


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

Test IFN- γ z plné krve měří odpovědi na stimulanty vrozené
a adaptivní imunitní odpovědi

Verze 1

 Pro diagnostiku in vitro



 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, USA

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NĚMECKO

1079024CS Rev. 03

 www.QuantiFERON.com



Obsah

Účel použití	4
Souhrn a princip testu	4
Princip testu	5
Čas potřebný k provedení testu	5
Komponenty a skladování	6
Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky	8
Skladování a manipulace	8
Upozornění a bezpečnostní opatření	10
Varování	10
Bezpečnostní opatření	11
Odběr vzorku a manipulace	13
Návod k použití	16
Výpočty a interpretace testu	22
Vytvoření standardní křivky	22
Kontrola kvality testu	23
Interpretace výsledků	23
Omezení	24
Charakteristiky funkčních vlastností	25
Klinické studie	25
Funkční vlastnosti	30
Technické údaje	31
Sražení vzorků plazmy	31
Návod na řešení problémů	32
Literatura	34
Symboly	35
Kontaktní údaje	35
Zkrácený postup testu	36

Účel použití

Test QuantiFERON Monitor (QFM) je in vitro diagnostický test určený k detekci buněčné imunitní funkce prostřednictvím měření interferonu gama (IFN- γ) v plazmě pomocí testu ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) po inkubaci heparinizované plné krve se stimulanty vrozené a adaptivní imunitní odpovědi. Tento test se používá k detekci buněčné imunitní odpovědi v populaci pacientů po transplantaci solidních orgánů, kterým jsou podávána imunosupresiva.

QFM je určen pro použití ve spojení s posouzením rizik a dalšími lékařskými a diagnostickými hodnoceními.

Souhrn a princip testu

Imunodeficience je charakterizována sníženou schopností účinně nastolit imunitní odpověď. Tato snížená nebo chybějící odpověď může být způsobena primární nebo získanou (sekundární) imunodeficiencí (1).

Primární imunodeficience jsou geneticky vrozené a charakterizují je deficience různých komponentů adaptivního nebo vrozeného imunitního systému (1). Nicméně většina imunodeficiencí je získaných (sekundárních) a lze je navodit patogenními látkami, léky (např. imunosupresiva po transplantaci orgánů), onemocněním (např. rakovina, např. leukémie a lymfom), nebo kontaminujícími látkami z prostředí (1).

Molekulární základ imunodeficience je různý; buněčná imunita však hraje klíčovou roli při způsobování mnoha pozorovaných klinických projevů. V současné době závisí diagnostika a léčba syndromů imunodeficience na původci (2, 3).

Například léčba „ad hoc“ je normou při sledování stavu buněčné imunodeficience u pacientů, kteří podstoupili transplantaci solidních orgánů (SOT) a dostávají léky k potlačení jejich imunitního systému. Stav imunitní odpovědi pacienta se obecně měří sledováním farmakologických hladin léků a klinickým/patologickým vyhodnocením funkce štěpu (2, 3).

Pomocí množství testů funkce T-lymfocytů se měří buněčná imunita vůči mitogenům, například fytohemaglutininu (PHA), pokeweed mitogenu a konkanavalinu A (ConA); tyto testy však měří pouze funkční schopnost T-lymfocytů a ty jsou podskupinou buněk zapojených do buněčné imunity. Je čím dál tím více zřejmé, že vrozený imunitní mechanismus přispívá vekou měrou k obranyschopnosti, ať už samostatně nebo zlepšením odpovědi specifických T-lymfocytů. Proto funkční odpovědi buněk vrozeného (NK buňky) a adaptivního (T-lymfocyty) imunitního systému spolu vyžadují komplexnější analýzu buněčné imunity (2, 3).

QFM je diagnostický test in vitro, který využívá kombinaci stimulantů (ve formě pelet LyoSphere™), které specificky stimulují různé typy buněk zapojených do vrozených i adaptivních imunitních systémů. Funkční stav imunitního systému

pacienta se vyhodnocuje měřením odpovědi na stimulaci vrozeného a adaptivního imunitního systému pomocí agonistů TLR receptoru (Toll Like Receptor), respektive receptoru T-lymfocytů (TCR). Detekce interferonu gama (IFN- γ) pomocí testu ELISA poskytuje kvalitativní i kvantitativní měření funkce buněčné imunity.

Princip testu

Test QFM využívá lyofilizované stimulanty (pelety QFM LyoSpheres™), které se přidávají k heparinizované plné krvi. Inkubace krve probíhá po dobu 16 až 24 hodin. Po této době se odebere plazma, která je testována na přítomnost IFN- γ vytvořeného v reakci na stimulanty.

Test QFM se provádí ve více fázích. Nejprve se odebere plná krev do zkumavky na odběr krve QFM. Dále jsou do zkumavky přidány pelety QFM LyoSphere. Poté se co nejdříve a do 8 hodin od odběru provede inkubace při teplotě 37 °C. Po fázi inkubace trvající 16 až 24 hodin se zkumavky odstředí, oddělí se plazma a změří se množství IFN- γ (uvádí se v mezinárodních jednotkách na ml; IU/ml) pomocí testu ELISA a porovná se s rozsahem očekávaných hodnot ke stanovení imunitní odpovědi pacienta.

QFM je test, který poskytuje kvalitativní i kvantitativní měření funkce imunitního systému. Výsledky QFM nemusí přímo kvantifikovat úroveň potlačení funkce imunitního systému.

Množství IFN- γ ve vzorcích plazmy může často být vyšší než horní limity většiny čteček ELISA, i když je u vyšetřovaných osob použita pouze mírná imunosuprese. Doporučuje se, aby vzorky plazmy byly zředěny v poměru 1:10, případně 1:100 v zeleném ředícím roztoku (Green Diluent) a otestovány pomocí testu ELISA spolu s neředěnou plazmou.

Poznámka: Prahová hodnota testu QFM se může lišit podle úrovně imunosuprese pacienta a individuálních podmínek transplantace.

Stručné informace o interpretaci výsledků testu QFM viz „Interpretace výsledků“ na straně 23 tohoto příbalového letáku.

Čas potřebný k provedení testu

Odhadovaný čas potřebný k provedení testu QFM je uveden níže. Je zde také uveden čas potřebný k testování více vzorků v jedné dávce.

Inkubace zkumavek s krví při 37 °C: 16 až 24 hodin

ELISA: Přibližně 3 hodiny pro jednu destičku ELISA
(až 88 vzorků)

< 1 hodina práce

Pro každou další destičku přidejte 10 až 15 minut

Komponenty a skladování

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Katalogové č.	0650-0701
Počet prep.	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 lahvičky
<i>Příbalový leták QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
Zkumavky pro odběr krve QuantiFERON Monitor	
Katalogové č.	0650-0101
Počet prep.	100
Zkumavky pro odběr krve QuantiFERON Monitor (bílý uzávěr, bílý kroužek)	100 zkumavek
<i>Příbalový leták pro zkumavky pro odběr krve QuantiFERON Monitor</i>	1

Součásti soupravy QuantiFERON Monitor ELISA se 2 destičkami	Souprava ELISA se 2 destičkami
Katalogové č.	0650-0201
Stripy s mikrodestičkami, 12 × 8 jamek (pokryté myší monoklonální protilátkou proti lidskému IFN- γ)	2 sady stripů mikrodestiček s 12 × 8 jamkami
IFN- γ Standard, lyophilized (Standardní IFN- γ , lyofylizovaný; obsahuje rekombinantní lidský IFN- γ , bovinní kasein, Thimerosal 0,01% hm.)	1 × lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)
Green Diluent (Zelený ředící roztok, obsahuje bovinní kasein; normální myší sérum, Thimerosal 0,01% hm.)	1 × 30 ml lahvička
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (Konjugát 100× koncentrát, lyofylizovaný; myší protilátkou proti lidskému IFN- γ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01% hm.)	1 × 0,3 ml po rekonstituci
Wash Buffer 20× Concentrate (20× koncentrát promývacího činidla; pH 7,2, obsahuje 0,05 % obj. ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztok enzymového substrátu; obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Zastavovací roztok enzymů; obsahuje 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
Příbalový leták QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Obsahuje kyselinu sírovou. Bezpečnostní opatření viz strana 11.

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

- Inkubátor 37 °C*; CO₂ není vyžadováno.
- Kalibrované pipety s proměnným objemem*
- Kalibrované vícekanálové pipety† pro výdej 50 µl a 100 µl s jednorázovými špičkami.
- Třepačka mikrodestiček†.
- Deionizovaná nebo destilovaná voda, 2 litry.
- Promývačka mikrodestiček (doporučuje se automatizovaná promývačka).
- Čtečka mikrodestiček† s filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm.
- Odměrný válec
- Savé utěrky s nízkou vláknivostí

Skladování a manipulace

Zkumavky pro odběr krve

Uchovávejte zkumavky QFM na odběr krve při teplotě 4 až 25 °C. Zkumavky QFM na odběr krve by měly mít v době odběru krve a promíchávání teplotu 17–25 °C.

LyoSpheres

Pelety LyoSpheres QFM skladujte při teplotě 2 až 8 °C.

Činidla soupravy ELISA

Činidla soupravy ELISA skladujte při teplotě 2 až 8 °C.

Roztok enzymového substrátu vždy chraňte před přímým slunečním světlem.

* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

Rekonstituovaná a nepoužitá činidla soupravy ELISA

Pokyny ke způsobu rekonstituce činidel ELISA viz „Fáze 2 – IFN- γ ELISA“, strana 17.

- Rekonstituovaný standard soupravy může být uchován až po dobu 3 měsíců, pokud je skladován při teplotě 2 až 8 °C.

Poznačte si datum, kdy byl standard soupravy rekonstituován.

- Po rekonstituci musí být nespotřebovaný konjugát 100× koncentrát vrácen do skladovací teploty 2 až 8 °C a musí být spotřebován do 3 měsíců.

Poznačte si datum, kdy byl konjugát rekonstituován.

- Pracovní roztok konjugátu musí být použit do 6 hodin od přípravy (viz tabulka 1).
- Pracovní promývací pufr může být uchován při pokojové teplotě ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) po dobu až 2 týdnů.

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro.

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

Varování

- QFM je test, který poskytuje kvalitativní i kvantitativní měření funkce imunitního systému. Výsledky QFM nemusí přímo kvantifikovat úroveň potlačení funkce imunitního systému.
- Výsledky testu QFM při stanovování stavu imunitního systému pacienta musí být použity ve spojení s klinickým vyšetřením, zdravotní anamnézou a dalšími klinickými ukazateli.
- Prahová hodnota testu QFM se může lišit podle úrovně imunosuprese pacienta a individuálních podmínek transplantace.

Bezpečnostní opatření

Pouze pro diagnostiku in vitro.



UPOZORNĚNÍ: S lidskou krví a plazmou zacházejte jako s potenciálně infekční. Dodržujte příslušné pokyny pro zacházení s krví a krevními produkty. Vzorky a materiály, které byly v kontaktu s krví nebo krevními produkty, likvidujte v souladu s federálními, státními a místními předpisy.

Na komponenty soupravy QuantiFERON Monitor ELISA se vztahují následující bezpečnostní věty a bezpečnostní opatření.

Informace o rizicích



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Zastavovací roztok enzymů QuantiFERON)

Obsahuje: kyselina sírová. Varování! Může být korozivní pro kovy. Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (Roztok enzymového substrátu QuantiFERON)

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.



QuantiFERON Green Diluent (Zelený ředící roztok QuantiFERON)

Obsahuje: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Obsahuje: tartrazin. Varování! Může vyvolat alergickou kožní reakci. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (Promývací činidlo QuantiFERON 20× koncentrát)

Obsahuje: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

Další informace

Bezpečnostní listy: www.qiagen.com/safety

- Odchylky od informací uvedených v *příbalovém letáku QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* mohou způsobit chybné výsledky. Před použitím si pečlivě přečtěte pokyny.
- **Důležité:** Před použitím zkontrolujte lahvičky. Nepoužívejte lahvičky s konjugátem, standardním IFN- γ nebo lahvičky s peletami QFM LyoSphere, pokud vykazují známky poškození nebo pokud došlo k porušení pryžového těsnění. Nemanipulujte s poškozenými lahvičkami. S použitím náležitých bezpečnostních opatření lahvičky bezpečně zlikvidujte. Doporučení: K otevření lahviček s konjugátem, standardním IFN- γ nebo lahviček s peletami QFM LyoSphere použijte odstraňovač kovových víček, aby bylo riziko zranění kovovým ochranným víčkem co nejmenší.
- Nepoužívejte soupravu ELISA, pokud jakákoliv láhev s činidlem vykazuje před použitím známky poškození nebo netěsnosti.
- Nepoužívejte společně stripy mikrodestiček, standardní IFN- γ , zelený ředící roztok nebo konjugát 100 \times koncentrát z různých šarží souprav QFM ELISA. Ostatní činidla (promývací pufr 20 \times koncentrát, roztok enzymového substrátu a zastavovací roztok enzymů) mohou být používána z různých šarží souprav za předpokladu, že u činidel nevypršela doba použitelnosti a že jsou zaznamenány informace o dané šarži.
- Zlikvidujte nepoužitá činidla a biologické vzorky v souladu s místními a národními bezpečnostními předpisy a předpisy o ochraně životního prostředí.
- Nepoužívejte zkumavky na odběr krve QFM, pelety QFM LyoSpheres ani QFM ELISA po vypršení doby použitelnosti.
- Ujistěte se, že laboratorní vybavení bylo kalibrováno/validováno pro použití.

Odběr vzorku a manipulace

Test QFM se může provádět pouze s použitím plné krve odebrané do zkumavky na odběr krve s obsahem heparinu lithného nebo přímo do zkumavky QFM na odběr krve; na jeden test je zapotřebí 1 ml plné krve. Zkumavky na odběr krve musí být patřičně označeny a musí obsahovat čas odběru krve.

Důležité: Stimulace vzorků krve QFM (tj. přidání pelet QFM LyoSphere k 1 ml alikvotního podílu krve) a jejich následná inkubace při teplotě 37 °C musí proběhnout do 8 hodin od odběru krve.

Před inkubací uchovávejte vzorky krve při pokojové teplotě (22 ± 5 °C).

Pro získání optimálních výsledků dodržujte následující postupy:

1. Označte zkumavky příslušným způsobem.

Ujistěte se, že je každá zkumavka na odběr krve QFM náležitě označena údaji pacienta a časem odběru krve.

2. Od každého pacienta odeberte 1 ml krve ze žíly přímo do každé ze zkumavek na odběr krve QFM. Tento postup musí provádět pracovník vyškolený ve flebotomii.

Důležitá poznámka: Zkumavky by v době plnění krví měly mít teplotu od 17 do 25 °C.

Zkumavky na odběr krve QFM je možné použít až do nadmořské výšky 810 metrů nad mořem.

Vzhledem k tomu, že krev do zkumavek o objemu 1 ml vtéká relativně pomalu, udržujte zkumavku na jehle po dobu 2–3 sekund, dokud není zkumavka zjevně naplněna. Tím se zajistí odběr správného objemu krve.

Černá značka na boční straně zkumavek na odběr krve QFM označuje objem plnění 1 ml. Zkumavky na odběr krve QFM jsou vyrobeny k odběru 1 ml ± 10 % a k optimální funkci v tomto rozmezí. Jestliže je hladina krve mimo rozsah značky, je nutné odebrat nový vzorek krve.

Jestliže se k odběru krve používá motýlková jehla, je nutné před použitím zkumavek na odběr krve QFM použít „odvzdušňovací“ zkumavku k zajištění, že je hadička naplněna krví.

Jestliže používáte zkumavky na odběr krve QFM v nadmořské výšce vyšší než 810 metrů nad mořem nebo pokud je odebrán malý objem krve, odeberte krev pomocí stříkačky a ihned přeneste 1 ml krve do zkumavky na odběr krve QFM. Z bezpečnostních důvodů je nejvhodnější odstranit jehlu ze stříkačky, zajistit náležité bezpečnostní postupy, odstranit víčko ze zkumavky QFM a přidat do ní 1 ml krve (po střed černé značky na boční straně štítku zkumavky). Na zkumavku opět nasadte pevně víčko a promíchejte dle níže uvedeného popisu.

Pokud používáte škrtidlo, uvolněte jej co nejdříve po zavedení jehly do žíly, aby nedocházelo k odchylkám v tlaku, které by mohly ovlivnit objem odebrané krve.

Krev může být také odebrána do běžné odběrové zkumavky obsahující heparin lithný jako antikoagulant a poté přenesena do zkumavek QFM. Jako antikoagulant používejte pouze heparin lithný, protože ostatní antikoagulanty mohou narušovat průběh testu. Naplňte zkumavku na odběr krve (minimální objem 3 ml) a jemně promíchejte tak, že zkumavku několikrát převrátíte dnem vzhůru, aby došlo k rozpuštění heparinu. Před přenosem do zkumavek na odběr krve QFM pro stimulaci pomocí pelet QFM LyoSphere uchovávejte krev při pokojové teplotě ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$). Ujistěte se, že je krev důkladně promíchána jemným obrácením zkumavky těsně před dávkováním krve. Přidejte 1 ml alikvotního podílu krve do zkumavky na odběr krve QFM. Proveďte tento postup asepticky a při odstranění víčka ze zkumavky na odběr krve QFM a přidání 1 ml krve (střed po černé značce na boční straně štítku zkumavky) zajistěte náležitě bezpečnostní postupy. Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle níže uvedeného popisu.

3. Ihned po naplnění zkumavky několikrát jemně převratte, aby došlo k rozpuštění heparinu.

Důležité: Příliš silné třepání může narušit gel a mohlo by vést k neplatným výsledkům.

4. Těsně před použitím ponechte vyrovnat teplotu pelet QFM LyoSpheres na pokojovou teplotu ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).

5. Aseptickým způsobem přidejte jednu peletu QFM LyoSphere k 1 ml krve.

Otevřete víčko zkumavky na odběr krve.

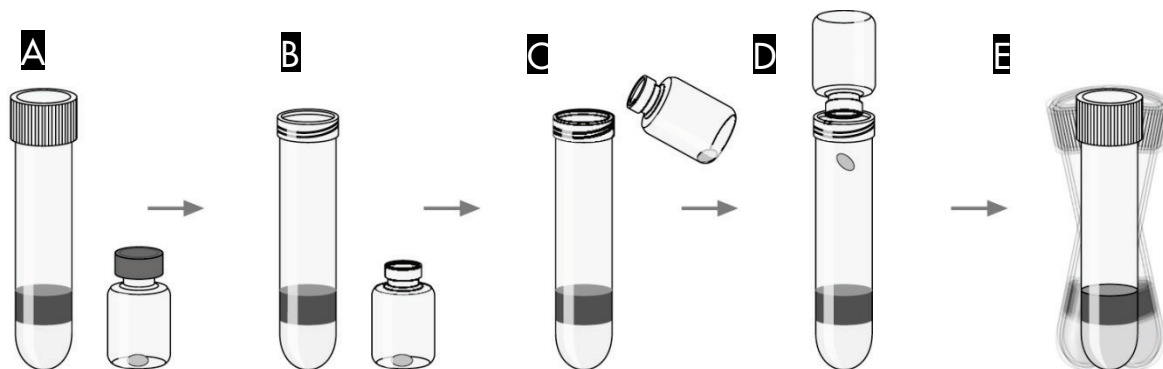
Lehce poklepejte lahvičkou QFM LyoSphere o tvrdý povrch, aby se peleta QFM LyoSphere dostala na dno lahvičky. Otevřete lahvičku QFM LyoSphere tak, že nejprve odstraníte kovové víčko a poté pryžovou zátku.

Opatrně přeneste peletu QFM LyoSphere do 1 ml vzorku krve tak, že vyrovnáte okraj skleněné lahvičky se zkumavkou na odběr krve QFM a lahvičku opatrně obrátíte, aby se peleta QFM LyoSphere dostala do zkumavky na odběr krve QFM (viz obrázek 1).

Důležité: Jestliže dojde k vypadnutí pelety QFM LyoSphere mimo zkumavku na odběr krve QFM, zlikvidujte ji a otevřete další lahvičku s peletou QFM LyoSphere.

Důležité: Nenechávejte lahvičku s peletou QFM LyoSphere delší dobu otevřenou. Peletu QFM LyoSphere je nutné přidat ke krvi ihned po otevření lahvičky.

Pokud se pelety QFM LyoSpheres přidávají ke krvi, která byla odebrána do zkumavky na odběr krve QFM, zajistěte, aby byla víčka vrácena na správné vzorky.



Obrázek 1. Přidávání pelety QFM LyoSphere. **A** Zkumavka na odběr krve QFM a lahvička s peletou QFM LyoSphere. **B** Odstraňte víčko ze zkumavky na odběr krve QFM a z lahvičky s peletou QFM LyoSphere odstraňte kovové víčko a pryžovou zátku. **C** Ihned přidejte peletu QFM LyoSphere ke krvi tak, že vyrovnáte okraj skleněné lahvičky s okrajem odběrové zkumavky. **D** Poté lahvičku opatrně převraťte tak, aby se peleta LyoSphere dostala do odběrové zkumavky. **E** Uzavřete zkumavku na odběr krve QFM a 5–10krát protřepteje.

6. Uzavřete zkumavku na odběr krve QFM a 5–10krát ji protřepte, dostatečně silně na to, aby se peleta QFM LyoSphere úplně rozpustila.

Jestliže se peleta QFM LyoSphere přilepí k vnitřnímu povrchu zkumavky, může být rozpuštěna pokrytím pelety LyoSphere krví při otáčení zkumavky.

Ujistěte se, že zkumavku po přidání pelety QFM LyoSphere uzavřete, aby se zabránilo náhodnému přidání druhé pelety LyoSphere do stejné zkumavky.

Poznámka: Vzhledem k tomu, že je peleta QFM LyoSphere bílá, nebude již po rozpuštění v krvi viditelná.

Důležité: Příliš silné třepání může narušit gel a mohlo by vést k neplatným výsledkům.

7. Po přidání a rozpuštění pelety QFM LyoSphere musí být zkumavky na odběr krve QFM co nejdříve přeneseny do inkubátoru při teplotě 37 ± 1 °C (do 8 hodin od odběru).

Návod k použití

Fáze 1 – inkubace krve a sběr plazmy

Dodávané materiály

- Zkumavky na odběr krve QFM (viz „Komponenty a skladování“, strana 6)

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

- Viz „Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky“, strana 8

Postup

- 1. Inkubujte zkumavky na odběr krve QFM obsahující 1 ml alikvotního podílu krve s peletou QFM LyoSphere ve SVISLÉ poloze při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 16 až 24 hodin.**

Poznámka: Inkubátor nevyžaduje CO₂ ani zvlhčování.

Po inkubaci mohou být zkumavky QFM na odběr krve před odstředěním uchovány při teplotě 4–27 °C po dobu až 3 dnů.

- 2. Po inkubaci se odebrání plazmy usnadní odstředěním zkumavek na odběr krve QFM po dobu 15 minut při 2000 až 3000 × g (RCF). Gelová zátka oddělí buňky od plazmy. Pokud k tomu nedojde, proveďte opětovné odstředění zkumavek.**

Plazmu je možné sbírat bez odstředění, avšak je nutné věnovat větší péči při odstraňování plazmy, aby nedošlo k rozvíření buněk.

- 3. Vzorky plazmy je možné odebírat pouze pomocí pipety.**

Důležité: Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

Vzorky plazmy je možné naplnit přímo z odstředěných zkumavek na odběr krve QFM do destičky QFM ELISA, včetně případů, kdy jsou použity automatizované pracovní stanice ELISA.

Vzorky plazmy je možné uchovat až po dobu 28 dní při teplotě 2 až 8 °C nebo, pokud je sebrána, při teplotě nižší než –20 °C po delší dobu. Alikvotní podíly vzorků odebrané plazmy musí být před uchováním uzavřeny.

Pokud provádíte odběr vzorků plazmy, odeberte alespoň 150 µl plazmy, aby bylo možné v případě potřeby test zopakovat.

Množství IFN- γ ve vzorcích plazmy může často být vyšší než horní limity většiny čteček ELISA, i když je u vyšetřovaných osob použita pouze mírná imunosuprese. Doporučuje se, aby vzorky plazmy byly zředěny v poměru 1:10, případně 1:100 v zeleném ředícím roztoku (Green Diluent) a otestovány pomocí testu ELISA spolu s neředěnou plazmou (viz Fáze 2 – IFN- γ ELISA).

Fáze 2 – IFN- γ ELISA

Dodávané materiály

- QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA (Souprava QuantiFERON Monitor ELISA se 2 destičkami) (viz „Komponenty a skladování“, strana 6)

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

- Viz „Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky“, strana 8

Příprava

IFN- γ v plazmě může často být vyšší než horní limity většiny čteček ELISA, i když je u vyšetřovaných osob použita pouze mírná imunosuprese. Doporučuje se: zředit vzorky plazmy v poměru 1:10, případně 1:100 v zeleném ředícím roztoku (Green Diluent) a otestovat pomocí testu ELISA spolu s neřaděnou plazmou.

V situacích, kdy může být u pacienta použita silná imunosuprese, může být příprava a testování pouze nezředěného vzorku plazmy dostačující pro získání kvantitativního výsledku.

Poznámka: Pro interpretaci výsledků by měly být použity výsledky vzorků, které jsou v rámci rozsahu testu QFM ELISA (tj. do 10 IU/ml). Pokud je výsledek vzorku nezředěné plazmy vyšší než rozsah testu QFM ELISA, mělo by se použít jako hlášený výsledek (bere v úvahu koeficient ředění) nejnížší ředění, které generuje výsledek v rámci rozsahu testu QFM ELISA.

Postup

- 1. Všechny vzorky plazmy a činidla, kromě konjugátu 100× koncentrátu, musí být před použitím ohřáty na pokojovou teplotu (22 ± 5 °C). Ponechte teplotu vyrovnat alespoň 60 minut.**
- 2. Z rámečku mikrodestičky vyjměte stripy, které nejsou vyžadovány, opět zalepte fólií, a vraťte do chladničky do doby, kdy je budete potřebovat.**

Ponechte alespoň jeden strip pro standardy QFM a dostatečné množství stripů pro počet pacientů, které chcete testovat. Po použití rámeček uchovejte a uzavřete pro použití se zbývajícími stripy.

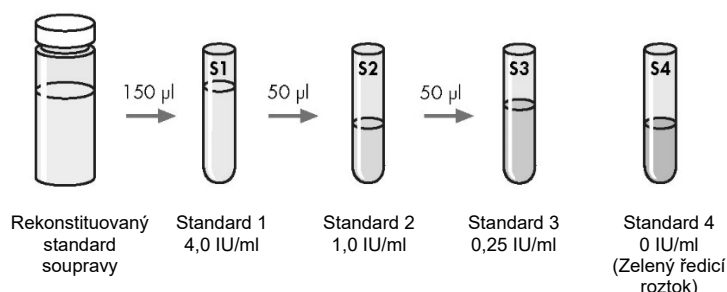
- 3. Rekonstituujte lyofilizovaný IFN- γ Standard pomocí objemu deionizované nebo destilované vody uvedeného na štítku lahvičky standardu. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění. Rekonstitucí standardu na uvedený objem se získá roztok o koncentraci 8,0 IU/ml.**

Důležité: Rekonstituční objem standardu IFN- γ se mezi jednotlivými dávkami liší. Pro zajištění správného objemu deionizované nebo destilované vody se podívejte na štítek lahvičky standardu.

Použijte rekonstituovaný standard soupravy k vytvoření série ředění 1 ku 2 a následně ředění 1 ku 4 IFN- γ se zeleným ředicím roztokem (GD) (viz obrázek 2). S1 (Standard 1) obsahuje 4,0 IU/ml, S2 (Standard 2) obsahuje 1,0 IU/ml, S3 (Standard 3) obsahuje 0,25 IU/ml, a S4 (Standard 4) obsahuje 0 IU/ml (samotný zelený ředicí roztok – GD). Standardy musí být otestovány v duplikátu. Připravte čerstvá ředění standardu soupravy pro každou relaci testu ELISA.

Doporučený postup pro duplikát standardů

- a. Označte 4 zkumavky „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- b. Přidejte 150 μ l GD do zkumavek S1, S2, S3, a S4.
- c. Přidejte 150 μ l standardu soupravy do zkumavky S1 a důkladně promíchejte.
- d. Přeneste 50 μ l ze zkumavky S1 do zkumavky S2 a důkladně promíchejte.
- e. Přeneste 50 μ l ze zkumavky S2 do zkumavky S3 a důkladně promíchejte.
- f. Zelený ředicí roztok (GD) samotný slouží jako nulový standard (S4).



Obrázek 2. Příprava standardní křivky.

4. Rekonstruuje lyofylizovaný konjugát 100× koncentrát pomocí 0,3 ml deionizované nebo destilované vody. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění konjugátu.

Pracovní konjugát se připravuje zředěním požadovaného množství rekonstituovaného konjugátu 100× koncentrátu v zeleném ředicím roztoku dle hodnot v tabulce 1 – Příprava konjugátu). Ihned po použití vraťte případný nespoteřovaný konjugát 100× koncentrát do skladovací teploty 2 až 8 °C. Použijte pouze zelený ředicí roztok.

Tabulka 1. Příprava konjugátu

Počet stripů	Objem konjugátu 100× koncentrátu	Objem zeleného ředicího roztoku
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. Vzorky plazmy získané ze zkumavek na odběr krve, které byly následně uloženy nebo zmrazeny, před přidáním do jamky testu ELISA dobře promíchejte.

Důležité: Jestliže mají být vzorky plazmy přidány přímo z odstředěných zkumavek QFM, plazmu nepromíchejte. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

6. Doporučuje se: Zředit vzorky v poměru 1:10.

- Přidejte 90 µl zeleného ředicího roztoku (GD) do zkumavky označené údaji pacienta a „1:10“.
- Poté přidejte 10 µl vzorků promíchané plazmy (podrobnosti o promíchaných vzorcích plazmy oproti vzorkům přidaným přímo odstředěných zkumavek QFM viz krok 5).
- Důkladně promíchejte pipetou a minimalizujte napěnění.

7. Doporučuje se: Zředit vzorky plazmy v poměru 1:100.

- Připravte ředění v poměru 1:10 (viz krok 6 výše).
- Přidejte 90 µl zeleného ředicího roztoku do zkumavky označené údaji pacienta a „1:100“.
- Přidejte 10 µl z ředění 1:10.
- Důkladně promíchejte pipetou a minimalizujte napěnění.

Doporučuje se: Otestovat následující vzorky paralelně a v tomto pořadí:

- Nežředěné, 1:10, 1:100

Analyzační software QFM také podporuje následující možnosti pro vzorky od pacientů:

- Neřředěné
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Neřředěné, 1:10

- 8. Přidejte 50 µl čerstvě připraveného pracovního konjugátu do požadovaných jamek ELISA pomocí vícekanálové pipety.**
- 9. Přidejte 50 µl vzorku plazmy pro testování do příslušných jamek pomocí vícekanálové pipety. Poté přidejte 50 µl každého ze standardů 1 až 4. Standardy otestujte v duplikátech.**
- 10. Zakryjte každou destičku víčkem a promíchejte důkladně konjugát a vzorky plazmy/standards pomocí třepačky mikrodestiček po dobu 1 minuty. Zabraňte stříkání.**
- 11. Proveďte inkubaci při pokojové teplotě (22 ± 5 °C) po dobu 120 ± 5 minut.**

Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.

- 12. Během inkubace zřeďte 1 část promývacího pufru 20× koncentrátu s 19 díly deionizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte. Je k dispozici dostatek promývacího pufru 20× koncentrátu k přípravě 2 litrů pracovního promývacího pufru.**

Promývejte jamky 400 µl pracovního promývacího pufru alespoň 6 cyklů pomocí promývacího roztoku na mikrotitrační destičky. Doporučuje se použít automatizovanou promývačku destiček.

Důkladné promytí je velmi důležité pro výkon testu. Ujistěte se, že je každá jamka při každém promývacím cyklu **úplně naplněna** promývacím pufrem. Doporučuje se: Pro dosažení nejlepších výsledků jamky mezi každým cyklem namočte alespoň na 5 sekund.

Do odpadního zásobníku přidejte standardní laboratorní dezinfekční prostředek a dodržujte zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.

- 13. Poklepejte destičkami čelem dolů na absorpční utěrku nepouštějící vlas, abyste odstranili zbytky pufru. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku enzymového substrátu, zakryjte každou destičku víčkem a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrodestiček.**

14. Proved'te inkubaci při pokojové teplotě (22 ± 5 °C) po dobu 30 minut.

Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.

15. Po inkubaci do každé jamky přidejte 50 μ l roztoku zastavovacího roztoku enzymů a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrodestiček.

Zastavovací roztok enzymů by měl být přidán do jamek ve stejném pořadí a přibližně stejnou rychlostí jako roztok enzymového substrátu v kroku 13.

16. Změřte optickou hustotu (OD) během 5 minut od zastavení reakce pomocí čtečky mikrodestiček s filtrem 450 nm a také s referenčním filtrem 620 až 650 nm. Hodnoty OD budou použity k výpočtu výsledků.

Výpočty a interpretace testu

Pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků se používá analyzační software QuantiFERON Monitor. Je k dispozici na stránkách www.QuantiFERON.com. Ujistěte se prosím, že používáte nejnovější verzi softwaru pro analýzu QuantiFERON Monitor.

Software provádí vyhodnocení kontroly kvality testu, vytváří standardní křivku a poskytuje výsledky testu pro každého pacienta, jak je uvedeno v části Interpretace výsledků.

Jestliže je výsledek nezředěné plazmy vyšší než horní mez (tj. > 10 IU/ml) QFM ELISA, uvede software pro analýzu QuantiFERON Monitor nejnižší ředění, které generuje výsledek v rámci rozsahu testu QFM ELISA, přičemž bere v úvahu koeficient ředění.

Jako alternativa k použití analyzačního softwaru QuantiFERON Monitor je možné výsledky stanovit dle následující metody.

Vytvoření standardní křivky

(Pokud není použit software pro analýzu QuantiFERON Monitor)

Určete střední hodnoty OD replikátů standardů soupravy na každé destičce.

Vytvořte standardní křivku $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ pomocí grafického znázornění $\log_{(e)}$ střední hodnoty OD (osy y) oproti koncentraci $\log_{(e)}$ IFN- γ standardů v IU/ml (osa x), s vynecháním nulového standardu z těchto výpočtů. Vypočtete čáru nejlepšího výsledku pro standardní křivku pomocí regresní analýzy.

Použijte standardní křivku ke stanovení koncentrace IFN- γ (IU/ml) pro každý testovaný vzorek plazmy s použitím hodnoty OD pro každý vzorek.

Tyto výpočty je možné provádět pomocí softwarových balíčků, které jsou k dispozici se čtečkami mikrodestiček a standardního tabulkového procesoru nebo statistického softwaru (například Microsoft® Excel®). Doporučuje se, aby byly tyto balíčky použity k výpočtu regresní analýzy, variačního koeficientu (%CV) pro standardy a korelačního koeficientu (r) standardní křivky.

Uvedený výsledek musí být vzat z nejnižšího ředění, které generuje výsledek v rámci rozsahu testu QFM ELISA (bere v úvahu koeficient ředění) pokud je výsledek nezředěné plazmy vyšší než horní mez testu QFM ELISA.

Kontrola kvality testu

Přesnost výsledků testu závisí na vytvoření přesné standardní křivky. Proto musí být výsledky odvozené od standardů před interpretací výsledky testů vzorků prošetřeny.

Aby byl test ELISA platný:

- Střední hodnota OD pro standard 1 musí být $\geq 0,600$.
- %CV pro OD hodnoty replikátu standardu 1 a standardu 2 musí být $\leq 15\%$.
- OD hodnoty replikátu pro standardy 3 a 4 se nesmí lišit o více než 0,040 jednotek optické hustoty od jejich střední hodnoty.
- Korelační koeficient (r) vypočtený ze středních hodnot absorbance těchto standardů musí být $\geq 0,98$.

Software pro analýzu QuantiFERON Monitor vypočítá tyto parametry kontroly kvality a vytvoří zprávu.

Pokud výše uvedená kritéria nejsou splněna, bude cyklus testu neplatný a musí být zopakován.

Střední hodnota OD pro nulový standard (zelený ředící roztok) musí být $\leq 0,150$. Jestliže je střední hodnota OD $> 0,150$, je nutné prověřit postup promývání destiček.

Interpretace výsledků

Výsledky QFM jsou interpretovány v závislosti na odpovědi IFN- γ na stimulanty vrozené a adaptivní imunity. Test QFM poskytuje kvalitativní i kvantitativní měření imunitní funkce. Výsledky QFM nemusí přímo kvantifikovat úroveň potlačení funkce imunitního systému.

Důležité: Při určování stavu imunitního systému pacienta musí být změřená hladina IFN- γ použita ve spojení s klinickou prezentací, lékařskou anamnézou a dalšími diagnostickými hodnoceními (tabulka 2). Prahová hodnota testu QFM se může lišit podle úrovně imunoprese pacienta a individuálních podmínek transplantace.

Tabulka 2. Interpretace výsledků

Výsledek IFN- γ (IU/ml) testu QFM	Klasifikace	Interpretace
< 15	Nízká	Pacient má nízkou odpověď IFN- γ na stimulanty vrozené a adaptivní imunity
15–1000	Střední	Pacient má střední odpověď IFN- γ na stimulanty vrozené a adaptivní imunity
> 1000	Vysoká	Pacient má vysokou odpověď IFN- γ na stimulanty vrozené a adaptivní imunity

Jestliže je změřená hladina IFN- γ v nezřaděných vzorcích plazmy nižší než 0,1 IU/ml:

- Ujistěte se, že byla peleta QFM LyoSphere přidána do vzorku krve a že zkumavka byla inkubována dle pokynů v tomto příbalovém letáku.
- Ujistěte se, že výsledek IFN- γ odpovídá aktuálnímu klinickému stavu pacienta.

Pokud existuje podezření, že došlo k technickým problémům při odběru nebo manipulaci se vzorky krve, zopakujte celý test QFM s novým vzorkem krve. Zopakujte testování ELISA stimulovaných vzorků plazmy, pokud existuje podezření, že se postup původního testu lišil od postupu popsaného v tomto příbalovém letáku (podrobnosti viz část Kontrola kvality testu).

Lékař si může přát zopakovat test také v případě, že výsledky nejsou v souladu s aktuálním klinickým stavem pacienta.

Omezení

Výsledky testů QFM musí být použity společně s klinickou anamnézou každého jedince, současným zdravotním stavem a dalšími diagnostickými hodnoceními. Laboratoře mohou stanovit své vlastní rozsahy testu.

Laboratoře mohou také paralelně se vzorky pacienta otestovat externí kontrolní vzorek odebraný od zdravého subjektu.

Nespolehlivé nebo nepřesné výsledky se mohou objevit v důsledku:

- Nesprávného antikoagulačního prostředku – používejte pouze heparin lithný, protože jiné antikoagulanty budou narušovat průběh testu.
- Odchytky od postupu popsaného v tomto příbalovém letáku.

- Nadměrné hladiny IFN- γ v krevním oběhu nebo přítomnost heterofilních protilátek.
- Uplynutí delší doby od odběru vzorku krve do inkubace při 37 °C než 8 hodin.
- Nedostatečné naplnění nebo přeplnění zkumavek na krev QFM mimo rozmezí 0,9 až 1,1 ml.

Charakteristiky funkčních vlastností

Klinické studie

Byly provedeny dvě klinické studie vyhodnocení odpovědí zjevně zdravých jedinců (n = 114) oproti pacientům po transplantaci (n=30). Z pacientů po transplantaci bylo 18 v kohortě brzy po transplantaci (včasné post-tx, do 3 měsíců po transplantaci) a 12 bylo v kohortě po delší době po transplantaci nebo stabilní fázi (pozdní post-tx, > 12 měsíců po transplantaci).

- Vzorky od každého jednotlivce v kohortě včasné post-tx byly odebrány až v 5 časových bodech (3 měsíce po transplantaci, n = 64 vzorků).
- Vzorky od každého jednotlivce v kohortě pozdní post-tx byly odebrány 1krát (kohorta pozdní posttransplantace, n = 12 vzorků).
- Vzorky od každého jednotlivce v kohortě zjevně zdravých osob byly odebrány 1krát (n = 114).

Odpovědi na QFM byly v rozsahu od nízké po střední u vzorků včasné post-tx a pozdní post-tx. Kohorta včasné post-tx měla vyšší procento (93,8 %) odpovědí v nízkém rozsahu a nižší procento odpovědí (6,3 %) ve středním rozsahu v porovnání s odpověďmi u vzorků z kohorty pozdní post-tx, s 25 % odpovědí v nízkém rozsahu a 66,7 % ve středním rozsahu (tabulka 3). Žádné odpovědi u vzorků z kohorty včasné post-tx nebyly v rozsahu vysoké odpovědi, zatímco pouze 1 (8,3 %) odpověď u vzorků z kohorty pozdní post-tx byla v rozsahu vysoké odpovědi. Odpovědi QFM v kohortě zjevně zdravých osob byly převážně ve středním rozsahu (83,3 %) a vysokém rozsahu (15,8 %) (tabulka 3).

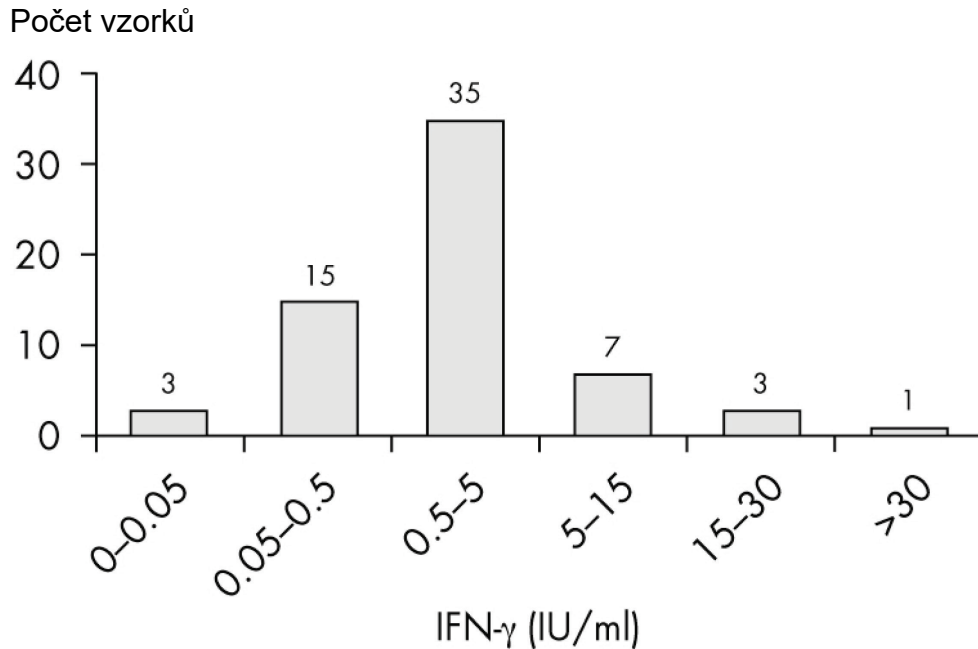
Tabulka 3. Rozsah odpovědí QFM u zjevně zdravých subjektů vs. u pacientů po transplantaci

IFN- γ (IU/ml)	Kategorie výsledků	Včasné post-tx %* 95% CI n	Pozdní post-tx %* 95% CI n	Zjevně zdravé subjekty % * 95% CI n	Celkové výsledky
< 15	Nízká	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	Střední	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	Vysoká	0,0% 0-5,7 n = 0	8,3% 1,5-35,4 n = 1	15,8% 10,2-23,6 n = 18	19
Celkový počet vzorků		64	12	114	190

* Procenta označují podíl vzorků v každé kohortě dárců, jejichž výsledky spadají do určitého rozsahu odpovědi.

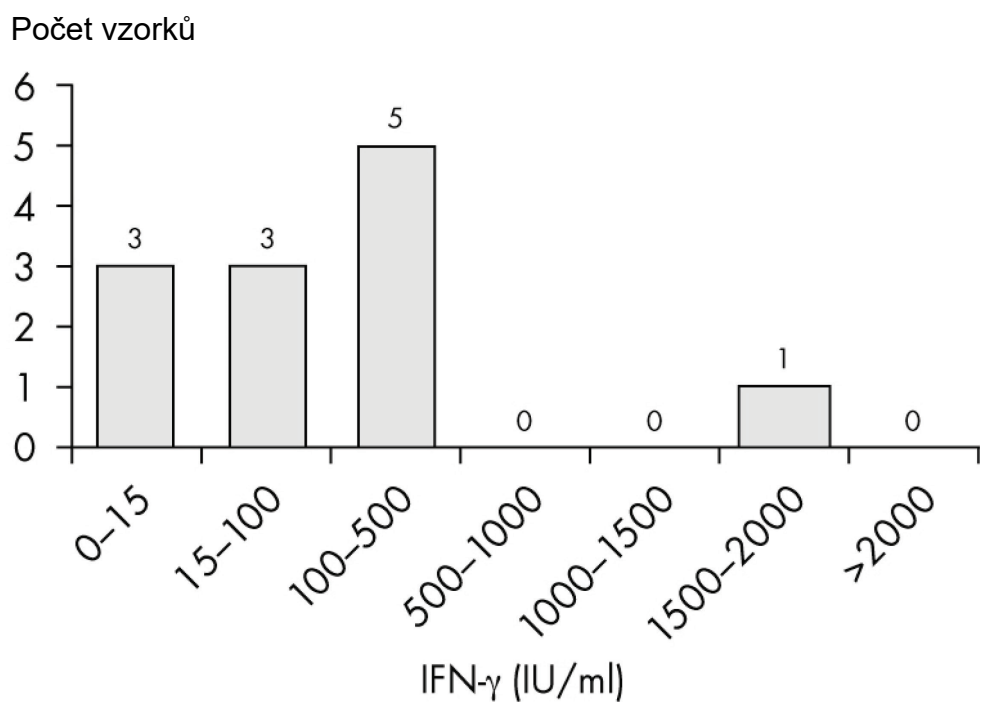
Očekávané hodnoty

Distribuce odpovědí IFN- γ na test QFM u pacientů brzy po transplantaci (až 3 měsíce po transplantaci) byla stanovena z 64 vzorků odebraných od 18 pacientů po transplantaci s použitím testu QFM ELISA (obrázek 3).



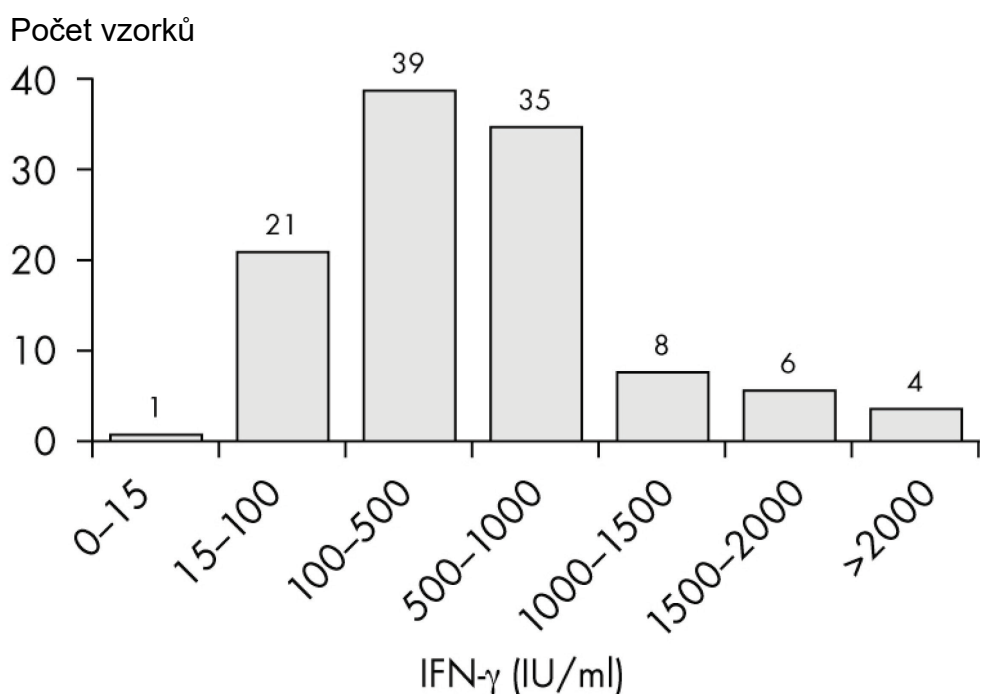
Obrázek 3. Distribuce odpovědí QFM IFN- γ u pacientů brzy po transplantaci (n = 64; medián = 1,5 IU/ml).

Distribuce odpovědí IFN- γ na test QFM u pacientů delší dobu po transplantaci (> 12 měsíců po transplantaci) byla stanovena z 12 vzorků s použitím testu QFM ELISA (obrázek 4).



Obrázek 4. Distribuce odpovědí QFM IFN- γ u pacientů delší dobu po transplantaci (n = 12; medián = 98,8 IU/ml).

Distribuce odpovědí IFN- γ na test QuantiFERON Monitor u zjevně zdravých subjektů byla stanovena ze 114 vzorků s použitím testu QFM ELISA (obrázek 5).



Obrázek 5. Distribuce odpovědí QFM IFN- γ u zjevně zdravých subjektů (n = 114; medián = 400,5 IU/ml).

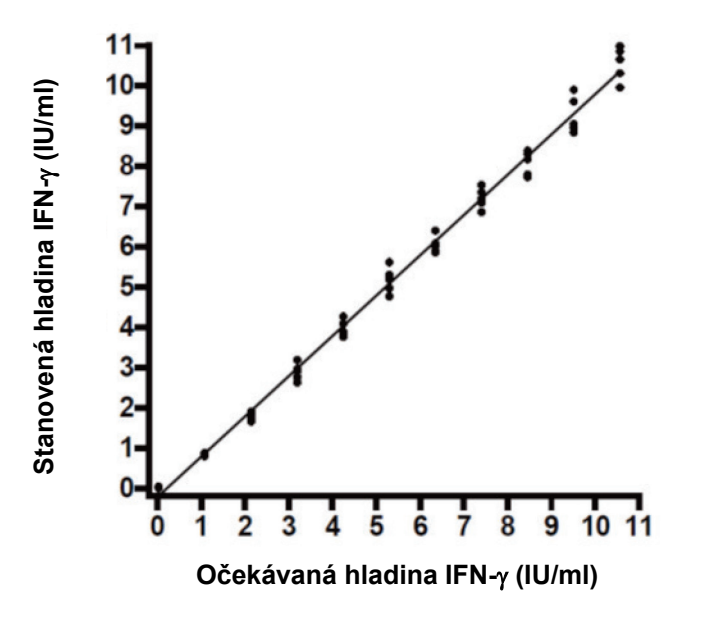
Odpovědi QFM u pacientů po transplantaci solidního orgánu

Test QFM byl vyhodnocen v observační prevalenční (cross-sectional) studii pacientů po transplantaci solidních orgánů (4). Studie zahrnovala: 212 zdravých subjektů s podskupinou 30 kontrolních subjektů podle věku a pohlaví, 30 pacientů před transplantací, 18 pacientů brzy po transplantaci (66 vzorků; medián doby po transplantaci = 21 dní), a 11 pacientů delší dobu po transplantaci (medián doby po transplantaci = 2290 dní). Průměrná produkce IFN- γ činila 555,2 IU/ml u zdravých kontrolních subjektů a 614,6 IU/ml u kontrolních subjektů uspořádaných dle věku a pohlaví. Ukázalo se, že průměrná produkce IFN- γ byla významně nižší u pacientů před transplantací (IFN- γ = 89,3 IU/ml) a pacientů brzy po transplantaci (IFN- γ = 3,76 IU/ml) v porovnání s kontrolními osobami uspořádanými dle věku a pohlaví ($p < 0,001$). Významně větší obnovení imunitní funkce bylo pozorováno a prokázáno u pacientů delší dobu po transplantaci (průměrná hodnota IFN- γ = 256,1 IU/ml) než u pacientů brzy po transplantaci ($p < 0,065$). Tato studie ukazuje, že se test QFM může použít k posouzení buněčné funkce imunitního systému v populaci pacientů po transplantaci solidních orgánů, kterým jsou podávána imunosupresiva.

Funkční vlastnosti

Linearita testu QFM ELISA se prokázala náhodným umístěním 5 replikátů 11 směsí plazmy se známými koncentracemi IFN- γ na destičku ELISA. Křivka lineární regrese měla sklon $1,002 \pm 0,011$ a korelační koeficient 0,99 (obrázek 6).

Detekční mez testu QFM ELISA činila 0,065 IU/ml a nebyl prokázán žádný důkaz efektu „high-dose hook“ (prozóna) u koncentrací IFN- γ do 10 000 IU/ml.



Obrázek 6. Profil linearity testu QFM ELISA určený z testování 5 replikátů 11 vzorků plazmy o známých koncentracích IFN- γ .

Reprodukovatelnost testu QFM (fáze 1) byla stanovena s použitím vzorků krve od 20 zdravých subjektů. Bylo provedeno vyhodnocení tří různých pracovníků obsluhy, šarží pelet QFM LyoSphere a souprav vybavení. Průměrný variační koeficient hladin odpovědí IFN- γ stanovených pomocí testu QFM ELISA u všech tří šarží pelet QFM LyoSpheres a při všech třech testovaných podmínkách činil 22,22 % (95% CI: 17,20–27,25).

Opakovatelnost testu QFM (fáze 1) byla vyhodnocena měřením variability 5–6 opakování stimulace krve peletami QFM LyoSphere v rámci stejného dárce u všech 14 subjektů. Průměrný variační koeficient u 14 testovaných subjektů činil 14,7 % (95% CI: 10,2–19,2). %CV u jednotlivých subjektů byl nižší než 30 %.

Reprodukovatelnost testu QFM ELISA (fáze 2) byla stanovena testováním 20 vzorků plazmy s různými koncentracemi IFN- γ ve 3 replikátech, 3 laboratořích, ve 3 dnech, které po sobě nenásledovaly, a s 3 různými obsluhami. Každý vzorek byl tedy testován 27krát, v 9 nezávislých testovacích cyklech. Jedním ze vzorků byla kontrola Nil, u níž byla vypočtena koncentrace IFN- γ 0,08 IU/ml (95% CI: 0,07–0,09). U zbývajících 19 vzorků plazmy byly

koncentrace v rozsahu okolo 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) až 7,7 IU/ml (95% CI: 7,48–7,92).

Nepřesnost během jednoho cyklu testu nebo mezi jednotlivými testy byla stanovena dle průměru hodnot %CV pro každý test plazmy obsahující IFN- γ z každého cyklu testu destičky (n = 9) a v rozsahu od 4,1 do 9,1 %CV. Průměrná hodnota %CV v rámci cyklu testu (\pm 95% CI) činila $6,6 \pm 0,6$ %. Průměrná nulová hodnota IFN- γ plazmy činila 14,1 %CV.

Celková nepřesnost nebo nepřesnost mezi testy byla stanovena porovnáním 27 vypočítaných koncentrací IFN- γ pro každý vzorek plazmy. Nepřesnost mezi testy byla v rozsahu od 6,6 do 12,3 %CV. Celková průměrná hodnota %CV (\pm 95% CI) činila $8,7 \pm 0,7$ %. Hodnota plazmy s nulovou hodnotou IFN- γ činila 26,1 %CV. Tato úroveň odchylky se dala očekávat, protože vypočítaná koncentrace IFN- γ je nízká a odchylka v okolí nízkého odhadu koncentrace bude větší než při vyšších koncentracích.

Technické údaje

Sražení vzorků plazmy

Pokud se při dlouhodobém skladování plazmy objeví ve vzorcích sraženiny fibrinu, odstředte vzorky, aby se sražený materiál usadil a napipetování bylo snadnější.

Návod na řešení problémů

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Více informací naleznete také v Technických údajích uvedených na stránkách: www.QuantiFERON.com. Kontaktní údaje naleznete na zadní straně.

Řešení problémů s testem ELISA

Nespecifické zbarvení

Možná příčina	Řešení
a) Nedokonalé promytí destičky	Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund.
b) Křížová kontaminace jamek ELISA	Při pipetování a mísení vzorku buďte opatrní, aby se minimalizovalo riziko kontaminace.
c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent	Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100x koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce.
d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu	Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla.
e) Mísení plazmy ve zkumavkách QFM před odběrem	Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

Nízké hodnoty optické hustoty pro standardy

Možná příčina	Řešení
a) Chyba ředění standardu	Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle pokynů v tomto příbalovém letáku.
b) Chyba pipetování	Ujistěte se, že je zařízení kalibrováno a používáno dle pokynů výrobce.
c) Příliš nízká teplota inkubace	Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (17 až 27 °C).

Řešení problémů s testem ELISA

- | | |
|---|--|
| d) Příliš krátká doba inkubace | Inkubujte destičky s konjugátem, standardy a vzorky po dobu 120 ± 5 minut. Roztok enzymového substrátu inkubujte na destičce po dobu 30 minut. |
| e) Nesprávný filtr čtečky destiček | Hodnoty destičky musí být načteny s filtrem o vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem od 620 do 650 nm. |
| f) Příliš chladná činidla | Všechna činidla, s výjimkou konjugátu 100× koncentrátu, musí být před zahájením testu temperována na pokojovou teplotu. To může trvat přibližně jednu hodinu. |
| g) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100× koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce. |

Výrazné pozadí

- | Možná příčina | Řešení |
|---|---|
| a) Nedokonalé promytí destičky | Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 μ l promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Příliš vysoká teplota inkubace | Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (17 až 27 °C). |
| c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100× koncentrát použit do tří měsíců od data rekonstituce. |
| d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu | Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla. |

Řešení problémů s testem ELISA

Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátu

Možná příčina	Řešení
a) Nedokonalé promytí destičky	Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufu na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund.
b) Chyba ředění standardu	Ujistěte se, že ředění standardu jsou připravena správně dle pokynů v tomto příbalovém letáku.
c) Nedostatečné promíchání	Činidla důkladně promíchejte tak, že před jejich přidáním na destičku zkumavku převrátíte nebo lehce protřepete na třepačce.
d) Nejednotná technika pipetování nebo přerušení během přípravy testu	Přidání vzorku a standardu by mělo být provedeno bez přerušení procesu. Všechna činidla musí být připravena před zahájením testu.

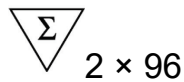
Informace o výrobku a technické pokyny jsou zdarma k dispozici u společnosti QIAGEN, prostřednictvím vašeho dodavatele nebo na www.QuantiFERON.com.

Literatura

Vyčerpávající seznam referenční literatury QFM je umístěn na Gnowee – referenční knihovně QuantiFERON, a to na stránkách www.gnowee.net.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Sanders.
2. Fernández-Ruiz, M., Kumar, D., and Humar, A. (2014) Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin. Transl. Immunol.* **3**, e12.
3. Sood, S. and Testro, A.G. (2014) Immune monitoring post liver transplant. *World J. Transplant.* **4**, 30.
4. Sood, S. (2014) A novel biomarker of immune function and initial experience in a transplant population. *Transpl. J.* **97**, e50.

Symbols



Dostatečné pro přípravu 2 × 96 vzorků



Výrobce



Symbol CE-IVD



Pro diagnostiku in vitro



Kód šarže



Katalogové číslo



Datum použitelnosti



Teplotní omezení



Viz návod k použití



Nepoužívejte opakovaně



Chraňte před slunečním světlem



Zplnomocněný zástupce pro Evropské společenství

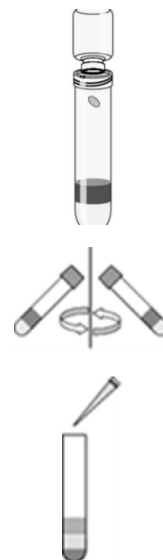
Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací prosím volejte na bezplatnou linku 00800-22-44-6000, navštivte náš technický servis na adrese www.qiagen.com/contact nebo kontaktujte oddělení technické podpory QIAGEN (viz zadní strana nebo navštivte webové stránky www.qiagen.com).

Zkrácený postup testu

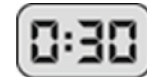
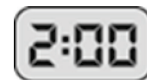
Fáze 1 – inkubace krve

1. Odeberte krev pacienta do zkumavky na odběr krve QFM nebo do odběrové zkumavky s heparinem lithným. Označte zkumavky údaji pacienta a časem odběru krve, poté odešlete do laboratoře při teplotě okolí do 8 hodin od odběru.
 - a. Jestliže byla krev odebrána do zkumavky s heparinem lithným, odeberte alikvotní podíl 1 ml krve do zkumavky na odběr krve QFM a označte zkumavku údaji pacienta a časem odběru krve.
2. Přidejte 1 peletu QFM LyoSphere do každé zkumavky na odběr krve QFM obsahující 1 ml krve, rozpustěte peletu LyoSphere a poté zkumavky co možná nejdříve inkubujte (do 8 hodin od odběru krve) ve **svislé poloze** po dobu 16–24 hodin při teplotě 37 °C.
3. Po inkubaci odstředte zkumavky po dobu 15 minut při 2000 až 3000 × g (RCF), aby se oddělila plazma a červené krvinky.
4. Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.



Fáze 2 – IFN- γ ELISA

1. Ponechte temperovat součásti testu ELISA, s výjimkou konjugátu 100 \times koncentrátu, na pokojovou teplotu alespoň po dobu 60 minut.
2. Rekonstituujte standard soupravy na 8,0 IU/ml pomocí deionizované nebo destilované vody. Připravte 4 standardní ředění.
3. Rekonstituujte mrazem sušený konjugát 100 \times koncentrát pomocí destilované nebo deionizované vody.
4. Připravte pracovní roztok konjugátu v zeleném ředícím roztoku a do všech jamek přidejte 50 μ l.
5. Přidejte 50 μ l vzorků plazmy k testování (nezředěný, ředění 1:10 a 1:100) a 50 μ l standardů do příslušných jamek. Promíchejte pomocí třepačky.
6. Inkubujte po dobu 120 \pm 5 minut při pokojové teplotě.
7. Promyjte jamky alespoň 6krát pomocí 400 μ l promývacího pufru na jamku.
8. Přidejte do jamek 100 μ l roztoku enzymového substrátu. Promíchejte pomocí třepačky.
9. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
10. Přidejte do jamek 50 μ l zastavovacího roztoku enzymů. Promíchejte pomocí třepačky.
11. Zjistěte výsledné hodnoty při 450 nm pomocí referenčního filtru 620 až 650 nm.
12. Proveďte analýzu výsledků.



Poznámky

Významné změny

Významné změny v tomto vydání příbalového letáku QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA jsou shrnuty v tabulce dole:

Část	Strana	Změna(y)
Bezpečnostní opatření	11	Nové informace o systému GHS
Bezpečnostní opatření	12	Doplněné bezpečnostní pokyny týkající se lahvíček s kovovými ochrannými víčky.

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

Omezená licenční smlouva pro soupravu QuantiFERON Monitor

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmkoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoli jiné licence, výslovné nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoli kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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

