

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

A veleszületett és szerzett immunstimulánsokra adott reakciókat mérő teljes vér IFN- γ teszt

1. verzió

IVD In vitro diagnosztikai célra

CE

REF 0650-0201

 QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, USA

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NÉMETORSZÁG

1079024HU ver. 03

 www.QuantiFERON.com



Tartalomjegyzék

Rendeltetés	4
A teszt összefoglalása és kifejtése	4
A teszt alapelve	5
A teszt elvégzéséhez szükséges idő	6
Összetevők és tárolás	6
Szükséges (de nem tartozék) eszközök	8
Tárolás és kezelés	8
Figyelmeztetések és óvintézkedések	10
Figyelmeztetések	10
Óvintézkedések	11
Mintavétel és a minta kezelése	13
Alkalmazási útmutató	16
Számítások és a teszt értelmezése	22
Standardgörbe létrehozása	22
A teszt minőségi felülvizsgálata	23
Az eredmények értelmezése	23
Korlátok	24
Teljesítményjellemzők	25
Klinikai vizsgálatok	25
A vizsgálat teljesítményjellemzői	30
Technikai tudnivalók	31
Alvadt plazmaminták	31
Hibaelhárítási útmutató	32
Hivatkozások	34
Szimbólumok	35
Elérhetőségek	35
Rövidített teszteljárás	36

Rendeltetés

A QuantiFERON Monitor teszt (QFM) egy in vitro diagnosztikai teszt, amelynek célja a sejtmediált immunműködés észlelése a gamma-interferon (IFN- γ) mérésével a vérplazmában. A vizsgálat enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálattal (ELISA) történik a heparinizált teljes vér inkubációját követően a veleszületett és szerzett immunstimulánsokra adott reakciók alapján. A teszttel észlelni lehet a sejtmediált immunválaszt az immunszuppressziót kapott szervátültetett populációban.

A QFM kockázatfelméréssel, valamint más orvosi és diagnosztikai felmérésekkel együtt használható.

A teszt összefoglalása és kifejtése

Az immunhiányos állapotra jellemző, hogy a szervezet kevésbé képes hatékony immunválasz adására. Ez a csökkent vagy hiányzó válasz elsődleges vagy szerzett (másodlagos) immunhiányból (1) adódhat.

Az elsődleges immunhiányos állapotok okai általában örökletesek. Ezeket a szerzett vagy veleszületett immunrendszer bizonyos összetevőinek elégtelensége jellemzi (1). Mindazonáltal a legtöbb immunhiányos állapot szerzett (másodlagos). Ezt kórokozók, gyógyszerek (például szervátültetést követő immunszuppressziós kezelés), kóros állapotok (például olyan rákos betegségek, mint a leukémia és a nyirokdaganat) vagy a környezetben lévő szennyező anyagok okozhatják (1).

Az immunhiányos állapot molekuláris alapja többféle lehet, de a sejtmediált immunműködés mindenképpen főszerepet játszik sok megfigyelt klinikai megnyilvánulás előidézésében. Jelenleg az immunhiányos tünetegyüttesek diagnosztikája és kezelése a kiváltó szertől függ (2, 3).

Az ad hoc kezelés a norma például az olyan szervátültetésen átesett alanyok sejtszintű immunhiányos állapotának monitorozásánál, akik gyógyszereket kapnak az immunreakciók részleges elnyomására. Az alany immunválaszának állapotát általában a gyógyszer szintek monitorozásával és a graft működésének klinikai/patológiai értékelésével mérik (2, 3).

Számos T-sejtműködést vizsgáló teszt az olyan mitogénekre adott sejtmediált immunműködést méri, mint a phytohaemagglutinin (PHA), az amerikai alkörmősből (*Phytolacca americana*) nyert mitogén vagy a concanavalin A (ConA). Ezek azonban csak a T-sejtek működőképességét mérik, és a sejtmediált immunműködésben résztvevő sejteknek csak egy részhalmazát jelentik. Egyre nyilvánvalóbb, hogy a veleszületett immunfolyamatok akár önmagukban, akár egyes T-sejtválaszok erősítésével nagyban hozzájárulnak a gazdaszervezet védekezéséhez. Így a veleszületett (természetes gyilkolósejtek – NK) és szerzett (T-sejt) immunsejtek funkcionális reakciói együttesen a sejtmediált immunműködés átfogóbb elemzését teszik lehetővé (2, 3).

A QFM in vitro diagnosztikai teszt olyan stimulánsok kombinációját használja (a LyoSphere™ golyócska formájában), amelyek egyes, mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszerben szerepet játszó különféle sejtípusokat stimulálnak. A teszt az alany funkcionális immunállapotát úgy értékeli ki, hogy méri a veleszületett és a szerzett immunrendszer toll like receptor (TLR) és T-sejt receptor (TCR) agonistával történő stimulálására adott reakciót. Amikor az ELISA észleli a gamma-interferont (IFN- γ), a sejtmediált immunműködésről kvalitatív és kvantitatív képet ad.

A teszt alapelve

A QFM teszt liofilizált stimulánsokat (QFM LyoSphere™ golyócskákat) használ, amelyeket a heparinizált teljes vérhez kell adni. A vért 16–24 órán keresztül inkubálják. Ezt követően a plazmát elválasztják, majd a stimulánsokra válaszul létrejövő IFN- γ jelenlétére tesztelik.

A QFM teszt többfázisú. Először teljes vért vesznek le a QFM vérvételi csőbe. Utána egy QFM LyoSphere golyócskát tesznek a csőbe, majd azt amint lehetséges, de legkésőbb a vérvételt követő 8 óra múlva 37 °C-on inkubálják. A 16–24 órás inkubálást követően a csöveket centrifugálják, a plazmát eltávolítják, majd az IFN- γ mennyiségét (nemzetközi egységben – IU/ml) az ELISA teszttel megméri, és összehasonlítják a várt értékek tartományával, hogy jellemezhesék az alany immunválaszát.

A QFM teszt az immunműködésről kvalitatív és kvantitatív képet ad. A QFM-eredmények nem feltétlenül számszerűsítik közvetlenül az immunszuppresszió szintjét.

Az IFN- γ mennyisége a plazmamintákban még az enyhébb immunszuppressziót kapott alanyok esetén is gyakran meghaladhatja az általában használt ELISA tesztek felső méréshatárát. Javasoljuk, hogy a plazmamintákat hígítsa 1:10 és/vagy 1:100 zöld hígítóval, majd a hígítatlan plazmával együtt vizsgálja az ELISA teszttel.

Megjegyzés: A QFM teszt mérési küszöbe aszerint változhat, hogy az alany milyen szintű immunszuppressziót kapott, illetve milyen paraméterei voltak a szervátültetésnek.

A QFM-eredmények értelmezésének rövid ismertetését az „Az eredmények értelmezése” című részben találja a kézikönyv 23. oldalán.

A teszt elvégzéséhez szükséges idő

A QFM teszt végrehajtásához szükséges becsült időtartamot alább találja. Itt a több minta egy munkamenetben történő teszteléséhez szükséges időt is megtalálja.

A vért tartalmazó csövek 37 °C-os inkubálása: 16–24 óra

ELISA: Egy ELISA-lemez esetén körülbelül 3 óra
(88 db mintáig)

1 munkaóránál kevesebb

Minden további lemezre újabb 10–15 percet kell számolni

Összetevők és tárolás

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Katalógusszám	0650-0701
Készítmények száma	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 cső
<i>QuantiFERON Monitor LyoSpheres kézikönyv</i>	1
QuantiFERON Monitor vérvételi csövek	
Katalógusszám	0650-0101
Készítmények száma	100
QuantiFERON Monitor vérvételi cső (fehér kupak, fehér gyűrű)	100 cső
<i>QuantiFERON Monitor vérvételi csövek kézikönyv</i>	1

QuantiFERON Monitor kétlemezes készlet ELISA összetevők	2 lemezes ELISA készlet
Katalógusszám	0650-0201
Mikrolemezcscsíkok, 12 × 8 lyukú (bevonva egér anti-humán IFN- γ monoklonális antitesttel)	2 készlet 12 × 8 lyukú mikrolemezcscsíkok
IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ standard, liofilizált; tartalma: rekombináns humán IFN- γ , szarvasmarha-kazein, 0,01% [m/V] thimerosal)	1 cső (8 IU/ml rehidratálva)
Green Diluent (zöld hígító; tartalma: szarvasmarha-kazein, normál egérszérum, 0,01% [m/V] thimerosal)	1 × 30 ml cső
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (konjugátum 100× koncentrátum, liofilizált; egér anti-humán IFN- γ HRP, 0,01% [m/V] thimerosal)	1 × 0,3 ml rehidratálva
Wash Buffer 20× Concentrate (mosópuffer 20× koncentrátum; pH 7,2; 0,05% [V/V] ProClin® 300-at tartalmaz)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (enzimsubstrátoldat; tartalma: H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametil-benzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (enzimleállító oldat; tartalma: 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
QuantiFERON Monitor ELISA kézikönyv	1

* Kénsavat tartalmaz. Az óvintézkedéseket lásd itt: 11. oldal.

Szükséges (de nem tartozék) eszközök

- 37 °C-os inkubátor*; CO₂ nem szükséges
- Kalibrált, változtatható térfogatú pipetták*
- Kalibrált, többcsatornás pipetták† 50–100 µl közti mennyiségekhez, eldobható véggel
- Mikrolemezzrázó gép†
- Ioncserélt vagy desztillált víz, 2 liter
- Mikrolemesmosó (automatikus mosó ajánlott)
- 450 nm-es szűrőjű mikrolemeszolvasó† 620–650 nm-es referenciaszűrővel
- Mérőhenger
- Nedvszívó, kevésbé szálalás kendők

Tárolás és kezelés

Vérvételi csövek

A QFM vérvételi csöveket 4 és 25 °C között tárolja. Amikor a QFM vérvételi csövekbe vért tölt és azt felkeveri, a csövek hőmérsékletének 17 és 25 °C között kell lennie.

LyoSpheres

A QFM LyoSphere golyócskákat 2 és 8 °C között tárolja.

ELISA készlet reagensei

A ELISA készletben lévő reagenseket 2 és 8 °C között tárolja.

Az enzimszubsztrátoldatot mindig napfénytől védett helyen kell tartani.

* Győződjön meg róla, hogy az eszközöket a gyártó ajánlásai szerint ellenőrizték és kalibrálták.

Rehidratált és maradék ELISA reagensek

Az ELISA reagensek rehidratálására vonatkozó utasításokat a „2. fázis – IFN- γ ELISA” című részben találja a(z) 17. oldalon.

- A készletben lévő standard rehidratálva 2–8 °C-on tárolható maximum 3 hónapig.

Jegyezze fel a készletben lévő standard rehidratálásának dátumát.

- A maradék rehidratált konjugátum 100× koncentrátumot vissza kell hűteni 2–8 °C-os tárolási hőmérsékletre, és 3 hónapon belül fel kell használni.

Jegyezze fel a konjugátum rehidratálásának dátumát.

- A készre hígított konjugátumot elkészítése után 6 órán belül fel kell használni (lásd az 1. táblázatot).
- A készre hígított mosópuffer szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C) tárolható legfeljebb 2 hétig.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai célra

Vegyszerek használatakor mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági (SDS) adatlapok tartalmazzák. Az egyes QUIAGEN készletek és összetevők biztonsági adatlapjai praktikus és kisméretű PDF fájl formájában megtalálhatók, megtekinthetők és kinyomtathatók a www.qiagen.com/safety oldalon.

Figyelmeztetések

- A QFM teszt az immunműködésről kvalitatív és kvantitatív képet ad. A QFM-eredmények nem feltétlenül számszerűsítik közvetlenül az immunszupresszió szintjét.
- A QFM teszt eredményeit az orvosi vizsgálatokkal, kórelőzményekkel és más klinikai mutatókkal együtt kell használni a páciens immunállapotának felméréséhez.
- A QFM teszt mérési küszöbe aszerint változhat, hogy az alany milyen szintű immunszupressziót kapott, illetve milyen paraméterei voltak a szervátültetésnek.

Óvintézkedések

Csak in vitro diagnosztikai célra.



FIGYELEM: Az emberi vért és vérplazmát kezelésükkor tekintse potenciálisan fertőzőnek. Tartsa be a vonatkozó vér- és vérplazma-kezelési előírásokat. A vérminták, valamint a vérrel és vérkészítményekkel érintkező anyagok hulladékkezelését mindig a helyi, tagállami és uniós előírások szerint végezze.

A QuantiFERON Monitor ELISA készlet összetevőire az alábbi H (figyelmeztető) és P (óvintézkedésre vonatkozó) mondatok vonatkoznak.

H (figyelmeztető) mondatok



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON enzimleállító oldat)

Tartalmaz: kénsav. Figyelem! Fémekre korrozív hatású lehet. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON enzimszubsztrátoldat)

Figyelem! Enyhén izgatja a bőrt. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.



QuantiFERON Green Diluent (QuantiFERON zöld hígító)

Tartalmaz: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Tartalmaz: tartrazin. Figyelem! Allergiás bőrreakciót válthat ki. Védőkesztyű/ védőruha/ szemvédő/ arcvédő használata kötelező.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (QuantiFERON mosópuffer 20× koncentrátum)

Tartalmaz: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Ártalmatlan a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz. Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

További tájékoztatás

Biztonsági adatlapok: www.qiagen.com/safety

- Ha nem tartja be a *QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* kézikönyv utasításait, hibás eredményeket kaphat. Használat előtt figyelmesen olvassa el az útmutatót.
- **Fontos:** Használat előtt vizsgálja meg az üvegeket. Ne használjon Conjugate, IFN- γ Standard vagy QFM LyoSphere üvegcsét, ha azon sérülés jeleit látja, vagy ha a gumi záróelem sérült. Ne fogja meg a törött üvegeket. Tegye meg a megfelelő elővigyázatossági intézkedéseket az üvegcsék biztonságos hulladékkezeléséhez. Javaslat: Használjon laboratóriumi fogót a Conjugate, IFN- γ Standard vagy QFM LyoSphere üvegcsék nyitására, hogy a fém zárókupak semmiképpen ne okozhasson sérülést.
- Sérültnek tűnő vagy szivárgó reagenspalackot tartalmazó ELISA készletet nem szabad használni.
- Nem engedélyezett az eltérő QFM ELISA készletekbe tartozó mikrolemezcsíkok, IFN- γ standardok, zöld hígítók, illetve konjugátum 100× koncentrátumok vegyes felhasználása, illetve összekeverése. A többi reagens (a mosópuffer 20× koncentrátum, enzimszubsztrátoldat és enzimeállító oldat) több készletből vegyesen is használható, ha azok felhasználhatósági ideje még nem járt le, és ha a gyári számokat feljegyzik.
- A fel nem használt reagensok és biológiai minták hulladékkezelését a helyi és országos biztonsági és környezetvédelmi előírások szerint végezze.
- A QFM vérvételi csöveket, a QFM LyoSphere golyócskákat és a QFM ELISA készletet ne használja a lejáratí idón túl.
- Gondoskodjon a laboratóriumi berendezések kalibrálásáról, illetve hogy azok alkalmazásra hitelesítettek legyenek.

Mintavétel és a minta kezelése

A QFM tesztet csak teljes vérrel végezze, amit vagy lítium-heparines vérvételi csőbe vagy közvetlenül a QFM vérvételi csőbe vett le. Tesztenként 1 ml teljes vérre van szükség. A vérvételi csöveket megfelelően címkézzé, és írja rájuk a vérvétel időpontját is.

Fontos: Mind a QFM vérminták stimulálását (vagyis a QFM LyoSphere hozzáadását az 1 ml-es vérmintához), mind azt ezt követő 37 °C-os inkubálást a vérvételtől számított 8 órán belül végezze el.

Inkubálás előtt a vérmintákat tartsa szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C-on).

Az optimális eredmény érdekében az alábbi eljárást kell követni:

1. A csöveket megfelelően feliratozza.

Ügyeljen a QFM vérvételi csövek az alany adataival és a vérvétel időpontjával történő megfelelő címkézésére.

2. Vegyen le alanyonként közvetlenül minden QFM vérvételi csőbe 1 ml vénás vért. Az eljárást vérvételre kiképzett személynek kell végeznie.

Fontos megjegyzés: Miközben vérrel tölti meg a csöveket, azok hőmérsékletének 17–25 °C között kell lennie.

A QFM vérvételi csöveket 810 méteres tengerszint feletti magasságig lehet használni.

Mivel az 1 ml-es csövek a vért viszonylag lassan veszik fel, a cső látszólagos telítődése után még 2–3 másodpercig tartsa a csövet a tűn. Így biztosíthatja a megfelelő mennyiségű mintavételt.

Az 1 ml-es töltési mennyiséget a QFM vérvételi cső oldalán lévő címkén feltüntetett fekete jel mutatja. A QFM vérvételi csöveket úgy tervezték, hogy 1 ml ± 10% vért lehessen venni velük, és ebben a tartományban működnek optimálisan. Ha egy csőben a vér szintje kívül van a jelzésen, új vérvételt kell végezni.

Ha a vérvétel pillangótűvel történik, ehhez először egy üres vérvételi csövet kell használni, hogy a QFM csöveinek megtöltése előtt az összekötő csövek biztosan megteljenek a vérrel.

Ha a QFM vérvételi csöveket 810 méternél nagyobb tengerszint feletti magasságon használja, vagy ha a levett vér mennyisége túl alacsony, fecskendővel vegyen vért, és ebből azonnal helyezzen át 1 ml-t a QFM csőbe. Biztonsági okokból ennek legjobb módja a fecskendő tűjének biztonságos eltávolítása, a QFM vérvételi cső kupakjának eltávolítása, majd 1 ml vér betöltése a csőbe (a csövek oldalán található fekete jelzés közepéig). Gondosan zárja vissza a cső kupakját, majd az alább ismertetett módon keverje.

Érszorító használata esetén lazítsa meg, amint a tű behatolt a vénába, hogy elkerülje a nyomásváltozásokat, mert ezek hatással lehetnek a vér mennyiségére.

A másik lehetőség, hogy a vért egy általános, antikoagulánsként lítium-heparint tartalmazó vérvételi csőbe veszi, és innen tölti át a QFM vérvételi csőbe. Csak lítium-heparin használható a vérben antikoagulánsként, mivel más antikoagulánsok megzavarják a tesztet. Töltsön fel egy vérvételi csövet (minimum 3 ml mennyiséggel), és a cső többszöri átfordításával végezzen óvatos keverést a heparin elosztatására. A vért szobahőmérsékleten (22 ± 5 °C-on) tárolja, amíg át nem helyezi a QFM vérvételi csőbe, hogy ott a QFM LyoSphere golyócskával stimulálja. A vér alapos felkeverése óvatos átfordításokkal mindig közvetlenül az áttöltést megelőzően történjen. A vérből 1 ml-t töltsön át egy QFM vérvételi csőbe. Az áttöltést aszeptikusan végezze, a megfelelő biztonsági eljárásokat betartva. Távolítsa el a QFM vérvételi cső kupakját, majd töltsön bele 1 ml vért (a cső oldalán található fekete jelzés közepéig). A csövek kupakját gondosan vissza kell zárni, majd az alábbi módon keverést kell végezni.

3. Közvetlenül a csövek megtöltése után a cső többszöri átfordításával végezzen óvatos keverést a heparin elosztatására.

Fontos: A túlságosan erős rázás a gél felszakadását okozhatja, és helytelen eredményhez vezethet.

4. Közvetlenül felhasználás előtt hagyja, hogy a QFM LyoSphere golyócskák felvegyék a (22 ± 5 °C-os) szobahőmérsékletet.

5. Aszeptikus módon helyezzen egy QFM LyoSphere golyócskát az 1 ml vérbe.

Távolítsa el a vérvételi cső kupakját.

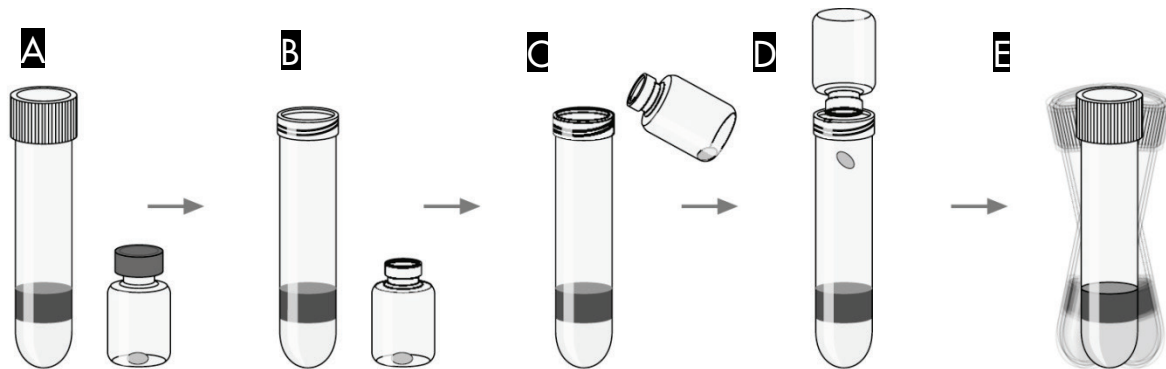
Óvatosan ütögesse a QFM LyoSphere üvegcsét egy szilárd felülethez, hogy a QFM LyoSphere az aljára kerüljön. Távolítsa el a QFM LyoSphere üvegcsé kupakját: először a fém zárósapkát távolítsa el, utána a gumi dugót.

Óvatosan ejtse az 1 ml vérmintába a QFM LyoSphere golyócskát. Ehhez hozza szintbe az üvegcsé száját a QFM vérvételi cső szájával, majd óvatosan fordítsa át a QFM LyoSphere golyócskát tartalmazó üvegcsét, hogy a golyócska a vérvételi csőbe kerüljön (lásd az 1. ábrát).

Fontos: Ha a QFM LyoSphere golyócska a QFM vérvételi csövön kívülre esik, dobja ki, és nyisson ki egy másik QFM LyoSphere üvegcsét.

Fontos: Ne hagyja a QFM LyoSphere üvegcsét hosszabb időre nyitva. A QFM LyoSphere golyócskát a vérbe kell helyezni, amint kinyitotta az azt tartalmazó üvegcsét.

Ha a QFM LyoSphere golyócskát olyan vérbe helyezi, amelyet a QFM vérvételi csőbe vettek le, ügyeljen rá, hogy a megfelelő kupakot helyezze vissza minden mintára.



1. ábra. A QFM LyoSphere golyócska vérvételi csőbe helyezése. **A** QFM vérvételi cső és QFM LyoSphere üvegcsé. **B** Távolítsa el a QFM vérvételi cső kupakját, majd a QFM LyoSphere üvegcsé kupakjának fém zárósapkáját és gumi dugóját. **C** Azonnal helyezze a vérbe a QFM LyoSphere golyócskát. Ehhez illessze az üvegcsé száját a vérvételi cső szájához. **D** Ezt követően fordítsa át óvatosan az üvegcsét, hogy a LyoSphere golyócska a vérvételi csőbe kerüljön. **E** Helyezze vissza a kupakot a QFM vérvételi csőre, és rázza meg 5–10 alkalommal.

6. Zárja vissza a QFM vérvételi cső kupakját, és rázza meg 5–10 alkalommal elég erővel ahhoz, hogy a QFM LyoSphere teljesen feloldódjon.

Ha a QFM LyoSphere golyócska a cső belső felületére tapad, leoldhatja, ha a csövet úgy fordítja, hogy a golyócskára vér kerüljön.

Ügyeljen rá, hogy a QFM LyoSphere golyócska hozzáadása után a lehető leghamarabb visszahelyezze a vérvételi cső kupakját, nehogy véletlenül még egy LyoSphere golyócska kerüljön bele.

Megjegyzés: Mivel a QFM LyoSphere golyócska fehér, oldódása után már nem lesz látható a vérben.

Fontos: A túlságosan erős rázás a gél felszakadását okozhatja, és helytelen eredményhez vezethet.

7. A QFM LyoSphere golyócska hozzáadása és oldódása után a QFM vérvételi csöveket a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 8 órán belül 37 ± 1 °C-os inkubátorba kell helyezni.

Alkalmazási útmutató

1. fázis – a vér inkubálása és a plazma elválasztása

Tartozék eszközök

- QFM vérvételi csövek (lásd: „Összetevők és ”, 6. oldal)

Szükséges (de nem tartozék) eszközök

- Lásd: „Szükséges (de nem tartozék) eszközök”, 8. oldal

Eljárás

1. Inkubálja az 1 ml vért és a QFM LyoSphere golyócskát tartalmazó QFM vérvételi csöveket **FÜGGŐLEGES** helyzetben 37 ± 1 °C-on 16–24 órán keresztül.

Megjegyzés: Inkubáláskor sem CO₂, sem párasítás nem szükséges.

Az inkubálás után és a centrifugálás előtt a QFM vérvételi csövek 4–27 °C-on tárolhatók legfeljebb 3 napig.

2. Inkubálás után a QFM vérvételi csöveket a plazma elválasztása céljából **2000–3000 g (RCF) centrifugális erővel 15 percig centrifugálja. A géldugó elkülöníti a sejteket a plazmától. Ha ez nem történik meg, centrifugálja újra a csöveket.**

A plazma centrifugálás nélkül is elválasztható, de fokozottan ügyelni kell arra, hogy közben a vérsejtek ne keveredjenek fel.

3. **A plazmamintákat csak pipettával szabad elválasztani.**

Fontos: A centrifugálás és az elválasztás között el kell kerülni a plazma felkeverését a pipetta fel-le mozgatásával vagy bármilyen más módon. A teljes folyamat során gondosan meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.

A plazmaminták közvetlenül a centrifugált QFM vérvételi csövekből tölthetők át a QFM ELISA lemezbe, automatikus ELISA munkaállomás használata esetén is.

A plazmaminták 2–8 °C között maximum 28 napig, illetve elválasztva –20 °C alatt hosszú ideig megőrizhetők. A szétválasztott plazmamintákat tárolás előtt le kell zárni.

Plazmaelválasztáskor legalább 150 µl plazmát gyűjtsön be, hogy rendelkezésre álljon, ha meg kell ismételni a tesztet.

Az IFN- γ mennyisége a plazmamintákban még az enyhébb immun-suppressziót kapott alanyok esetén is gyakran meghaladhatja az általában használt ELISA tesztek felső méréshatárát. Javasoljuk, hogy a plazmamintákat hígítsa 1:10 és/vagy 1:100 zöld hígítóval, majd vizsgálja az ELISA teszttel a hígítatlan plazmával együtt (lásd: „2. fázis – IFN- γ ELISA”).

2. fázis – IFN- γ ELISA

Tartozék eszközök

- QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA (lásd: „Összetevők és ”, 6. oldal)

Szükséges (de nem tartozék) eszközök

- Lásd: „Szükséges (de nem tartozék) eszközök”, 8. oldal

Előkészítés

Az IFN- γ mennyisége a plazmamintákban még az enyhébb immunszuppressziót kapott alanyok esetén is gyakran meghaladhatja az általában használt ELISA tesztek felső méréshatárát. Javaslat: a plazmamintákat hígítsa 1:10 és/vagy 1:100 zöld hígítóval, majd vizsgálja az ELISA teszttel a hígítatlan plazmával együtt.

Erős immunszuppressziót kapott pácienseknél hígítatlan plazmaminta készítése és tesztelése önmagában elég lehet egy kvantitatív eredményhez.

Megjegyzés: Az eredmények értelmezéséhez a QFM ELISA teszt méréshatárán belüli (vagyis legfeljebb 10 IU/ml-es) mintaeredményeket használja. Leletezett eredményként a legalacsonyabb olyan hígítást kell használni, ami a QFM ELISA teszt méréshatárán belül eredményt ad (a hígítási arány figyelembevételével), ha a hígítatlan plazma a QFM ELISA méréshatárát meghaladó eredményt ad.

Eljárás

1. **Felhasználás előtt a konjugátum 100× koncentrátum kivételével minden plazmamintát és reagenst szobahőmérsékletre (22 ± 5 °C-ra) kell hozni. A hő kiegyenlítődésre legalább 60 percet kell hagyni.**
2. **Vegye ki a mikrolemezkeretből azokat a csíkokat, amelyekre nincs szükség, ezeket zárja vissza a fóliatasakba, majd felhasználásig helyezze vissza a hűtött tárolóba.**

Számoljon legalább egy csíkkal a QFM standardokhoz, plusz a teszt-alanyok számához elegendő számú csíkkal. Használat után a többi csík számára őrizze meg a keretet és a fedelet.

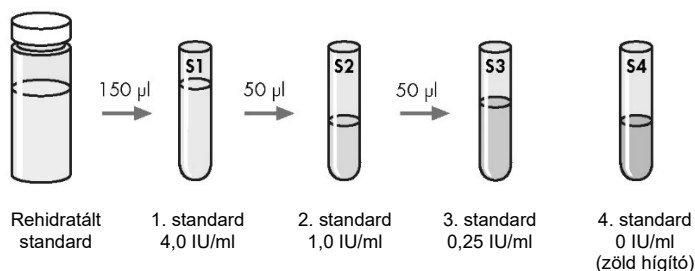
3. **Rehidratálja a liofilizált IFN- γ standardot a standard üvege címkéjén feltüntetett mennyiségű ioncserélt vagy desztillált vízzel. Óvatosan, minimális habképződéssel keverje, amíg teljesen fel nem oldódik. A standard megadott térfogatra rehidratálása 8,0 IU/ml koncentrációjú oldatot képez.**

Fontos: Az IFN- γ standard rehidratálási térfogata tételenként eltérő. A standard üvegének címkéjén ellenőrizze, hogy megfelelő mennyiségű ioncserélt vagy desztillált vizet használ-e.

Használja rehidratálva a készletben lévő standardot 1:2 arányú oldat elkészítéséhez, majd az IFN- γ 1:4 arányú hígítási sorozatának elkészítéséhez zöld hígítóban (GD) (lásd: 2. ábra). Az S1 (1. standard) tartalma 4,0 IU/ml, az S2 (2. standard) tartalma 1,0 IU/ml, az S3 (3. standard) tartalma 0,25 IU/ml és az S4 (4. standard) tartalma 0 IU/ml (csak zöld hígító). A standardokat duplán kell tesztelni. Minden ELISA munkamenethez friss hígítást kell készíteni a készletben lévő standardból.

Ajánlott eljárás a dupla standardokhoz

- Címkézzen fel 4 csövet: S1, S2, S3, S4.
- Töltsön 150 μ l zöld hígítót az S1, S2, S3 és S4 csövekbe.
- Töltsön 150 μ l standardot az S1 csőbe, és alaposan keverje össze.
- Töltsön át 50 μ l-t az S1-ből az S2 csőbe, és alaposan keverje össze.
- Töltsön át 50 μ l-t az S2-ből az S3 csőbe, és alaposan keverje össze.
- A zöld hígító (GD) magában nullstandardként szolgál (S4).



2. ábra. A standardgörbe elkészítése.

4. Rehidratálja a liofilizált konjugátum 100× koncentrátumot 0,3 ml ioncserélt vagy desztillált vízzel. Óvatosan, minimális habképződéssel keverje, hogy a konjugátum teljesen feloldódjon.

A konjugátum készre hígításához hígítsa fel a kívánt mennyiségű rehidratált konjugátum 100× koncentrátumát zöld hígítóval (1. táblázat, Konjugátumkészítés). Az esetleg megmaradó összes konjugátum 100× koncentrátumot azonnal vissza kell hűteni 2–8 °C-ra. Csak zöld hígítót használjon.

1. táblázat. Konjugátumkészítés

Csíkok száma	A konjugátum 100× koncentrációjának mennyisége	A zöld hígító mennyisége
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. A vérvételi csövekből elválasztott, majd tárolt vagy fagyasztott plazmamintákat az ELISA lyukakba töltés előtt alaposan keverje fel.

Fontos: Közvetlenül a centrifugált QFM csövekből áttöltött plazmaminták esetén a plazma keverését kerülni kell. A teljes folyamat során gondosan meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.

6. **Javaslat: Hígítsa a plazmamintákat 1:10 arányban.**

- Töltsön 90 µl zöld hígítót (GD) a páciens adataival és „1:10” felirattal címkézett csőbe.
- Ezt követően adjon hozzá 10 µl-es kevert plazmamintákat (a kevert plazmaminták és a közvetlenül a centrifugált QFM csövekből származók kezelése közötti különbségről az 5. lépésben olvashat).
- Keverje át teljesen pipettával. Ügyeljen, hogy a lehető legkevesebb hab keletkezzen.

7. **Javaslat: Hígítsa a plazmamintákat 1:100 arányban.**

- Készítsen 1:10 hígítást (lásd fent a 6. lépést).
- Töltsön 90 µl zöld hígítót a páciens adataival és „1:100” felirattal címkézett csőbe.
- Tegyen hozzá 10 µl-t az 1:10-es hígításból.

- Keverje át teljesen pipettával. Ügyeljen, hogy a lehető legkevesebb hab keletkezzen.

Javaslat: Tesztelje a következő mintákat párhuzamosan és a következő sorrendben:

- Hígítatlan, 1:10, 1:100

A QFM Analysis szoftver az alanyra vonatkozó további mintabeállításokat is támogatja:

- Hígítatlan
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Hígítatlan, 1:10

8. Töltsön 50 µl frissen készre hígított konjugátumot a szükséges ELISA lyukakba többcsatornás pipettával.
9. Töltsön 50 µl-es teszt plazmamintákat a megfelelő lyukakba többcsatornás pipettával. Ezt követően töltsön 50 µl mennyiséget az 1–4 standardokból. A standardokat duplán tesztelje.
10. Helyezzen minden lemezre fedelet, és keverje alaposan a konjugátumot és a plazmamintákat vagy standardokat mikrolemezzel 1 percig. Kerülje el a kiloccsanást.
11. Inkubálja szobahőmérsékleten ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) 120 ± 5 percen át.
A lemezeket inkubálás alatt nem érheti közvetlen napfény.
12. Az inkubálás alatt hígítson 1 rész mosópuffer 20× koncentrátumot 19 rész ioncserélt vagy desztillált vízzel, és keverje meg alaposan. 2 liter készre hígított mosópuffer elkészítéséhez elegendő mosópuffer 20× koncentrátumot mellékelünk.
A lyukakat 400 µl készre hígított mosópufferrel mossa legalább 6 cikluson keresztül mikrolemezzel mosóban. Automatikus lemezmosó használata ajánlott.
A teszt minősége érdekében nagyon fontos az alapos mosás. Ügyeljen arra, hogy minden lyuk **színültig telítődjön** a mosópufferrel minden mosási ciklusban. Javaslat: A legjobb eredmény érdekében áztassa a lyukakat legalább 5 másodpercig az egyes ciklusok között.
Tegyen standard laboratóriumi fertőtlenítőszerrel a szennyvíztartályba, és ártalmatlanítsa a potenciálisan fertőző anyagot az előírások szerint.
13. **Ütögesse a lemezeket lefordítva nedvszívó, kevésbé szálkás kendőre, hogy a maradék mosópuffer eltávozzon. Töltsön 100 µl enzimszubsztrátoldatot minden lyukba, helyezzen minden lemezre fedelet, és végezzen alapos keverést mikrolemezzel.**

14. Inkubálja szobahőmérsékleten ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) 30 percen át.

A lemezeket inkubálás alatt nem érheti közvetlen napfény.

15. Inkubálás után töltsön 50 μl enzimleállító oldatot minden lyukba, és végezzen alapos keverést mikrolemezzrázóval.

Az enzimleállító oldatot az enzimszubsztrátoldat 13. lépésben leírt adagolásakor alkalmazott sorrendben és közel hasonló sebességgel töltsé a lyukakba.

16. A reakció leállítását követő 5 percen belül mérje meg az optikai denzitás (OD) értékét egy 450 nm-es szűrőjű és 620–650 nm-es referenciaszűrőjű mikrolemezolvasóval. A teszteredményeket az OD értékekből kell kiszámolni.

Számítások és a teszt értelmezése

A nyers adatok elemzése és az eredmények kiszámítása a QuantiFERON Monitor Analysis szoftverrel történik. Ez beszerezhető a www.QuantiFERON.com webhelyen. Ügyeljen rá, hogy mindig a QuantiFERON Monitor Analysis szoftver legújabb verzióját használja.

A szoftver az „Eredmények értelmezése” című fejezetben leírtak szerint elvégzi a teszt minőségi felülvizsgálatát, létrehozza a standardgörbét, és kiszámítja az egyes alanyok teszteredményét.

Ha a hígítatlan plazma a QFM ELISA teszt felső méréshatára (10 UI/ml) felett van, a QuantiFERON Monitor Analysis szoftver a legalacsonyabb olyan hígításnak megfelelő eredményt leletezi a hígítási arány figyelembevételével, ami eredményt ad a QFM ELISA tartományán belül.

A QuantiFERON Monitor Analysis szoftver alkalmazása helyett az eredmények az alábbi módon is megállapíthatók.

Standardgörbe létrehozása

(QuantiFERON Monitor Analysis szoftver nélkül)

Határozza meg minden tálcán a standardok átlagos OD értékeit.

Szerkesszen egy $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ standardgörbét, amely az átlagos OD $\log_{(e)}$ értékét ábrázolja (y tengely) a standardok IU/mlben mért IFN- γ -koncentrációs értékének $\log_{(e)}$ függvényében (x tengely), a nullstandardot a számításból kihagyva. Számítsa ki regresszióanalízissel a standardgörbe legjobban illeszkedő vonalát.

Állapítsa meg a standardgörbe segítségével az egyes tesztplazmaminták IFN- γ koncentrációját (IU/ml) a hozzájuk tartozó OD értékből.

Ezeket a számításokat a mikrolemezolvasóhoz tartozó szoftvercsomagokkal, valamint hagyományos táblázatkezelő vagy statisztikai szoftverekkel (például Microsoft® Excel®) végezheti el. Ajánlatos ezeket a csomagokat használni a regresszióanalízis, valamint a standardokra vonatkozó ingadozási együttható (%CV) és a standardgörbe korrelációs együtthatójának (r) kiszámításához.

Leletezett eredményként a legalacsonyabb olyan hígítást kell számításba venni, ami eredményt ad a QFM ELISA teszt méréshatárán belül (a hígítási arány figyelembevételével), ha a hígítatlan plazma a QFM ELISA méréshatárát meghaladó eredményt ad.

A teszt minőségi felülvizsgálata

A teszteredmények pontossága attól függ, hogy mennyire sikerült pontos standardgörbét létrehozni, ezért a minták adatainak értelmezését megelőzően felül kell vizsgálni a standardokból származó eredményeket.

Az ELISA teszt érvényességének feltételei:

- Az 1. standardra vonatkozó OD átlagnak $\geq 0,600$ értékűnek kell lennie.
- Az 1. és 2. standardok ismétlődő OD értékeihez tartozó $\%CV \leq 15\%$ lehet.
- A 3. és 4. standardok ismétlődő OD értékei nem mutathatnak $0,040$ optikai denzitási egységnél nagyobb szórást az átlagértéktől.
- A standardok átlagos abszorpciók értékeiből számított korrelációs együtthatónak (r) $\geq 0,98$ értékűnek kell lennie.

A QuantiFERON Monitor Analysis szoftver kiszámolja ezeket a minőség felülvizsgálati paramétereket, és jelentést készít róluk.

Ha a fenti követelmények nem teljesülnek, akkor a teszt érvénytelen, és meg kell ismételni.

A nullstandardhoz (zöld hígító) tartozó átlagos OD érték $\leq 0,150$ lehet. Ha az átlagos OD érték $> 0,150$, akkor a lemezmosási munkafolyamatot kell felülvizsgálni.

Az eredmények értelmezése

A QFM teszt eredményeinek értelmezése a veleszületett és szerzett immunstimulánsokra adott IFN- γ -választól függ. A QFM teszt az immunműködésről kvalitatív és kvantitatív képet ad. A QFM-eredmények nem feltétlenül számszerűsítik közvetlenül az immunszuppresszió szintjét.

Fontos: Egy alany immunállapotának megállapításakor a mért IFN- γ -szintet az orvosi vizsgálatokkal, kórelőzményekkel és más klinikai mutatókkal együtt kell használni (2. táblázat). A QFM teszt mérési küszöbe aszerint változhat, hogy az alany milyen szintű immunszuppressziót kapott, illetve milyen paraméterei voltak a szervátültetésnek.

2. táblázat. Az eredmények értelmezése

QFM IFN- γ -eredmények (IU/ml)	Besorolás	Értelmezés
< 15	Gyenge	Az alannak a veleszületett és szerzett immunstimulánsokra adott IFN- γ -válasza gyenge.
15–1000	Mérsékelt	Az alannak a veleszületett és szerzett immunstimulánsokra adott IFN- γ -válasza mérsékelt.
> 1000	Erős	Az alannak a veleszületett és szerzett immunstimulánsokra adott IFN- γ -válasza erős.

Ha egy hígítatlan plazmaminta mért IFN- γ -szintje kevesebb mint 0,1 IU/ml:

- Ellenőrizze, hogy a QFM LyoSphere golyócskát hozzáadta-e a vérmin-tához, és a csövet a jelen kézikönyvnek megfelelően inkubálta-e.
- Ellenőrizze, hogy az IFN- γ -eredmény megfelel-e az alany aktuális klinikai állapotának.

A vérvételekor vagy a vérminták kezelésekor elkövetett technikai hibák gyanúja esetén ismétlje meg a teljes QFM tesztet új vérmintával. Ismétlje meg a stimulált plazmaminták ELISA tesztjét, ha felmerül annak a lehetősége, hogy az eredeti teszt eltért a jelen kézikönyvben ismertetett eljárástól (az „A teszt minőségi felülvizsgálata” című fejezetben további részleteket talál).

Előfordul, hogy a kezelőorvos meg kívánja ismételni a tesztet, ha az eredmények nem illenek az alany aktuális klinikai állapotához.

Korlátok

A QFM teszt eredményeit az egyes személyek kórtörténetével együtt, az aktuális egészségi állapotukkal összhangban és az egyéb diagnosztikai szempontok figyelembe vételével kell használni. A laboratóriumok saját tartományokat állapíthatnak meg a teszthez.

A laboratóriumok úgy is dönthetnek, hogy egy egészséges alanytól vett külső kontrollmintát együtt vizsgálják a páciens vérmintáival.

A megbízhatatlan és pontatlan eredmények lehetséges okai:

- Nem megfelelő antikoaguláns a vérben – csak lítium-heparint használjon, mert más antikoagulánsok megzavarhatják a tesztet.
- A jelen kézikönyvben meghatározott szabályoktól való eltérések.

- Túlzott mértékű keringő IFN- γ vagy heterofil antitestek jelenléte.
- 8 óránál hosszabb idő telt el a vérvétel és a 37 °C-os inkubálás között.
- A QFM vérvételi csövek helytelen mennyiségű, 0,9 ml-nél kevesebb vagy 1,1 ml-nél több vérrel való töltése.

Teljesítményjellemzők

Klinikai vizsgálatok

Két klinikai vizsgálatot végeztek egészségesnek tartott személyek (n = 114) és transzplantáltak (n = 30) immunválaszának kiértékelésére. A transzplantáltak közül 18-an tartoztak a nemrég transzplantáltak csoportjába („Early Post-Tx”, a szervátültetéstől számított 3 hónapon belül), és 12-en a régebben transzplantáltakéba („Late Post-Tx”, több mint 12 hónap telt el a szervátültetés óta); az utóbbit nevezték stabil csoportnak.

- Az Early Post-Tx tagoktól legfeljebb 5 különböző időpontban vettek vérmintát (3 hónapos poszttranszplantációs csoport, n = 64 minta).
- A Late Post-Tx tagoktól egyszer vettek vérmintát (késői poszttranszplantációs csoport, n = 12 minta).
- Az egészségesnek tartott személyektől egyszer vettek vérmintát (n = 114).

A QFM-re adott Early Post-Tx és Late Post-Tx minták immunválaszai a gyenge és a mérsékelt besorolás közé estek. Az Early Post-Tx csoportnál nagyobb volt a gyenge tartományba tartozó válaszok százalékaránya (93,8%), és kisebb a mérsékelt tartományúaké (6,3%), a Late Post-Tx csoportnál viszont a válaszok 25%-a tartozott a gyenge tartományba, és 66,7% a mérsékeltbe (3. táblázat). Az Early Post-Tx csoport egyetlen immunválasza sem volt erős besorolású, a Late Post-Tx csoportban pedig csak egy (8,3%). Az egészségesnek tartott személyek csoportjának QFM-válaszai főként a mérsékelt (83,3%) vagy az erős (15,8%) tartományba estek (3. táblázat).

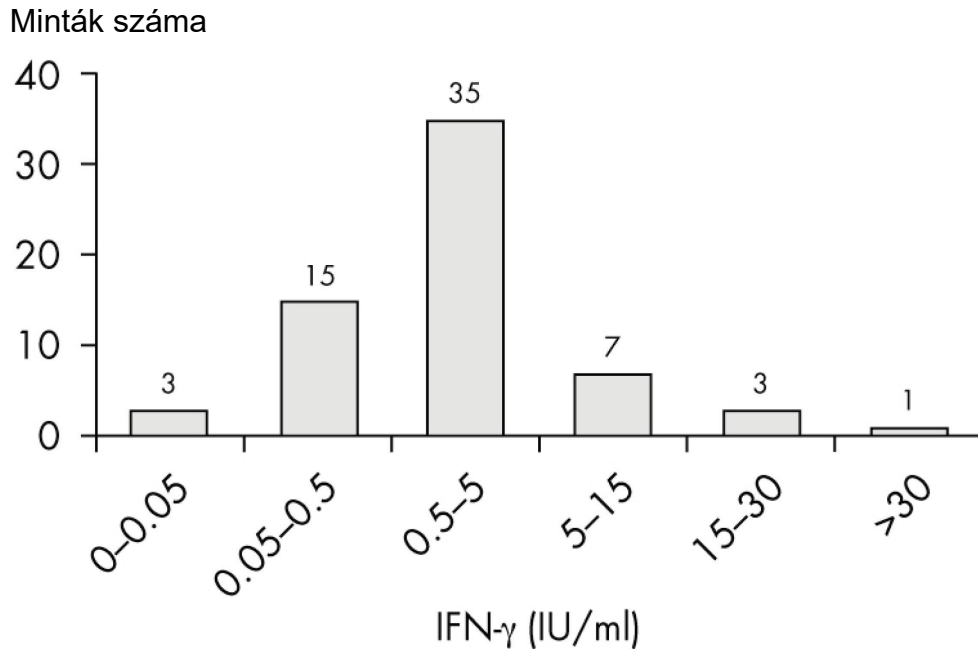
3. táblázat. A QFM-válaszok eloszlása egészségesnek tartott alanyoknál és transzplantáltaknál

IFN- γ (IU/ml)	Eredmény beso- rolása	Early Post-Tx %* CI: 95% n	Late Post-Tx %* CI: 95% n	Egész- séges alanyok %* CI: 95% n	Összes eredmény
< 15	Gyenge	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	Mérsékelt	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	Erős	0,0% 0–5,7 n = 0	8,3% 1,5–35,4 n = 1	15,8% 10,2–23,6 n = 18	19
Összes minta		64	12	114	190

* A százalékok az olyan vérminták arányát jelzik az egyes donorcsoportokban, amelyek az adott választartományba esnek.

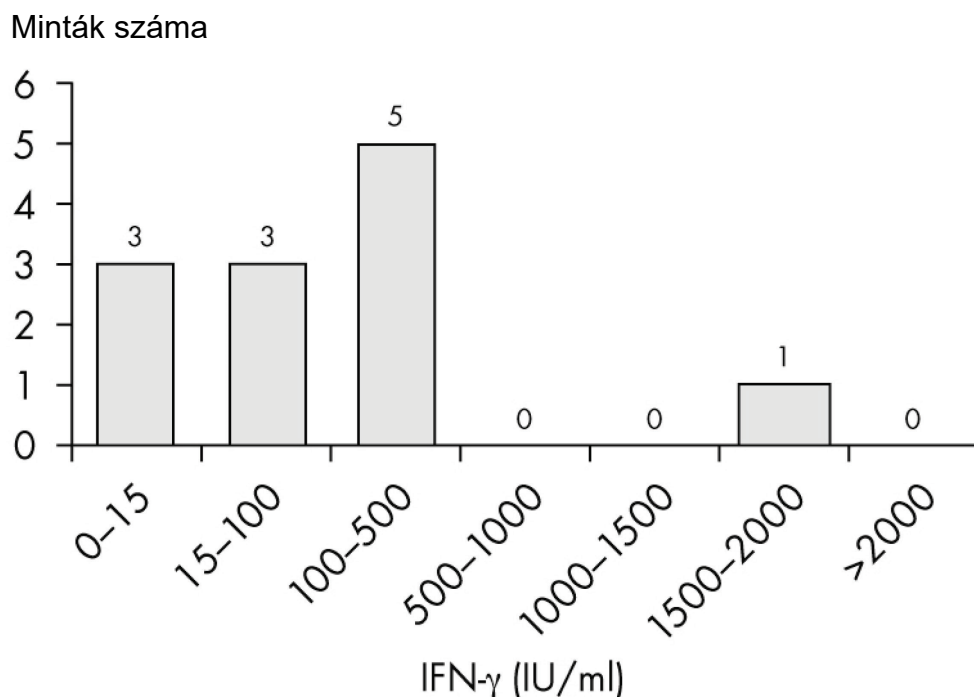
Várható értékek

A QFM-re adott IFN- γ -válaszok eloszlását a nemrég (legfeljebb 3 hónapja) transzplantáltaknál a 18 transzplantálttól vett 64 vérminta QFM ELISA tesztje alapján állapították meg (3. ábra).



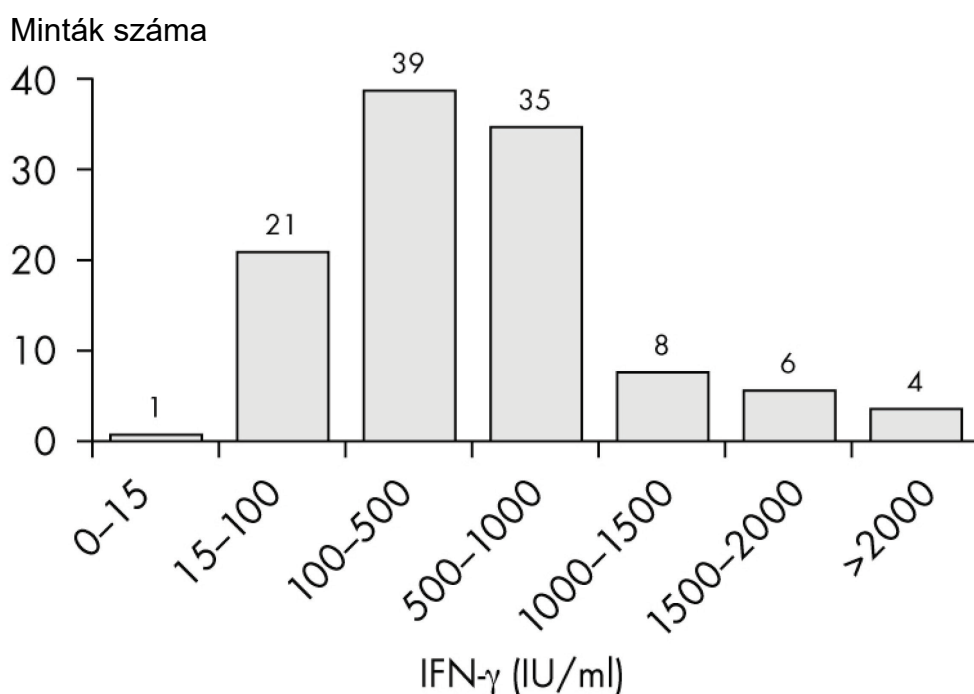
3. ábra. A QFM IFN- γ -válaszok eloszlása nemrég transzplantált pácienseknél (n = 64; medián = 1,5 IU/ml).

A QFM-re adott IFN- γ -válaszok eloszlását a korábban (több mint 12 hónapja) transzplantáltaknál a 12 vérminta QFM ELISA tesztje alapján állapították meg (4. ábra).



4. ábra. A QFM IFN- γ -válaszok eloszlása régebben transzplantált pácienseknél (n = 12; medián = 98,8 IU/ml).

A QuantiFERON Monitor tesztre adott IFN- γ -válaszok eloszlását az egészségesnek tartott alanyoknál a 114 vérminta QFM ELISA tesztje alapján állapították meg (5. ábra).



5. ábra. A QFM IFN- γ -válaszok eloszlása egészségesnek tartott alanyoknál (n = 114; medián = 400,5 IU/ml).

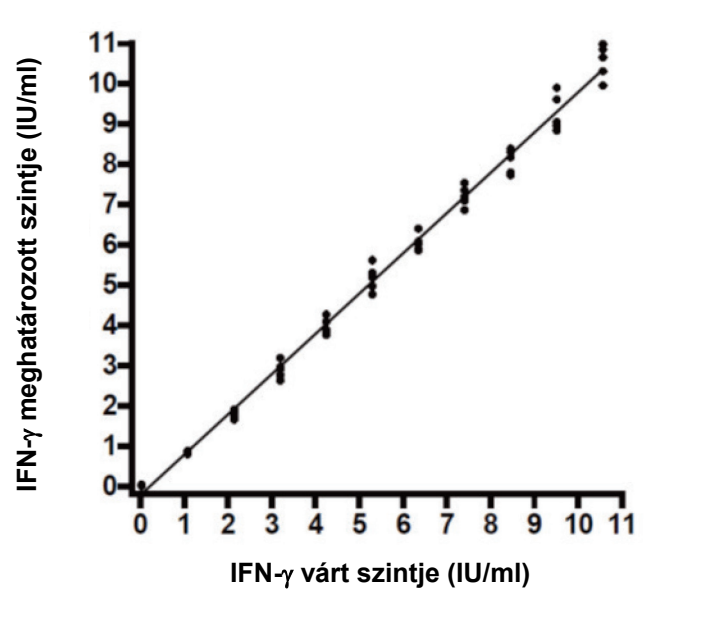
QFM-válaszok transzplantált pácienseknél

A QFM tesztet transzplantált páciensek megfigyeléses, keresztmetszeti vizsgálatában értékelték ki (4). A vizsgálat résztvevői: 212 egészséges alany egy 30 fős, kor és nem szerint összeállított kontrollrészcsoporttal, 30 szervátültetésre váró páciens, 18 nemrég transzplantált páciens (66 vérminta; a transzplantáció óta eltelt napok számának mediánja = 21) és 11 jóval korábban transzplantált páciens (a transzplantáció óta eltelt napok számának mediánja = 2290). Az átlagos IFN- γ -termelés 555,2 IU/ml volt az egészséges kontrollalanyoknál és 614,6 IU/ml a kor és nem szerint összeállított kontrollcsoportnál. Az átlagos IFN- γ -termelés a felmérés szerint szignifikánsan alacsonyabb volt mind a transzplantációra váró (IFN- γ = 89,3 IU/ml), mind a nem sokkal transzplantáció utáni (IFN- γ = 3,76 IU/ml) pácienseknél a kor és nem szerint összeállított kontrollcsoporthoz képest ($p < 0,001$). A korábban transzplantált pácienseknél az immunműködés helyreállítását (átlagos IFN- γ = 256,1 IU/ml) figyelték meg, és megmutatták, hogy ez szignifikánsan magasabb, mint a nemrég transzplantált pácienseknél ($p < 0,05$). Ez a vizsgálat azt mutatja, hogy a QFM felhasználható a sejtmediált immunműködés felmérésére az immunszuppressziót kapott szervátültetett populációban.

A vizsgálat teljesítményjellemzői

A QFM ELISA linearitását úgy bizonyították, hogy 11 ismert IFN- γ -koncentrációjú plazmaforrás 5 megismételt tételét helyezték véletlenszerűen az ELISA tálcára. A lineáris regressziós vonal meredeksége $1,002 \pm 0,011$, korrelációs együtthatója 0,99 (6. ábra).

A QFM ELISA kimutatási határa 0,065 IU/ml, és semmi sem utal prozónajelenségre, még akár 10 000 IU/ml IFN- γ -koncentráció mellett sem.



6. ábra. A QFM ELISA linearitási profilját 11 ismert IFN- γ -koncentrációjú plazmaminta 5 megismételt tételének tesztelése alapján határozták meg.

A QFM teszt (1. fázisának) reprodukálhatóságát 20 egészséges alany vérmintái alapján határozták meg. A felmérés három különböző kezelővel, eltérő tételszámú QFM LyoSphere készletekkel és más-más laboratóriumi felszereléssel történt. Az IFN- γ immunválaszszintek átlagos variációs együtthatóját QFM ELISA teszttel határozták meg a három eltérő tételszámú QFM LyoSphere készlettel és háromféle laboratóriumi körülmény között; az érték 22,22% (95% CI: 17,20–27,25) volt.

A QFM teszt (1. fázisának) ismételtetőségét úgy mérték fel, hogy ugyanattól a 14 alanytól vett vérmintákon megmérték 5–6 ismételt QFM LyoSphere vérstimuláció variabilitását. A 14 alany átlagos variációs együtthatója (coefficient of variation, CV) 14,7% (95% CI: 10,2–19,2) volt. Az egyes alanyok százalékos CV-értéke nem érte el a 30%-ot.

A QFM ELISA teszt (2. fázisának) reprodukálhatóságát 20 változó IFN- γ -koncentrációjú plazmaminta alapján becsülték meg 3 ismétléssel, 3 laboratóriumban, 3 nem egymást követő napon, 3 kezelővel. Ennek megfelelően minden mintát 9 független tesztmunkafolyamatban, összesen 27 alkalommal teszteltek. Az egyik minta 0,08 IU/ml (95% CI: 0,07–0,09)

számított IFN- γ -koncentrációjú nullkontroll volt. A fennmaradó 19 plazmaminta koncentrációja 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) és 7,7 IU/ml (95% CI: 7,48–7,92) közé esett.

A munkafolyamaton belüli és a tesztek közötti pontatlanság közelítő értékét az egyes tesztmunkafolyamatokból származó (n = 9), 4,1 és 9,1 %CV érték közötti IFN- γ -tartalmú tesztplazmák %CV értékeinek átlagolásával kapták meg. A munkafolyamaton belüli átlagos %CV (\pm 95% CI) értéke $6,6 \pm 0,6\%$ volt. A nulla IFN- γ plazma átlaga 14,1 %CV volt.

Az összes teszten belüli pontatlanságot plazmamintánként 27 különféle számított IFN- γ -koncentráció összevetésével határozták meg. A tesztek közötti pontatlanság 6,6 és 12,3 %CV között volt. Az összesített átlagos %CV (\pm 95% CI) értéke $8,7 \pm 0,7\%$ volt. A nulla IFN- γ értékű plazma 26,1 %CV értéket mutatott. Ez egy elvárható szintű ingadozás, mert a számított IFN- γ -koncentráció alacsony értékű, és az alacsony értékű becsült koncentrációk ingadozása mindig nagyobb, mint a magasabb koncentrációs értékeké.

Technikai tudnivalók

Alvadt plazmaminták

A plazmaminták hosszú idejű tároláskor kialakuló rögzösödés esetén a minta centrifugálásával ülepedhetnek a vérrögök, és lehetővé válik a plazma pipettázása.

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. Részletesebb útmutató található a Technical Information (Technikai tudnivalók) alatt: www.QuantiFERON.com. Az elérhetőségek a hátsó borítón találhatóak.

ELISA – hibaelhárítás

Nem specifikus szín kialakulása

Lehetséges ok	Megoldás
a) A lemez nem megfelelő mosása	A tálcát legalább 6 alkalommal kell átmosni lyukanként 400 µl mosópufferrel. Az alkalmazott mosófolyadéktól függően 6-nál többszöri átmosásra is szükség lehet. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között.
b) Az ELISA lemez lyukai közötti keresztfertőzés	A kockázat minimalizálása érdekében ügyeljen a minták pipettázásakor és keverésekor.
c) A készlet vagy összetevői lejártak	Ügyeljen arra, hogy a készletet a lejáratási időn belül felhasználja. A rehidratált standardot és konjugátum 100× koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő 3 hónapon belül fel kell használni.
d) Az enzimszubsztrát-oldat szennyezett	Kékes elszíneződés esetén a szubsztrátumot hulladékba kell helyezni. Ügyeljen a reagenstartály tisztaságára.
e) Elválasztás előtt felkeveredik a plazma a QFM csövekben	A centrifugálás és az elválasztás között el kell kerülni a plazma felkeverését a pipetta fel-le mozgatásával vagy bármilyen más módon. A teljes folyamat során gondosan meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.

Alacsony leolvasott optikai denzitás a standardoknál

Lehetséges ok	Megoldás
a) Standardhígítási hiba	Ügyeljen rá, hogy a jelen kézikönyvben foglaltak szerint történjen a standardkészlet hígítása.
b) Pipettázási hiba	A pipettákat mindig a gyártói utasítások betartásával kell kalibrálni és alkalmazni.
c) Túl alacsony inkubációs hőmérséklet	Az ELISA inkubációját szobahőmérsékleten kell elvégezni (17–27 °C).

ELISA – hibaelhárítás

- | | |
|---|---|
| d) Túl rövid inkubációs idő | Inkubálja a konjugátumot, a standardokat és a mintákat tartalmazó lemezt 120 ± 5 percen át. Inkubálja az enzimszubsztrát-oldatot 30 percen át a lemezen. |
| e) Nem megfelelő szűrő a lemezbeolvasásnál | A lemezbeolvasásnak 450 nm-en kell történnie 620–650 nm-es szűrővel. |
| f) Túl hideg reagensek | A teszt kezdete előtt a konjugátum $100\times$ koncentrátum kivételével minden reagenst szobahőmérsékletre kell hozni. Ehhez körülbelül 1 óra szükséges. |
| g) A készlet vagy annak összetevői lejártak | Ügyeljen arra, hogy a készletet a lejáratási időn belül felhasználja. A rehidratált standardot és konjugátum $100\times$ koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő 3 hónapon belül fel kell használni. |

Magas háttérszíneződés

- | Lehetséges ok | Megoldás |
|---|---|
| a) A lemez nem megfelelő mosása | A tálcát legalább 6 alkalommal kell átmosni lyukanként 400 μ l mosópufferrel. Az alkalmazott mosófolyadéktól függően 6-nál többszöri átmosásra is szükség lehet. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között. |
| b) Túl magas inkubációs hőmérséklet | Az ELISA inkubációját szobahőmérsékleten kell elvégezni ($17\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| c) A készlet vagy összetevői lejártak | Ügyeljen arra, hogy a készletet a lejáratási időn belül felhasználja. A rehidratált standardot és konjugátum $100\times$ koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő három hónapon belül fel kell használni. |
| d) Az enzimszubsztrát-oldat szennyezett | Kékes elszíneződés esetén a szubsztrátumot hulladékba kell helyezni. Ügyeljen a reagenstartály tisztaságára. |

ELISA – hibaelhárítás

Nem lineáris standardgörbe és kétszeres változékonyság

Lehetséges ok	Megoldás
a) A lemez nem megfelelő mosása	A tálcát legalább 6 alkalommal kell átmosni lyukanként 400 µl mosópufferrel. Az alkalmazott mosófolyadéktól függően 6-nál többszöri átmosásra is szükség lehet. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között.
b) Standardhígítási hiba	Ügyeljen rá, hogy a jelen kézikönyvben foglaltak szerint történjen a standard hígítása.
c) Elégtelen keverés	A reagenseket a lemezre töltésük előtt alaposan fel kell keverni átfordítással vagy óvatos vortexeléssel.
d) Nem egyenletes pipettázás vagy teszt előkészítésének megszakítása	A minták és a standardok kitöltését folyamatosan kell végezni. A teszt megkezdése előtt minden reagenst elő kell készíteni.













Terméktájékoztató és technikai útmutató ingyenesen rendelkezésre áll a QIAGEN forgalmazójától, illetve ha felkeresi a www.QuantiFERON.com webhelyet.

Hivatkozások

A Gnowee QuantiFERON referencia könyvtárában (reference library) megtalálható a QFM referenciák átfogó listája a www.gnowee.net webhelyen.

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.

Szimbólumok

 2 × 96	Elegendő 2 × 96 minta-előkészítéshez
	Gyártó jogi személy
	CE-IVD jelölt szimbólum
	In vitro diagnosztikai célra
	Tételkód
	Katalógusszám
	Felhasználhatósági dátum
	Hőmérsékleti korlát
	Nézze meg a használati útmutatóban
	Ne használja fel újra
	Óvja a napfénytől
	Felhatalmazott képviselő az Európai Közösségben

Elérhetőségek

Műszaki segítségért vagy további információkért hívja az ingyenes 00800-22-44-6000 számot, keresse fel műszaki támogatóközpontunkat a www.qiagen.com/contact webhelyen, vagy forduljon az egyik QIAGEN ügyfélszolgálati osztályhoz (lásd a hátsó borítón, vagy látogassa meg a www.qiagen.com webhelyet).

Rövidített teszteljárás

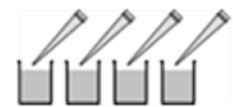
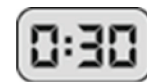
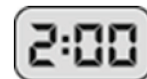
1. fázis – a vér inkubálása

1. Vegyen le vért a páciens-től a QFM vérvételi csőbe vagy egy lítium-heparines vérvételi csőbe. Címkézze fel a csöveket a páciens adataival és a vérvétel időpontjával, majd környezeti hőmérsékleten szállítsa a laboratóriumba a vérvétel időpontjától számított 8 órán belül.
 - a. Ha a vért lítium-heparint tartalmazó vérvételi csőbe vették, helyezzen át 1 ml vért a QFM vérvételi csőbe, és címkézze fel a páciens adataival és a vérvétel időpontjával.
2. Tegyen 1 darab QFM LyoSphere golyócskát mindegyik 1 ml vért tartalmazó QFM vérvételi csőbe, oldja fel a LyoSphere golyócskát, majd inkubálja a csöveket, amint lehetséges (a vérvétel időpontjától számított 8 órán belül) **függőleges** helyzetben 16–24 órán keresztül 37 °C-on.
3. Inkubálás után centrifugálja a csöveket 15 percig 2000–3000 g (RCF) centrifugális erővel, hogy a plazma és a vörösvértestek elváljanak.
4. A centrifugálás és az elválasztás művelete között kerülni kell a pipetta használatát, illetve a plazma bármilyen felkeverését. Végig gondosan meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.



2. fázis – IFN- γ ELISA

1. Legalább 60 percen keresztül engedje, hogy az ELISA összetevői a konjugátum 100× koncentrátum kivételével felvegyék a szobahőmérsékletet.
2. Rehidratálja a készletben lévő standardot 8,0 IU/ml mennyiségre desztillált vagy ioncserélt vízzel. Készítsen 4 standard hígítást.
3. Rehidratálja a liofilizált konjugátum 100× koncentrátumot desztillált vagy ioncserélt vízzel.
4. Készítsen készre hígított konjugátumot a zöld hígítóval, majd töltsön 50 μ l mennyiséget minden lyukba.
5. Töltsön 50 μ l-es tesztplazmamintákat (hígítatlan, 1:10 vagy 1:100 arányú hígítás, szükség szerint) és 50 μ l-es standardadagokat a megfelelő lyukakba. Keverje a rázógéppel.
6. Inkubálja 120 \pm 5 percig szobahőmérsékleten.
7. A lyukakat legalább 6 alkalommal mossa át lyukanként 400 μ l mosópufferrel.
8. Töltsön 100 μ l enzimszubsztrátoldatot a lyukakba. Keverje a rázógéppel.
9. Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.
10. Töltsön 50 μ l enzimeállító oldatot a lyukakba. Keverje a rázógéppel.
11. Olvassa be az eredményeket 450 nm-en 620–650 nm-es referenciaszűrővel.
12. Elemezze az eredményeket.



Megjegyzések

Jelentős módosítások

A QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA kézikönyv jelen kiadásában történt jelentős módosítások összefoglaló táblázata:

Fejezet	Oldal	Módosítás(ok)
Óvintézkedések	11	Új GHS-információk
Óvintézkedések	12	A zárókupakos üvegcsékre vonatkozó biztonsági utasítások hozzáadása.

Védjegyek: QIAGEN[®], QFM[®], QuantiFERON[®], QuantiFERON Monitor[®] (QIAGEN Csoport); LyoSphere[™], LyoSpheres[™] (BioLymph); Excel[®], Microsoft[®] (Microsoft); ProClin[®] (Rohm and Haas Co.).

A QuantiFERON Monitor Kit korlátozott licencszerződése

A termék használatával a vásárló vagy felhasználó elfogadja a jelen termékre vonatkozó feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint szabad használni, és csak a készletben szereplő összetevőkkel. A QIAGEN egyetlen szellemi terméke esetén sem engedélyezi, hogy a mellékelt összetevőket bármely, a készlethez nem tartozó összetevővel együtt használják. Ez alól kivételt képeznek a termékhez tartozó, a jelen kézikönyvben leírt vagy a weblapon található egyéb protokollokban leírtak: www.qiagen.com. Egyes kiegészítő protokollokat a QIAGEN felhasználói bocsátják a QIAGEN felhasználóinak rendelkezésére. Ezeket a protokollokat a QIAGEN nem tesztelte vagy optimalizálta átfogó módon. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem szavatolja, hogy mások jogait a protokoll nem sérti.
2. A kifejezetten megemlített licenccen kívül a QIAGEN nem vállal felelősséget azért, hogy a készlet, illetve annak használata nem sérti mások jogait.
3. A készletre és összetevőire egyszeri használatra szóló engedély vonatkozik, és tilos újrafelhasználni, felújítani vagy ismét eladni.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A készlet vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy tilos olyan lépéseket tennie vagy másvalakinek megengednie, amely a fent tiltott cselekedetek bármelyikét eredményezné vagy elősegítené. A QIAGEN a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak betartatása érdekében jogosult bármely bírósághoz fordulni, és az azzal kapcsolatos összes vizsgálati és perköltséget behajtani, beleértve a készlethez, illetve annak összetevőihöz kapcsolódó, a jelen korlátozott licencszerződésből vagy bármely szellemi termékhez fűződő jog érvényesítéséből eredő ügyvédi költséget.

A legfrissebb licencfeltételek: www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, minden jog fenntartva.

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

