



QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA – uputstvo za upotrebu


 2 × 96

IFN- γ test pune krvi koji meri odgovore na urođene i adaptivne
stimulanse imuniteta

Verzija 1

 Za korišćenje u in vitro dijagnostici

CE

 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, SAD

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NEMAČKA

1079024SR Rev. 03

 www.QuantiFERON.com



Sadržaj

Predviđena upotreba	4
Rezime i objašnjenje testa	4
Principi testa	5
Vreme potrebno za obavljanje testa	5
Komponente i skladištenje	6
Potreban materijal koji se ne isporučuje	8
Skladištenje i rukovanje	8
Upozorenja i mere opreza	10
Upozorenja	10
Mere opreza	11
Prikupljanje uzoraka i rukovanje njima	13
Uputstva za upotrebu	16
Izračunavanje i tumačenje rezultata	22
Generisanje krive standarda	22
Kontrola kvaliteta testa	23
Tumačenje rezultata	23
Ograničenja	24
Karakteristike učinka	25
Kliničke studije	25
Karakteristike učinka testa	30
Tehničke informacije	31
Zgrušani uzorci plazme	31
Vodič za rešavanje problema	32
Reference	34
Simboli	35
Kontakt informacije	35
Skraćena procedura testiranja	36

Predviđena upotreba

QuantiFERON Monitor test (QFM) je in vitro dijagnostički test namenjen za otkrivanje ćelijskih funkcija imuniteta merenjem interferon gama vrednosti (IFN- γ) u plazmi putem testa ELISA (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), koji se radi nakon inkubacije heparinizirane pune krvi urođenim i adaptivnim stimulansima imuniteta. Test se koristi za otkrivanje ćelijskog imunskog odgovora kod imunosuprimiranih osoba sa transplantiranim čvrstim organom.

QFM je predviđen za upotrebu zajedno sa procenom rizika i drugim medicinskim i dijagnostičkim procenama.

Rezime i objašnjenje testa

Imunodeficijenciju karakteriše smanjena mogućnost efikasnog stvaranja imunološkog odgovora. Ovaj ugroženi ili nepostojeći odgovor može da dovede do primarne ili stečene (sekundarne) imunodeficijencije (1).

Primarne imunodeficijencije su genetski nasleđene i karakteriše ih nedostatak određenih komponenti adaptivnog ili urođenog imunološkog sistema (1). Ipak, većina imunodeficijencija su stečene (sekundarne) i mogu da nastanu usled patogenih agenasa, lekova (kao što je lečenje imunosupresivima nakon transplantacije organa), stanja bolesti (kao što je rak, npr. leukemija i limfom) ili usled zagađenja životne sredine (1).

Molekularna osnova imunodeficijencije je različita, međutim, ćelijski imunski odgovori imaju ključnu ulogu u indukovanju velikog broja primećenih kliničkih manifestacija. Trenutno, dijagnostika i upravljanje sindromom imunodeficijencije zavisi od agensa uzroka (2, 3).

Na primer, ad-hok upravljanje predstavlja normu prilikom nadgledanja statusa imunodeficijencije ćelija kod pacijenata koji su bili podvrgnuti transplantacijama čvrstih organa (SOT) i koji dobijaju lekove za supresiju imunološkog sistema. Status imunološkog odgovora subjekta se generalno meri praćenjem farmakološkog nivoa lekova i kliničkom/patološkom procenom funkcije grafta (2, 3).

Veliki broj testova funkcije T ćelija meri ćelijske imunске odgovore na mitogene kao što su fitohemaglutinin (PHA), mitogen vinobojke i konkanavalin A (ConA); međutim, oni mere samo funkcionalnost T ćelija i predstavljaju podskup ćelija uključenih u ćelijski imunski odgovor. Postalo je jasno da urođeni mehanizmi imuniteta značajno doprinose odbrani domaćina, bilo da reaguju samostalno ili pojačavanjem odgovora specifičnih T ćelija. Zbog toga, funkcionalni odgovori urođenih (prirodnih ćelija ubica [NK]) i adaptivnih imunoloških ćelija (T ćelija) zajedno formiraju sveobuhvatniju analizu ćelijskih imunskih odgovora (2, 3).

QFM je in vitro dijagnostički test koji koristi kombinaciju stimulansa (u obliku LyoSphere™ kuglica) koji posebno stimulišu različite tipove ćelija uključene u urođene i adaptivne imunološke sisteme. Funkcionalni imunološki status

subjekta se procenjuje merenjem odgovora na stimulaciju urođenog i adaptivnog imunološkog sistema pomoću receptora Toll Like Receptor (TLR) i agonista receptora T ćelija (TCR), tim redosledom. Otkrivanje Interferon-gama (IFN- γ) vrednosti pomoću ELISA testa obezbeđuje kvalitativno i kvantitativno merenje ćelijskih funkcija imuniteta.

Principi testa

QFM test koristi liofilizirane stimulanse (QFM LyoSpheres™), koji se dodaju hepariniziranoj punoj krvi. Inkubacija krvi se odvija u epruvetama tokom 16 do 24 sati, nakon čega se plazma prikuplja i testira na prisustvo IFN- γ proteina dobijenog kao odgovor na stimulanse.

QFM test se obavlja u fazama. Prvo, puna krv se prikuplja u QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi. Zatim, QFM LyoSphere se dodaje u epruvetu, koja se zatim inkubira na 37 °C čim to bude moguće i u roku od 8 sati od prikupljanja uzorka. Nakon perioda inkubacije od 16 do 24 sati, epruvete se centrifugiraju, plazma se uklanja i posmatra se količina IFN- γ proteina (beleži se u međunarodnim jedinicama, na primer po ml; IU/ml) izmerena ELISA testom i poredi se sa širokim opsegom očekivanih vrednosti kako bi se utvrdila svojstva imunološkog odgovora subjekta.

QFM je test koji obezbeđuje kvalitativna i kvantitativna merenja funkcije imuniteta. QFM rezultati možda neće direktno odrediti nivo imunosupresije.

Količina proteina IFN- γ u uzorcima plazme često može da bude iznad gornje granice na većini ELISA uređaja za očitavanje, čak i kada su pojedinci umereno imunosuprimirani. Preporučuje se da se uzorci plazme rastvore u odnosu 1 prema 10 i/ili 1 prema 100 u zelenom rastvoru i da se testiraju ELISA testom zajedno sa nerazređenom plazmom.

Napomena: Granična vrednost za QFM test može da se razlikuje, u zavisnosti od nivoa imunosupresije subjekta, kao i individualnih karakteristika transplantacije.

Pogledajte „Tumačenje rezultata“ na stranici 23 ovog uputstva za upotrebu da biste videli kako se tumače rezultati QFM testa.

Vreme potrebno za obavljanje testa

Vreme potrebno za obavljanje QFM testa je procenjeno u nastavku. Takođe je navedeno vreme testiranja većeg broja uzoraka u grupi.

Inkubacija na 37 °C za epruvete sa uzorkom krvi: 16 do 24 sati

ELISA: Približno 3 sata za jednu ELISA ploču
 (do 88 uzoraka)

< 1 sat rada

Dodajte od 10 do 15 minuta za svaku narednu ploču

Komponente i skladištenje

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Broj u katalogu	0650-0701
Broj priprema	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 bočica
<i>QuantiFERON Monitor LyoSpheres – uputstvo za upotrebu</i>	1
QuantiFERON Monitor epruvete za prikupljanje uzoraka krvi	
Broj u katalogu	0650-0101
Broj priprema	100
QuantiFERON Monitor epruvete za prikupljanje uzoraka krvi (beli poklopac, beli prsten)	100 epruveta
<i>QuantiFERON Monitor epruvete za prikupljanje uzoraka krvi – uputstvo za upotrebu</i>	1

Sadržaj QuantiFERON Monitor ELISA kompleta sa 2 ploče	ELISA komplet sa 2 ploče
Broj u katalogu	0650-0201
Trake za mikroploču, 12 × 8 udubljenja (premazane slojem mišjeg anti-humanog IFN- γ monoklonalnog antitela)	2 kompleta traka za mikroploču sa udubljenjima 12 × 8
IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ standardizovani, liofilizovani; sadrži rekombinantni humani IFN- γ , bovin kazein, 0,01% w/v timerosal)	1 × bočica (8 IU/ml kada se rekonstituiše)
Green Diluent (zeleni razblaživač; sadrži bovin kazein, normalni mišji serum, 0,01% w/v timerosal)	1 × 30 ml bočica
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (koncentrovani konjugat od 100×, liofilizirani; mišji anti-humanu IFN- γ HRP, sadrži 0,01% w/v timerosal)	1 × 0,3 ml kada se rekonstituiše
Wash Buffer 20× Concentrate (koncentrovani pufer za ispiranje od 20×; pH 7,2, sadrži 0,05% v/v ProClin [®] 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (rastvor enzimskog supstrata; sadrži H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije; sadrži 0,5,5M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
QuantiFERON Monitor ELISA – uputstvo za upotrebu	1

* Sadrži sumpornu kiselinu. Pogledajte stranicu 11 da biste videli dodatne mere opreza.

Potreban materijal koji se ne isporučuje

- Inkubator za 37 °C*; CO₂ nije potreban
- Kalibrisane pipete sa promenljivom zapreminom*
- Kalibrisana pipeta† sa više kanala koja može da dozira 50 µl i 100 µl, sa vrhovima za jednokratnu upotrebu
- Šejker za mikroploče†
- Dejonizovana ili destilovana voda, 2 litra
- Perač mikroploče (preporučuje se automatski perač)
- Čitač mikroploče† opremljen filterom od 450 nm i referentnim filterom od 620 nm do 650 nm
- Stepenovani cilindar (cilindar za merenje)
- Upijajući ubrusi koji ne ostavljaju vlakna

Skladištenje i rukovanje

Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi

Čuvajte QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi na temperaturi od 4 do 25 °C. QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi trebalo bi da budu na temperaturi između 17–25 °C u vreme punjenja krvlju i mešanja.

LyoSpheres

Čuvajte QFM LyoSpheres na temperaturi od 2 do 8 °C.

Reagensi za ELISA komplet

ELISA komplet reagenasa čuvajte na temperaturi od 2 do 8 °C.

Rastvor enzimskog supstrata uvek štitite od direktne sunčeve svetlosti.

* Proverite da li su instrumenti provereni i kalibrisani u skladu sa preporukama proizvođača.

Rekonstituisani i neupotrebljeni ELISA reagensi

Uputstva o tome kako da rekonstituišete ELISA reagense potražite u odeljku „Faza 2 – IFN- γ ELISA“, na stranici 17.

- Rekonstituisani standard iz kompleta može da se čuva najviše 3 meseca ako se skladišti na temperaturi od 2 do 8 °C.

Zabeležite datum kada je standard iz kompleta rekonstituisan.

- Kada se rekonstituiše, neiskorišćeni 100× koncentrovani konjugat mora da se vrati u skladište na temperaturu od 2 do 8 °C i mora da se iskoristi u roku od 3 meseca.

Zabeležite datum kada je konjugat rekonstituisan.

- Konjugat spreman za upotrebu mora da se upotrebi u roku od 6 sati od pripreme (pogledajte tabelu 1).
- Pufer za ispiranje spreman za upotrebu može da se čuva na sobnoj temperaturi (22 ± 5 °C) najviše 2 nedelje.

Upozorenja i mere opreza

Za korišćenje u in vitro dijagnostici

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate tehničke specifikacije za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.

Upozorenja

- QFM je test koji obezbeđuje kvalitativna i kvantitativna merenja funkcije imuniteta. QFM rezultati možda neće direktno odrediti nivo imunosupresije.
- Rezultati QFM testa bi trebalo da se koriste zajedno sa kliničkom prezentacijom, medicinskom istorijom i drugim kliničkim indikatorima kada se uspostavlja imunološki status pacijenta.
- Granična vrednost za QFM test može da se razlikuje, u zavisnosti od nivoa imunosupresije subjekta, kao i individualnih karakteristika transplantacije.

Mere opreza

Samo za korišćenje u in vitro dijagnostici.



OPREZ: Rukujte humanom krvlju i plazmom kao da su potencijalno zarazne. Obratite pažnju na važne smernice za rukovanje krvlju i proizvodima za krv. Odlazite uzorke i materijale koji su došli u kontakt sa krvlju ili sa proizvodima za krv u skladu sa državnim i lokalnim zakonima.

Sledeće izjave o opasnostima i merama opreza se odnose na komponente QuantiFERON Monitor ELISA testa.

Izjave o opasnosti



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije)

Sadrži: sulfuric acid. Upozorenje! Može biti korozivno za metale. Izaziva iritaciju kože. Dovodi do jake iritacije oka. Nositi zaštitne rukavice/ zaštitnu odeću/ zaštitne naočare/ zaštitu za lice.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON rastvor enzimskog supstrata)

Upozorenje! Blago nadražuje kožu. Nositi zaštitne rukavice/ zaštitnu odeću/ zaštitne naočare/ zaštitu za lice.



QuantiFERON Green Diluent (QuantiFERON zeleni razblaživač)

Sadrži: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Sadrži: tartrazine. Upozorenje! Može da izazove alergijske reakcije na koži. Nositi zaštitne rukavice/ zaštitnu odeću/ zaštitne naočare/ zaštitu za lice.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (QuantiFERON 20× koncentrovani pufer za ispiranje)

Sadrži: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Štetno za živi svet u vodi sa dugotrajnim posledicama. Izbegavati ispuštanje/ oslobađanje u životnu sredinu.

Dodatne informacije

List sa bezbednosnim podacima: www.qiagen.com/safety

- Odstupanja od *QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA uputstva za upotrebu* mogu da dovedu do pogrešnih rezultata. Pročitajte uputstva pre upotrebe.
- **Važno:** Pregledajte bočice pre upotrebe. Nemojte da koristite konjugat, IFN- γ Standard ili QFM LyoSphere ako na bočicama postoje znaci oštećenja ili ako je oštećen gumeni poklopac. Nemojte da radite sa slomljenim bočicama. Preduzmite odgovarajuće mere opreza prilikom bezbednog odlaganja bočica. Preporuka: Za otvaranje konjugat, IFN- γ Standard ili QFM LyoSphere bočica koristite klešta za otvaranje bočica da biste smanjili rizik od povrede metalnim poklopcem.
- Nemojte da koristite ELISA komplet ako neka od bočica sa reagensima pokazuje znake oštećenja ili curenja pre upotrebe.
- Nemojte da mešate ili da koristite trake za mikroploču, IFN- γ standardizovani, zeleni razblaživač ili 100 \times koncentrovani konjugat iz različitih QFM ELISA serija kompleta. Drugi reagensi (koncentrovani pufer za ispiranje od 20 \times , rastvor enzimskog supstrata i enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije) mogu da se razmenjuju između kompleta, pod uslovom da su reagensi u okviru svog roka upotrebe i da su zabeleženi detalji o seriji.
- Neupotrebljene reagense i biološke uzorke odložite na otpad u skladu sa lokalnim, nacionalnim i propisima za zaštitu životne sredine.
- Nemojte da koristite QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi, QFM LyoSpheres ili QFM ELISA test nakon isteka roka upotrebe.
- Uverite se da je laboratorijska oprema kalibrisana/proverena za upotrebu.

Prikupljanje uzoraka i rukovanje njima

QFM test može da se obavlja samo korišćenjem pune krvi koja je prikupljena u epruvetu za prikupljanje krvi sa litijum heparinom ili direktno u QFM epruvetu za prikupljanje krvi; potreban je 1 ml pune krvi po testu. Epruvete za prikupljanje krvi moraju da budu pravilno označene i da sadrže vreme prikupljanja krvi.

Važno: Stimulacija QFM uzoraka krvi (npr. dodavanje QFM LyoSphere-a u 1 ml krvi) i kasnija inkubacija na 37 °C mora da se obavi u roku od 8 sati od prikupljanja krvi.

Pre inkubacije, držite uzorke krvi na sobnoj temperaturi (22 ± 5 °C).

Poštujte sledeće procedure da biste dobili optimalne rezultate:

1. Ispravno obeležite epruvete.

Uverite se da je svaka QFM epruveta za prikupljanje uzoraka krvi pravilno označena i da sadrži detalje subjekta i vreme prikupljanja krvi.

2. Za svakog pacijenta prikupite 1 ml venske krvi direktno u QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi. Ovaj postupak bi trebalo da obavi tehničar obučen za uzimanje krvi.

Važna napomena: U trenutku punjenja temperatura epruveta bi trebalo da bude od 17 do 25 °C.

QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi mogu da se koriste na visinama od najviše 810 metara iznad nivoa mora.

Pošto epruvete od 1 ml relativno sporo prikupljaju krv, zadržite epruvetu na igli oko 2–3 sekunde nakon što se punjenje naizgled završi. Tako se omogućava prikupljanje tačne količine.

Crna oznaka sa strane QFM epruvete za prikupljanje uzorka krvi ukazuje na zapreminu punjenja od 1 ml. QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi se proizvode za uzimanje 1 ml ± 10% krvi i optimalno rade u ovom opsegu. Ako je nivo krvi u nekoj od epruveta van opsega linije indikatora, potrebno je pribaviti nov uzorak krvi.

Ako se krv prikuplja pomoću leptir igle, morate da koristite epruvetu za „pročišćavanje“ kako biste se uverili da je cev popunjena krvlju pre upotrebe QFM epruveta za prikupljanje krvi.

Ako koristite QFM epruvete za prikupljanje krvi na nadmorskoj visini većoj od 810 metara ili ako je zapremina prilikom prikupljanja krvi mala, prikupite krv pomoću šprica i odmah prebacite po 1 ml krvi u QFM epruvetu. Iz bezbednosnih razloga, najbolje je da skinete iglu sa šprica uz praćenje odgovarajućih bezbednosnih procedura, da skinete poklopac sa QFM epruvete i da dodate po 1 ml krvi (do centra crne oznake na bočnoj strani nalepnice na epruveti). Vratite poklopac i čvrsto ga zatvorite, a zatim promešajte kao što je opisano u nastavku.

Ako koristite povesku, otpustite je čim stavite iglu u venu kako biste izbegli promene pritiska koje bi mogle da utiču na zapreminu krvi.

Druga mogućnost je da krv prikupite u jednu generičku epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi koja sadrži litijum heparin kao antikoagulant, a zatim da je prebacite u QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi. Koristite samo litijum heparin kao antikoagulant za krv jer drugi antikoagulant ometaju analizu. Napunite epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi (minimalna zapremina 3 ml) i lagano promešajte tako što ćete okrenuti epruvetu nekoliko puta da bi se rastvorio heparin. Neka krv bude na sobnoj temperaturi ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) pre prenosa u QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi za stimulaciju sa QFM LyoSphere. Uverite se da je krv dobro promešana laganim okretanjem neposredno pre raspoređivanja. Stavite 1 ml krvi u QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi. Ovo se najbolje obavlja aseptično, prateći odgovarajuće bezbednosne procedure, skidanjem poklopaca sa QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi i dodavanjem 1 ml krvi (do centra crne oznake na bočnoj strani nalepnice na epruveti). Vratite poklopce epruveta i čvrsto ih zatvorite, a zatim promešajte kao što je opisano u nastavku.

3. Odmah nakon popunjavanja epruvete, okrenite je nekoliko puta lagano kako biste rastvorili heparin.

Važno: Ukoliko epruvetu tresete previše snažno, to može da dovede do razlaganja gela i dobijanja netačnih rezultata.

4. Neposredno pre upotrebe, kalibrišite QFM LyoSpheres na sobnoj temperaturi ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).

5. Aseptično dodajte jedan QFM LyoSphere u 1 ml krvi.

Skinite poklopac sa epruvete za prikupljanje krvi.

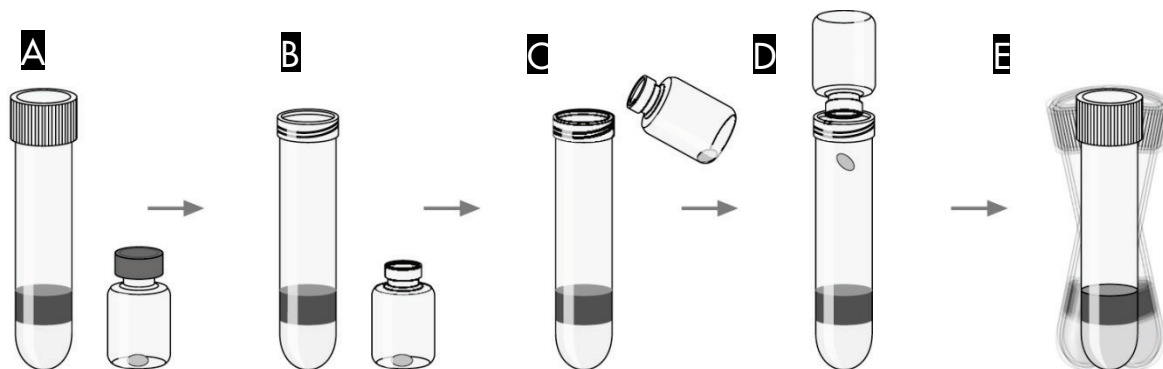
Lupnite QFM LyoSphere bočicom lagano o čvrstu površinu da biste se uverili da se QFM LyoSphere nalazi na dnu bočice. Skinite poklopac QFM LyoSphere bočice tako što ćete prvo ukloniti metalni poklopac, a zatim gumeni graničnik.

Pažljivo stavite QFM LyoSphere u uzorak krvi od 1 ml tako što ćete poravnati otvor staklene bočice sa otvorom QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi, a zatim polako okrenite bočicu da biste preneli QFM LyoSphere u QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi (pogledajte sliku 1).

Važno: Ako QFM LyoSphere ispada iz QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi, odbacite tu bočicu i uzmite novu.

Važno: QFM LyoSphere bočica ne sme da bude otvorena duži vremenski period. QFM LyoSphere bi trebalo da se doda u krv čim otvorite bočicu.

Ako se QFM LyoSphere kuglice dodaju u krv koja je prikupljena u QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi, uverite se da su poklopci epruveta vraćeni na odgovarajuće uzorke.



Slika 1. Dodavanje QFM LyoSphere. **A** QFM epruveta za prikupljanje uzoraka krvi i QFM LyoSphere bočica. **B** Uklonite poklopac sa QFM epruvete, metalni poklopac i gumeni graničnik sa QFM LyoSphere bočice. **C** Odmah dodajte QFM LyoSphere u krv tako što ćete poravnati vrh staklene bočice sa vrhom epruvete za prikupljanje uzoraka krvi. **D** Zatim, polako okrenite bočicu da biste sipali LyoSphere u epruvetu. **E** Vratite poklopac na QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi i protresite 5–10 puta.

6. Stavite poklopac na QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi i protresite 5–10 puta dovoljno jako da biste se uverili da se QFM LyoSphere u potpunosti rastvorio.

Ako se QFM LyoSphere zalepi za unutrašnju površinu epruvete, možete da ga rastvorite tako što ćete ga prekriti krvlju dok okrećete epruvetu.

Kada dodate QFM LyoSphere obavezno zatvorite epruvetu da biste sprečili slučajno ponovno dodavanje QFM LyoSphere u istu epruvetu.

Napomena: Pošto je QFM LyoSphere bele boje, on neće biti vidljiv kada se rastvori u krvi.

Važno: Ukoliko epruvetu tresete previše snažno, to može da dovede do razlaganja gela i dobijanja netačnih rezultata.

7. Kada se QFM LyoSphere doda i rastvori, QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi moraju da se prenesu u inkubator na temperaturu od 37 ± 1 °C u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 8 sati nakon prikupljanja uzorka.

Uputstva za upotrebu

Faza 1 – inkubacija krvi i prikupljanje plazme

Obezbeđeni materijal

- QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi (pogledajte odeljak „Komponente i skladištenje“ na strani 6)

Potreban materijal (koji se ne isporučuje)

- Pogledajte odeljak „Potreban materijal koji se ne isporučuje“ na strani 8

Procedura

1. Inkubirajte QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi koje sadrže 1 ml krvi i QFM LyoSphere U **USPRAVNOM POLOŽAJU** na temperaturi 37 ± 1 °C, u trajanju od 16 do 24 sata.

Napomena: Inkubator ne zahteva CO₂ ili vlaženje.

Nakon inkubacije, QFM epruvete za prikupljanje uzoraka krvi mogu da se čuvaju na temperaturi od 4 do 27 °C najviše 3 dana pre centrifugiranja.

2. Nakon inkubacije, prikupljanje plazme je olakšano centrifugiranjem QFM epruveta za prikupljanje uzoraka krvi u trajanju od 15 minuta pri 2000 do 3000 × g (RCF). Sloj gela će odvojiti ćelije od plazme. Ako se ovo ne dogodi, ponovo centrifugirajte epruvete.

Plazma može da se prikupi i bez centrifugiranja, ali je potreban dodatni oprez da bi se plazma uklonila bez remećenja ćelija.

3. Uzorke plazme prikupljajte isključivo pomoću pipete.

Važno: Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.

Uzorci plazme mogu da se ubace direktno iz centrifugiranih QFM epruveta za prikupljanje uzoraka krvi u QFM ELISA ploču, čak i kada se koriste automatizovane ELISA radne stanice.

Uzorci plazme mogu da se čuvaju do 28 dana na temperaturi od 2 do 8 °C ili, ako su prikupljeni, ispod -20 °C duži vremenski period. Jednaki deo prikupljenih uzoraka plazme mora da se zatvori pre skladištenja.

Prilikom prikupljanje uzoraka plazme, prikupite najmanje 150 µl plazme kako bi ponovno testiranje bilo moguće, ako bude potrebno.

Količina proteina IFN-γ u uzorcima plazme često može da bude iznad gornje granice na većini ELISA uređaja za očitavanje, čak i kada su pojedinci umereno imunosuprimirani. Preporučuje se da se uzorci plazme rastvore u odnosu 1 prema 10 i/ili 1 prema 100 u zelenom rastvoru i da se testiraju ELISA testom zajedno sa nerazređenom plazmom (pogledajte Faza 2 – IFN-γ ELISA).

Faza 2 – IFN- γ ELISA

Obezbeđeni materijal

- QuantiFERON Monitor ELISA komplet sa dve ploče (pogledajte „Komponente i skladištenje“ na strani 6)

Potreban materijal (koji se ne isporučuje)

- Pogledajte odeljak „Potreban materijal koji se ne isporučuje“ na strani 8

Priprema

IFN- γ protein u plazmi često može da bude iznad gornje granice na većini ELISA uređaja za očitavanje, čak i kada su pojedinci umereno imunosuprimirani. Preporučuje se da se uzorci plazme rastvore u odnosu 1 prema 10 i/ili 1 prema 100 u zelenom rastvoru i da se testiraju ELISA testom zajedno sa nerazređenom plazmom.

U situacijama kada je pacijent ozbiljno imunosuprimiran, za dobijanje kvantitativnog rezultata dovoljno je pripremiti i testirati samo nerazređene uzorke plazme.

Napomena: Za tumačenje rezultata treba koristiti primere rezultata koji se nalaze u opsegu QFM ELISA testa (npr. do 10 IU/ml). Ako je nerazređena plazma iznad opsega QFM ELISA testa, kao prijavljeni rezultat bi trebalo koristiti najblaži rastvor koji generiše rezultat u okviru opsega QFM ELISA testa (uzimajući u obzir i faktor rastvaranja).

Procedura

- 1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100 \times koncentrovanog konjugata, moraju postići sobnu temperaturu (22 ± 5 °C) pre korišćenja. Planirajte najmanje 60 minuta za nivelisanje temperature.**
- 2. Iz okvira mikroploče uklonite suvišne trake, vratite ih u foliju i čuvajte ih u frižideru do sledeće upotrebe.**

Odvojite najmanje jednu traku za QFM standarde i dovoljno traka za broj pacijenata koji se testiraju. Nakon korišćenja, sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.

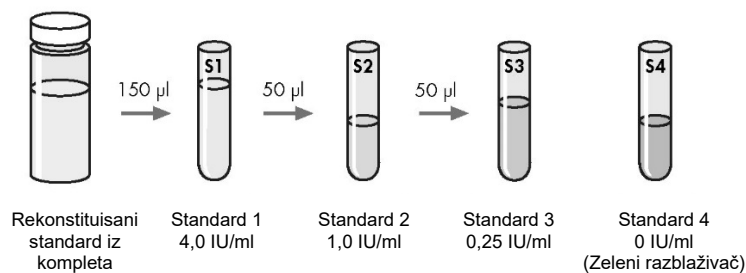
- 3. Rekonstituišite liofilizirani IFN- γ Standard pomoću određene količine dejonizovane ili destilovane vode navedene na etiketi standardne bočice. Mešajte lagano da biste smanjili stvaranje pene i uverite se da je u potpunosti rastopljen. Rekonstitucija standarda na navedeni volumen proizvodi rastvor sa koncentracijom od 8,0 IU/ml.**

Važno: Rekonstitucija volumena standardnog IFN- γ proteina razlikuje se u zavisnosti od serije. Proverite oznaku na standardnoj bočici da biste se uverili da koristite odgovarajuću zapreminu dejonizovane ili destilovane vode.

Koristite rekonstituisani standardni komplet da biste proizveli rastvor 1 prema 2, a nakon toga seriju rastvora 1 prema 4 za IFN- γ u zelenom razblaživaču (GD) (pogledajte sliku 2). S1 (Standard 1) sadrži 4,0 IU/ml, S2 (Standard 2) sadrži 1,0 IU/ml, S3 (Standard 3) sadrži 0,25 IU/ml i S4 (Standard 4) sadrži 0 IU/ml (samo GD). Standardi bi trebalo da se testiraju u dva primerka. Pripremite sveže rastvore standarda iz kompleta za svaku ELISA sesiju.

Preporučena procedura za standarde u dva primerka

- Označite 4 epruvete „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- Dodajte 150 μ l zelenog razblaživača u S1, S2, S3 i S4.
- Dodajte 150 μ l iz standardnog kompleta u S1 i dobro promešajte.
- Prenesite 50 μ l iz S1 u S2 i dobro promešajte.
- Prenesite 50 μ l iz S2 u S3 i dobro promešajte.
- Sam zeleni razblaživač (GD) služi kao nulti standard (S4).



Slika 2. Priprema krive standarda.

- Rekonstituišite liofilizirani 100 \times koncentrovani konjugat pomoću 0,3 ml dejonizovane ili destilovane vode. Mešajte lagano da biste smanjili stvaranje pene i uverite se da je konjugat u potpunosti rastopljen.**

Konjugat spreman za upotrebu priprema se razređivanjem potrebne količine rekonstituisanog 100 \times koncentrovanog konjugata u zelenom razblaživaču (tabela 1: Priprema konjugata). Vratite sav neiskorišćen 100 \times koncentrovani konjugat na temperaturu od 2 do 8 $^{\circ}$ C odmah nakon upotrebe. Koristite samo zeleni razblaživač.

Tabela 1: Priprema konjugata

Broj traka	Zapremina 100× koncentrovanog konjugata	Zapremina zelenog razblaživača
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. Za uzorke plazme prikupljene iz epruveta za uzimanje uzoraka krvi koji se naknadno skladište ili zamrzavaju, promešajte uzorke pre dodavanja u ELISA udubljenje.

Važno: Ako se uzorci plazme dodaju direktno iz centrifugiranih QFM epruveta, izbegavajte bilo kakvo mešanje plazme. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.

6. Preporučeno: Rastvorite uzorke plazme u odnosu 1:10.

- Dodajte 90 µl zelenog razblaživača (eng. Green Diluent – GD) u epruvetu označenu detaljima pacijenta i u razmeri 1:10.
- Zatim dodajte 10 µl mešanih uzoraka plazme (pogledajte 5. korak da biste saznali više o razlici između mešanih uzoraka plazme i onih koji se dodaju direktno iz centrifugiranih QFM epruveta).
- Detaljno promešajte pipetom da biste umanjili mogućnost stvaranja pene.

7. Preporučeno: Rastvorite uzorke plazme u razmeri 1:100.

- Pripremite rastvor u odnosu 1:10 (pogledajte 6. korak u prethodnom delu teksta).
- Dodajte 90 µl zelenog razblaživača u epruvetu označenu detaljima pacijenta i u razmeri 1:100.
- Dodajte 10 µl u razmeri od 1:10.

- Detaljno promešajte pipetom da biste umanjili mogućnost stvaranja pene.

Preporučeno: Testirajte sledeće uzorke paralelno, ovim redosledom:

- Nerazblaženo, 1:10, 1:100

QFM softver za analizu podržava i sledeće opcije za uzorke subjekata:

- Nerazblaženo
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Nerazblaženo, 1:10

8. Dodajte 50 µl sveže pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuća ELISA udubljenja pomoću višekanalne pipete.

9. Dodajte 50 µl uzoraka plazme u odgovarajuća udubljenja pomoću višekanalne pipete. Zatim dodajte po 50 µl standarda od 1 do 4. Testirajte standarde u dva primerka.

10. Stavite poklopac preko svake ploče i temeljno pomešajte rastvor i uzorke plazme/standarde korišćenjem šejkera za mikroploče tokom 1 minuta. Izbegavajte prskanje.

11. Inkubirajte na sobnoj temperaturi (22 ± 5 °C) na oko 120 ± 5 minuta. Ploče ne smeju da se izlažu direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije.

12. Tokom inkubacije, razblažite 1 deo 20× koncentrovanog pufera za ispiranje sa 19 delova dejonizovane ili destilovane vode i dobro promešajte. Obezbeđeno je dovoljno 20× koncentrovanog pufera za ispiranje za pripremu 2 litra pufera za ispiranje spremnog za upotrebu.

Ispirajte udubljenja u peraču mikroploča sa 400 µl pufera za ispiranje spremnog za upotrebu u najmanje 6 ciklusa. Preporučuje se upotreba automatskog uređaja za pranje ploče.

Detaljno pranje je veoma važno za učinak testa. Uverite se da je svako udubljenje **u potpunosti ispunjeno** puferom za ispiranje u svakom ciklusu pranja. Preporučeno: Potapajte udubljenja u trajanju od najmanje 5 sekundi između svakog ciklusa da biste dobili najbolje rezultate.

Dodajte standardno laboratorijsko sredstvo za dezinfekciju u odvodni rezervoar i pratite standardne procedure za dekontaminaciju potencijalno zaraznog materijala.

13. Ploče sa udubljenjima okrenite na upijajući ubrus koji ne ostavlja vlakna da biste uklonili ostatke pufera za ispiranje. Dodajte 100 µl rastvora enzimskog supstrata u svaku posudu, stavite poklopac preko svake ploče i dobro promešajte pomoću šejkera za mikroploče.

- 14. Inkubirajte na sobnoj temperaturi (22 ± 5 °C) na oko 30 minuta.**
Ploče ne smeju da se izlažu direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije.
- 15. Nakon inkubacije, dodajte 50 μ l rastvora enzimskog supstrata u svaku posudu i dobro promešajte pomoću šejkera za mikroploče.**
Enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije trebalo bi da se doda u udubljenja istim redosledom i istom brzinom kao i za dodavanje supstrata enzima u koraku 13.
- 16. Izmerite optičku gustinu (OD) u roku od 5 minuta od dodavanja rastvora za zaustavljanje reakcije pomoću čitača za mikroploče sa filterom od 450 nm i referentnim filterima od 620 do 650 nm. Vrednosti optičke gustine se koriste za izračunavanje rezultata.**

Izračunavanje i tumačenje rezultata

QuantiFERON Monitor softver za analizu se koristi za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata. Dostupan je na adresi www.QuantiFERON.com. Uverite se da se koristi najnovija verzija QuantiFERON Monitor softvera za analizu.

Ovaj softver obavlja procenu kontrole kvaliteta testa, generiše krivu standarda i obezbeđuje rezultate testiranja za svakog pacijenta, kao što je detaljno navedeno u odeljku „Tumačenje rezultata“.

Ako je nerastvorena plazma iznad gornje granice (npr. > 10 IU/ml) QFM ELISA testa, QuantiFERON Monitor softver za analizu prijavljuje najniži rastvor koji generiše rezultat u okviru opsega QFM ELISA testa, uzimajući u obzir faktor rastvaranja.

Kao alternativno rešenje u odnosu na QuantiFERON Monitor softver za analizu, rezultati mogu da se utvrde i korišćenjem sledećeg metoda.

Generisanje krive standarda

(Ako se ne koristi QuantiFERON Monitor softver za analizu)

Odredite srednju vrednost optičke gustine replikata standarda iz kompleta na svakoj ploči.

Konstruišite $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ krivu standarda tako što ćete grafički prikazati $\log_{(e)}$ srednje vrednosti optičke gustine (y-osa) u odnosu na $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IU/ml (x-osa), izuzimajući nulti standard iz ovog proračuna. Regresionom analizom izračunajte najbolju liniju krive standarda.

Pomoću krive standarda odredite IFN- γ koncentraciju (IU/ml) za svaki od uzoraka plazme za testiranje, koristeći vrednost optičke gustine svakog uzorka.

Ove proračune možete da obavite pomoću softverskih paketa koji su dostupni uz čitače za mikroploču i standardnih unakrsnih tabela ili programa za statistiku (kao što je Microsoft® Excel®). Preporučuje se da se ovi paketi koriste za izračunavanje regresione analize, koeficijenta varijacije (%CV) za standarde i koeficijenta korelacije (r) krive standarda.

Ako je nerastvorena plazma iznad opsega QFM ELISA testa, prijavljeni rezultat bi trebalo uzeti iz najblažeg rastvora koji generiše rezultat u okviru opsega QFM ELISA testa (uzimajući u obzir faktor rastvaranja).

Kontrola kvaliteta testa

Tačnost rezultata testa zavisi od pravilnog formiranja krive standarda. Zbog toga je neophodno da se ispituju rezultati dobijeni iz standarda da bi rezultati testiranja uzoraka mogli da se protumače.

ELISA test je važeći ako su ispunjeni sledeći uslovi:

- Srednja vrednost optičke gustine za standard 1 mora da bude $\geq 0,600$.
- %CV za ponovljene vrednosti optičke gustine za standard 1 i standard 2 mora da bude $\leq 15\%$.
- Ponovljene vrednosti optičke gustine za standarde 3 i 4 ne smeju da odstupaju za više od 0,040 jedinica optičke gustine od svoje srednje vrednosti.
- Koeficijent korelacije (r) izračunat iz srednjih vrednosti apsorpcije standarda mora da bude $\geq 0,98$.

QuantiFERON Monitor softver za analizu izračunava i prijavljuje ove parametre za kontrolu kvaliteta.

Ako gorenavedeni kriterijumi nisu ispunjeni, test nije važeći i mora da se ponovi.

Srednja vrednost optičke gustine nultog standarda (zeleni razblaživač) trebalo bi da bude $\leq 0,150$. Ako je srednja vrednost optičke gustine $> 0,150$, mora da se istraži procedura ispiranja ploče.

Tumačenje rezultata

QFM rezultati se tumače u zavisnosti od IFN- γ odgovora na urođene i adaptivne imunološke stimulanse. QFM test obezbeđuje kvalitativna i kvantitativna merenja funkcije imuniteta. QFM rezultati možda neće direktno odrediti nivo imunosupresije.

Važno: Kada utvrđujete imunološki status subjekta, izmereni nivo IFN- γ proteina bi trebalo da se koristi zajedno sa kliničkom slikom, medicinskom istorijom i drugim dijagnostičkim procenama (tabela 2). Granična vrednost za QFM test može da se razlikuje, u zavisnosti od nivoa imunosupresije subjekta, kao i individualnih karakteristika transplantacije.

Tabela 2: Tumačenje rezultata

QFM rezultat IFN-γ (IU/ml)	Klasifikacija	Interpretacija
< 15	Nizak	Subjekt ima nizak IFN- γ odgovor na urođene i adaptivne imunološke stimulanse
15–1000	Umereno	Subjekt ima umeren IFN- γ odgovor na urođene i adaptivne imunološke stimulanse
> 1000	Visok	Subjekt ima visok IFN- γ odgovor na urođene i adaptivne imunološke stimulanse

Ako je izmereni IFN- γ nivo nerastvorenog uzorka plazme manji od 0,1 IU/ml:

- Uverite se da je QFM LyoSphere dodat u uzorak krvi i da je epruveta inkubirana na način naveden na pakovanju.
- Uverite se da IFN- γ rezultat odgovara trenutnom kliničkom statusu subjekta.

Ako sumnjate da je došlo do tehničkih problema prilikom prikupljanja uzoraka krvi ili prilikom rukovanja njima, ponovite ceo QFM test na novim uzorcima krvi. Ponovite ELISA testiranje stimuliranih uzoraka plazme ako sumnjate da je originalni test dobijen iz procedure opisane u ovom uputstvu za upotrebu (detaljnije informacije potražite u temi „Kontrola kvaliteta“ u okviru odeljka „Testiranje“).

Lekar će možda želeti da ponovi testiranje ako rezultati ne odgovaraju trenutnom kliničkom statusu subjekta.

Ograničenja

Rezultati QFM testiranja moraju da se koriste u kombinaciji sa kliničkom istorijom svakog pojedinca, trenutnim medicinskim statusom i drugim dijagnostičkim procenama. Laboratorije mogu da odluče da uspostave sopstvene opsege testiranja.

Laboratorije mogu da odluče da koriste spoljašnji kontrolni uzorak prikupljen od zdravih subjekata, paralelno sa uzorcima pacijenata.

Nepouzdana ili netačni rezultati mogu da se pojave u sledećim slučajevima:

- Neispravni antikoagulant krvi – koristite samo litijum heparin zato što drugi antikoagulanti utiču na test.
- Odstupanja od procedure opisane u uputstvu za upotrebu.

- Previsoki nivo cirkulacije IFN- γ proteina ili prisustvo heterofilnih antitela.
- Od uzimanja uzoraka krvi do inkubacije na 37 °C proteklo je više od 8 sati.
- Nedovoljno punjenje ili prepunjavanje QFM epruveta uzorcima krvi izvan opsega od 0,9 do 1,1 ml.

Karakteristike učinka

Kliničke studije

Obavljene su dve kliničke studije kako bi se procenili odgovori naizgled zdravih pojedinaca (n = 114) u odnosu na primaocce transplantacije (n = 30). Kada se radi o primaocima transplantacije, 18 osoba je bilo u grupi ranog perioda nakon transplantacije (rani post-Tx, do 3 meseca nakon transplantacije), a 12 osoba je bilo u kasnijem periodu nakon transplantacije ili u stabilnoj grupi (kasniji post-Tx, više od 12 meseci nakon transplantacije).

- Uzorci su prikupljeni u okviru 5 vremenskih razmaka od svakog pojedinca u ranom post-Tx periodu (grupa do 3 meseca nakon transplantacije, n = 64 uzoraka).
- Uzorci su prikupljeni samo jednom od svakog pojedinca u kasnijem post-Tx periodu (grupa u kasnijem periodu nakon transplantacije, n = 12 uzoraka).
- Uzorci su prikupljeni samo jednom od svakog pojedinca u grupi zdravih osoba (n = 114).

Odgovori na QFM su u opsegu između niskih i umerenih kod uzoraka u ranom periodu nakon transplantacije i kasnijem periodu nakon transplantacije. Grupa u ranom periodu nakon transplantacije imala je viši procenat (93,8%) odgovora u okviru niskog opsega, a niži procenat odgovora (6,3%) u okviru umerenog opsega, u poređenju sa odgovorima u grupi u kasnijem periodu nakon transplantacije, gde je 25% odgovora u niskom opsegu, a 66,7% je u umerenom opsegu (tabela 3). Nije bilo odgovora u okviru grupe u ranom periodu nakon transplantacije koji pripadaju opsegu visokog odgovora, dok je samo 1 (8,3%) odgovor u uzorcima grupe u kasnijem periodu nakon transplantacije bio u opsegu visokog odgovora. QFM odgovori u grupi zdravih ljudi bili su uglavnom u umerenom opsegu (83,3%) i u opsegu sa visokim odgovorom (15,8%) (tabela 3).

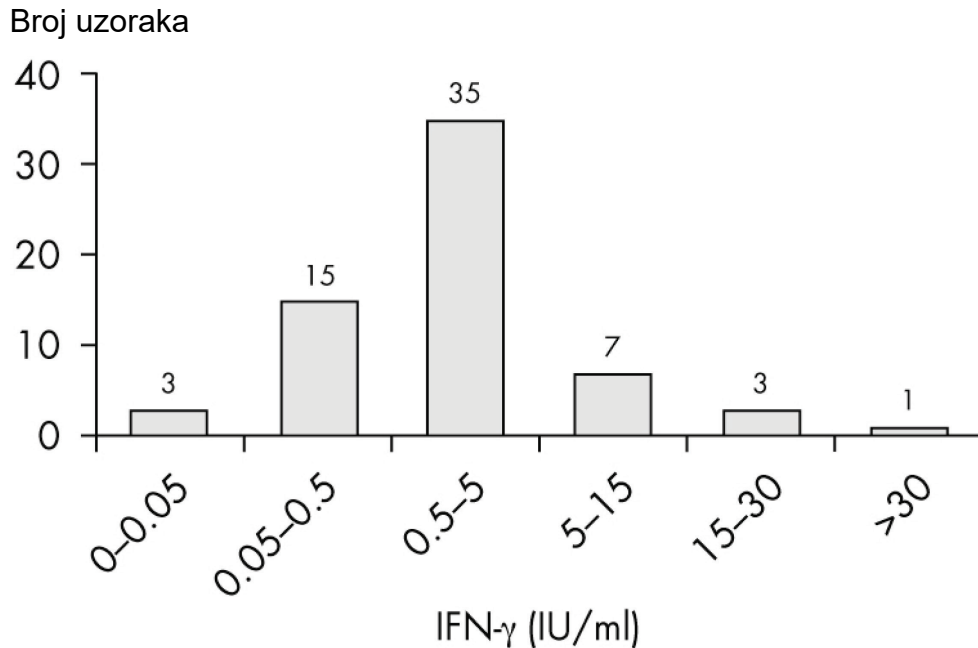
Tabela 3: Opseg QFM odgovora kod zdravih subjekata u odnosu na primaoce transplantacije

IFN- γ (IU/ml)	Kategorija rezultata	Rani period Post-Tx %* 95% CI n	Kasni period Post-Tx %* 95% CI n	Zdrave osobe %* 95% CI n	Ukupni rezultati
< 15	Nizak	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	Umereno	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	Visok	0,0% 0–5,7 n = 0	8,3% 1,5–35,4 n = 1	15,8% 10,2–23,6 n = 18	19
Ukupno uzoraka		64	12	114	190

* Procenti pokazuju proporcije uzoraka u okviru svake grupe donatora koji pripadaju određenoj grupi odgovora.

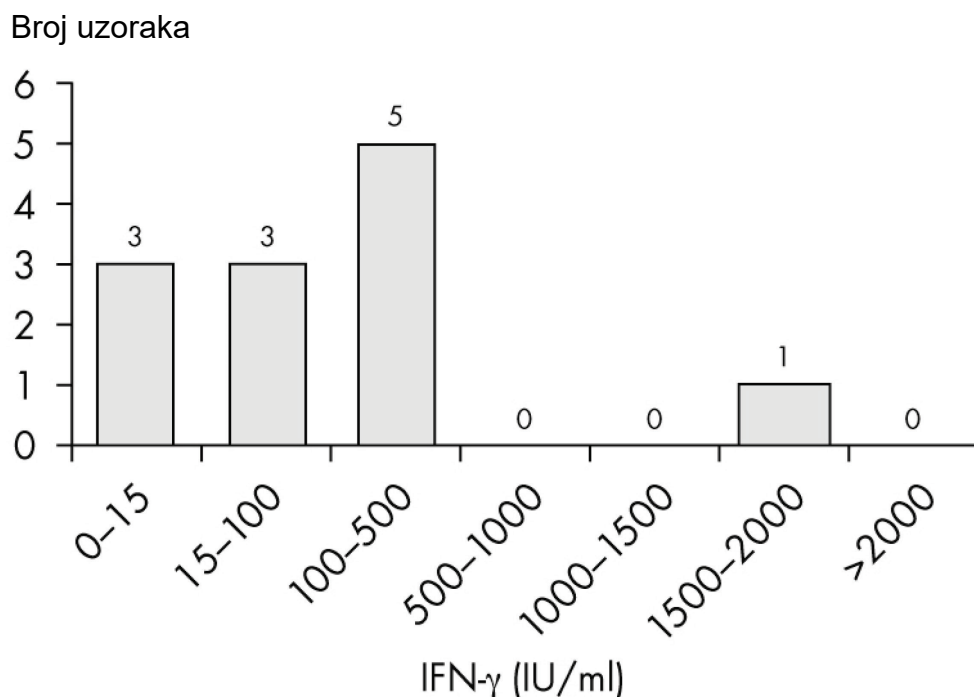
Očekivane vrednosti

Distribucija IFN- γ odgovora na QFM kod pacijenata u ranom periodu nakon transplantacije (do 3 meseca nakon transplantacije) određen je na osnovu 64 uzoraka prikupljenih od 18 pacijenata primaoca transplantacije pomoću QFM ELISA testa (slika 3).



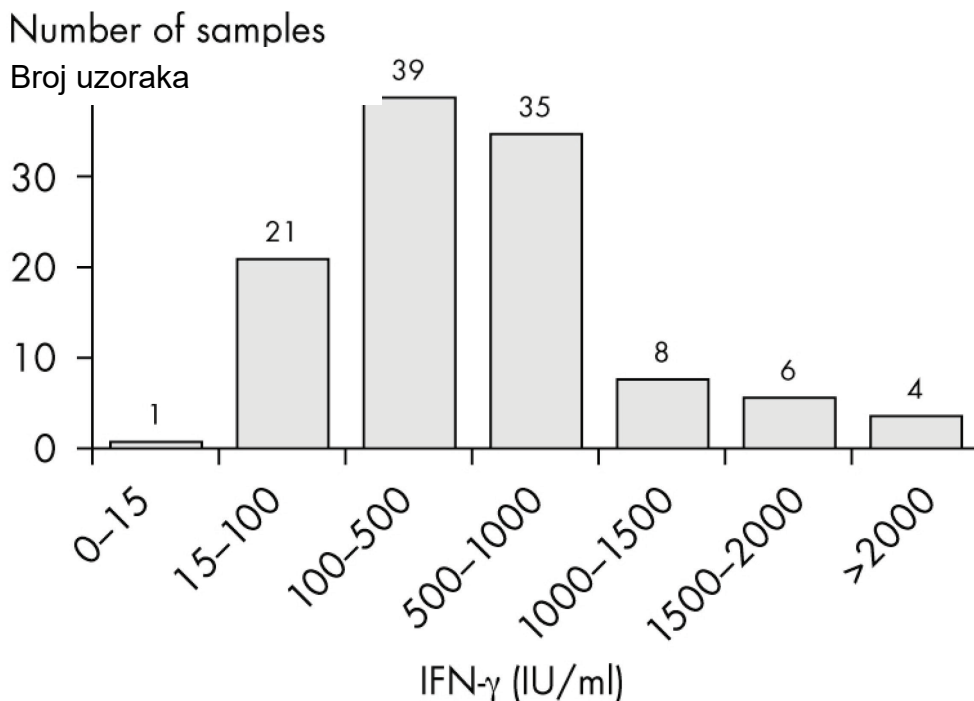
Slika 3. Distribucija QFM IFN- γ odgovora kod pacijenata u ranom periodu nakon transplantacije (n = 64; srednja vrednost = 1,5 IU/ml).

Distribucija IFN- γ odgovora na QFM kod pacijenata u kasnijem periodu nakon transplantacije (više od 12 meseci nakon transplantacije) određen je na osnovu 12 uzoraka prikupljenih pomoću QFM ELISA testa (slika 4).



Slika 4. Distribucija QFM IFN- γ odgovora kod pacijenata u kasnijem periodu nakon transplantacije (n = 12; srednja vrednost = 98,8 IU/ml).

Distribucija IFN- γ odgovora na QuantiFERON Monitor kod zdravih subjekata određena je na osnovu 114 uzorka pomoću QFM ELISA testa (slika 5).



Slika 5. Distribucija QFM IFN- γ odgovora kod zdravih subjekata (n = 114; srednja vrednost = 400,5 IU/ml).

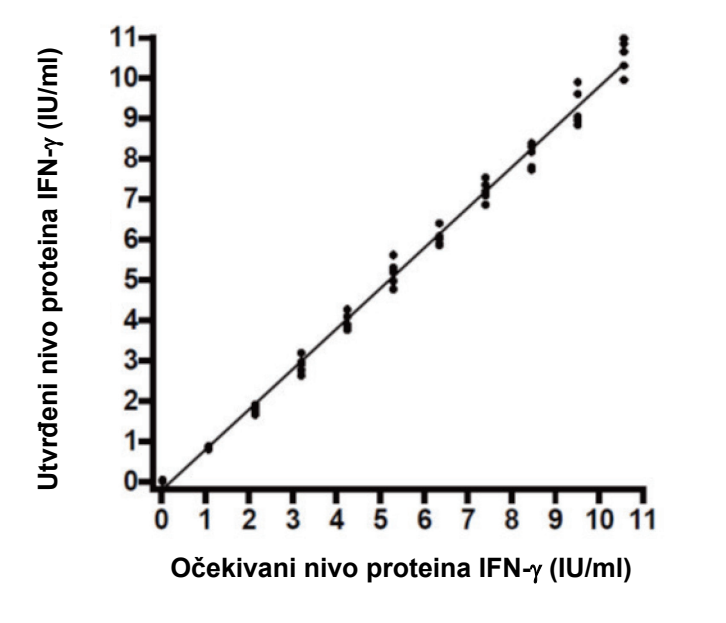
QFM odgovori kod pacijenata sa transplantacijom čvrstih organa

QFM je procenjen u opservacionoj studiji koja obuhvata više sekcija, kod pacijenata sa transplantacijom čvrstih organa (4). Studija je obuhvatala: 212 zdravih subjekata sa podgrupom od 30 osoba istog uzrasta i pola, 30 pacijenata u periodu pre transplantacije, 18 pacijenata u periodu nakon transplantacije (66 uzoraka, srednje vreme nakon transplantacije = 21 dan) i 11 pacijenata u kasnijem periodu nakon transplantacije (prosečno vreme nakon transplantacije=2290 dana). Srednja IFN- γ proizvodnja iznosila je 555,2 IU/ml kada su se kontrolisali zdravi subjekti, a 614,6 IU/ml u kontrolama subjekata istog uzrasta i pola. Srednja IFN- γ proizvodnja je bila značajno manja kod pacijenata u periodu pre transplantacije (IFN- γ = 89,3 IU/ml) i kod pacijenata u ranom periodu nakon transplantacije (IFN- γ = 3,76 IU/ml) u poređenju sa kontrolama pacijenata istog uzrasta i pola ($p < 0,001$). Vraćanje funkcije imuniteta kod pacijenata u kasnijem periodu nakon transplantacije (srednja vrednost IFN- γ = 256,1 IU/ml) primećena i pokazala se kao značajno veća nego kod pacijenata u ranom periodu nakon transplantacije ($p < 0,05$). Ova studija ukazuje na to da QFM može da se koristi za pristup funkciji ćelijskog imunskog odgovora kod imunosuprimiranih osoba sa transplantiranim čvrstim organom.

Karakteristike učinka testa

QFM ELISA test se pokazao kao linearan jer postavlja 5 replika od 11 uzoraka plazme sa poznatom koncentracijom IFN- γ proteina, nasumično postavljenih na ELISA ploči. Prava linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99 (slika 6).

Ograničenje otkrivanja testa QFM ELISA je 0,065 IU/ml i ne pokazuje da postoji efekat prozona pri koncentracijama proteina IFN- γ od najviše 10.000 IU/ml.



Slika 6. Profil linearnosti testa QFM ELISA utvrđen na osnovu testiranja 5 replikata za 11 uzoraka plazme sa poznatom koncentracijom proteina IFN- γ .

Reprodukcija QFM testa (faza 1) bila je određena korišćenjem uzoraka krvi od 20 zdravih subjekata. Procenjena su tri različita laboranta, QFM LyoSphere kompleti i skupovi opreme. Prosečni koeficijent varijacije nivoa IFN- γ odgovora određen je korišćenjem QFM ELISA testa u sva tri kompleta QFM LyoSphere i u tri testirana stanja iznosio je 22,22% (95% CI: 17,20–27,25).

Ponovljivost QFM testa (faza 1) je procenjena merenjem varijabilnosti od 5–6 ponovljenih QFM LyoSphere stimulacija krvi, u okviru istog donatora, kod 14 subjekata. Prosečni koeficijent varijacije kod 14 testiranih subjekata iznosio je 14,7% (95% CI: 10,2–19,2). Iznos %CV pojedinačnih subjekata je bio manji od 30%.

Reprodukcija QFM ELISA testa (faza 2) bila je procenjena testiranjem 20 uzoraka plazme sa promenljivim IFN- γ koncentracijama u 3 primerka, u 3 laboratorije, test je obavljan u 3 dana koja nisu uzastopna i od strane 3 laboranta. Na taj način, svaki uzorak je testiran 27 puta u 9 nezavisnih testova. Jedan uzorak je bila nulta kontrola i imao je izračunatu koncentraciju proteina IFN- γ od 0,08 IU/ml (95% CI: 0,07–0,09). Na preostalim 19 uzoraka

plazme, koncentracije su imale opseg od 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) do 7,7 IU/ml (95% CI: 7,48–7,92).

Nepreciznost tokom obavljanja testa ili između testova procenjena je na osnovu proseka %CV za svaku testiranu plazmu sa IFN- γ proteinom sa svake obrađene ploče (n = 9) i iznosi od 4,1 do 9,1 %CV. Prosečni %CV (\pm 95% CI) tokom obrade iznosio je $6,6 \pm 0,6\%$. Prosek za nultu IFN- γ plazmu bio je 14,1 %CV.

Ukupna nepreciznost ili nepreciznost u okviru testa je određena upoređivanjem 27 izračunatih koncentracija proteina IFN- γ za svaki uzorak plazme. Nepreciznost unutar testa bila je u opsegu od 6,6 do 12,3 %CV. Ukupan prosečni %CV (\pm 95% CI) iznosio je $8,7 \pm 0,7\%$. Nulta IFN- γ plazma pokazala je vrednost od 26,1 %CV. Ovaj nivo varijacija je očekivan zato što je izračunata koncentracija IFN- γ proteina niska, a varijacije u odnosu na nisku koncentraciju će biti veće nego kada je u pitanju visoka koncentracija.

Tehničke informacije

Zgrušani uzorci plazme

Ako dođe do zgrušavanja plazme fibrinskim vlaknima tokom njenog dugotrajnog skladištenja, centrifugirajte uzorke da biste sedimentirali zgrušani materijal i da biste olakšali prikupljanje plazme pipetom.

Vodič za rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može da bude koristan pri rešavanju svih problema do kojih može doći. Više informacija potražite u tehničkim informacijama navedenim na adresi: www.QuantiFERON.com. Kontakt informacije možete pronaći na poslednjoj strani.

Rešavanje problema sa ELISA testom

Pojavljivanje nespecifične boje

Mogući uzrok	Rešenje
a) Nedovršeno pranje ploče	Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 µl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme natapanja od najmanje 5 minuta između ciklusa.
b) Unakrsna kontaminacija ELISA udubljenja	Budite pažljivi kada koristite pipetu i mešate uzorke da biste smanjili rizik.
c) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti	Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100× koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od 3 meseca od datuma rekonstituisanja.
d) Rastvor enzimskog supstrata je kontaminiran	Bacite supstrat ako se pojavi plava boja. Obavezno koristite čiste rezervoare za reagense.
e) Mešanje plazme u QFM epruветama pre prikupljanja	Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.

Očitavanje niske optičke gustine za standarde

Mogući uzrok	Rešenje
a) Greška u razređivanju standarda	Uverite se da su rastvori standarda iz kompleta pravilno pripremljeni u skladu sa ovim uputstvima.
b) Greška pri korišćenju pipeta	Uverite se da su pipete kalibrisane i da se koriste u skladu sa uputstvima proizvođača.
c) Temperatura inkubacije je suviše niska	Inkubacija ELISA testova mora da se obavlja na sobnoj temperaturi (od 17 do 27 °C).

Rešavanje problema sa ELISA testom

- | | |
|---|---|
| d) Vreme inkubacije je prekratko | Inkubirajte ploču sa konjugatom, standardima i uzorcima oko 120 ± 5 minuta. Inkubirajte rastvor enzimskog supstrata na ploči u trajanju od 30 minuta. |
| e) Korišćen je neodgovarajući filter za čitač ploče | Ploča se očitava pri 450 nm sa referentnim filterom između 620 i 650 nm. |
| f) Reagensi su previše hladni | Svi reagensi, osim 100× koncentrovanog konjugata, moraju da se dovedu na sobnu temperaturu pre započinjanja testa. Za to je potreban približno jedan sat. |
| g) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti | Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100× koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od 3 meseca od datuma rekonstituisanja. |

Visoka pozadina

Mogući uzrok

Rešenje

- | | |
|--|---|
| a) Nedovršeno pranje ploče | Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 μ l po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme natapanja od najmanje 5 minuta između ciklusa. |
| b) Temperatura inkubacije je suviše visoka | Inkubacija ELISA testova mora da se obavlja na sobnoj temperaturi (od 17 do 27 °C). |
| c) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti | Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100× koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od tri meseca od datuma rekonstituisanja. |
| d) Rastvor enzimskog supstrata je kontaminiran | Bacite supstrat ako se pojavi plava boja. Obavezno koristite čiste rezervoare za reagense. |

Rešavanje problema sa ELISA testom

Nelinearna standardna kriva i promenljivost duplikata

Mogući uzrok	Rešenje
a) Nedovršeno pranje ploče	Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 µl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme natapanja od najmanje 5 minuta između ciklusa.
b) Greška u razređivanju standarda	Uverite se da su rastvori standarda pravilno pripremljeni u skladu sa ovim uputstvima.
c) Nedovoljno mešanje	Dobro promešajte reagense tako što ćete ih okretati ili lagano promešati pre postavljanja na ploču.
d) Nedosledna upotreba pipete ili prekid tokom podešavanja analize	Dodavanje uzorka i standarda trebalo bi da se obavlja bez prekida. Svi reagensi bi trebalo da se pripreme pre započinjanja analize.

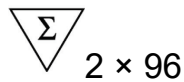
Informacije o proizvodu i tehnička uputstva možete dobiti besplatno od kompanije QIAGEN, od vašeg prodavca ili ih možete pronaći na lokaciji www.QuantiFERON.com.

Reference

Detaljna lista QFM referenci se nalazi u Gnowee – QuantiFERON referentnoj laboratoriji, dostupnoj na adresi www.gnowee.net.

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

Simboli



Dovoljno za pripremu uzorka 2 × 96



Zakonski proizvođač



Simbol CE-IVD oznake



Za korišćenje u in vitro dijagnostici



Šifra serije



Kataloški broj



Upotrebiti do dana



Temperaturno ograničenje



Pogledajte uputstva za upotrebu



Nemojte ponovo da koristite



Držite dalje od sunčeve svetlosti



Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici

Kontakt informacije

Da biste dobili tehničku pomoć i dodatne informacije, pozovite besplatan broj 00800-22-44-6000, pogledajte naš Centar za tehničku podršku na adresi www.qiagen.com/contact ili se obratite jednom od QIAGEN odeljenja za tehničku pomoć (pogledajte poledinu ili posetite adresu www.qiagen.com).

Skraćena procedura testiranja

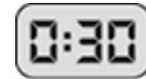
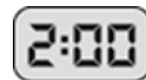
Faza 1 – inkubacija krvi

1. Prikupite krv pacijenta u QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi ili epruvetu za prikupljanje krvi sa litijum heparinom. Označite epruvete tako što ćete navesti podatke o pacijentu i vreme uzimanja krvi, a zatim ih prenesite u laboratoriju na temperaturi okruženja u roku od 8 sati od prikupljanja.
 - a. Ako je krv prikupljena u epruveti sa litijum heparinom, stavite 1 ml krvi u QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi i označite je podacima o pacijentu i vremenu prikupljanja
2. Dodajte 1 QFM LyoSphere u svaku QFM epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi u kojoj se nalazi 1 ml krvi, rastvorite LyoSphere, a zatim inkubirajte epruvete čim to bude moguće (u roku od 8 sati od prikupljanja krvi) **u uspravnom položaju** na temperaturi od 37 °C, u trajanju od 16 do 24 sata.
3. Nakon inkubacije centrifugirajte epruvete tokom 15 minuta pri 2000 do 3000 × g (RCF) da biste razdvojili plazmu i crvena krvna zrnca.
4. Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.



Faza 2 – IFN- γ ELISA

1. Kalibrišite ELISA komponente, sa izuzetkom 100 \times koncentrata konjugata, na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.
2. Rekonstituišite standard iz kompleta na 8,0 IU/ml sa destilovanom ili dejonizovanom vodom. Pripremite 4 rastvora standarda.
3. Rekonstituišite zamrznuti 100 \times koncentrovani konjugat pomoću destilovane ili dejonizovane vode.
4. Pripremite konjugat spreman za upotrebu u zelenom razblaživaču i dodajte 50 μ l u sva udubljenja.
5. Dodajte 50 μ l uzoraka plazme za testiranje (nerazređene i razređene u odnosu 1:10 i 1:100) i 50 μ l standarda u odgovarajuće otvore. Promešajte pomoću šejkera.
6. Inkubirajte 120 \pm 5 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Udubljenja operite najmanje 6 puta sa 400 μ l po udubljenju koristeći pufer za ispiranje.
8. Dodajte 100 μ l rastvora enzimskog supstrata u udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.
10. Dodajte 50 μ l enzimskog rastvora za zaustavljanje reakcije u sva udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
11. Pročitajte rezultate na 450 nm sa referentnim filterom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



Napomene

Važne promene

Značajne promene u ovom izdanju QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA uputstvu za upotrebu rezimirane su u tabeli u nastavku:

Odeljak	Stranica	Promene
Mere opreza	11	Nove informacija pod izjavama o opasnosti
Mere opreza	12	Dodata bezbednosna uputstva koja se tiču bočica sa metalnim poklopcima.

Zaštićeni znakovi: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (QIAGEN grupa); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLymph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Ugovor o ograničenoj licenci za QuantiFERON Monitor komplet

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

1. Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučениh komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu i dodatnim protokolima dostupnim na adresi www.qiagen.com. Neke od ovih dodatnih protokola su obezbedili korisnici QIAGEN proizvoda za korisnike QIAGEN proizvoda. Kompanija QIAGEN nije detaljno testirala niti optimizovala te protokole. QIAGEN ne daje garancije za njih niti tvrdi da oni ne krše prava nezavisnih proizvođača.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne garantuje da ovaj komplet i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
3. Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu upotrebu i ne smeju da se ponovo koriste, dorađuju ili ponovo prodaju.
4. Kompanija QIAGEN posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u prethodnom tekstu. QIAGEN može da primeni zabrane ovog Ugovora o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Ugovora o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Da biste videli ažurirane uslove licenciranja, posetite www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, sva prava zadržana.

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

