

QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA Prospektüsü

Σ 2 x 96


Doğuştan gelen ve uyuma dayalı uyarıcılara verilen yanıtları
ölçen tam kan IFN- γ testi

Sürüm 1

IVD in vitro tanı amaçlı kullanım için

CE

REF 0650-0201

 QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, ABD

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ALMANYA

1079024TR Rev. 03

 www.QuantiFERON.com



İçindekiler

Kullanım Amacı	4
Test Özeti ve Açıklaması	4
Test prensipleri	5
Testi gerçekleştirmek için gereken süre	5
Bileşenler ve Saklama	6
Gerekli olan ancak sağlanmayan malzemeler	8
Saklama ve kullanma	8
Uyarılar ve Önlemler	9
Uyarılar	9
Önlemler	10
Numune Toplama ve Kullanımı	12
Kullanım Talimatları	15
Hesaplamalar ve Testin Yorumlanması	21
Standart eğrinin çizilmesi	21
Testin kalite kontrolü	22
Sonuçların yorumlanması	22
Sınırlamalar	23
Performans Özellikleri	24
Klinik çalışmalar	24
Test performans özellikleri	28
Teknik Bilgiler	29
Pıhtılaşmış plazma örnekleri	29
Sorun Giderme Kılavuzu	30
Referanslar	32
Semboller	33
İletişim Bilgileri	33
Kısaltılmış Test Prosedürü	34

Kullanım Amacı

QuantiFERON İzleme testi (QFM), heparinli tam kanın inkübasyonunun ardından, plazmadaki interferon gammanın (IFN- γ) enzime bağlı immüno-sorbent testi (ELISA) ile ölçülmesi yoluyla, hücre dolayımı bağışıklık işlevinin doğuştan gelen ve uyuma dayalı yanıt uyarıcılarıyla tespit edilmesine yönelik bir in vitro diyagnostik testtir. Bu test, bağışıklığı baskılanmış solid organ nakli popülasyonunda hücre dolayımı bağışıklık yanıtını tespit etmede kullanılır.

QFM risk değerlendirmesi ve diğer tıbbi ve tanısal değerlendirmeler ile bağlantılı olarak kullanılmaya yöneliktir.

Test Özeti ve Açıklaması

Bağışıklık yetmezliği, bağışıklık yanıtını etkili biçimde sunma yetisinde azalma olması ile karakterizedir. Bu yanıt eksikliği ya da yokluğu, birincil ya da edinilmiş (ikincil) bağışıklık yetmezliğinden ileri gelebilir (1).

Birincil bağışıklık yetmezlikleri genetik olarak kalıtsaldır ve uyuma dayalı ya da doğuştan gelen bağışıklık sisteminin belirli bileşenlerinin eksiklikleri ile karakterizedir (1). Bununla birlikte, çoğu bağışıklık yetmezliği edinilmiş (ikincil) olur ve patojenik ajanlar, ilaçlar (organ nakli sonrasında bağışıklık baskılayıcı tedavi gibi), hastalık durumları (örn. lösemi ve lenfoma gibi kanser türleri) veya çevredeki kirletici maddeler ile indüklenebilir (1).

Bağışıklık yetmezliğinin moleküler temeli çeşitlilik gösterir; bununla birlikte, hücre dolayımı bağışıklık, gözlemlenen klinik görünümlerin çoğunun indüklenmesinde kilit rol oynar. Mevcut durumda, bağışıklık yetmezliğinin tanısı ve tedavisi ona neden olan ajana bağlıdır (2, 3).

Örneğin, ihtiyaca göre tedavi, solid organ nakli (SON'ler) geçiren ve bağışıklık sistemlerinin baskılanması için ilaç almakta olan hastaların hücre bağışıklık yetmezliği durumunu izlemede norm niteliğindedir. Hastanın bağışıklık yetmezliğinin durumu genellikle farmakolojik ilaç seviyelerinin ve greft işlevinin klinik/patolojik değişiminin izlenmesi yoluyla ölçülür (2, 3).

Fitohemagglutinin (PHA), şekerçi boyası mitojeni ve konkanavalin A (ConA) gibi mitojenlere olan hücre dolayımı bağışıklığı ölçmek için bir dizi T hücresi işlevi testi kullanılır; öte yandan, bu testler yalnızca T hücrelerinin işlevsel yetisini ölçer ve bunlar hücre dolayımı bağışıklıkta rol oynayan hücrelerin bir alt kümesidir. Doğuştan gelen mekanizmaların, konağın savunmasına, ya tek başına etki göstererek ya da belirli T hücresi yanıtlarını artırarak büyük katkıda bulunduğu gitgide bariz hale gelmiştir. Bu nedenle, doğuştan gelen (doğal öldürücü [NK] hücre) ve uyuma dayalı (T hücresi) bağışıklık hücrelerinin işlevsel yanıtları birlikte, hücre dolayımı bağışıklığa dair daha kapsamlı bir analiz oluşturmaktadır (2, 3).

QFM gerek doğuştan gelen, gerekse uyuma dayalı bağışıklık sistemlerinde rol oynayan farklı türlerdeki hücreleri özel olarak uyaran uyarıcıların (LyoSphere™ peleti biçiminde) bileşiminin kullanıldığı bir in vitro diyagnostik testtir. Bir

hastanın işlevsel bağışıklık durumu, doğuştan gelen ya da uyuma dayalı bağışıklık sisteminin, sırasıyla Toll Benzeri Reseptör (TLR) ve T hücre reseptörü (TCR) agonistleri ile uyarılmasına verilen yanıtın ölçülmesi ile değerlendirilir. Interferon-gammanın (IFN- γ) ELISA ile tespit edilmesi, hücre dolayımı bağışıklık işlevine dair gerek niceliksel, gerekse niteliksel bir ölçüm sağlar.

Test prensipleri

QFM testinde, heparinli tam kana eklenen liyofilize uyarıcılar (QFM LyoSpheres™) kullanılır. Tüpler içinde 16 ila 24 saatte meydana gelen kanın inkübasyonundan sonra plazma toplanır ve uyarıcılara yanıt olarak üretilen IFN- γ varlığı açısından test edilir.

QFM testi aşamalar halinde gerçekleştirilir. Öncelikle, tam kan QFM Kan Alma Tüpü içine toplanır. Ardından, QFM LyoSphere tüpe eklenir; daha sonra tüp mümkün olan en kısa sürede ve alındıktan sonra 8 saat içinde 37°C'de inkübe edilir. 16 ila 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından, tüpler santrifüjlenir, plazma alınır, IFN- γ (ml başına Uluslararası birim olarak bildirilir; IU/ml) miktarı ELISA ile ölçülür ve hastanın bağışıklık yanıtını karakterize etmek üzere beklenen veriler yelpazesi ile karşılaştırılır.

QFM bağışıklık işlevine dair hem niceliksel, hem de niteliksel ölçüm sağlayan bir testtir. QFM sonuçları bağışıklık baskılama düzeyini doğrudan niceliklendirmeyebilir.

Plazma örneklerindeki IFN- γ miktarı, bireylerin bağışıklık baskılanma oranı orta düzeyde olduğunda bile, çoğu ELISA okuyucusunun üst sınırlarının üzerinde olabilir. Plazma örneklerinin Yeşil Seyreltici içinde, 10'da 1 ve/veya 100'de 1 oranlarında seyreltilmesi ve seyreltilmemiş plazma ile ELISA'da birlikte test edilmesi tavsiye edilir.

Not: QFM testinin eşiği, hastanın bağışıklık baskılanma düzeyine ve bireydeki nakil ayarlarına göre değişkenlik sergileyebilir.

QFM sonuçlarının nasıl yorumlandığına dair genel bilgi için bu ambalaj prospektüsünün "Sonuçların yorumlanması", sayfa 22 bölümüne bakın.

Testi gerçekleştirmek için gereken süre

QFM testini gerçekleştirmek için gereken süre aşağıda hesaplanmıştır. Gruplandırılmış birden çok örneğin test süresi de gösterilmiştir.

Kan tüplerinin 37°C'de inkübasyonu: 16 ila 24 saat

ELISA: Bir ELISA plaka için yaklaşık olarak 3 saat
(en fazla 88 örnek)

< 1 saat işçilik

Her bir ekstra plaka için 10 ila 15 dakika eklenmelidir

Bileşenler ve Saklama

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Katalog no.	0650-0701
Prep sayısı	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 şişe
<i>QuantiFERON Monitor LyoSpheres Prospektüsü</i>	1
QuantiFERON Monitor Kan Alma Tüpleri	
Katalog no.	0650-0101
Prep sayısı	100
QuantiFERON Monitor Kan Alma Tüpleri (beyaz kapakçık, beyaz halka)	100 tüp
<i>QuantiFERON Monitor Kan Alma Tüpleri Prospektüsü</i>	1

QuantiFERON Monitor 2 Plakalı ELISA Kiti bileşenleri	2 Plakalı ELISA Kiti
Katalog no.	0650-0201
Microplate Strips, 12 × 8 wells (Mikroplaka Stripleri, 12 × 8 kuyulu) (murin anti-human IFN- γ monoklonal antikorlu kaplı)	2 set 12 × 8 kuyulu Mikroplaka Stripleri
IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ Standardı, liyofilize) (rekombinant insan IFN- γ , bovin kazein, %0,01 w/v Thimerosal içerir)	1 × şişe (çözüldüğünde 8 IU/ml)
Green Diluent (Yeşil Seyreltici) (bovin kazein, normal fare serumu, %0,01 w/v Thimerosal içerir)	1 × 30 ml şişe
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (Konjugat 100× Konsantre, liyofilize) (murin anti-human IFN- γ HRP, %0,01 w/v Thimerosal içerir)	çözüldüğünde 1 × 0,3 ml
Wash Buffer 20× Concentrate (Yıkama Tamponu 20× Konsantre) (pH 7,2, %0,05 v/v ProClin® 300 içerir)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzim Substrat Solüsyonu) (H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' Tetrametilbenzidin içerir)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzim Durdurma Solüsyonu) (0,5 M H ₂ SO ₄ içerir)*	1 × 15 ml
QuantiFERON Monitor ELISA Prospektüsü	1

* Sülfürik asit içerir. Önlemler için bkz. sayfa 11.

Gerekli olan ancak sağlanmayan malzemeler

- 37°C inkübatör; CO₂ gerekmez
- Kalibre edilmiş, değişken hacimli pipetler*
- 50 µl ila 100 µl uygulama kapasiteli, kalibre edilmiş çok kanallı pipetler† ve tek kullanımlık uçları
- Mikroplaka çalkalayıcı†
- 2 litre deiyonize veya damıtılmış su
- Mikroplaka yıkayıcı (otomatik yıkayıcı tavsiye edilir)
- 450 nm filtreli ve 620 nm ila 650 nm referans filtreli mikroplaka okuyucu†
- Adımlı silindir (ölçme silindiri)
- Düşük havlı, emici havlular

Saklama ve kullanma

Kan alma tüpleri

QFM Kan Alma Tüplerini 4 ila 25°C'de saklayın. QFM Kan Alma Tüpleri kanı doldurma ve karıştırma sırasında 17–25°C sıcaklığında olmalıdır.

LyoSpheres

QFM LyoSpheres'i 2 ila 8°C'de saklayın.

ELISA Kiti Reaktifleri

ELISA kit reaktiflerini 2 ila 8°C'de saklayın.

Enzim Substrat Solüsyonunu daima doğrudan güneş ışığından koruyun.

Yeniden hazırlanmış ve kullanılmamış ELISA reaktifler

ELISA reaktiflerinin yeniden hazırlanmasına yönelik talimatlar için bkz. "2. Aşama – IFN-γ ELISA", sayfa 16.

- Yeniden hazırlanan kit standardı, 2 ila 8°C'de saklandığı takdirde 3 aya kadar muhafaza edilebilir.
Kit standardının yeniden hazırlandığı tarihi kaydedin.
- Yeniden hazırlandığında, kullanılmamış Konjugat 100× Konsantresi 2 ila 8°C'de saklanmaya devam edilmeli ve 3 ay içinde kullanılmalıdır.
Konjugatın yeniden hazırlandığı tarihi kaydedin.

* Cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

- Kullanıma hazır konjugat, hazırlanmasından itibaren 6 saat içinde kullanılmalıdır (bkz. Tablo 1).
- Kullanıma hazır Yıkama Tamponu oda sıcaklığında ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) 2 haftaya kadar saklanabilir.

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım için

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDSs) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

Uyarılar

- QFM bağışıklık işlevine dair hem niceliksel, hem de niteliksel ölçüm sağlayan bir testtir. QFM sonuçları bağışıklık baskılama düzeyini doğrudan niceliklendirmeyebilir.
- QFM testinin sonuçları, bir hastanın bağışıklık durumu tespit edilirken, klinik görünüm, tıbbi öykü ve diğer klinik göstergeler ile birlikte kullanılmalıdır.
- QFM testinin eşiği, hastanın bağışıklık baskılanma düzeyine ve bireydeki nakil ayarlarına göre değişkenlik sergileyebilir.

Önlemler

Sadece in vitro tanı amaçlı kullanım içindir.



DİKKAT: İnsan kanını ve plazmasını kullanırken potansiyel enfeksiyöz olarak değerlendirin. İlgili kan ve kan ürünü kullanımı yönergelerine uyun. Kan veya kan ürünleri ile temas eden örnekleri ve materyalleri federal, ulusal ve yerel düzenlemelere uygun şekilde imha edin.

Aşağıdaki tehlikeler ve önleyici bildirimler QuantiFERON Monitor ELISA bileşenleri için geçerlidir.

Tehlike Bildirimleri



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON Enzim Durdurma Solüsyonu)

İçerik: sülfürik asit. Uyarı! Metalleri aşındırabilir. Cilt tahrişine yol açar. Ciddi göz tahrişine yol açar. Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON Enzim Substrat Solüsyonu)

Uyarı! Hafif cilt tahrişine yol açar. Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.



QuantiFERON Green Diluent (QuantiFERON Yeşil Seyreltici)

İçerik: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. İçerik: tartrazin. Uyarı! Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar. Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (QuantiFERON Yıkama Tamponu 20× Konsantre)

İçerik: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Sucul ortamda uzun süre kalıcı, zararlı etki. Çevreye verilmesinden kaçının.

Daha fazla bilgi

Güvenlik Veri Sayfaları: www.qiagen.com/safety

- *QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA Prospektüsünden* farklı işlemler, hatalı sonuçlara yol açabilir. Lütfen kullanmadan önce talimatları dikkatlice okuyun.
- **Önemli:** Flakonları kullanmadan önce inceleyin. Conjugate, IFN- γ Standard veya QFM LyoSphere flakonlarında hasar belirtileri görülüyor ya da kauçuk mühür bozulmuş durumda ise flakonları kullanmayın. Kırık flakonları işleme koymayın. Flakonları güvenli biçimde bertaraf etmek için güvenlik önlemlerini alın. Öneri: Metal kıvrımlı kapak nedeniyle yaralanma riskini en aza indirmek için Conjugate, IFN- γ Standard veya QFM LyoSphere flakonlarını açmak üzere flakon kıvrım açıcı kullanın.
- Kullanım öncesinde bir reaktif şişesinde hasar veya akma ibaresi görülüyorsa, ELISA kiti kullanmayın.
- Farklı QFM ELISA kit gruplarından alınan Mikroplaka Striplerini, IFN- γ Standardını, Yeşil Seyrelticiyi veya Konjugat 100 \times Konsantresini karıştırmayın veya kullanmayın. Reaktiflerin son kullanma tarihleri ve kaydedilen lot ayrıntıları içinde kullanılması şartıyla, diğer reaktifler (Yıkama Tamponu 20 \times Konsantre, Enzim Substrat Solüsyonu ve Enzim Durdurma Solüsyonu) kitler arasında değiştirilebilir.
- Kullanılmamış reaktifleri ve biyolojik örnekleri yerel, ulusal ve çevresel düzenlemelere uygun şekilde atın.
- QFM Kan Alma Tüplerini, QFM LyoSpheres'i veya QFM ELISA'yı son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Laboratuvar ekipmanının kullanım için kalibre edilmiş/onaylanmış olduğundan emin olun.

Numune Toplama ve Kullanımı

QFM testi yalnızca ya lityum heparin kan alma tüpü kullanılarak ya da doğrudan QFM Kan Alma Tüpü içine alınan tam kan kullanılarak gerçekleştirilmelidir; test başına 1 ml tam kan gereklidir. Kan alma tüpleri uygun şekilde etiketlenmelidir ve kanın alındığı saat üzerinde belirtilmelidir.

Önemli: Hem QFM kan örneklerinin stimülasyonu (başka bir deyişle 1 ml kan alikotuna QFM LyoSphere'in eklenmesi) hem de ardından 37°C'de inkübasyonu kanın alınmasından sonraki 8 saat içinde gerçekleştirilmelidir.

İnkübasyon öncesinde kan örneklerini oda sıcaklığında tutun ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).

En iyi sonuçları elde etmek için aşağıdaki prosedürler izlenmelidir:

1. Tüpleri uygun şekilde etiketleyin.

Her QFM Kan Alma Tüpünün, hastanın bilgileri ve kanın alındığı saat ile uygun şekilde etiketlendiğinden emin olun.

2. Her bir kişi için, venipunktür ile doğrudan her bir QFM Kan Alma Tüpüne 1 ml kan alın. Bu prosedür eğitimli bir flebotomist tarafından gerçekleştirilmelidir.

Önemli not: Kan doldurma sırasında sıcaklık $17\text{--}25^\circ\text{C}$ arasında olmalıdır.

QFM Kan Alma Tüpleri, deniz seviyesinin üstünde en fazla 810 m rakıma kadar kullanılabilir.

1 ml'lik tüpler diğer tüplere göre kanı biraz yavaş aldığından, tüp tamamen dolduğunda tüpü 2–3 saniye iğnenin üzerinde bekletin. Bu, doğru hacimde kanın tüpe alınmasını sağlayacaktır.

QFM Kan Alma Tüpünün yan tarafındaki siyah işaret, 1 ml'lik dolun hacmini gösterir. QFM Kan Alma Tüpleri $1 \text{ ml} \pm \%10$ kan almak üzere imal edilir ve bu aralık dahilinde en iyi performansı sergiler. Herhangi bir tüpteki kan seviyesi, gösterge çizgisinin dışındaysa yeni bir kan örneği elde edilmelidir.

Kan alımı için “kelebek” iğne kullanılıyorsa, kullanılan QFM Kan Alma Tüplerinden önce, hortumun kanla dolduğundan emin olmak için bir “tahliye” tüpü kullanılmalıdır.

QFM Kan Alma Tüplerini 810 metreden yüksek bir rakımda kullanıyorsanız ya da alınan kan hacmi düşükse, kullanıcılar kanı bir şırınga kullanarak alabilir ve QFM Kan Alma Tüpüne hemen 1 ml kan transfer edebilir.

Güvenlik nedeniyle, bu işlemi yaparken şırınga iğnesini çıkarın, ilgili güvenlik prosedürlerini uygulayarak, QFM Kan Alma Tüpünün kapağını çıkarın ve içine 1 ml kan ekleyin (tüp etiketinin yan tarafındaki siyah işaretin ortasına kadar). Kapağı sıkıca kapatın ve aşağıda anlatıldığı gibi karıştırın.

Eğer turnike kullanırsanız, kan hacmini etkileyebilecek, basınçtaki değişkenlikleri önlemek için, iğne vene batırılır batırılmaz turnikeyi gevşetin.

Alternatif olarak, kan antikoagülan olarak lityum heparin içeren tek bir jenerik kan alma tüpüne alınabilir ve ardından QFM Kan Alma Tüpüne transfer edilebilir. Diğer antikoagülanlar testle etkileşime girdiğinden antikoagülan olarak sadece lityum heparin kullanın. Bir kan alma tüpünü doldurun (minimum hacim 3 ml) ve heparini çözmek için birkaç kez ters çevirerek yavaşça karıştırın. QFM LyoSphere ile stimülasyon için QFM Kan Alma Tüplerine aktarmadan önce kanı oda sıcaklığında ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) tutun. Kanın dağıtılmadan hemen önce yavaşça ters çevrilerek iyice karıştırıldığından emin olun. QFM Kan Alma Tüpünde 1 ml kan alikvotu hazırlayın. Hazırlama işlemini aseptik olarak, ilgili güvenlik prosedürlerinin uygulanmasını sağlayarak, QFM Kan Alma Tüpünün kapağını çıkarıp 1 ml kan ekleyerek (tüpün etiketinin yanındaki siyah işarete kadar) gerçekleştirin. Tüp kapaklarını sıkıca kapatın ve aşağıda anlatıldığı gibi karıştırın.

3. Tüpleri doldurduktan hemen sonra, heparinin çözünmesi için tüpü birkaç kez nazikçe baş aşağı çevirin.

Önemli: Aşırı şiddetli çalkalama jel bozunumuna ve anormal sonuçların alınmasına neden olabilir.

4. Kullanımdan hemen önce, QFM LyoSpheres'i oda sıcaklığına ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) gelecek şekilde dengeleyin.

5. Aseptik olarak, 1 ml kana bir QFM LyoSphere ekleyin.

Kan alma tüpünün kapağını açın.

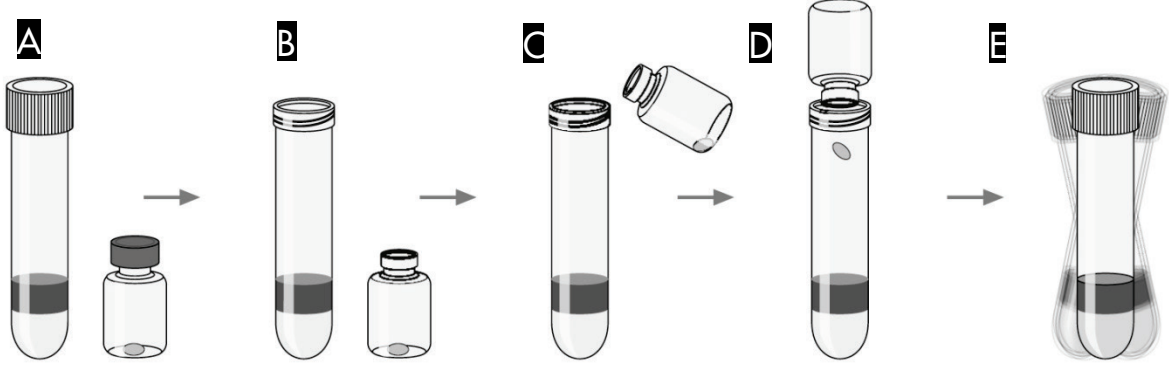
QFM LyoSphere'in flakonun dibinde olduğundan emin olmak için, QFM LyoSphere'i sert bir yüzeye nazikçe vurun. Önce metal kıvrımlı kapakçığı, ardından kauçuk tıpayı çıkararak, QFM LyoSphere flakonunun kapağını açın.

Cam flakonun ağzını QFM Kan Alma Tüpünün ağzı ile hizalayarak, QFM LyoSphere'i 1 ml'lik kan örneği içine dikkatli biçimde damlatın, ardından flakonu nazikçe baş aşağı çevirerek QFM LyoSphere'i QFM Kan Alma Tüpüne aktarın (bkz. Şekil 1).

Önemli: Eğer QFM LyoSphere QFM Kan Alma Tüpünün dışına düşerse onu atın ve başka bir QFM LyoSphere flakonu açın.

Önemli: QFM LyoSphere flakonunu uzun süreler boyunca açık olarak bırakmayın. QFM LyoSphere, flakonun kapağı açılır açılmaz kana eklenmelidir.

Eğer QFM LyoSpheres QFM Kan Alma Tüpü içine alınmış olan kana ekleniyorsa tüp kapaklarının doğru örneklere döndürüldüğünden emin olun.



Şekil 1. QFM LyoSphere'i Ekleme. **A** QFM Kan Alma Tüpü ve QFM LyoSphere flakonu. **B** QFM Kan Alma Tüpü'nün kapağını çıkarın ve QFM LyoSphere flakonun metal kıvrımını ve kauçuk tıpasını çıkarın. **C** Cam flakonun ağzını kan alma tüpünün ağzı ile hizalayarak, QFM LyoSphere'i kana hemen ekleyin. **D** Ardından, flakonu nazikçe baş aşağı çevirerek LyoSphere'i kan alma tüpüne aktarın. **E** QFM Kan Alma Tüpü'nün kapağını yeniden takın ve 5–10 kez sallayın.

6. QFM Kan Alma Tüpü'nün kapağını takın ve onu 5–10 defa, QFM LyoSphere'in tam olarak çözündüğünden emin olmaya yetecek kadar sertçe sallayın.

QFM LyoSphere iç tüp yüzeyine yapışırsa tüp baş aşağı çevrilirken kandaki LyoSphere'i kaplayarak çözündürülebilir.

Aynı tüpe ikinci bir LyoSphere'in kazara eklenmesini engellemek için QFM LyoSphere eklendiği zaman tüpün kapağının kapandığından emin olun.

Not: QFM LyoSphere beyaz olduğu için, çözündüğü zaman artık kanda gözle görülür olmayacaktır.

Önemli: Aşırı şiddetli çalkalama jel bozunumuna ve anormal sonuçların alınmasına neden olabilir.

7. QFM LyoSphere eklendikten ve çözündürüldükten sonra, QFM Kan Alma Tüpleri mümkün olduğunca hızlı bir şekilde ve kan almayı takip eden 8 saat içinde $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'lik inkübatöre transfer edilmelidir.

Kullanım Talimatları

1. Aşama – kanın inkübasyonu ve plazmanın toplanması

Sağlanan malzemeler

- QFM Kan Alma Tüpleri (bkz. “Bileşenler ve Saklama”, sayfa 6)

Gerekli olan (ancak sağlanmayan) malzemeler

- Bkz. “Gerekli olan ancak sağlanmayan malzemeler”, sayfa 8

Prosedür

1. 1 ml kan alikuotları içeren QFM Kan Alma Tüplerini, QFM LyoSphere 16 ila 24 saat süreyle $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de DİK olacak şekilde inkübe edin.

Not: İnkübatörün CO_2 içermesi veya nemli olması gerekli değildir.

İnkübasyondan sonra, QFM Kan Alma Tüpleri santrifüjlenmeden önce, 4 ila 27°C arasında 3 güne kadar saklanabilir.

2. İnkübasyondan sonra, plazmanın alınması, QFM Kan Alma Tüplerinin 2000 ila $3000 \times g$ 'de (RCF) 15 dakika santrifüjlenmesi ile kolaylaştırılır. Jel tıpası, hücreleri plazmadan ayırır. Eğer bu meydana gelmezse tüpleri yeniden santrifüjleyin.

Santrifüj yapılmadan da plazmayı almak mümkündür, ancak hücreleri bozmadan plazmayı ayırmak için ekstra dikkat edilmesi gereklidir.

3. Plazma örnekleri yalnızca pipet ile toplanmalıdır.

Önemli: Santrifüj yaptıktan sonra, plazmayı toplamadan önce aşağı ve yukarı doğru pipetleme yapmaktan veya herhangi bir yolla plazmayı karıştırmaktan kaçının. İşlemin her aşamasında, jel üzerindeki materyali bozmamaya dikkat edin.

Plazma örnekleri doğrudan santrifüj edilmiş kan toplama tüplerinden QFM Kan Alma Tüplerine yüklenebilir. Bu durum, otomatik ELISA platformları kullanıldığında da geçerlidir.

Plazma örnekleri 2 ila 8°C 'de 28 güne kadar saklanabilir veya toplanmışlarsa -20°C 'nin altında uzun süre saklanabilir. Alınan plazma örneklerinin alikuotları saklama öncesinde mühürlenmelidir.

Eğer plazma örneklerini alıyorsanız, gerekirse tekrar test yapılmasına imkan vermek üzere en az 150 μl plazma alın.

Plazma örneklerindeki IFN- γ miktarı, bireylerin bağışıklık baskılanma oranı orta düzeyde olduğunda bile, çoğu ELISA okuyucusunun üst sınırlarının üzerinde olabilir. Plazma örneklerinin Yeşil Seyreltici içinde, 1:10 ve/veya 1:100 oranlarında seyreltilmesi ve seyreltilmemiş plazma ile ELISA'da birlikte test edilmesi tavsiye edilir (bkz. “2. Aşama – IFN- γ ELISA”).

2. Aşama – IFN- γ ELISA

Sağlanan malzemeler

- QuantiFERON Monitor 2 Plakalı ELISA Kiti (bkz. “Bileşenler ve Saklama”, sayfa 6)

Gerekli olan (ancak sağlanmayan) malzemeler

- Bkz. “Gerekli olan ancak sağlanmayan malzemeler”, sayfa 8

Hazırlama

Plazmadaki IFN- γ miktarı, bireylerin bağışıklık baskılanma oranı orta düzeyde olduğunda bile, çoğu ELISA okuyucusunun üst sınırlarının üzerinde olabilir. Plazma örneklerinin Yeşil Seyreltici içinde, 1:10 ve/veya 1:100 oranlarında seyreltilmesi ve seyreltilmemiş plazma ile ELISA'da birlikte test edilmesi tavsiye edilir.

Hastanın bağışıklığının yoğun olarak baskılanmış olabileceği durumlarda, yalnızca seyreltilmemiş bir plazma örneğinin hazırlanması ve test edilmesi niceliksel sonucun elde edilmesi için yeterli olabilir.

Not: QFM ELISA (örn. en fazla 10 IU/ml) aralığı dahilinde olan örnek sonuçları, Sonuçların Yorumlanmasında kullanılmalıdır. Eğer seyreltilmemiş plazma QFM ELISA aralığının yukarısında ise QFM ELISA aralığı dahilinde bir sonuç oluşturan en düşük seyreltme oranı, bildirilen sonuç olarak kullanılmalıdır (seyreltme faktörü hesaba katılarak).

Prosedür

1. Tüm plazma numuneleri ve reaktifler, Konjugat 100× Konsantre hariç, kullanılmadan önce oda sıcaklığına ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) getirilmelidir. Dengeleme için en az 60 dakika bekletilmelidir.

2. Mikro-plaka gövdesindeki, kullanılmayacak şeritleri çıkarın, folyo ambalajda yeniden mühürleyin ve gerekinceye dek saklamak için buzdolabına geri koyun.

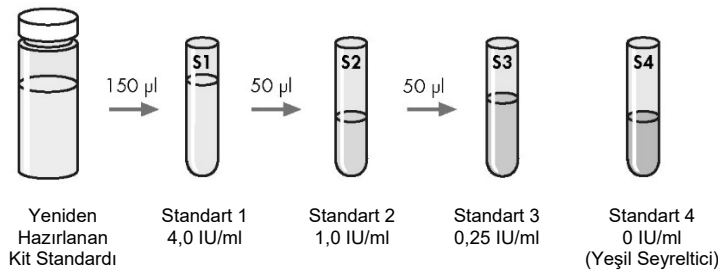
QFM standartları için en az bir şerit ve test edilen hasta sayısı için gereken sayıda şerit bırakın. Kullanımdan sonra, kalan şeritlerin kullanımı için plak çerçevesini ve kapağı saklayın.

3. Liyofilize Standart IFN- γ Standardını flakonun etiketinde belirtilen hacimdeki iyonu giderilmiş veya damıtılmış su ile hazırlayın. Köpürmesini azaltmak ve tamamen çözüldüğünden emin olmak için, hafifçe karıştırın. Belirtilen hacimde Standardın çözülmesi ile 8,0 IU/ml konsantrasyonunda solüsyon elde edilir.

Önemli: IFN- γ Standardının hazırlanma hacmi gruplar arasında farklılık gösterir. Doğru hacimde iyonu giderilmiş ya da damıtılmış su kullandıktan emin olmak için standart flakonun etiketine bakın.

Yeşil Seyreltici (GD) içindeki IFN- γ 4'lü seyreltme serisinden 1'ini hazırladıktan sonra, 2'li seyreltme serisinden 1 adet hazırlamak için çözülmüş kit standardını kullanın (bkz. Şekil 2). S1 (Standart 1) 4,0 IU/ml içerir, S2 (Standart 2) 1,0 IU/ml içerir, S3 (Standart 3) 0,25 IU/ml içerir ve S4 (Standart 4) 0 IU/ml içerir (tek başına GD). Standartlar çift olarak test edilmelidir. Her ELISA seansı için kit standardının dilüsyonlarını taze olarak hazırlayın.

Çift standartlar için önerilen prosedür	
a.	4 tüpü "S1", "S2", "S3", "S4" olarak etiketleyin.
b.	S1, S2, S3, S4'e 150 μ l GD ekleyin.
c.	S1'e 150 μ l kit standardı ekleyin ve iyice karıştırın.
d.	S1'den 50 μ l alıp S2'ye koyun ve iyice karıştırın.
e.	S2'den 50 μ l alıp S3'e koyun ve iyice karıştırın.
f.	Yeşil Seyreltici (GD) tek başına sıfır standardı olarak işlev görür (S4).



Şekil 2. Standart eğrinin hazırlanışı.

4. Liyofilize Konjugat 100× Konsantre'yi 0,3 ml deiyonize veya distile su ile çözün. Köpürmesini azaltmak ve konjugatın tamamen çözüldüğünden emin olmak için, hafifçe karıştırın.

Kullanıma hazır konjugat, gereken miktarda çözülmüş Konjugat 100× Konsantre'nin Yeşil Seyreltici ile seyreltilmesiyle hazırlanır (Tablo 1. Konjugat Hazırlama). Kullanımdan hemen sonra, kalan açılmamış Konjugat 100× Konsantre'yi 2 ila 8°C'de muhafaza etmek üzere kaldırın. Sadece Yeşil Seyreltici kullanın.

Tablo 1. Konjugat hazırlama

Şerit sayısı	Konjugat 100× Konsantre Hacmi	Yeşil Seyreltici Hacmi
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. Kan alma tüplerinden toplanan ve sonrasında saklanan veya dondurulan plazma örneklerini ELISA kuyusuna eklemeyen önce karıştırın.

Önemli: Plazma örnekleri santrifüj edilmiş QFM tüplerinden doğrudan eklenecekse plazmanın karıştırılmasından kaçınılmalıdır. İşlemin her aşamasında, jel üzerindeki materyali bozmamaya dikkat edin.

6. Tavsiyeler: Plazma örneklerini 1:10 oranında seyreltin.

- Hastanın bilgileri ve “1:10” ile etiketlenmiş bir tüpe 90 µl Yeşil Seyreltici (GD) ekleyin.
- Ardından, karma plazma örneklerinden 10 µl ekleyin (karma plazma örnekleriyle doğrudan santrifüjlü QFM tüplerinden eklenenlerin karşılaştırılmasına dair bilgiler için bkz. adım 5).
- Köpüklenmeyi en aza indirerek, pipet ile iyice karıştırın.

7. Tavsiyeler: 1:100'lik plazma örneklerini seyreltin.

- 1:10'lik seyrelti hazırlayın (bkz. yukarıdaki adım 6).
- Hastanın bilgileri ve “1:100” ile etiketlenmiş bir tüpe 90 µl Yeşil Seyreltici ekleyin.
- 1:10'lik seyreltiden 10 µl ekleyin.
- Köpüklenmeyi en aza indirerek, pipet ile iyice karıştırın.

Tavsiyeler: Aşağıdaki örnekleri paralel olarak ve bu sıra ile test edin:

- Seyreltilmemiş, 1:10, 1:100

Aşağıdaki hasta örneği seçenekleri de QFM Analiz Yazılımı tarafından desteklenir:

- Seyreltilmemiş
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Seyreltilmemiş, 1:10

- 8. Çok kanallı pipet kullanarak, gerekli ELISA kuyularına 50 µl taze hazırlanmış kullanıma hazır konjugat ekleyin.**
- 9. Çok kanallı pipet kullanarak, uygun kanallara test plazma örneğinden 50 µl ekleyin. Ardından, 1 ila 4 arası standartların her birine 50 µl ekleyin. Standartları çiftler halinde test edin.**
- 10. Her plakayı kapak ile kapatın ve mikropilaka çalkalayıcı kullanarak, konjugat ve plazma örnekleri/standartlarını 1 dakika boyunca iyice karıştırın. Sıçramayı önleyin.**
- 11. Oda sıcaklığında ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) 120 ± 5 dakika süreyle inkübe edin.**
Plakalar inkübasyon sırasında doğrudan güneş ışığına maruz kalmamalıdır.
- 12. İnkübasyon sırasında, 1 birim Yıkama Tamponu 20× Konsantreyi 19 birim deiyonize veya distile su ile seyreltin ve iyice karıştırın. Mevcut Yıkama Tamponu 20× Konsantre, 2 litre kullanıma hazır yıkama solüsyonu hazırlamak için yeterlidir.**
Kuyuları 400 µl kullanıma hazır yıkama tamponu ile, mikro-plaka yıkayıcı içinde en az 6 çevrimde yıkayın. Otomatik bir plaka yıkayıcı kullanılması tavsiye edilir.
Testin performansı için düzgün bir yıkama yapılması çok önemlidir. Her kuyunun, her yıkama çevriminde, yıkama tamponu ile **tamamen dolu** olduğundan emin olun. Tavsiyeler: En iyi sonuçları almak için, kuyuları her çevrim arasında en az 5 saniye süreyle sıvıya batırın.
Dışa akış haznesine standart laboratuvar dezenfektanı ekleyin ve bulaşıcı olması olası olan materyalin dekontaminasyonu için belirlenmiş prosedürleri için.
- 13. Plakaların üzerinde kalan yıkama solüsyonunu gidermek için plakaları emici, az tiftikli bir havlu üzerinde ters çevirin ve arkasına vurun. Her kuyuya 100 µl Enzim Substrat Solüsyonundan ekleyin, her plakayı kapak ile kapatın ve bir mikropilaka çalkalayıcı kullanarak iyice karıştırın.**

14. Oda sıcaklığında ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) 30 dakika süreyle inkübe edin.

Plakalar inkübasyon sırasında doğrudan güneş ışığına maruz kalmamalıdır.

15. İnkübasyondan sonra, her kuyuya Enzim Durdurma Solüsyonundan 50 µl ekleyin ve bir mikro-plaka çalkalayıcı kullanarak iyice karıştırın.

Enzim Durdurma Solüsyonu, 13. adımdaki Enzim Substrat Solüsyonundaki ile aynı sıra ile ve yaklaşık aynı hızda kuyulara eklenmelidir.

16. 450 nm'lik bir filtresi ve 620 ila 650 nm'lik referans filtresi bulunan bir mikro-plaka okuyucu kullanarak, reaksiyonu durdurduktan sonraki 5 dakika içinde Optik Yoğunluğu (OD) ölçün. OD değerleri sonuçların hesaplanmasında kullanılır.

Hesaplamalar ve Testin Yorumlanması

QuantiFERON Monitor Analiz Yazılımı, ham verilerin analizi ve sonuçların hesaplanmasında kullanılır. www.QuantiFERON.com adresinden edinilebilir. Lütfen QuantiFERON Monitor Analiz Yazılımının en güncel sürümünün kullanıldığından emin olun.

Yazılım, Sonuçların Yorumlanması bölümünde detaylı şekilde anlatıldığı gibi, testin kalite kontrol değerlendirmesini gerçekleştirir, bir standart eğri oluşturur ve her kişi için bir test sonucu sunar.

Seyreltilmemiş plazma QFM ELISA'nın üst aralığının (örn. > 10 IU/ml) yukarısında ise, QuantiFERON Monitor Analiz Yazılımı, seyreltme faktörünü hesaba katarak, QFM ELISA'nın aralığı içindeki bir sonucu oluşturan en düşük seyreltme oranını bildirir.

QuantiFERON Monitor Analiz Yazılımını kullanmak yerine, sonuçlar aşağıdaki metoda göre hesaplanabilir.

Standart eğrinin çizilmesi

(QuantiFERON Monitor Analiz Yazılımı kullanılmazsa)

Her plakadaki kit standardı tekrarlamalarından ortalama OD değerlerini hesaplayın.

Ortalama OD $\log_{(e)}$ 'una (y-ekseni) karşı standartların IU/ml cinsinden IFN- γ konsantrasyonu $\log_{(e)}$ 'u (x-ekseni) çizerek bir $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standart eğrisi oluşturun; sıfır standardını bu hesaplamalara katmayın. Standart eğrinin en iyi çizimini regresyon analizi ile hesaplayın.

Her bir örneğin OD değerini kullanarak, her bir test plazma örneğinin IFN- γ konsantrasyonunu (IU/ml) belirlemek için standart eğriyi kullanın.

Bu hesaplamalar, mikrolaka okuyucularla gelen yazılım paketleri ve standart çalışma sayfası veya istatistik yazılımları (Microsoft® Excel® gibi) kullanılarak da yapılabilir. Bu paketlerin, regresyon analizinin, standartların değişim katsayısının (%CV) ve standart eğrinin doğruluk katsayısının (r) hesaplanmasında kullanılması tavsiye edilir.

Eğer seyreltilmemiş plazma QFM ELISA'nın aralığının yukarısında ise, bildirilen sonuç, QFM ELISA aralığı içindeki bir sonucu oluşturan en düşük seyreltme oranından alınmalıdır (seyreltme faktörü hesaba katılarak).

Testin kalite kontrolü

Test sonucunun kesinliği, doğru bir standart eğrinin oluşturulmasına bağlıdır. Bu yzden, test rneği sonuçları yorumlanmadan nce standartlardan edinilen sonuçlar gzden geğirilmelidir.

ELISA'nın geğerli olması için:

- Standart 1'in ortalama OD değerı $\geq 0,600$ olmalıdır.
- Standart 1 ve Standart 2'nin tekrarlarının OD değerleri arasındaki %CV $\leq \%15$ olmalıdır.
- Standart 3 ve Standart 4'ün tekrarlamalarının OD değerleri ile ortalamaları arasında 0,040 optik dansite değerinden fazla fark olmamalıdır.
- Standartların ortalama absorbans değerlerinden hesaplanan korelasyon katsayısı (r) $\geq 0,98$ olmalıdır.

QuantiFERON Monitor Analiz Yazılımı bu kalite kontrol parametrelerini hesaplar ve rapor eder.

Yukarıdaki kriterler karşılanmıyorsa, ęalıřma geğersiz kabul edilmeli ve tekrarlanmalıdır.

Sıfır Standardının (Yeşil Seyreltici) ortalama OD değerı $\leq 0,150$ olmalıdır. Eğer ortalama OD değerı $> 0,150$ ise plaka yıkama prosedürü gzden geğirilmelidir.

Sonuçların yorumlanması

QFM sonuçları, doğuştan gelen ve uyuma dayalı bağışıklık uyarıcılarına verilen IFN- γ yanıtına gbre yorumlanır. QFM testi bağışıklık işlevine dair hem niceliksel, hem de niteliksel ölçüm sağlar. QFM sonuçları bağışıklık baskılama düzeyini doğrudan niceliklendirmeyebilir.

Önemli: Bir hastanın bağışıklık durumu belirlenirken, ölçülen IFN- γ düzeyi, klinik görünüm, tıbbi öykü ve diğer tanısal değerlendirmeler ile birleşik olarak kullanılmalıdır (Tablo 2). QFM testinin eşiği, hastanın bağışıklık baskılanma düzeyine ve bireydeki nakil ayarlarına gbre değişkenlik sergileyebilir.

Tablo 2. Sonuçların yorumlanması

QFM sonucu IFN- γ (IU/ml)	Sınıflandırma	Yorum
< 15	Düşük	Hastanın doğuştan gelen ve uyuma dayalı bağışıklık uyarıcılarına verdiği IFN- γ yanıtı düşüktür
15–1.000	Orta	Hastanın doğuştan gelen ve uyuma dayalı bağışıklık uyarıcılarına verdiği IFN- γ yanıtı orta derecedir
> 1.000	Yüksek	Hastanın doğuştan gelen ve uyuma dayalı bağışıklık uyarıcılarına verdiği IFN- γ yanıtı yüksektir

Eğer seyreltilmemiş plazma örneğinin IFN- γ düzeyi 0,1 IU/ml'in altında ise:

- QFM LyoSphere'in kan örneğine eklenmiş ve tüpün bu ambalaj prospektüsünde belirtilen şekilde inkübe edildiğinden emin olun.
- IFN- γ sonucunun hastanın mevcut klinik durumu ile örtüştüğünden emin olun.

Eğer kan örneklerinin alınması veya kullanılmasında teknik sorunlardan şüpheleniliyorsa, QFM testinin tamamı yeni kan örneği ile tekrarlanmalıdır. Eğer başlangıçta yapılan testte, bu ambalaj prospektüsünde tarif edilen prosedürden sapma olduğundan şüphelenilirse, stimüle edilen plazma örnekleri üzerindeki ELISA testini tekrar edin (Ayrıntılı bilgi için bkz. Testin Kalite Kontrolü bölümü).

Eğer sonuçlar hastanın mevcut klinik durumu ile örtüşür nitelikte değilse hekimin testi tekrar etmesi yararlı olabilir.

Sınırlamalar

QFM test sonuçları, her bireyin kendi klinik öyküsü, mevcut tıbbi durumu ve diğer tanısal değerlendirmelerinin bir birleşimi ile birlikte kullanılmalıdır. Laboratuvarlar kendi test aralıklarını belirlemeyi tercih edebilirler.

Laboratuvarlar aynı zamanda hasta numuneleriyle paralel olarak, sağlıklı bir denekten alınan harici kontrol numunesini de teste tabi tutmayı tercih edebilirler.

Aşağıdakilere bağlı olarak güvenilir olunmayan veya yanlış sonuçlar elde edilebilir:

- Yanlış kan antikoagülanı – yalnızca lityum heparin kullanın, çünkü diğer antikoagülanlar testte sekteye yol açabilir.

- Bu prospektüste anlatılan prosedürden farklı işlemler.
- Aşırı yüksek seviyelerde IFN- γ dolaşımı veya heterofil antikörlerin varlığı.
- Kan numunesi alma ile 37°C'deki inkübasyon arası sürenin 8 saatten fazla olması.
- QFM tüplerinin 0,9 ila 1,1 ml aralığı dışında, gereğinden az ya da fazla doldurulması.

Performans Özellikleri

Klinik çalışmalar

Görünüşte sağlıklı olan bireylerin (n = 114) organ nakli alıcıları (n = 30) ile, verdikleri yanıtlar açısından karşılaştırıldığı iki klinik çalışma yürütülmüştür. Organ nakli alıcıları içinden 18'i erken nakil sonrası kohortta (Erken Nakil Sonrası, nakilden sonra 3 ay içinde), 12'si de geç nakil sonrası ya da stabil kohortta (Geç Nakil Sonrası, Nakilden > 12 ay sonra) bulunmakta idi.

- Erken Nakil Sonrası kohorttaki her bir bireyden en fazla 5 zaman noktasında örnekler alındı (Nakilden 3 ay sonrası kohortu, n = 64 örnek).
- Geç Nakil Sonrası kohorttaki her bir bireyden en fazla 1 zaman noktasında örnekler alındı (Geç nakil sonrası kohort, n = 12 örnek)
- Görünürde sağlıklı olan kohorttaki her bir bireyden en fazla 1 zaman noktasında örnekler alındı (Geç nakil sonrası kohort, n = 114)

QFM'ye verilen yanıtlar, Erken Nakil Sonrası örnekler ile Geç Nakil Sonrası örnekler arasında düşük ila orta derece arasında idi. Yanıtların %25'inin düşük aralıkta, %66,7'sinin de orta derece aralıkta olduğu Geç Nakil Sonrası kohorttaki yanıtlarla karşılaştırıldığında, Erken Nakil Sonrası kohorttaki yanıtların daha yüksek bir yüzdesi (%93,8) düşük aralıkta, daha düşük bir yüzdesi de (%6,3) orta dereceli aralıkta oldu (Tablo 3). Erken Nakil Sonrası kohorttaki yanıtların hiçbiri yüksek yanıt aralığında değilken, Geç Nakit Sonrası örneklerde sadece 1 (%8,3) yanıt yüksek yanıt aralığında idi. Görünüşe göre sağlıklı olan kohorttaki QFM raporları temel olarak orta dereceli aralıkta (%83,3) ve yüksek yanıt aralığında (%15,8) idi (Tablo 3).

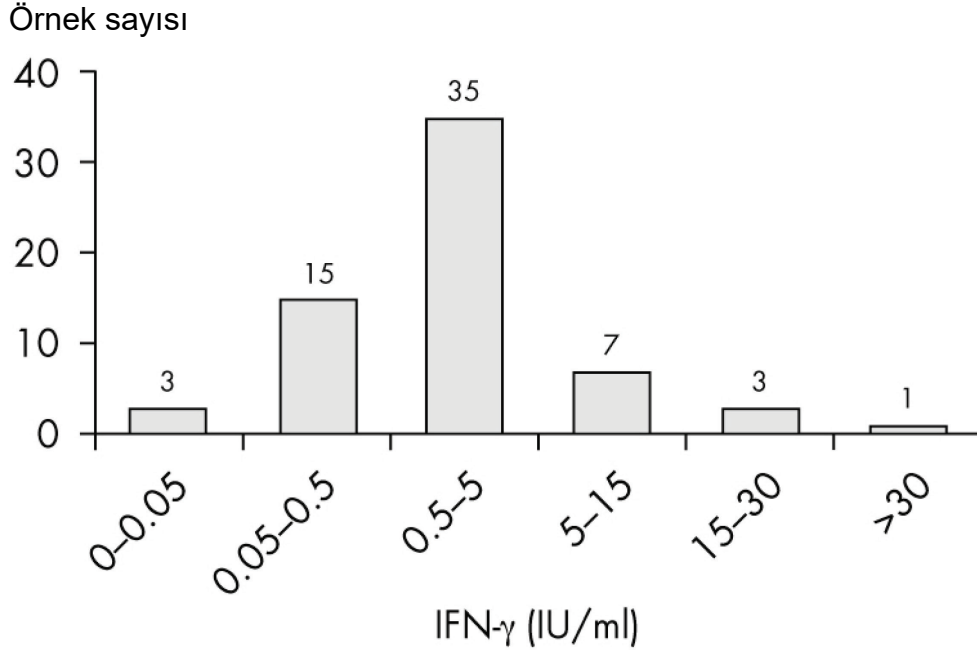
Tablo 3. Görünüşe göre sağlıklı olan hastaların nakil alıcılar ile karşılaştırmalı QFM yanıt aralığı

IFN- γ (IU/ml)	Sonuçlar kategorisi	Nakil Sonrası- Erken %* %95 GA n	Nakil Sonrası- Geç %* %95 GA n	Görünürde Sağlıklı %* %95 GA n	Toplam sonuçlar
< 15	Düşük	%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
15–1.000	Orta	%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
> 1.000	Yüksek	%0,0 0–5,7 n = 0	%8,3 1,5–35,4 n = 1	%15,8 10,2–23,6 n = 18	19
Toplam örnekler		64	12	114	190

* Yüzdeler oranlar, her bir donör kohortundaki, söz konusu yanıt aralığı içine düşen örneklerin oranını belirtir.

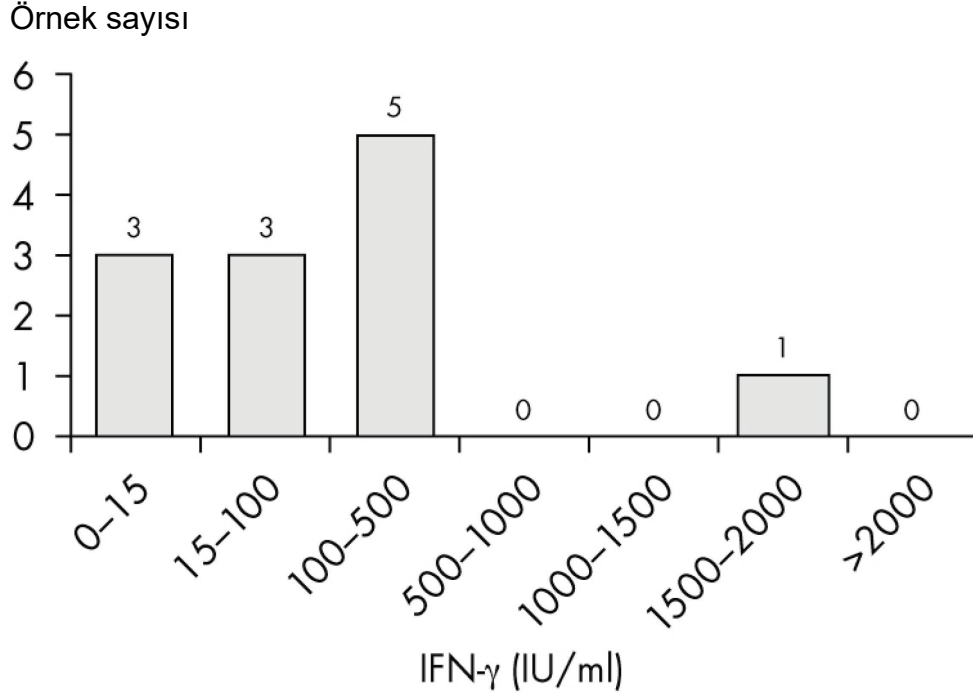
Beklenen Değerler

Erken nakil sonrası (nakilden sonra 3 aya kadar) kohorttaki hastalarda QFM'e verilen IFN- γ yanıtlarının dağılımı, QFM ELISA'nın kullanıldığı 18 nakil alıcısından alınan 64 örneğe dayalı olarak belirlenmiştir (Şekil 3).



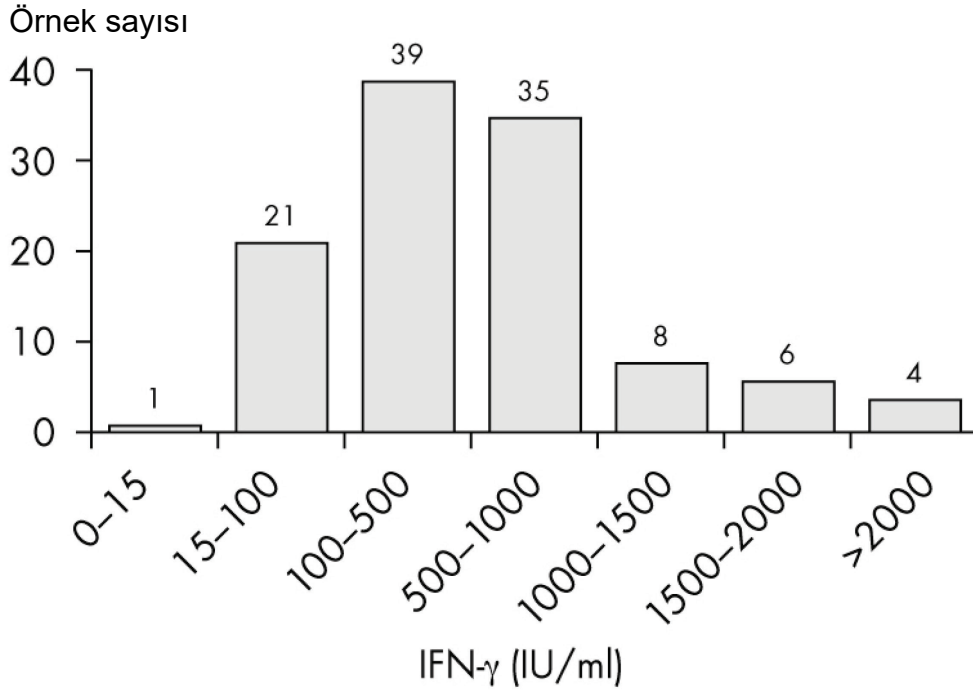
Şekil 3. Erken nakil sonrası hastalarda QFM IFN- γ yanıtlarının dağılımı (n = 64; medyan = 1,5 IU/ml).

Geç nakil sonrası (nakilden > 12 ay sonra) kohorttaki hastalarda QFM'e verilen IFN- γ yanıtlarının dağılımı, QFM ELISA'nın kullanıldığı 12 örneğe dayalı olarak belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Geç nakil sonrası hastalarda QFM IFN- γ yanıtlarının dağılımı (n = 12; medyan = 98,8 IU/ml).

Görünüşe göre sağlıklı olan deneklerde QuantiFERON Monitor'a verilen IFN- γ yanıtlarının dağılımı, QFM ELISA'nın kullanıldığı 114 örneğe dayalı olarak belirlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Görünürde sağlıklı deneklerde QFM IFN- γ yanıtlarının dağılımı (n = 114; medyan = 400,5 IU/ml).

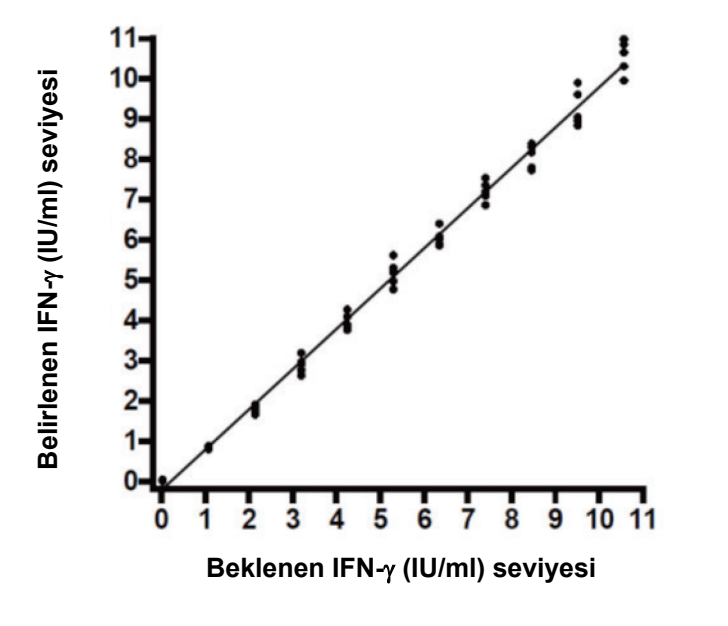
Solid organ nakli hastalarında QFM yanıtları

QFM, solid organ nakli hastaları üzerinde yürütülen, gözleme dayalı, kesitsel bir çalışma ile değerlendirilmiştir (4). Çalışmaya aşağıdakiler dahil edilmiştir: Yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 30 kontrolden oluşan alt grubun olduğu 212 sağlıklı denek, 30 nakil öncesi hasta, 18 nakil sonrası hasta (66 örnek; nakil sonrası medyan süre = 21 gün) ve 11 geç nakil sonrası hasta (nakilden sonraki medyan süre = 2290 gün). Ortalama IFN- γ üretimi, sağlıklı kontrollerde 555,2 IU/ml, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş kontrollerde de 614,6 IU/ml olmuştur. Ortalama IFN- γ üretiminin, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş kontrollerle karşılaştırıldığında, hem nakil öncesi (IFN- γ = 89,3 IU/ml), hem de erken nakil sonrası (IFN- γ = 3,76 IU/ml) hastalarda anlamlı biçimde daha düşük olduğu gösterilmiştir ($p < 0,001$). Geç nakil sonrası hastalarda bağışıklık işlevinin eski haline getirildiği (ortalama IFN- γ = 256,1 IU/ml) gözlemlenmiştir ve erken nakil sonrası hastalara kıyasla anlamlı biçimde daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$). Bu çalışma QFM'nin, bağışıklığı baskılanmış solid organ nakli popülasyonunda hücre dolayımı bağışıklık yanıtını değerlendirmede kullanılabileceğini göstermektedir.

Test performans özellikleri

QFM ELISA'nın, ELISA plakasına IFN- γ konsantrelerinin bilinen 11 plazma havuzunun 5 replikası rasgele yerleştirilerek doğrusal olduğu gösterilmiştir. Doğrusal regresyon hattı $1,002 \pm 0,011$ 'lik eğime sahip olup, korelasyon katsayısı 0,99'dur (Şekil 6).

QFM ELISA tespit sınırı 0,065 IU/ml'dir ve 10.000 IU/ml'ye kadar IFN- γ konsantrasyonlarında yüksek doz kanca (prozon) etkisi kanıtı göstermemiştir.



Şekil 6. QFM ELISA'nın doğrusallık profili, bilinen IFN- γ konsantrelerinin 11 plazma örneğinden 5'inin replikası test edilerek kanıtlanmıştır.

QFM testinin tekrar edilebilirliği (1. Aşama), 20 sağlıklı denekten alınan kan örnekleri kullanılarak belirlenmiştir. Üç farklı operatör, QFM LyoSphere lotu ve ekipman dizisi değerlendirilmiştir. QFM LyoSpheres'in üç lotunun tamamında ve test edilen üç koşulun tamamında, QFM ELISA kullanılarak belirlenen IFN- γ yanıt düzeyleri değişkenliği ortalama katsayısı %22,22'dir (%95 Güven Aralığı: 17,20–27,25) olarak tespit edilmiştir.

QFM testinin tekrar edilebilirliği (1. Aşama), 14 deneğin tamamında aynı donör ile yapılan 5–6 tekrarlı QFM LyoSphere kan stimölasyonunun değişkenliğinin ölçülmesi ile değerlendirilmiştir. Test edilen 14 deneğin tamamında ortalama değişkenlik katsayısı %14,7 (%95 Güven Aralığı: 10,2–19,2) olarak tespit edilmiştir. Aynı ayrı deneklerin %CV değeri %30'un altında olmuştur.

QFM ELISA'nın tekrar edilebilirliği (2. Aşama), değişken IFN- γ konsantrasyonlarında 20 plazma örneğinin 3'erli eş gruplar halinde, 3 farklı laboratuvarında, ardışık olmayan 3 günde ve 3 farklı operatör tarafından test edilmesiyle hesaplanmıştır. Böylece her örnek 9 ayrı test çevriminde, 27 kez test edilmiştir. Örneklerden nil kontrol olan birisinin hesaplanan IFN- γ konsantrasyon değeri 0,08 IU/ml (%95 Güven Aralığı: 0,07–0,09) olarak tespit edilmiştir. Kalan 19 plazma örneğinden, konsantrasyon değeri aralığı 0,33 (%95 Güven Aralığı: 0,31–0,34) ile 7,7 IU/ml (%95 Güven Aralığı: 7,48–7,92) olarak tespit edilmiştir.

Çalışma içinde veya intra-test hata payı, çalıştırılan (n = 9) her plakadan IFN- γ içeren her bir test plazması için %CV'lerin ortalaması alınarak tahmin edilmiştir ve elde edilen hata payı değeri %4,1 ile 9,1 CV arasında çıkmıştır. Ortalama değer %CV (\pm %95 CI) %6,6 \pm 0,6 olarak tespit edilmiştir. Ortalama sıfır IFN- γ plazma değeri %14,1 CV olarak tespit edilmiştir.

Toplam veya testler arasındaki hata payı, her bir plazma örneği için hesaplanan 27 IFN- γ konsantrasyonu kıyaslanarak tespit edilmiştir. Elde edilen inter-test hata payı değeri %6,6 ile 12,3 CV arasındadır. Genel ortalama %CV (\pm %95 Güven Aralığı) %8,7 \pm 0,7 olarak tespit edilmiştir. Sıfır IFN- γ plazma değeri %26,1 CV'yi göstermiştir. Bu düzeyde bir değişkenlik beklenmiştir, çünkü hesaplanan IFN- γ konsantrasyonu düşüktür ve düşük bir konsantre tahminindeki değişkenlik, daha yüksek konsantrasyona kıyasla daha fazla olur.

Teknik Bilgiler

Pıhtılaşmış plazma örnekleri

Plazma örneklerinin uzun süreli saklanmasıyla fibrin pıhtıları meydana gelirse, pıhtılaşmış materyali çöktürmek ve plazmanın pipetlenmesini kolaylaştırmak için örnekleri santrifüj edin.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için, aşağıdaki adreste verilen Teknik Bilgilere başvurabilirsiniz: www.QuantiFERON.com. İletişim bilgileri için bkz. arka kapak.

ELISA sorun giderme

Spesifik olmayan renk oluşumu

Olası neden	Çözüm
a) Yetersiz plaka yıkaması	Plakayı en az 6 kez 400 µl/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkayın. Kullanılan yıkayıcıya bağlı olarak 6 yıkamadan fazlası gerekli olabilir. Her yıkama adımı arasında en az 5 saniye bekleme periyodu olmalıdır.
b) ELISA kuyularının çapraz kontaminasyonu	Riski en aza indirmek için pipetlerken ve karıştırırken dikkatli olun.
c) Kitin/bileşenlerin son kullanma tarihinin geçmesi	Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen standardın ve Konjugat 100× Konsantrenin çözüldüğü tarihten sonraki 3 ay için kullanıldığından emin olun.
d) Enzim Substrat Solüsyonunun kontamine olması	Mavi renklenme mevcutsa substratı kullanmayın. Temiz reaktif kapları kullanıldığından emin olun.
e) Toplama öncesinde QFM tüplerinde plazma karışımı	Santrifüj yaptıktan sonra, plazmayı toplamadan önce aşağı ve yukarı doğru pipetleme yapmaktan veya herhangi bir yolla plazmayı karıştırmaktan kaçının. İşlemin her aşamasında, jel üzerindeki materyali bozmamaya dikkat edin.

Standartların Düşük Optik Dansite Okumaları

Olası neden	Çözüm
a) Standartların dilüsyon hatası	Kit Standardının bu prospektüste anlatıldığı şekilde hazırlandığından emin olun.
b) Pipetleme hatası	Pipetlerin üreticilerinin belirttiği gibi kalibre edildiğinden ve kullanıldığından emin olun.
c) İnkübasyon sıcaklığının çok düşük olması	ELISA'nın inkübasyonu oda sıcaklığında (17 ila 27°C'de) yapılmalıdır.

ELISA sorun giderme

- | | |
|--|--|
| d) İnkübasyon süresinin çok kısa olması | Plakayı konjugat, standartlar ve numuneler ile 120 ± 5 dakika süreyle inkübe edin. Enzim Substrat Solüsyonunu plaka üzerinde 30 dakika süreyle inkübe edin. |
| e) Hatalı plaka okuyucu filtresi kullanılması | Plaka ana filtre olarak 450 nm'de, referans filtre olarak da 620 ila 650 nm arasında okunmalıdır. |
| f) Reaktiflerin çok soğuk olması | Konjugat 100× Konsantre hariç, tüm reaktifler, teste başlamadan önce mutlaka oda sıcaklığına getirilmelidir. Bu işlem yaklaşık bir saat sürer. |
| g) Kitin/bileşenlerin son kullanma tarihinin geçmesi | Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen standardın ve Konjugat 100× Konsantrenin çözüldüğü tarihten sonraki 3 ay için kullanıldığından emin olun. |

Yüksek arkaplan

- | Olası neden | Çözüm |
|--|---|
| a) Yetersiz plaka yıkaması | Plakayı en az 6 kez 400 µl/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkayın. Kullanılan yıkayıcıya bağlı olarak 6 yıkamadan fazlası gerekli olabilir. Her yıkama adımı arasında en az 5 saniye bekleme periyodu olmalıdır. |
| b) İnkübasyon sıcaklığının çok yüksek olması | ELISA'nın inkübasyonu oda sıcaklığında (17 ila 27°C) yapılmalıdır. |
| c) Kitin/bileşenlerin son kullanma tarihinin geçmesi | Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen standardın ve Konjugat 100× Konsantrenin çözüldüğü tarihten sonraki üç ay için kullanıldığından emin olun. |
| d) Enzim Substrat Solüsyonunun kontamine olması | Mavi renklenme mevcutsa substratı kullanmayın. Temiz reaktif kapları kullanıldığından emin olun. |

ELISA sorun giderme

Doğrusal olmayan standart eğri ve çift değişkenlik

Olası neden	Çözüm
a) Yetersiz plaka yıkaması	Plakayı en az 6 kez 400 µl/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkayın. Kullanılan yıkayıcıya bağlı olarak 6 yıkamadan fazlası gerekli olabilir. Her yıkama adımı arasında en az 5 saniye bekleme periyodu olmalıdır.
b) Standart dilüsyon hatası	Standart dilüsyonlarının bu prospektüste anlatıldığı şekilde hazırlandığından emin olun.
c) Yetersiz karıştırma	Reaktifleri ters çevirerek veya plakaya eklemekten önce hafif vorteksleyerek iyice karıştırın.
d) Tutarsız pipetleme tekniği veya test kurulumu sırasında ara verme	Örnek ve standart ekleme sürekli bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Tüm reaktifler teste başlanmadan önce hazırlanmalıdır.













Ürün bilgileri ve teknik kılavuzlar, QIAGEN'den, dağıtıcınızdan veya www.QuantiFERON.com adresi ziyaret edilerek ücretsiz elde edilebilir.

Referanslar

QFM referanslarının kapsamlı bir listesi Gnowee'de bulunmaktadır — QuantiFERON referans kütüphanesi www.gnowee.net web sitesinde mevcuttur.

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.

Semboller

 2 x 96	2 x 96 örnek hazırlama için yeterlidir
	Yasal üretici
	CE-IVD işaretli sembol
	İn vitro tanı amaçlı kullanım için
	Parti kodu
	Katalog numarası
	Son kullanma tarihi
	Sıcaklık sınırlaması
	Kullanım talimatlarına bakın
	Tekrar kullanmayın
	Güneş ışığından uzak tutun
	Avrupa Birliği yetkili temsilcisi

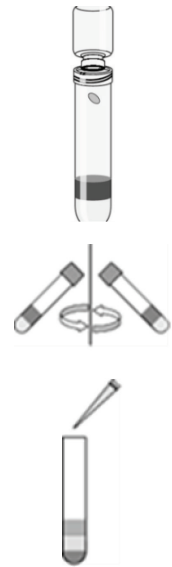
İletişim Bilgileri

Teknik destek ve daha fazla bilgi için lütfen ücretsiz 00800-22-44-6000 numaralı telefonu arayın, www.qiagen.com/contact adresindeki Teknik Destek Merkezi'ne bakın ya da QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden birine başvurun (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Kısaltılmış Test Prosedürü

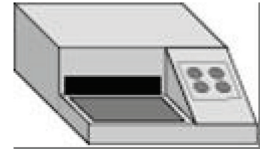
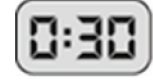
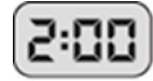
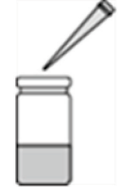
1. Aşama – kan inkübasyonu

1. Hastanın kanını ya QFM Kan Alma Tüpüne ya da lityum heparin kan alma tüpüne alın. Tüpleri hasta bilgileri ve kanın alındığı saat ile etiketleyin; ardından, kanın alınmasından sonra 8 saat içinde ortam sıcaklığında laboratuvara aktarın.
 - a. Eğer kan lityum heparin içine alınmış ise, 1 ml kanı QFM Kan Alma Tüpü içine alikuot olarak bölün ve tüpü hastanın bilgilerin ve kanın alındığı saat ile etiketleyin
2. 1 ml kan içeren her bir QFM Kan Alma Tüpüne 1 LyoSphere ekleyin, LyoSphere'in çözülmesini sağlayın, ardından tüpleri 37°C'de 16–24 saat boyunca **dik olarak** inkübe edin (kanın alınmasından sonraki 8 saat içinde).
3. İnkübasyondan sonra, plazma ve eritrositlerin ayrılması için 15 dakika, 2000 ila 3000 × g (RCF'de) santrifüj edin.
4. Santrifüj yaptıktan sonra, plazmayı almadan önce aşağı ve yukarı doğru pipetleme yapmaktan veya herhangi bir yolla plazmayı karıştırmaktan kaçının. İşlemin her aşamasında, jel üzerindeki materyali bozmamaya dikkat edin.



2. Aşama – IFN- γ ELISA

1. Konjugat 100× Konsantre hariç, ELISA reaktiflerini çalışma sıcaklığına getirmek için, oda sıcaklığında en az 60 dakika bekletin.
2. Kit standardını 8,0 IU/ml olacak şekilde distile veya deiyonize su ile çözün. 4 standart dilüsyonunu hazırlayın.
3. Dondurularak kurutulmuş Konjugat 100× Konsantre'yi distile veya deiyonize su ile çözün.
4. Çalışma konjugatını Yeşil Seyreltici ile hazırlayın ve her kuyuya 50 μ l ekleyin.
5. 50 μ l test plazma örneklerini (uygun olan şekilde seyreltilmemiş, 1:10 ve 1:100 seyreltiler) ve 50 μ l standartları uygun kuyulara ekleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.
6. Oda sıcaklığında 120 ± 5 dakika inkübe edin.
7. Kuyuları en az 6 kez 400 μ l/kuyu yıkama tamponu ile yıkayın.
8. Kuyulara 100 μ l Enzim Substrat Solüsyonu ekleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.
9. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edin.
10. Tüm kuyulara 50 μ l Enzim Durdurma Solüsyonu ekleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.
11. Sonuçları 450 nm ana filtre ve 620 ila 650 nm referans filtre kullanarak okuyun.
12. Sonuçları analiz edin.



Notlar

Önemli Değişiklikler

QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA Prospektüsünün bu baskısındaki önemli değişiklikler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Kısım	Sayfa	Değişiklikler
Önlemler	11	Yeni GHS bilgileri
Önlemler	12	Kıvrımlı kapaklara sahip flakonlarla ilgili güvenlik talimatları eklenmiştir.

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

QuantiFERON Monitor Kit için Sınırlı Lisans Anlaşması

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde denenmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN bu protokollerin üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Bu kitin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans koşulları için bkz. www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

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

