


# Prospect QuantiFERON Monitor<sup>®</sup> (QFM<sup>®</sup>) ELISA

 2 x 96

Testul IFN- $\gamma$  asupra sângelui integral pentru măsurarea  
răspunsurilor la stimulenți imuni înnăscuți și adaptativi

Versiunea 1

**IVD** A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

**CE**

**REF** 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, SUA

**EC REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, GERMANIA

1079024RO Rev. 03

 [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)





# Cuprins

<b>Domeniul de utilizare</b>	<b>4</b>
<b>Rezumatul și explicarea testului</b>	<b>4</b>
Principiile testului	5
Timpul necesar pentru efectuarea testului	6
<b>Componente și mod de păstrare</b>	<b>6</b>
Materiale necesare, dar nefurnizate	8
Păstrare și manipulare	8
<b>Avertizări și precauții</b>	<b>10</b>
Avertizări	10
Precauții	11
<b>Recoltarea și manipularea probelor</b>	<b>13</b>
<b>Instrucțiuni de utilizare</b>	<b>16</b>
<b>Calculule și interpretarea testului</b>	<b>22</b>
Generarea curbei standard	22
Controlul calității testului	23
Interpretarea rezultatelor	23
<b>Limitări</b>	<b>24</b>
<b>Caracteristici de performanță</b>	<b>25</b>
Studii clinice	25
Caracteristicile de performanță ale testului	30
<b>Informații tehnice</b>	<b>31</b>
Probe de plasmă coagulate	31
<b>Ghid de remediere a problemelor</b>	<b>32</b>
<b>Referințe</b>	<b>34</b>
<b>Simboluri</b>	<b>35</b>
<b>Date de contact</b>	<b>35</b>
<b>Procedura de testare pe scurt</b>	<b>36</b>

## Domeniul de utilizare

Testul QuantiFERON Monitor (QFM) este un test de diagnosticare in vitro destinat detectării funcției imune mediate celular prin măsurarea nivelului de interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) din plasmă cu ajutorul testului de imunoabsorbție enzimatică (ELISA), după incubarea sângelui integral heparinizat cu stimulenți ai răspunsului imun înăscut și adaptativ. Testul este utilizat pentru a detecta răspunsul imun mediat celular la persoanele cu imunosupresie care au suferit transplanturi de organe solide.

QFM este destinat utilizării în asociere cu măsurile de evaluare a riscului și alte evaluări medicale și de diagnostic.

## Rezumatul și explicarea testului

Imunodeficiența se caracterizează printr-o abilitate scăzută de a iniția un răspuns imun eficient. Acest răspuns compromis sau absent poate fi cauzat de o imunodeficiență primară sau dobândită (secundară) (1).

Imunodeficiențele primare sunt moștenite genetic și se caracterizează prin deficiențe ale unor componente distincte ale sistemului imunitar adaptativ sau înăscut (1). Totuși, majoritatea imunodeficiențelor sunt dobândite (secundare) și pot fi induse de agenți patogeni, medicamente (precum tratamentul imunosupresiv ca urmare a unui transplant de organe), afecțiuni (precum unele forme de cancer, de exemplu, leucemie și limfom) sau de factori de contaminare din mediul înconjurător (1).

Baza moleculară a imunodeficienței este diversă; cu toate acestea, imunitatea mediată celular joacă un rol cheie în inducția multor manifestări clinice observate. În prezent, diagnosticarea și gestionarea sindroamelor de imunodeficiență depind de agentul cauzal (2, 3).

De exemplu, gestionarea ad hoc reprezintă norma în monitorizarea stadiului imunodeficienței celulare în cazul subiecților care au suferit transplanturi de organe solide (TOS) și care sunt tratați cu medicamente pentru supresia sistemului imunitar. Starea răspunsului imun a subiectului este de regulă măsurată prin monitorizarea nivelurilor farmacologice ale medicamentului și prin evaluarea clinică/patologică a funcției grefei (2, 3).

Există o serie de teste ale funcțiilor celulelor T care măsoară imunitatea mediată celular la mitogeni precum fitohemaglutinina (PHA), mitogenul din cârmâz și concanavalina A (ConA); cu toate acestea, ele doar măsoară capacitatea funcțională a celulelor T și reprezintă un subset al celulelor implicate în imunitatea mediată celular. A devenit din ce în ce mai clar că mecanismele imune înăscute contribuie în mare măsură la apărarea gazdei, fie acționând singure, fie sporind răspunsurile specifice ale celulelor T. Prin urmare, răspunsurile funcționale ale celulelor imune înăscute (celule natural killer [NK]) și adaptative (celule T) formează împreună o analiză mai comprehensivă a imunității mediate celular (2, 3).

QFM este un test de diagnosticare in vitro care utilizează o combinație de stimulenți (în forma unui pelet LyoSphere™) care stimulează în mod specific diferite tipuri de celule implicate atât în sistemul imunitar înnăscut, cât și în cel adaptativ. Starea imună funcțională a unui subiect este evaluată prin măsurarea răspunsului la stimularea sistemului imunitar înnăscut și adaptativ cu ajutorul agoniștilor receptorilor de tip Toll (TLR), respectiv ai receptorilor celulelor T (TCR). Detectarea interferonului gamma (IFN- $\gamma$ ) cu ajutorul ELISA asigură atât o măsurare cantitativă, cât și calitativă a funcției imune mediate celular.

## Principiile testului

Testul QFM utilizează stimulenți liofilizați (QFM LyoSphere™), care se adaugă la sângele integral heparinizat. Perioada de incubare a sângelui este cuprinsă între 16 și 24 de ore, după care, plasma este recoltată și testată pentru prezența IFN- $\gamma$  rezultat ca răspuns la stimulenți.

Testul QFM este efectuat în câteva etape. Mai întâi, sângele integral este recoltat în tubul de recoltare a sângelui QFM. În continuare, se adaugă un pelet QFM LyoSphere în tub, care este mai apoi incubat la 37 °C cât de curând posibil și nu mai târziu de 8 ore de la recoltare. După perioada de incubare de 16–24 de ore, se centrifughează tuburile, se îndepărtează plasma și se măsoară cantitatea de IFN- $\gamma$  (raportată în Unități Internaționale per ml; UI/ml) cu ajutorul ELISA. Rezultatul obținut se compară cu un interval de valori preconizate pentru a stabili răspunsul imun al subiectului.

QFM este un test cu ajutorul căruia se efectuează atât o măsurătoare cantitativă, cât și calitativă a funcției imune. E posibil ca rezultatele QFM să nu cuantifice în mod direct nivelul de supresie imună.

Cantitatea de IFN- $\gamma$  din probele de plasmă poate depăși adesea limitele superioare ale celor mai multe cititoare ELISA, chiar dacă indivizii suferă de o imunosupresie moderată. Se recomandă ca probele de plasmă să fie diluate în soluție de 1 la 10 și/sau 1 la 100 cu Diluant verde și să fie testate în aparatul ELISA împreună cu plasmă nediluată.

**Notă:** Pragul testului QFM poate varia în funcție de nivelul de imunosupresie al subiectului și de condițiile individuale de transplant.

Consultați secțiunea „Interpretarea rezultatelor” de la pagina 23 a acestui prospect pentru a afla cum se interpretează rezultatele QFM.

## Timpul necesar pentru efectuarea testului

Timpul necesar pentru efectuarea testului QFM este estimat mai jos. Este indicat și timpul necesar pentru testarea probelor multiple grupate pe loturi.

Incubarea tuburilor cu sânge la 37 °C: 16-24 de ore

ELISA: Aproximativ 3 ore pentru o placă ELISA  
(până la 88 de probe)

<1 oră de lucru

Se adaugă 10–15 minute pentru fiecare placă suplimentară

## Componente și mod de păstrare

<b>QuantiFERON Monitor LyoSpheres</b>	
<b>Nr. de catalog</b>	<b>0650-0701</b>
<b>Număr de preparări</b>	<b>10</b>
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 flacoane
<i>Prospect QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
<b>Tuburi de recoltare a sângelui QuantiFERON Monitor</b>	
<b>Nr. de catalog</b>	<b>0650-0101</b>
<b>Număr de preparări</b>	<b>100</b>
Tuburi de recoltare a sângelui QuantiFERON Monitor (capac alb, inel alb)	100 de tuburi
<i>Prospect tuburi de recoltare a sângelui QuantiFERON Monitor</i>	1

<b>Componente Trusă ELISA cu 2 plăci QuantiFERON Monitor</b>	<b>Trusă ELISA cu 2 plăci</b>
<b>Nr. de catalog</b>	<b>0650-0201</b>
Stripuri de microplăci, 12 × 8 godeuri (acoperite cu anticorpi monoclonali murini anti-IFN- $\gamma$ )	2 seturi stripuri pentru placă cu 12 × 8 godeuri
IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (Standard IFN- $\gamma$ liofilizat; conține IFN- $\gamma$ uman recombinant, cazeină bovină, timerosal 0,01% m/v)	1 × flacon (8 UI/ml după reconstituire)
Green Diluent (Diluant verde; conține cazeină bovină, ser normal de șoarece, timerosal 0,01% m/v)	1 × 30 ml flacon
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (Conjugat concentrat 100× liofilizat; HRP IFN- $\gamma$ murin antiuman, conține timerosal 0,01% m/v)	1 × 0,3 ml după reconstituire
Wash Buffer 20× Concentrate (Soluție tampon pentru spălare concentrată 20×; pH 7,2, conține ProClin® 300 0,05% v/v)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Soluție de substrat enzimatic; conține H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3', 5,5', tetrametilbenzidină)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Soluție de inhibitor enzimatic; conține H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M)*	1 × 15 ml
Prospect QuantiFERON Monitor ELISA	1

\* Conține acid sulfuric. Pentru măsuri de precauție, consultați pagina 11.

## **Materiale necesare, dar nefurnizate**

- Incubator setat la 37 °C\*; CO<sub>2</sub> nu este necesar
- Pipete cu volum variabil calibrate\*
- Pipete multicanal calibrate†, capabile să elibereze 50 µl și 100 µl, cu vârfuri de unică folosință
- Agitator pentru microplăci†
- Apă deionizată sau distilată, 2 litri
- Spălător pentru microplăci (este recomandat un spălător automat)
- Cititor de microplăci† prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință între 620 și 650 nm
- Cilindru gradat (cilindru de măsurare)
- Prosoape absorbante fără scame

## **Păstrare și manipulare**

### **Tuburi de recoltare a sângelui**

Păstrați tuburile de recoltare a sângelui QFM la o temperatură cuprinsă între 4 și 25 °C. Temperatura tuburilor de recoltare a sângelui QFM trebuie să fie cuprinsă între 17 și 25 °C în momentul recoltării și amestecării.

### **LyoSpheres**

Păstrați QFM LyoSphere la o temperatură cuprinsă între 2 și 8 °C.

### **Reactivii din trusa ELISA**

Păstrați reactivii din trusă ELISA la o temperatură cuprinsă între 2 și 8 °C.

Protejați în permanență soluția de substrat enzimatic de lumina solară directă.

\* Asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.



## **Reactivii ELISA reconstituiți și neutilizați**

Pentru instrucțiuni despre modul de reconstituire a reactivilor ELISA, vă rugăm să consultați „Etapa 2 — testul ELISA pentru IFN- $\gamma$ ” de la pagina 17.

- Standardul din trusă reconstituit poate fi păstrat cel mult 3 luni, dacă este păstrat la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C.

Notați data la care a fost reconstituit standardul din trusă.

- Odată reconstituit, conjugatul concentrat 100× neutilizat trebuie păstrat în continuare la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C și utilizat în cel mult 3 luni.

Notați data la care a fost reconstituit conjugatul.

- Conjugatul în concentrație de lucru trebuie utilizat în cel mult 6 ore de la preparare (vezi Tabelul 1).
- Soluția tampon de spălare în concentrație de lucru poate fi păstrată la temperatura camerei ( $22 \pm 5$  °C) timp de cel mult 2 săptămâni.

## Avertizări și precauții

### A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (FDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărei truse și componente a trusei QIAGEN.

### Avertizări

- QFM este un test cu ajutorul căruia se efectuează atât o măsurătoare cantitativă, cât și calitativă a funcției imune. E posibil ca rezultatele QFM să nu cuantifice în mod direct nivelul de supresie imună.
- Rezultatele testului QFM trebuie utilizate în asociere cu prezentarea clinică, anamneza și alți indicatori clinici în vederea stabilirii stării imune a unui pacient.
- Pragul testului QFM poate varia în funcție de nivelul de imunosupresie al subiectului și de condițiile individuale de transplant.

## Precauții

A se utiliza numai pentru diagnosticare in vitro.



**ATENȚIE: Manipulați sângele uman și plasma ca și cum ar avea potențial infecțios. Respectați îndrumările relevante cu privire la manipularea sângelui și a produselor pe bază de sânge. Eliminați probele și materialele care au intrat în contact cu sângele sau cu produsele pe bază de sânge în conformitate cu reglementările locale și naționale.**

Următoarele avertizări cu privire la pericole și măsurile de precauție se aplică pentru componentele QuantiFERON Monitor ELISA.

### Avertizări cu privire la pericole



#### **QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Soluție de inhibitor enzimatic QuantiFERON)**

Conține: sulfuric acid. Atenție! Poate fi corosiv pentru metale. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Purtați mănuși de protecție/ îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.

#### **QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (Soluție de substrat pentru enzime QuantiFERON)**

Atenție! Provoacă iritația ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/ îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.



#### **QuantiFERON Green Diluent (Diluant verde QuantiFERON)**

Conține: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Conține: tartrazine. Atenție! Poate provoca o reacție alergică a pielii. Purtați mănuși de protecție/ îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.



#### **QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (Soluție tampon de spălare QuantiFERON concentrată 20×)**

Conține: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. Evitați dispersarea în mediu.

## Informații suplimentare

Fișe cu date de securitate: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- Abaterile de la *prospectul QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* pot genera rezultate incorecte. Citiți cu atenție instrucțiunile înainte de utilizare.
- **Important:** Inspectați flacoanele înainte de utilizare. Nu utilizați flacoanele Conjugate, IFN- $\gamma$  Standard sau QFM LyoSphere dacă prezintă semne de deteriorare sau dacă sigiliul de cauciuc a fost compromis. Nu manipulați flacoanele sparte. Luați măsuri adecvate de precauție pentru eliminarea flacoanelor în siguranță. Recomandare: Deschideți flacoanele Conjugate, IFN- $\gamma$  Standard sau QFM LyoSphere cu ajutorul unui clește de desigilare a flacoanelor pentru a reduce riscul de leziuni provocate de capacul cu sigiliu metalic.
- Nu utilizați trusa ELISA dacă unul dintre flacoanele de reactivi prezintă semne de deteriorare sau scurgeri înainte de utilizare.
- Nu amestecați și nu utilizați stripuri de microplăci, standard IFN- $\gamma$ , Diluant verde sau conjugat concentrat 100× din truse QFM ELISA aparținând unor loturi diferite. Alți reactivi (soluția tampon de spălare concentrată 20×, soluția de substrat enzimatic și soluția de inhibitor enzimatic) pot fi interschimbați între truse cu condiția ca reactivii să nu aibă termenul de valabilitate expirat și detaliile lotului să fie înregistrate.
- Eliminați reactivii neutilizați și probele biologice conform reglementărilor locale, naționale și de mediu.
- Nu utilizați tuburile de recoltare a sângelui QFM, QFM LyoSphere sau trusa QFM ELISA după data de expirare.
- Asigurați-vă că echipamentul de laborator a fost în mod corespunzător calibrat/validat pentru utilizare.

## Recoltarea și manipularea probelor

Testul QFM trebuie efectuat doar cu sânge integral recoltat fie într-un tub de recoltare a sângelui cu litu-heparină, fie direct într-un tub de recoltare a sângelui QFM; este nevoie de 1 ml de sânge integral pentru fiecare testare. Tuburile de recoltare a sângelui trebuie etichetate în mod corespunzător și să includă ora recoltării.

**Important:** Stimularea probelor de sânge QFM (adăugarea QFM LyoSphere într-o parte alicotă de 1 ml de sânge) și incubarea lor la 37 °C trebuie să se facă în decurs de 8 ore de la recoltarea sângelui.

Înainte de incubare, păstrați probele de sânge la temperatura camerei ( $22 \pm 5$  °C).

**Pentru obținerea unor rezultate optime, trebuie respectate următoarele proceduri:**

### 1. Etichetați tuburile în mod corespunzător.

Asigurați-vă că fiecare tub de recoltare a sângelui QFM este etichetat în mod corespunzător cu detaliile subiectului și ora de recoltare.

### 2. Pentru fiecare subiect, recoltați 1 ml de sânge prin puncție venoasă, direct într-un tub de recoltare a sângelui QFM. Procedura trebuie efectuată de către un flebotomist cu experiență.

**Notă importantă:** Tuburile trebuie să aibă temperatura între 17–25 °C în momentul umplerii cu sânge.

Tuburile de recoltare a sângelui QFM pot fi utilizate până la o altitudine de 810 metri.

Întrucât sângele se recoltează relativ lent în tuburile de 1 ml, păstrați tubul pe ac timp de 2–3 secunde după ce tubul pare să se fi umplut. Astfel, vă veți asigura că ați recoltat volumul corespunzător.

Marcajul negru de pe partea laterală a tubului de recoltare a sângelui QFM indică nivelul de umplere corespunzător pentru 1 ml. Tuburile de recoltare a sângelui QFM sunt concepute pentru a recolta 1 ml  $\pm$  10% funcționând la parametri optimi în acest interval. Dacă nivelul de sânge nu se încadrează în intervalul definit de linia indicatoare, trebuie recoltată o nouă probă de sânge.

Dacă pentru recoltarea sângelui se folosește un ac cu aripioare, utilizați un tub de purjare, pentru a vă asigura că tubul este umplut cu sânge înainte ca tuburile de recoltare a sângelui QFM să fie utilizate.

Dacă tuburile de recoltare a sângelui QFM sunt utilizate la o altitudine mai mare de 810 m sau dacă volumul de sânge recoltat este scăzut, recoltați sângele cu ajutorul unei seringi și transferați imediat 1 ml de sânge în tubul de recoltare a sângelui QFM. Din motive de siguranță, este ideal ca această operațiune să fie efectuată scoțând acul seringii, urmând procedurile de siguranță corespunzătoare, îndepărtând capacul tubului de

recoltare a sângelui QFM și adăugând 1 ml de sânge (până la punctul de mijloc al marcajului negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Montați la loc și fixați bine capacul și omogenizați așa cum este descris mai jos.

Dacă utilizați un garou, slăbiți-l de îndată ce acul este introdus în venă pentru a evita variațiile de tensiune care ar putea influența volumul de sânge.

Ca alternativă, sângele poate fi recoltat într-un tub universal de recoltare a sângelui cu litu-heparină pe post de anticoagulant, după care poate fi transferat într-un tub de recoltare a sângelui QFM. Utilizați doar litu-heparină pe post de anticoagulant sanguin deoarece alți anticoagulanți pot interfera cu testul. Umpleți un tub de recoltare a sângelui (volum minim 3 ml) și amestecați ușor întorcând tubul de câteva ori pentru a dizolva heparina. Păstrați sângele la temperatura camerei ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) înainte de a-l transfera în tuburile de recoltare a sângelui QFM pentru stimularea cu QFM LyoSphere. Asigurați-vă că sângele este bine amestecat întorcând tubul cu grijă imediat înaintea transferului. Transferați o parte alicotă de 1 ml de sânge într-un tub de recoltare a sângelui QFM. Efectuați transferul aseptice, urmând procedurile de siguranță corespunzătoare, îndepărtând capacul tubului de recoltare a sângelui QFM și adăugând 1 ml de sânge (până la marcajul negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Montați la loc și fixați bine capacele tuburilor și omogenizați așa cum este descris mai jos.

**3. Imediat după umplerea tuburilor, răsturnați tubul ușor de mai multe ori pentru a dizolva heparina.**

**Important:** O scuturare prea puternică poate cauza distrugerea gelului și poate duce la rezultate aberante.

**4. Imediat înainte de utilizare, aduceți stimulenții QFM LyoSphere la temperatura camerei ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).**

**5. Adăugați respectând procedura aseptice un pelet QFM LyoSphere într-un mililitru (1 ml) de sânge.**

Desfaceți tubul de recoltare a sângelui.

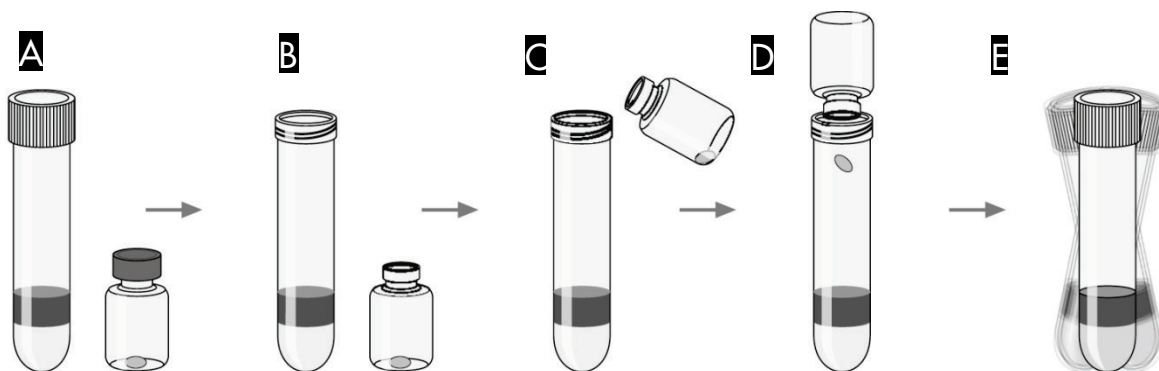
Loviți ușor flaconul QFM LyoSphere de o suprafață tare pentru a vă asigura că peletul QFM LyoSphere se află în partea inferioară a flaconului. Desfaceți flaconul QFM LyoSphere îndepărtând mai întâi sigiliul metalic, apoi dopul de cauciuc.

Introduceți cu grijă peletul QFM LyoSphere într-un mililitru de sânge, aliniind buza flaconului de sticlă cu buza tubului de recoltare a sângelui QFM, apoi răsturnând flaconul cu grijă pentru a transfera peletul QFM LyoSphere în tubul de recoltare a sângelui QFM (vezi Figura 1).

**Important:** Dacă QFM LyoSphere cade lângă tubul de recoltare a sângelui QFM, eliminați-l și deschideți un nou flacon QFM LyoSphere.

**Important:** Nu lăsați flaconul QFM LyoSphere deschis timp îndelungat. QFM LyoSphere trebuie introdus în sânge de îndată ce flaconul a fost deschis.

Dacă QFM LyoSphere este introdus în sângele recoltat în tubul de recoltare a sângelui QFM, aveți grijă să puneți capacul înapoi pe proba corespunzătoare.



**Figura 1. Procedura de adăugare a QFM LyoSphere.** **A.** Tub de recoltare a sângelui QFM și flacon QFM LyoSphere. **B.** Scoateți capacul de pe tubul de recoltare a sângelui QFM și îndepărtați sigiliul metalic și dopul de cauciuc de pe flaconul QFM LyoSphere. **C.** Adăugați imediat QFM LyoSphere în sânge, aliniind buza flaconului de sticlă cu buza tubului de recoltare. **D.** În continuare, răsturnați flaconul cu grijă pentru a transfera peletul LyoSphere în tub. **E.** Montați înapoi capacul pe tubul de recoltare a sângelui QFM și agitați de 5–10 ori.

**6. Montați capacul pe tubul de recoltare a sângelui QFM și agitați-l de 5–10 ori, suficient de ferm pentru a vă asigura că peletul LyoSphere s-a dizolvat complet.**

Dacă un pelet QFM LyoSphere aderă la suprafața interioară a tubului, acesta poate fi dizolvat prin acoperirea LyoSphere cu sânge și răsturnarea tubului.

Asigurați-vă că tubul este acoperit cu capacul de îndată ce ați adăugat QFM LyoSphere pentru a preveni adăugarea unui al doilea pelet LyoSphere în același tub.

**Notă:** Deoarece peletul QFM LyoSphere este alb, nu va mai fi vizibil în sânge după ce s-a dizolvat.

**Important:** O scuturare prea puternică poate cauza distrugerea gelului și poate duce la rezultate aberante.

**7. După adăugarea și dizolvarea peletului QFM LyoSphere, tuburile de recoltare a sângelui QFM trebuie transferate cât mai curând posibil într-un incubator de  $37 \pm 1$  °C, în descurs de cel mult 8 ore de la recoltarea sângelui.**

# Instrucțiuni de utilizare

## Etapa 1 — incubarea sângelui și recoltarea plasmei

### Materialele furnizate

- Tuburi de recoltare a sângelui QFM (consultați „Componente și mod de păstrare” de la pagina 6)

### Materiale necesare (dar nefurnizate)

- Consultați „Materiale necesare, dar nefurnizate” de la pagina 8

### Procedură

- 1. Incubați tuburile de recoltare a sângelui QFM cu părți alicote de 1 ml sânge cu QFM LyoSphere în poziție VERTICALĂ la  $37 \pm 1$  °C timp de 16–24 de ore.**

**Notă:** Incubatorul nu necesită CO<sub>2</sub> sau umidificare.

După incubare, tuburile de recoltare a sângelui QFM pot fi păstrate la temperaturi între 4 și 27 °C timp de cel mult 3 zile înainte de centrifugare.

- 2. După incubare, recoltarea plasmei este facilitată prin centrifugarea tuburilor de recoltare a sângelui QFM timp de 15 minute la 2000–3000 × g (RCF). Dopul de gel va separa celulele de plasmă. Dacă acest lucru nu se întâmplă, centrifugați din nou tuburile.**

Recoltarea plasmei fără centrifugare este posibilă, însă este necesară o atenție sporită pentru îndepărtarea plasmei fără afectarea celulelor.

- 3. Probele de plasmă trebuie recoltate exclusiv cu pipeta.**

**Important:** După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

Probele de plasmă pot fi încărcate din tuburile de recoltare a sângelui QFM centrifugate direct pe placa QFM ELISA, inclusiv atunci când se utilizează stații de lucru automate ELISA.

Probele de plasmă pot fi păstrate cel mult 28 de zile la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C, sau, dacă au fost recoltate, la temperaturi sub –20 °C pe perioade de timp îndelungate. Părțile alicote de plasmă recoltată trebuie sigilate înainte de păstrare.

La recoltarea probelor de plasmă, recoltați cel puțin 150 μl de plasmă pentru repetarea testării în caz de nevoie.

Cantitatea de IFN-γ din probele de plasmă poate depăși adesea limitele superioare ale celor mai multe cititoare ELISA, chiar dacă indivizii suferă



de o imunosupresie moderată. Se recomandă ca probele de plasmă să fie diluate în soluție de 1:10 și/sau 1:100 cu Diluant verde și să fie testate în aparatul ELISA împreună cu plasmă nediluată (vezi Etapa 2 — testul ELISA pentru IFN- $\gamma$ ).

## **Etapa 2 — testul ELISA pentru IFN- $\gamma$**

### **Materialele furnizate**

- Componente Trusă ELISA cu 2 plăci QuantiFERON Monitor (consultați „Componente și mod de păstrare” de la pagina 6)

### **Materiale necesare (dar nefurnizate)**

- Consultați „Materiale necesare, dar nefurnizate” de la pagina 8

### **Pregătire**

Cantitatea de IFN- $\gamma$  din plasmă poate depăși adesea limitele superioare ale celor mai multe cititoare ELISA, chiar dacă indivizii suferă de o imunosupresie moderată. Recomandare: diluați probele de plasmă în soluție de 1:10 și/sau 1:100 cu Diluant verde și testați în aparatul ELISA împreună cu plasmă nediluată.

În situațiile în care pacienții suferă de imunosupresie crescută, e suficient să preparați și să testați doar o probă de plasmă nediluată pentru a obține un rezultat cantitativ.

**Notă:** Rezultatele probelor care se încadrează în intervalul QFM ELISA (mai precis, până la 10 UI/ml) trebuie utilizate pentru interpretarea rezultatelor. Se va raporta cea mai scăzută diluție care generează un rezultat în intervalul QFM ELISA (luând în calcul factorul de diluție) dacă plasma nediluată se situează deasupra intervalului QFM ELISA.

### **Procedură**

- 1. Toate probele de plasmă și toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100 $\times$ , trebuie aduse la temperatura camerei ( $22 \pm 5$  °C) înainte de utilizare. Lăsați-le cel puțin 60 de minute pentru echilibrare.**
- 2. Scoateți de pe suportul pentru microplăci stripurile care nu sunt necesare, ambalați-le la loc în punga de protecție și păstrați-le în frigider cât timp este necesar.**

Alocați cel puțin un strip pentru standardele QFM și stripuri suficiente pentru numărul de pacienți supuși testării. După utilizare, păstrați suportul și capacul în vederea utilizării împreună cu stripurile rămase.

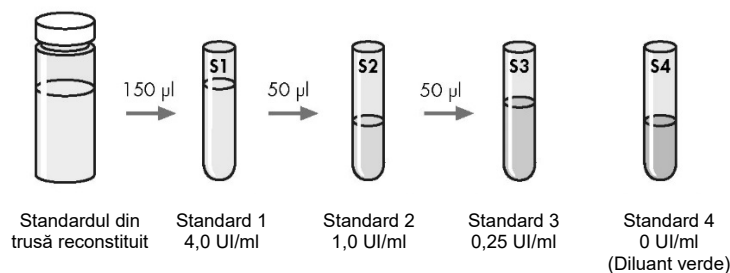
3. **Reconstituiți standardul IFN- $\gamma$  liofilizat cu volumul de apă deionizată sau distilată indicat pe eticheta flaconului standard. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura solubilizarea completă. Prin reconstituirea standardului la volumul indicat se va obține o soluție cu o concentrație de 8,0 UI/ml.**

**Important:** Volumul de reconstituire a standardului IFN- $\gamma$  din trusă diferă în funcție de lot. Consultați eticheta flaconului standard pentru a vă asigura că utilizați volumul corect de apă deionizată sau distilată.

Utilizați standardul din trusă reconstituit pentru a obține o serie de 1 la 2, urmată de o serie de 1 la 4 de diluții IFN- $\gamma$  în diluantul verde (GD) (vezi Figura 2). S1 (Standardul 1) conține 4,0 UI/ml, S2 (Standardul 2) conține 1,0 UI/ml, S3 (Standardul 3) conține 0,25 UI/ml și S4 (Standardul 4) conține 0 UI/ml (doar GD). Standardele trebuie testate în duplicat. Preparați diluții proaspete cu standard din trusă pentru fiecare sesiune de testare ELISA.

#### Procedura recomandată pentru standarde duplicate

- Etichetați 4 tuburi cu „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.
- Adăugați 150  $\mu$ l de GD în S1, S2, S3 și S4.
- Adăugați 150  $\mu$ l de standard din trusă în tubul S1 și amestecați bine.
- Transferați 50  $\mu$ l din tubul S1 în tubul S2 și amestecați bine.
- Transferați 50  $\mu$ l din tubul S2 în tubul S3 și amestecați bine.
- Diluantul Verde (GD) simplu servește ca standard zero (S4).



**Figura 2. Prepararea curbei standard.**

**4. Reconstituiți conjugatul concentrat 100× liofilizat cu 0,3 ml de apă deionizată sau distilată. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura solubilizarea completă a conjugatului.**

Concentrația de lucru a conjugatului se obține prin diluarea cantității necesare de conjugat concentrat 100× reconstituit în Diluant verde (Tabelul 1. Prepararea conjugatului). Readuceți conjugatul concentrat 100× neutilizat la o temperatură între 2 și 8 °C imediat după utilizare. Utilizați doar Diluant verde.

**Tabelul 1. Prepararea conjugatului**

Numărul de stripuri	Volumul de conjugat concentrat 100×	Volumul de Diluant verde
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. Pentru probele de plasmă recoltate din tuburile de recoltare a sângelui și ulterior stocate sau congelate, amestecați probele înainte de a le adăuga la godeul ELISA.**

**Important:** Dacă probele de plasmă se adaugă direct din tuburile QFM centrifugate, trebuie să evitați orice amestecare a plasmelor. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

**6. Recomandare: Probe de plasmă diluate 1:10.**

- Adăugați 90 µl de Diluant verde (GD) într-un tub etichetat cu detaliile pacientului și cu mențiunea „1:10”.
- Apoi, adăugați 10 µl de probe de plasmă amestecate (vezi pasul 5 pentru detalii despre probele de plasmă amestecate comparativ cu probele adăugate direct din tuburile centrifugate QFM).
- Amestecați temeinic cu pipeta, minimizând spumarea.

**7. Recomandare: Probe de plasmă diluate 1:100.**

- Preparați o diluție de 1:10 (vezi pasul 6 de mai sus).
- Adăugați 90 µl de Diluant verde într-un tub etichetat cu detaliile pacientului și cu mențiunea „1:100”.
- Adăugați 10 µl de diluție 1:10.
- Amestecați temeinic cu pipeta, minimizând spumarea.

**Recomandare: Testați următoarele probe în paralel, în această ordine:**

- Nediluată, 1:10, 1:100

Software-ul pentru analiză QFM acceptă și următoarele opțiuni pentru probele de la pacient:

- Nediluată
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Nediluată, 1:10

**8. Adăugați 50 µl de conjugat în concentrație de lucru proaspăt preparat în godeurile ELISA dorite folosind o pipetă multicanal.**

**9. Adăugați 50 µl din proba de plasmă de testat în godeurile corespunzătoare folosind o pipetă multicanal. Apoi, adăugați câte 50 µl din fiecare dintre standardele de la 1 la 4. Testați standardele în duplicat.**

**10. Acoperiți fiecare placă cu un capac și omogenizați temeinic conjugatul și probele de plasmă/standardele folosind un agitator pentru microplăci timp de 1 minut. Evitați stropirea.**

**11. Incubați la temperatura camerei ( $22 \pm 5$  °C) timp de  $120 \pm 5$  minute. Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării.**

- 12. În timpul incubării, diluați o (1) parte soluție tampon de spălare concentrată 20× cu 19 părți de apă deionizată sau distilată și omogenizați temeinic. A fost furnizată o cantitate suficientă de soluție tampon de spălare concentrată 20× pentru a prepara 2 litri de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru.**

Spălați godeurile cu 400 μl de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru timp de cel puțin 6 cicluri într-un spălător pentru microplăci. Este recomandat un spălător de plăci automat.

Spălarea temeinică este foarte importantă pentru reușita testului. Asigurați-vă că fiecare godeu este **umplut în întregime** cu soluție tampon de spălare pentru fiecare ciclu de spălare. Recomandare: Înmuiați godeurile timp de cel puțin 5 secunde între cicluri pentru rezultate optime.

Adăugați dezinfectant standard de laborator în rezervorul pentru efluent și urmați procedurile omologate pentru decontaminarea materialelor potențial infectioase.

- 13. Loviți ușor plăcile așezate cu fața în jos pe un prosop absorbant fără scame pentru a elimina soluția tampon de spălare reziduală. Adăugați 100 μl de soluție de substrat enzimatic în fiecare godeu, acoperiți fiecare placă cu un capac și amestecați bine, folosind un agitator pentru microplăci.**

- 14. Incubați la temperatura camerei ( $22 \pm 5$  °C) timp de 30 de minute.**

Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării.

- 15. După incubare, adăugați 50 μl de soluție de inhibitor enzimatic în fiecare godeu și amestecați bine, folosind un agitator pentru microplăci.**

Soluția de inhibitor enzimatic trebuie adăugată în godeuri în aceeași ordine și cu aproximativ aceeași viteză ca și la adăugarea soluției de substrat enzimatic de la pasul 13.

- 16. Măsurați Densitatea Optică (DO) în cel mult 5 minute de la stoparea reacției, utilizând un cititor de microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm, precum și un filtru de referință între 620 și 650 nm. Valorile DO sunt utilizate pentru calcularea rezultatelor.**

## Calculule și interpretarea testului

Pentru analiza datelor brute și calcularea rezultatelor, se folosește Software-ul pentru analiză QuantiFERON Monitor. Acesta este disponibil la [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Vă rugăm să vă asigurați că este utilizată cea mai nouă versiune a software-ului pentru analiză QuantiFERON Monitor.

Software-ul efectuează o evaluare a controlului calității testului, generează o curbă standard și furnizează rezultatul testului pentru fiecare subiect, așa cum este detaliat în secțiunea Interpretarea rezultatelor.

Dacă plasma nediluată depășește intervalul superior ( $> 10$  UI/ml) al QFM ELISA, software-ul de analiză QuantiFERON Monitor raportează cea mai scăzută diluție care generează un rezultat cuprins în intervalul QFM ELISA, luând în calcul factorul de diluție.

Ca o alternativă la utilizarea software-ului pentru analiză QuantiFERON Monitor, rezultatele pot fi obținute folosind metoda de mai jos.

## Generarea curbei standard

### (Dacă nu este utilizat software-ul pentru analiză QuantiFERON Monitor)

Determinați media valorilor DO ale duplicatelor standardului din trusă de pe fiecare placă.

Construiți o curbă standard  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  reprezentând grafic valoarea  $\log_{(e)}$  a mediei DO (axa-y) în raport cu valoarea  $\log_{(e)}$  a concentrației de IFN- $\gamma$  a standardelor în UI/ml (axa-x), omițând standardul zero din aceste calcule. Calculați linia care corespunde cel mai bine curbei standard prin analiza de regresie.

Utilizați curba standard pentru determinarea concentrației de IFN- $\gamma$  (UI/ml) pentru fiecare dintre probele de plasmă testate, utilizând valoarea DO a fiecărei probe.

Aceste calcule pot fi efectuate utilizând pachetele software disponibile împreună cu cititoarele de microplăci și un program de calcul tabelar sau un software statistic standard (ca de exemplu Microsoft® Excel®). Este recomandat ca aceste pachete să fie utilizate pentru a calcula analiza de regresie, coeficientul de variație (CV%) al standardelor și coeficientul de corelație ( $r$ ) al curbei standard.

Rezultatul raportat trebuie preluat de la cea mai redusă diluție care generează un rezultat încadrat în intervalul QFM ELISA (luând în considerare factorul de diluție) dacă plasma nediluată este deasupra intervalului.

## Controlul calității testului

Acuratețea rezultatelor testului depinde de generarea unei curbe standard exacte. Din acest motiv, rezultatele obținute pe baza standardelor trebuie examinate înainte ca rezultatele probelor testate să poată fi interpretate.

Pentru ca testul ELISA să fie valid:

- Valoarea medie a DO pentru Standardul 1 trebuie să fie  $\geq 0,600$ .
- CV% pentru valorile DO duplicate pentru Standardul 1 și Standardul 2 trebuie să fie  $\leq 15\%$ .
- Valorile DO duplicate pentru Standardul 3 și Standardul 4 nu trebuie să varieze cu mai mult de 0,040 unități de densitate optică față de media lor.
- Coeficientul de corelație ( $r$ ) calculat pe baza valorilor medii de absorbanță ale standardelor trebuie să fie  $\geq 0,98$ .

Software-ul pentru analiza QuantiFERON Monitor calculează și raportează acești parametri de control al calității.

Dacă criteriile de mai sus nu sunt îndeplinite, execuția testului este nevalidă și trebuie repetată.

Valoarea medie a DO pentru Standardul zero (Diluantul verde) trebuie să fie  $\leq 0,150$ . Dacă valoarea medie a DO este  $> 0,150$ , trebuie analizată procedura de spălare a plăcilor.

## Interpretarea rezultatelor

Rezultatele QFM se interpretează în funcție de răspunsul IFN- $\gamma$  la stimulenții răspunsului imun înnăscut și adaptativ. QFM este un test care reprezintă o măsurătoare atât cantitativă cât și calitativă a funcției imune. E posibil ca rezultatele QFM să nu cuantifice în mod direct nivelul de supresie imună.

**Important:** La stabilirea stării imune a unui subiect, nivelul măsurat de IFN- $\gamma$  trebuie utilizat în asociere cu prezentarea clinică, anamneza și alte evaluări diagnostice (Tabelul 2). Pragul testului QFM poate varia în funcție de nivelul de imunosupresie al subiectului și de condițiile individuale de transplant.

**Tabelul 2. Interpretarea rezultatelor**

<b>Rezultat QFM IFN-<math>\gamma</math> (UI/ml)</b>	<b>Clasificare</b>	<b>Interpretare</b>
< 15	Scăzut	Subiectul are un răspuns IFN- $\gamma$ scăzut la stimulenții răspunsului imun înnăscut și adaptativ
15–1.000	Moderat	Subiectul are un răspuns IFN- $\gamma$ moderat la stimulenții răspunsului imun înnăscut și adaptativ
> 1.000	Ridicat	Subiectul are un răspuns IFN- $\gamma$ ridicat la stimulenții răspunsului imun înnăscut și adaptativ

Dacă nivelul măsurat al IFN- $\gamma$  al unei probe de plasmă nediluate este mai mic de 0,1 UI/ml:

- Asigurați-vă că peletul QFM LyoSphere a fost adăugat în proba de sânge și că tubul a fost incubat în conformitate cu instrucțiunile din acest prospect.
- Asigurați-vă că rezultatul IFN- $\gamma$  corespunde cu starea clinică actuală a subiectului.

Dacă sunt suspectate probleme tehnice legate de recoltarea sau manipularea probelor de sânge, repetați întregul test QFM cu o probă de sânge nouă. Repetați testarea ELISA a probelor de plasmă stimulate dacă se suspectează că testul inițial a deviat de la procedura descrisă în acest prospect (vezi Controlul Calității a secțiunii de Testare pentru detalii).

Medicul poate opta pentru repetarea testării dacă rezultatele nu sunt consecvente cu starea clinică actuală a subiectului.

## Limitări

Rezultatele testului QFM trebuie interpretate împreună cu istoricul clinic, starea actuală de sănătate și alte evaluări de diagnosticare ale fiecărui individ. Laboratoarele pot opta să-și impună propriile intervale pentru test.

De asemenea, au posibilitatea de a efectua în paralel cu testarea probelor de pacient, un control cu o probă externă recoltată de la un subiect sănătos.

Rezultatele nefiabile sau inexacte se pot datora:

- Utilizării unui anticoagulant sanguin incorect — utilizați doar litiu-heparină deoarece alte anticoagulante interferează cu testul.
- Abaterii de la procedura descrisă în acest prospect.



- Nivelurilor excesive de IFN- $\gamma$  circulatorii sau prezența anticorpilor heterofili.
- Scurgerii unui interval de timp de peste 8 ore de la recoltarea probei de sânge până la incubarea la 37 °C.
- Umplerii tuburilor de recoltare a sângelui QFM cu o cantitate în afara intervalului cuprins între 0,9 și 1,1 ml.

## Caracteristici de performanță

### Studii clinice

Au fost efectuate două studii clinice pentru a evalua răspunsurile persoanelor aparent sănătoase (n = 114) comparativ cu pacienții cu transplant (n = 30). Dintre pacienții cu transplant, 18 au fost incluși în cohorta de post-transplant recent (Post-Tx recent, maxim 3 luni după transplant) și 12 au fost incluși în cohorta de post-transplant vechi sau stabil (Post-Tx vechi, > 12 luni după transplant).

- S-au recoltat probe în până la 5 momente de timp diferite de la fiecare persoană din cohorta Post-Tx recent (3 luni după transplant, n = 64 de probe).
- S-au recoltat probe o singură dată de la fiecare persoană din cohorta Post-Tx vechi (cohorta post-transplant vechi, n = 12 probe)
- S-au recoltat probe o singură dată de la fiecare subiect din cohorta cu persoanele aparent sănătoase (n = 114)

Răspunsurile la QFM au variat între scăzut și moderat atât la probele din cohorta Post-Tx recent, cât și la probele din cohorta Post-Tx vechi. Cohorta Post-Tx recent a înregistrat un procentaj mai mare (93,8%) de răspunsuri în intervalul scăzut, respectiv un procentaj mai mic de răspunsuri (6,3%) în intervalul moderat, comparativ cu răspunsurile din cohorta Post-Tx vechi, cu 25% dintre răspunsuri în intervalul scăzut și 66,7% în intervalul moderat (Tabelul 3). Niciunul dintre răspunsurile cohortei Post-Tx recent nu s-a încadrat în intervalul ridicat, în vreme ce un (1) singur răspuns (8,3%) din probele cohortei Post-Tx vechi s-a încadrat în intervalul de răspuns ridicat. Răspunsurile QFM în cadrul cohortei cu persoanele aparent sănătoase s-au încadrat în principal în intervalul de răspuns moderat (83,3%) și ridicat (15,8%) (Tabelul 3).

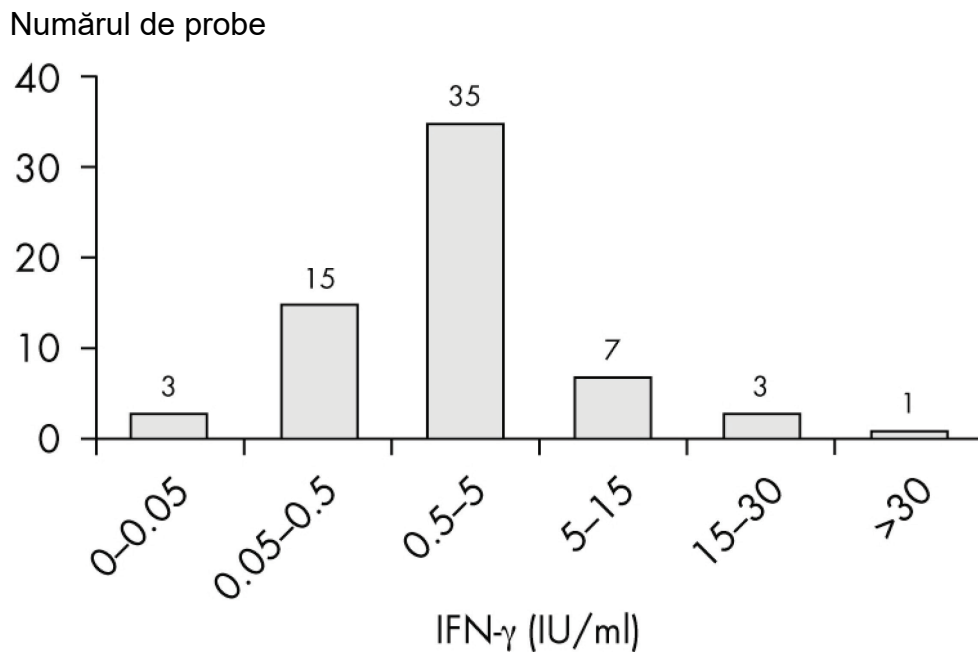
**Tabelul 3. Intervalul de răspuns la QFM la subiecți aparent sănătoși vs. pacienți cu transplant**

<b>IFN-<math>\gamma</math> (UI/ml)</b>	<b>Categorie rezultate</b>	<b>Post-Tx recent %* Î 95% n</b>	<b>Post-Tx vechi %* Î 95% n</b>	<b>Persoane aparent sănătoase %* Î 95% n</b>	<b>Rezultate totale</b>
< 15	Scăzut	93,8% 85,0–97,5 n = 60	25,0% 8,9–53,2 n = 3	0,9% 0,2–4,8 n = 1	<b>64</b>
15–1.000	Moderat	6,3% 2,5–15,0 n = 4	66,7% 39,1–86,2 n = 8	83,3% 75,4–89,1 n = 95	<b>107</b>
> 1.000	Ridicat	0,0% 0–5,7 n = 0	8,3% 1,5–35,4 n = 1	15,8% 10,2–23,6 n = 18	<b>19</b>
<b>Total probe</b>		<b>64</b>	<b>12</b>	<b>114</b>	<b>190</b>

\* Procentele indică proporția de probe din cadrul fiecărei cohorte de donatori care se încadrează în intervalul de răspunsuri respectiv.

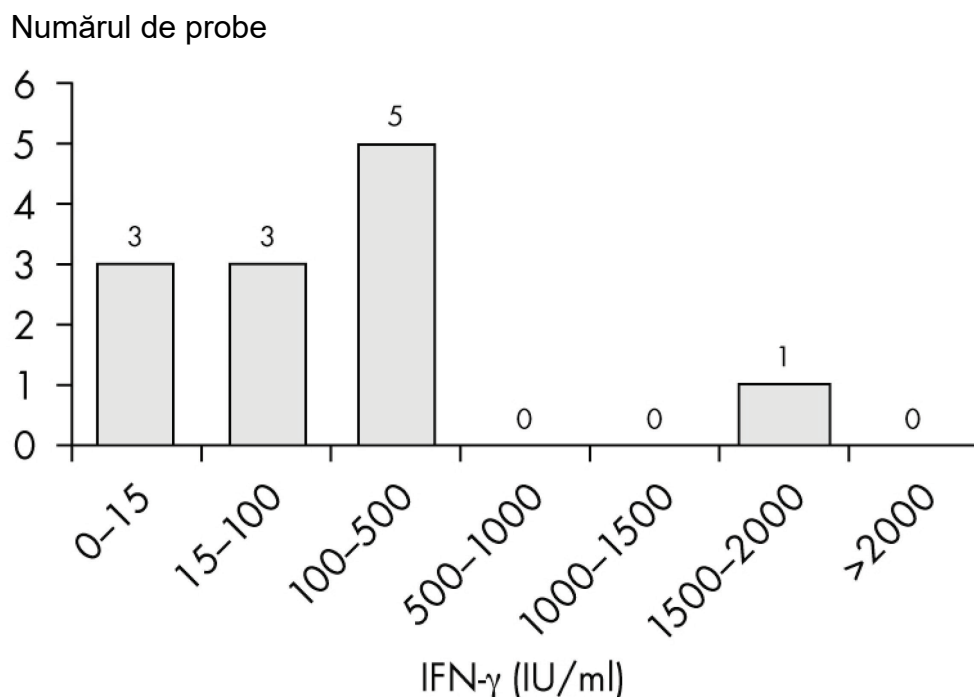
## Valori prognozate

Distribuția de răspunsuri IFN- $\gamma$  la QFM în cazul pacienților cu transplanturi recente (până la 3 luni post-transplant) a fost determinată pe baza a 64 de probe recoltate de la 18 pacienți cu transplant utilizând QFM ELISA (Figura 3).



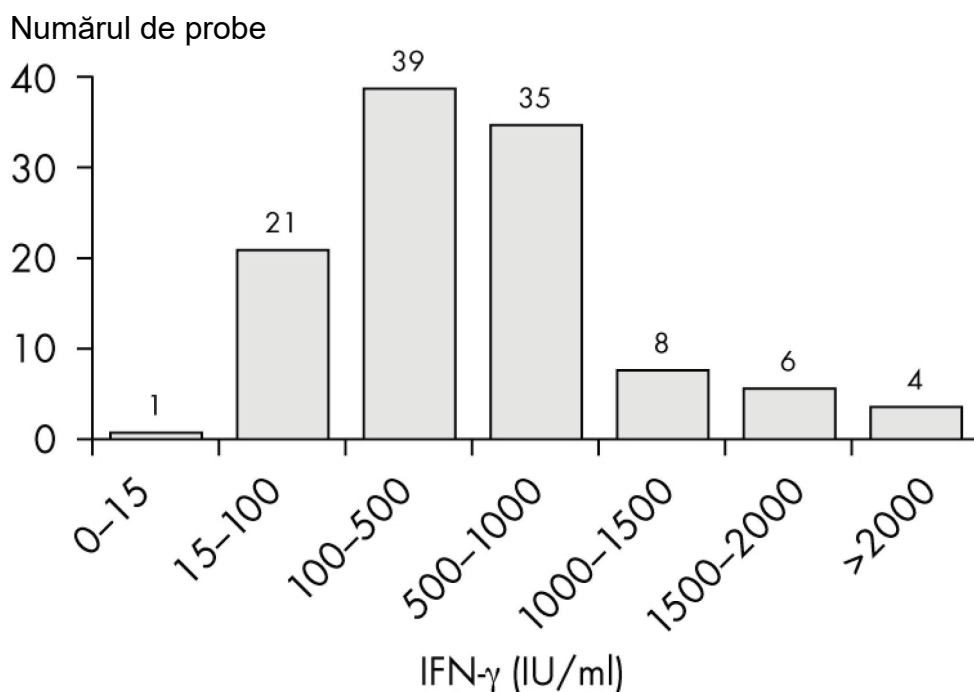
**Figura 3. Distribuția răspunsurilor QFM IFN- $\gamma$  la pacienții cu transplanturi recente (n = 64; mediana = 1,5 UI/ml).**

Distribuția de răspunsuri IFN- $\gamma$  la QFM în cazul pacienților cu transplanturi vechi (> 12 luni post-transplant) a fost determinată pe baza a 12 probe recoltate utilizând QFM ELISA (Figura 4).



**Figura 4. Distribuția răspunsurilor QFM IFN- $\gamma$  la pacienții cu transplanturi vechi (n = 12; mediana = 98,8 UI/ml).**

Distribuția de răspunsuri IFN- $\gamma$  la QuantiFERON Monitor în cazul persoanelor aparent sănătoase a fost determinată pe baza a 114 probe recoltate utilizând QFM ELISA (Figura 5).



**Figura 5. Distribuția răspunsurilor QFM IFN- $\gamma$  la persoane aparent sănătoase (n = 114; mediana = 400,5 UI/ml).**

## **Răspunsuri QFM la pacienții cu transplanturi de organe solide**

QFM a fost evaluat într-un studiu observațional, transversal la pacienți cu transplanturi de organe solide (4). Studiul a inclus: 212 subiecți sănătoși cu un subgrup de 30 de controale corelate ca vârstă și sex, 30 de pacienți pre-transplant, 18 pacienți post-transplant recent (66 de probe; durată mediană post-transplant = 21 de zile) și 11 pacienți post-transplant vechi (durată mediană post-transplant = 2290 de zile). Producția medie de IFN- $\gamma$  a fost de 555,2 UI/ml la controalele sănătoase și de 614,6 UI/ml la controalele corelate ca vârstă și sex. Producția medie de IFN- $\gamma$  a fost semnificativ mai scăzută atât la pacienții pre-transplant (IFN- $\gamma$ =89,3 UI/ml), cât și la pacienții post-transplant recent (IFN- $\gamma$ =3,76 UI/ml) comparativ cu controalele corelate ca vârstă și sex ( $p < 0,001$ ). S-a observat și demonstrat că restaurarea funcției imune la pacienții post-transplant vechi (IFN- $\gamma$  mediu = 256,1 UI/ml) a fost semnificativ mai bună decât la pacienții post-transplant recent ( $p < 0,05$ ). Acest studiu indică faptul că QFM poate fi utilizat pentru a evalua răspunsul imun mediat celular la persoanele cu imunosupresie care au suferit transplanturi de organe solide.

## Caracteristicile de performanță ale testului

Testul QFM ELISA s-a dovedit linear în condițiile poziționării aleatorii a 5 duplicate pentru 11 probe de plasmă cu concentrații de IFN- $\gamma$  cunoscute pe placa ELISA. Linia regresiei liniare are o pantă de  $1,002 \pm 0,011$  și un coeficient de corelație de 0,99 (Figura 6).

Limita de detecție a testului QFM ELISA este de 0,065 UI/ml și nu există dovezi de rezultate fals negative la doză ridicată (prozonă) pentru concentrații de IFN- $\gamma$  de până la 10.000 UI/ml.

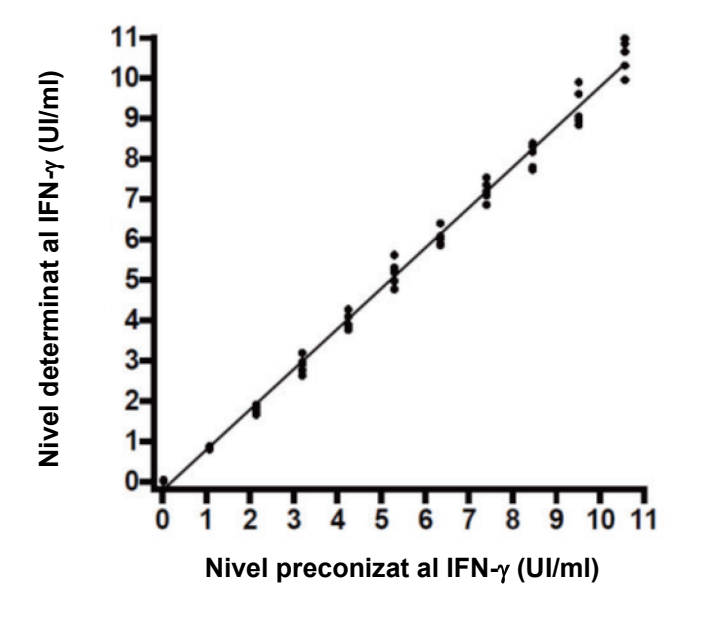


Figura 6. Profilul liniarității testului ELISA QFM determinat în urma testării a 5 duplicate pentru 11 probe de plasmă cu concentrații de IFN- $\gamma$  cunoscute.

Reproductibilitatea testului QFM (Etapa 1) a fost determinată utilizând probe de sânge de la 20 de subiecți sănătoși. S-au evaluat trei operatori diferiți, trei loturi QFM LyoSphere și trei seturi de echipamente. Coeficientul mediu de variație al nivelurilor de răspuns IFN- $\gamma$  determinat cu ajutorul QFM ELISA la toate cele trei loturi de QFM LyoSphere și pentru toate cele trei condiții testate a fost de 22,22% (IÎ 95%: 17,20–27,25).

Repetabilitatea testului QFM (Etapa 1) a fost evaluată prin măsurarea variabilității a 5–6 stimulări repetate de sânge cu LyoSphere de la același donor în cazul a 14 subiecți diferiți. Coeficientul mediu de variație pentru cei 14 subiecți testați a fost de 14,7% (IÎ 95%: 10,2–19,2). %CV pentru subiecții individuali a fost sub 30%.

Reproductibilitatea QFM ELISA (Etapa 2) a fost estimată în urma efectuării unui test pe 20 de probe de plasmă cu concentrații de IFN- $\gamma$  diferite în câte 3 duplicate, în 3 laboratoare diferite, în 3 zile neconsecutive și de către 3 operatori diferiți. Așadar, fiecare probă a fost testată de 27 de ori, în cadrul a 9 execuții de teste independente. Una dintre probe a fost un control Nil, iar

concentrația de IFN- $\gamma$  calculată pentru aceasta a fost de 0,08 UI/ml (Î 95%: 0,07–0,09). Pentru cele 19 probe de plasmă rămase, intervalul de concentrații a fost de 0,33 (Î 95%: 0,31–0,34) și 7,7 UI/ml (Î 95%: 7,48–7,92).

Imprecizia intra-test și inter-teste a fost estimată prin calcularea mediei CV% pentru fiecare probă de plasmă testată care conținea IFN- $\gamma$  din cadrul fiecărei analize a plăcii (n = 9), iar imprecizia era cuprinsă în intervalul 4,1–9,1 CV%. Media CV% ( $\pm$  95% Î) din cadrul testului a fost de  $6,6 \pm 0,6\%$ . Media plasmei cu zero IFN- $\gamma$  a fost de 14,1 CV%.

Imprecizia totală sau inter-teste a fost determinată prin compararea celor 27 de concentrații calculate de IFN- $\gamma$  pentru fiecare probă de plasmă. Imprecizia inter-teste a fost cuprinsă în intervalul 6,6–12,3 CV%. Media totală a CV% ( $\pm$  95% Î) a fost de  $8,7 \pm 0,7\%$ . Plasma cu zero IFN- $\gamma$  a avut un CV% de 26,1. Acest nivel de variație este preconizat deoarece concentrația de IFN- $\gamma$  calculată este mică, iar variația în jurul unei valori mici estimate pentru concentrație va fi mai mare decât în cazul concentrațiilor mai mari.

## **Informații tehnice**

### **Probe de plasmă coagulate**

În cazul în care apar cheaguri de fibrină în urma stocării pe termen lung a probelor de plasmă, centrifugați probele pentru a sedimenta substanța coagulată și a facilita pipetarea plasmei.

## Ghid de remediere a problemelor

Acest ghid de remediere a problemelor poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, consultați și Informațiile tehnice furnizate la adresa: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Pentru informații de contact, consultați coperta spate.

### Remediarea problemelor survenite la trusa ELISA

---

#### Colorare nespecifică

Cauză posibilă	Soluție
a) Spălare insuficientă a plăcii	Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
b) Contaminare încrucișată a godeurilor ELISA	Aveți grijă când pipetați sau amestecați proba pentru a minimaliza riscul.
c) Trusa/componentele a(u) expirat	Asigurați-vă că utilizați trusa înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100× reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii.
d) Soluția de substrat enzimatic este contaminată	Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi.
e) Amestecarea plasmelor în tuburile QFM înainte de recoltare	După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmelor înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

#### Valori scăzute ale densității optice a standardelor

Cauză posibilă	Soluție
a) Eroare la diluarea standardului	Asigurați-vă că diluțiile standardului din trusă sunt preparate corect, conform acestui prospect.
b) Eroare la pipetare	Asigurați-vă că pipetele sunt calibrate și utilizate conform instrucțiunilor producătorului.
c) Temperatură de incubare prea mică	Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (între 17 și 27 °C).



## Remedierea problemelor survenite la trusa ELISA

---

- |  |   |
|--|---|
| d) Timp de incubare prea scurt                               | Incubați placa cu conjugatul, standardele și probele timp de $120 \pm 5$ minute. Incubați soluția de substrat enzimatic pe placă timp de 30 de minute.  |
| e) Filtru necorespunzător utilizat pentru cititorul de plăci | Placa trebuie citită la 450 nm, cu un filtru de referință între 620 și 650 nm.  |
| f) Reactivii sunt prea reci                                  | Toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat $100\times$ , trebuie aduși la temperatura camerei înainte de începerea testării. Această operațiune durează aproximativ o oră.             |
| g) Trusa/componentele a(u) expirat                           | Asigurați-vă că utilizați trusa înainte de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat $100\times$ reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii. |

### Fond ridicat

- | Cauză posibilă                                    | Soluție  |
|---|--|
| a) Spălare insuficientă a plăcii                  | Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 $\mu$ l de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri. |
| b) Temperatură de incubare prea mare              | Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (între 17 și 27 °C).   |
| c) Trusa/componentele a(u) expirat                | Asigurați-vă că utilizați trusa înainte de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat $100\times$ reconstituite sunt utilizate în cel mult trei luni de la data reconstituirii.   |
| d) Soluția de substrat enzimatic este contaminată | Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi.  |

## Remedierea problemelor survenite la trusa ELISA

---

### Curbă standard neliniară și variabilitate între duplicate

Cauză posibilă	Soluție
a) Spălare insuficientă a plăcii	Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
b) Eroare la diluarea standardului	Asigurați-vă că diluțiile standardului sunt preparate corect, conform acestui prospect.
c) Amestecare insuficientă	Amestecați bine reactivii prin răsturnarea acestora sau cu mișcări circulare înaintea adăugării lor pe plăcuță.
d) Tehnică de pipetare inconsecventă sau întrerupere în timpul configurării testului	Adăugarea probei și a standardului trebuie efectuată în mod continuu. Toți reactivii trebuie preparați înainte de a începe testul.

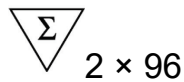
**Informațiile despre produs și îndrumările tehnice vă sunt puse la dispoziție gratuit de către QIAGEN, prin intermediul distribuitorului dvs., sau al site-ului [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).**

## Referințe

Găsiți o listă integrală cu referințele QFM pe site-ul Gnowee — biblioteca QuantiFERON, la adresa [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net).

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7<sup>th</sup> 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.

## Simboluri



Suficiente pentru 2 × 96 preparări de probe



Producător legal



Simbol marcat CE-IVD



A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro



Cod lot



Număr catalog



Termen de valabilitate



Limitări de temperatură



Consultați instrucțiunile de utilizare



A nu se refolosi



A se păstra ferit de razele soarelui



Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană

## Date de contact

Pentru asistență tehnică și mai multe informații, sunați la numărul gratuit 00800-22-44-6000, vizitați site-ul web al Centrului de Asistență Tehnică la [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) sau contactați unul dintre Departamentele de Servicii Tehnice QIAGEN (afișate pe verso și pe site-ul web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Procedura de testare pe scurt

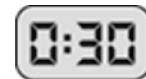
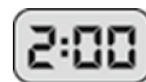
## Etapa 1 — incubarea sângelui

1. Recoltați sângele pacientului fie într-un tub de recoltare a sângelui QFM, fie într-un tub de recoltare a sângelui cu litiu-heparină. Etichetați tuburile cu detaliile pacientului și ora recoltării sângelui, apoi transportați-le la laborator la temperatura camerei în decurs de 8 ore de la recoltare.
  - a. Dacă sângele a fost recoltat într-un tub de recoltare a sângelui cu litiu-heparină, turnați 1 ml de sânge într-un tub de recoltare a sângelui QFM și etichetați tubul cu detaliile pacientului și ora recoltării sângelui
2. Adăugați câte 1 pelet QFM LyoSphere în fiecare tub de recoltare a sângelui QFM ce conține 1 ml de sânge, dizolvați LyoSphere, apoi incubați tuburile cât mai curând posibil (în decurs de 8 ore de la recoltarea sângelui) în poziție **verticală** timp de 16–24 de ore la 37 °C.
3. După incubare, centrifugați tuburile timp de 15 minute la 2.000 până la 3.000 × *g* (RCF) pentru a separa plasma și hematiile.
4. După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.



## Etapa 2 — testul ELISA pentru IFN- $\gamma$

1. Aduceți componentele trusei ELISA, cu excepția conjugatului concentrat 100 $\times$ , la temperatura camerei timp de cel puțin 60 de minute.
2. Reconstituiți standardul din trusă la o concentrație de 8,0 UI/ml cu apă distilată sau deionizată. Preparați 4 diluții ale standardului.
3. Reconstituiți conjugatul concentrat 100 $\times$  liofilizat cu apă distilată sau deionizată.
4. Preparați conjugatul în concentrație de lucru în Diluant verde și adăugați 50  $\mu$ l în toate godeurile.
5. Adăugați 50  $\mu$ l de probe de plasmă test (nediluate, în diluție de 1:10, respectiv 1:100 în funcție de necesități) și 50  $\mu$ l de standarde în godeurile corespunzătoare. Amestecați folosind agitatorul.
6. Incubați timp de 120  $\pm$  5 de minute la temperatura camerei.
7. Spălați godeurile de cel puțin 6 ori cu 400  $\mu$ l de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu.
8. Adăugați 100  $\mu$ l de soluție de substrat enzimatic în godeuri. Amestecați folosind agitatorul.
9. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei.
10. Adăugați 50  $\mu$ l de soluție de inhibitor enzimatic în toate godeurile. Amestecați folosind agitatorul.
11. Citiți rezultatele la 450 nm folosind un filtru de referință între 620 și 650 nm.
12. Analizați rezultatele.



## Notiçe

## Modificări semnificative

Modificările semnificative din această ediție a prospectului QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA sunt rezumate în tabelul de mai jos:

<b>Secțiune</b>	<b>Pagină</b>	<b>Modificare/Modificări</b>
Precauții	11	Informații noi GHS
Precauții	12	Instrucțiuni de siguranță adăugate cu privire la flacoanele care au capace cu sigiliu.





Mărci comerciale: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (Grupul QIAGEN); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLyph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

#### **Acord de licență limitată pentru trusa QuantiFERON Monitor**

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în trusă. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în această trusă cu orice componentă care nu este inclusă în această trusă, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că această trusă și/sau utilizarea (utilizările) acesteia nu încalcă drepturile terților.
3. Această trusă și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul trusei acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de trusă și/sau componentele acesteia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2014 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ [techservice-au@qiagen.com](mailto:techservice-au@qiagen.com)

**Austria** ■ [techservice-at@qiagen.com](mailto:techservice-at@qiagen.com)

**Belgium** ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

**Brazil** ■ [suportetecnico.brasil@qiagen.com](mailto:suportetecnico.brasil@qiagen.com)

**Canada** ■ [techservice-ca@qiagen.com](mailto:techservice-ca@qiagen.com)

**China** ■ [techservice-cn@qiagen.com](mailto:techservice-cn@qiagen.com)

**Denmark** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**Finland** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**France** ■ [techservice-fr@qiagen.com](mailto:techservice-fr@qiagen.com)

**Germany** ■ [techservice-de@qiagen.com](mailto:techservice-de@qiagen.com)

**Hong Kong** ■ [techservice-hk@qiagen.com](mailto:techservice-hk@qiagen.com)

**India** ■ [techservice-india@qiagen.com](mailto:techservice-india@qiagen.com)

**Ireland** ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

**Italy** ■ [techservice-it@qiagen.com](mailto:techservice-it@qiagen.com)

**Japan** ■ [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

**Korea (South)** ■ [techservice-kr@qiagen.com](mailto:techservice-kr@qiagen.com)

**Luxembourg** ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

**Mexico** ■ [techservice-mx@qiagen.com](mailto:techservice-mx@qiagen.com)

**The Netherlands** ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

**Norway** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**Singapore** ■ [techservice-sg@qiagen.com](mailto:techservice-sg@qiagen.com)

**Sweden** ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

**Switzerland** ■ [techservice-ch@qiagen.com](mailto:techservice-ch@qiagen.com)

**UK** ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

