неправилен кръвен антикоагулант — използвайте само литиев хепарин, тъй като другите антикоагуланти смущават теста.

- Отклонения от процедурите, описани в настоящата листовка.
- Свърхвисоки нива на IFN- γ в циркулацията или наличие на хетерофилни антитела.
- Период над 8 часа между вземането на кръвната проба до инкубирането при 37°C.
- Недостатъчно или прекомерно напълване на епруветките за кръв за QFM извън диапазона от 0,9 до 1,1 ml.

Работни характеристики

Клинични проучвания

Проведени са две клинични проучвания за оценка на отговорите на привидно здрави индивиди ($n = 114$) спрямо такива с транспланти ($n = 30$). От индивидите, получили трансплант, 18 са в ранната посттрансплантационна кохорта (ранен посттрансплантационен период, в рамките на 3 месеца след трансплантацията), а 12 са в късната посттрансплантационна или стабилна кохорта (късен посттрансплантационен период, > 12 месеца след трансплантацията).

- Взети са проби в до 5 времеви точки от всеки индивид в ранния посттрансплантационен период (3 месеца, посттрансплантационна кохорта, $n = 64$ проби).
- Взети са проби 1 път от всеки индивид в късния посттрансплантационен период (късна посттрансплантационна кохорта, $n = 12$ проба).
- Взети са проби 1 път от всеки индивид в кохортата на привидно здрави индивиди ($n = 114$).

Отговорите към QFM варират между слаби и умерени при ранните посттрансплантационни проби и късните посттрансплантационни проби. Ранната посттрансплантационна кохорта е с по-висок процент (93,8%) на отговори в рамките на ниския диапазон и по-нисък процент отговори (6,3%) в умерения диапазон в сравнение с отговорите от късния посттрансплантационен период, като 25% от отговорите са в ниския диапазон, а 66,7% са в умерения диапазон (таблица 3). Няма отговори от ранния посттрансплантационен период в диапазона на силен отговор, докато само 1 (8,3%) отговор в късните посттрансплантационни проби е в диапазона на силен отговор. Отговорите към QFM в кохортата на привидно здрави индивиди са главно в диапазона на умерен отговор (83,3%) и силен отговор (15,8%) (таблица 3).

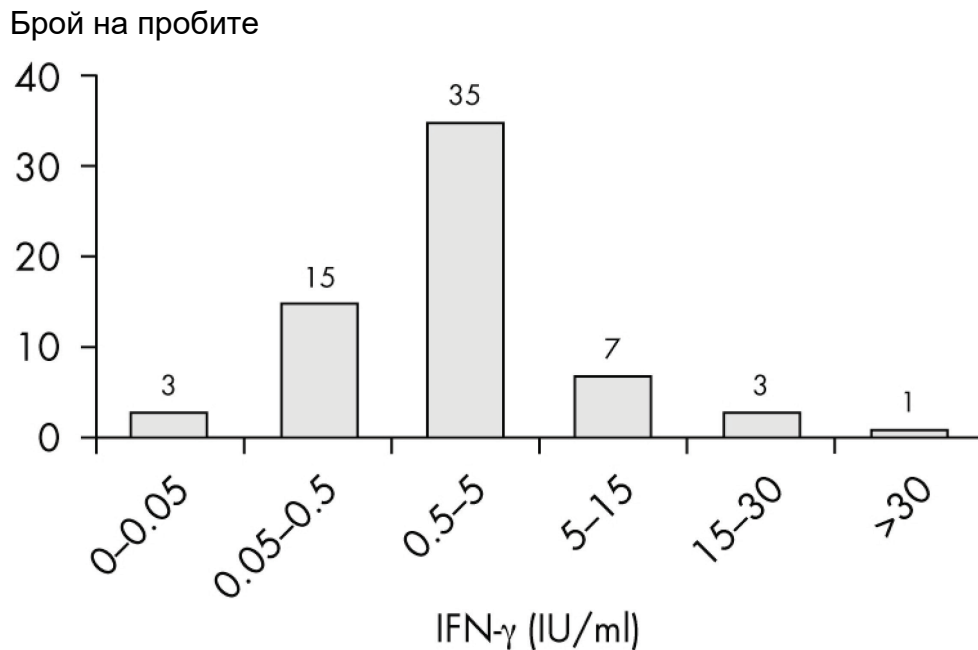
Таблица 3. Диапазон на отговора към QFM при привидно здрави индивиди спрямо лица с транспланти

IFN- γ (IU/ml)	Категория на резултатите	Ранен посттр. %* 95% CI n	Късен посттр. %* 95% CI n	Привидно здрави %* 95% CI n	Общо резултати
< 15	Слаб	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	Умерен	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	Силен	0,0% 0–5,7 n = 0	8,3% 1,5–35,4 n = 1	15,8% 10,2–23,6 n = 18	19
Общо проби		64	12	114	190

* Процентите посочват частта от пробите във всяка кохорта донори, които попадат в диапазона на дадения отговор.

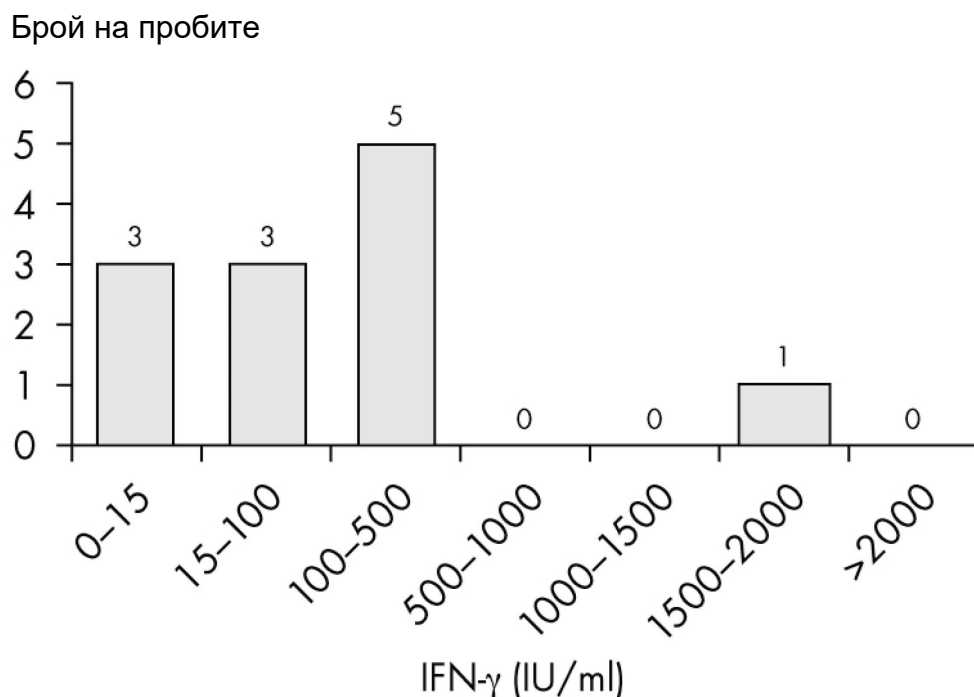
Очаквани стойности

Разпределението на IFN- γ отговорите към QFM при пациентите в ранния посттрансплантационен период (до 3 месеца след трансплантацията) е установено от 64 проби, взети от 18 пациенти с трансплант, с използване на QFM ELISA (фигура 3).



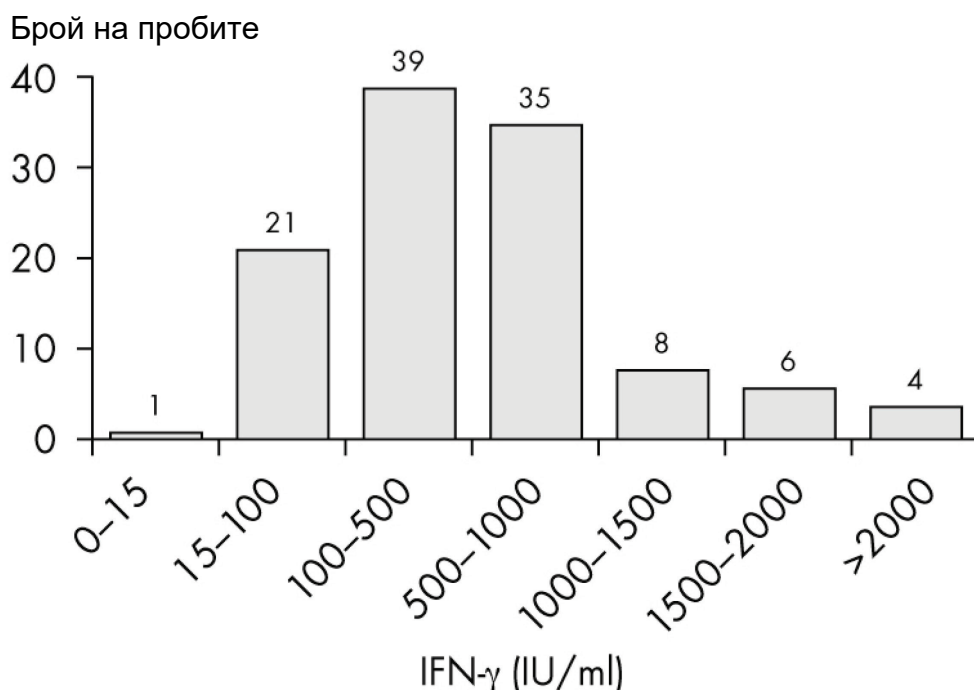
Фигура 3. Разпределение на QFM IFN- γ отговорите при пациенти в ранния посттрансплантационен период (n = 64; медиана = 1,5 IU/ml).

Разпределението на IFN- γ отговорите към QFM при пациентите в късния посттрансплантационен период (> 12 месеца след трансплантацията) е установен от 12 проби с използване на QFM ELISA (фигура 4).



Фигура 4. Разпределение на QFM IFN-γ отговорите при пациенти в късния посттрансплантационен период (n = 12; медиана = 98,8 IU/ml).

Разпределението на IFN-γ отговорите към QuantiFERON Monitor при привидно здрави индивиди е определено от 114 проби с използване на QFM ELISA (фигура 5).



Фигура 5. Разпределение на QFM IFN-γ отговорите при привидно здрави индивиди (n = 114; медиана = 400,5 IU/ml).

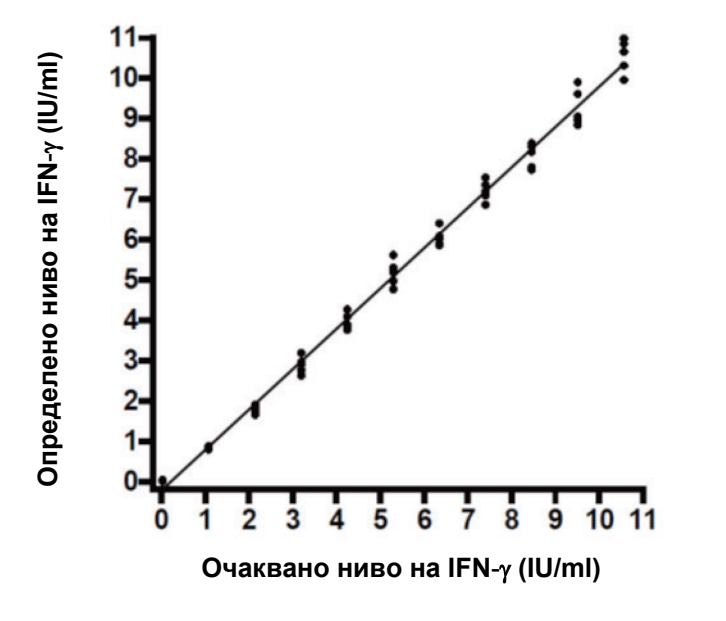
QFM отговори при пациенти с трансплантация на солиден орган

QFM е оценен при неконтролирано проучване на базата на моментното състояние (cross-sectional study) при пациенти с трансплантация на солиден орган (4). Проучването включва: 212 здрави индивиди с подгрупа от 30 съответстващи по възраст и пол контроли, 30 предтрансплантационни пациенти, 18 ранни посттрансплантационни пациенти (66 проби; медиана на време посттрансплантационно = 21 дни), както и 11 пациенти в късния посттрансплантационен период (медиана на време посттрансплантационно = 2290 дни). Средното производство на IFN- γ е 555,2 IU/ml при здрави контроли и 614,6 IU/ml при контроли, съответстващи по възраст и пол. Доказано е, че средното производство на IFN- γ е значително по-ниско при предтрансплантационните (IFN- γ = 89,3 IU/ml) и ранните посттрансплантационни (IFN- γ = 3,76 IU/ml) пациенти в сравнение с контролите, съответстващи по възраст и пол ($p < 0,001$). Наблюдавано е възстановяване на имунната функция при пациенти в късния посттрансплантационен период (средно IFN- γ = 256,1 IU/ml) и е доказано, че то е значително по-високо, отколкото при пациенти в ранния посттрансплантационен период ($p < 0,05$). Това проучване показва, че QFM може да се използва за оценка на клетъчно медираната имунна функция при имunosупресирана популация с трансплантация на солиден орган.

Работни характеристики на теста

Доказано е, че QFM ELISA е линеен чрез поставяне на 5 репликата на 11 сборни плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ на случаен принцип в плака за ELISA. Линеината регресионна линия е с наклон от $1,002 \pm 0,011$ и корелационен коефициент от 0,99 (фигура 6).

Границата на откриване на QFM ELISA е 0,065 IU/ml и няма доказателства за прозонов (Hook) ефект на висока концентрация при концентрации на IFN- γ до 10 000 IU/ml.



Фигура 6. Линеен профил на QFM ELISA, установен чрез тестване на 5 репликата на 11 плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ .

Възпроизводимостта на теста QFM (стадий 1) е определен с използване на кръвни проби от 20 здрави индивиди. Оценени са трима различни оператори, партиди QFM LyoSphere и набори от оборудване. Средният коефициент на вариация на нивата на IFN- γ отговор, определени с използване на QFM ELISA за всичките три партиди на QFM LyoSpheres и всичките три тествани условия, е 22,22% (95% CI: 17,20–27,25).

Повторяемостта на теста QFM (стадий 1) е оценена чрез измерване на вариацията на 5 до 6 повторни QFM LyoSphere кръвни стимулации за същия донор в рамките на 14 индивиди. Средният коефициент на вариация в рамките на тестваните 14 индивиди е 14,7% (95% CI: 10,2–19,2). %CV на отделните индивиди е под 30%.

Възпроизводимостта на QFM ELISA (стадий 2) е оценена чрез изследване на 20 плазмени проби с различни концентрации на IFN- γ в 3 репликата, в 3 центъра, в 3 непоследователни дни от 3-ма оператори. По този начин всяка проба е тествана 27 пъти в 9 независими работни цикъла на теста. Една проба е нулевата контрола и е с изчислена концентрация на

IFN- γ от 0,08 IU/ml (95% CI: 0,07–0,09). При останалите 19 плазмени проби диапазонът на концентрациите е 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) до 7,7 IU/ml (95% CI: 7,48–7,92).

Неточността в рамките на работния цикъл или интратестовата неточност е определена приблизително чрез усредняване на %CV за всяка тестова плазма, съдържаща IFN- γ от всеки работен цикъл на плаката (n = 9), като неточността е в диапазона от 4,1 до 9,1% CV. Средният %CV в рамките на работния цикъл (\pm 95% CI) е 6,6% \pm 0,6%. Средната стойност на нулевата IFN- γ плазма е 14,1% CV.

Общата или интертестовата неточност е определена чрез сравняване на 27 изчислени концентрации на IFN- γ за всяка плазмена проба. Интертестовата неточност е в диапазона от 6,6 до 12,3% CV. Общият среден %CV (\pm 95% CI) е 8,7% \pm 0,7%. Нулевата IFN- γ плазма показва 26,1% CV. Това ниво на вариация се очаква, тъй като изчислената концентрация на IFN- γ е ниска и вариацията около ниска приблизителна оценка ще е по-голяма от тази при по-високи концентрации.

Техническа информация

Плазмени проби със съсиреци

Ако при продължително съхраняване на плазмените проби се появят фибринови съсиреци, пробите се центрофугират, за да се утаи съсиреният материал и да се улесни пипетирането на плазмата.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да е полезно при отстраняване на проблеми, които може да възникнат. За повече информация вижте също техническата информация, предоставена на: www.QuantiFERON.com. За информация за контакти вижте задната корица.

Отстраняване на проблеми при ELISA

Неспецифично оцветяване

Възможна причина	Решение
а) Непълно промиване на плаката	Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на накисване от най-малко 5 секунди между циклите.
б) Кръстосано контаминиране на ямките за ELISA	Внимавайте при пипетирането и смесването на пробата за свеждане на риска до минимум.
в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност	Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100x концентрат се използват в рамките на 3 месеца сред датата на разтварянето.
г) Разтворът на ензимен субстрат е контаминиран	Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реагенти.
д) Смесване на плазмата в епруветки за QFM преди събирането ѝ	След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

Ниски отчитания на оптичната плътност за стандартите

Възможна причина	Решение
а) Грешка при разреждането на стандарта	Уверете се, че разрежданията на стандарта на набора са извършени правилно съгласно настоящата листовка.

Отстраняване на проблеми при ELISA

- | | |
|--|---|
| б) Грешка при пипетирането | Уверете се, че пипетите са калибрирани и се използват съгласно инструкциите на производителя. |
| в) Температурата на инкубиране е прекалено ниска | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (17 до 27°C). |
| г) Времето на инкубиране е твърде кратко | Инкубирайте плаката с конюгат, стандарти и проби за 120 ± 5 минути. Инкубирайте разтвора на ензимния субстрат в плаката за 30 минути. |
| д) Използван е неправилен филтър на четеца за плаки | Плаките трябва да се отчитат при 450 nm с референтен филтър между 620 и 650 nm. |
| е) Реагентите са твърде студени | Всички реагенти, с изключение на конюгата 100× концентрат, трябва да се темперират до стайна температура преди започване на теста. Това отнема около един час. |
| ж) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100× концентрат се използват в рамките на 3 месеца след датата на разтварянето. |

Висок фон

- | Възможна причина | Решение |
|--|---|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на накисване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Температурата на инкубиране е твърде висока | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (17 до 27°C). |

Отстраняване на проблеми при ELISA

- | | |
|--|---|
| в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100× концентрат се използват в рамките на три месеца сред датата на разтварянето. |
| г) Разтворът на ензимен субстрат е контаминиран | Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реагенти. |

Нелинейна стандартна крива и променливост на двойните проби

- | Възможна причина | Решение |
|---|---|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на накисване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Грешка при разреждането на стандарта | Уверете се, че разрежданията на стандарта са извършени правилно съгласно настоящата листовка. |
| в) Лошо смесване | Смесвайте добре реагентите чрез обръщане или леко разбъркване преди прибавянето им към плаката. |
| г) Непостоянна техника на пипетиране или прекъсване по време на извършване на теста | Прибавянето на пробата и стандарта трябва да се извършва без прекъсване. Всички реагенти трябва да бъдат приготвени преди началото на теста. |













Информация за продукта и технически справочници се предлагат безплатно от QIAGEN или чрез Вашия дистрибутор, или като посетите www.QuantiFERON.com.

Литературни източници

Пълен списък на литературните източници относно QFM можете да намерите на Gnowee — справочната библиотека на QuantiFERON, достъпна на 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.

СИМВОЛИ

 2 x 96	Достатъчно за 2 x 96 подготовки на проби
	Законен производител
	Символ за CE-IVD маркировка
	За in vitro диагностика
	Код на партида
	Каталожен номер
	Годно до
	Температурни ограничения
	Вижте инструкциите за употреба
	Да не се използва повторно
	Да се пази от слънчева светлина
	Оторизиран представител в Европейската общност

Информация за контакти

За техническа помощ и повече информация позвънете на безплатния телефон 00800-22-44-6000, вижте нашия център за техническа поддръжка на www.qiagen.com/contact или се свържете с един от отделите за техническа поддръжка на QIAGEN (вижте задната корица или посетете www.qiagen.com).

Съкратена процедура на теста

Етап 1 — инкубиране на кръвта

1. Вземете кръв от пациента или в епруветка за вземане на кръв за QFM, или в епруветка за вземане на кръв с литиев хепарин. Поставете етикети на епруветките с данните за пациента и часа на вземане на кръвта, след което транспортирайте до лабораторията при стайна температура до 8 часа от вземането.



- a. Ако кръвта е взета в епруветка с литиев хепарин, разпределете аликвот от 1 ml кръв в епруветката за вземане на кръв за QFM и поставете етикет с данните за пациента и часа на вземане на кръв

2. Добавете 1 QFM LyoSphere във всяка епруветка за вземане на кръв за QFM, съдържаща 1 ml кръв, разтворете LyoSphere, след което инкубирайте епруветките **изправени** възможно най-скоро (в рамките на 8 часа от вземането на кръвта) за период от 16 до 24 часа при 37°C.



3. След инкубирането центрофугирайте епруветките за 15 минути при 2000 до 3000 × g (RCF) с цел разделяне на плазмата и еритроцитите.

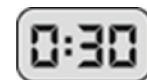
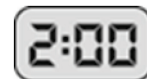


4. След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.



Етап 2 — IFN- γ ELISA

1. Темперирайте ELISA компонентите, с изключение на конюгата 100 \times концентрат, до стайна температура за най-малко 60 минути.
2. Разтворете стандарта на набора до 8,0 IU/ml с дестилирана или дейонизирана вода. Подгответе 4 разреждания на стандарта.
3. Разтворете лиофилизирания конюгат 100 \times концентрат с дестилирана или дейонизирана вода.
4. Пригответе конюгат с работна концентрация в зеления разредител и добавете 50 μ l във всяка ямка.
5. Добавете 50 μ l тестови плазмени проби (неразредени, разреждания 1:10 и 1:100 според необходимостта) и 50 μ l стандарти към съответните ямки. Смесете с шейкър.
6. Инкубирайте за 120 \pm 5 минути на стайна температура.
7. Промийте ямките най-малко 6 пъти с 400 μ l/ямка от промивния буфер.
8. Добавете 100 μ l разтвор на ензимен субстрат в ямките. Смесете с шейкър.
9. Инкубирайте за 30 минути на стайна температура.
10. Добавете 50 μ l ензимен стопиращ разтвор във всички ямки. Смесете с шейкър.
11. Отчетете резултатите при 450 nm с референтен филтър 620 до 650 nm.
12. Анализирайте резултатите.



Забележки

Значими промени

Значимите промени в това издание на листовката за QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA са обобщени в таблицата по-долу:

Раздел	Страница	Промяна (Промени)
Предпазни мерки	11	Нова информация за Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химични вещества (GHS)
Предпазни мерки	12	Добавени инструкции за безопасност, свързани с флакони, които имат метални обкатки.

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

Ограничено лицензионно споразумение за набора QuantiFERON Monitor

Използването на продукта означава приемане от закупилите или използващите продукта лица на следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящото ръководство, както и само с компонентите, включени в набора. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този набор с каквито и да е компоненти, които не са включени в него, с изключенията, описани в протоколите, предоставени с продукта, ръководството и допълнителните протоколи, които можете да намерите на www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са щателно тествани или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN нито предоставя гаранция, нито заявява, че те не нарушават правата на други производители.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава никаква гаранция, че този набор и/или неговата употреба(и) не нарушават права на други производители.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично отхвърля всички други лицензи, посочени или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора дават съгласие да не предприемат или да позволяват на други лица да предприемат каквито и да е стъпки, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензионно споразумение в който и да е съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски хонорари, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензионно споразумение или някое от правата на интелектуална собственост, свързани с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, всички права запазени.

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

