

Travanj 2022.

# Upute za uporabu za komplet QuantiFERON<sup>®</sup> SARS-CoV-2 ELISA Kit



2 x 96

Inačica 1



Za in vitro dijagnostičku uporabu

Za uporabu s epruветama za uzimanje krvi QuantiFERON<sup>®</sup>  
SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes



626420



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, USA  
Telefon: +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724  
Hilden, Germany



1124420HR



# Sadržaj

Predviđena uporaba .....	5
Predviđeni korisnik .....	6
Opis i načelo.....	7
<b>Sažetak i objašnjenje .....</b>	<b>7</b>
Uključeni materijali .....	9
<b>Sadržaj kompleta .....</b>	<b>9</b>
Dijelovi kompleta .....	10
Platforma i softver .....	10
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	11
Dodatni reagensi.....	11
Oprema .....	11
Upozorenja i mjere opreza .....	12
Sigurnosne informacije.....	12
Mjere opreza .....	13
Pohrana i rukovanje reagensima .....	16
Stabilnost tijekom uporabe .....	16
Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi .....	16
Pohrana i rukovanje ispitcima.....	17
Postupak: izvođenje ELISA testa .....	18
<b>Protokol: IFN-<math>\gamma</math> ELISA .....</b>	<b>18</b>
Rezultati (izračuni).....	23
<b>Generiranje standardne krivulje i vrijednosti uzoraka .....</b>	<b>23</b>

---

<b>Kontrola kvalitete testa</b> .....	25
Tumačenje rezultata .....	27
Ograničenja .....	28
Radne značajke ispitivanja .....	29
<b>Analitičke radne značajke</b> .....	29
Kliničke radne značajke .....	38
Referencije .....	45
Vodič za rješavanje problema .....	50
Simboli .....	53
Kontaktни podaci .....	54
Dodatak A: Tehnički podaci .....	55
<b>Neodređeni rezultati</b> .....	55
<b>Zgrušani uzorci plazme</b> .....	55
<b>Uzorci lipemične plazme</b> .....	55
Dodatak B: Skraćeni testni postupak ELISA .....	56
Informacije za naručivanje .....	58
Povijest revizija dokumenta .....	59

# Predviđena uporaba

Ispitivanje QuantiFERON SARS-CoV-2 assay in vitro je dijagnostički test namijenjen za kvalitativno otkrivanje interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) koji proizvode CD4+ i CD8+ T-stanice kao odgovor na stimulaciju koktelom peptida virusa SARS-CoV-2 u hepariniziranoj punoj krvi. Količina proizvedenog IFN-  $\gamma$  mjeri se enzimski vezanim imunosorbentnim ispitivanjem (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

Ispitivanje QuantiFERON SARS-CoV-2 assay namijenjeno je da se upotrebljava kao pomoć u procjeni stanično posredovanih imunskih (cell-mediated immune, CMI) odgovora u osoba bez povijesti infekcije virusom SARS-CoV-2 koje su cijepljene protiv bolesti COVID-19 cjepivima koja ciljaju na virusni protein šiljka (spike protein, S) virusa SARS-CoV-2.

Ispitivanje QuantiFERON SARS-CoV-2 trebalo bi se upotrebljavati u kombinaciji s drugim laboratorijskim testovima te epidemiološkom/kliničkom procjenom za procjenu imunskog odgovora osobe uslijed cijepljenja protiv bolesti COVID-19.

Možda će trebati nekoliko dana nakon cijepljenja da se razviju imunski odgovori T-stanica, iako trajanje prisutnosti imunskih odgovora T-stanica nije dobro karakterizirano u cijepljenih osoba.

Nereaktivni rezultati ne isključuju aktivnu infekciju virusom SARS-CoV-2 niti utvrđuju djelotvornost cjepiva protiv bolesti COVID-19. Ako se sumnja na aktivnu infekciju, potvrdite uporabom drugog molekularnog ili antigenskog testa za SARS-CoV-2. Rezultati ispitivanja uvijek bi se trebali upotrebljavati u kombinaciji s kliničkim pregledom, povijesti bolesti pacijenta i drugim nalazima.

Za in vitro dijagnostičku uporabu.

---

## Predviđeni korisnik

Ovaj komplet namijenjen je za profesionalnu uporabu.

Proizvod smije upotrebljavati samo osoblje koje je primilo posebne upute i obučeno je za tehnike molekularne biologije te je upoznato s navedenom tehnologijom.

# Opis i načelo

## Sažetak i objašnjenje

QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) kvalitativno je ispitivanje pri kojemu se upotrebljavaju specijalizirane epruvete za uzimanje krvi koje sadržavaju peptidne antigene koji stimuliraju imunosne stanice primjenom proteina specifičnih za SARS CoV-2. Krv se inkubira u epruvetama od 16 do 24 sata, nakon čega se izdvaja plazma i testira na prisutnost IFN- $\gamma$  proizvedenog kao odgovor na peptidne antigene. Specifični odgovori na infekciju virusom SARS-CoV-2 posredovani T-stanicama zabilježeni su nakon cijepljenja različitim vrstama cjepiva koja ciljaju na protein šiljka [1–34].

Najprije se puna krv prikuplja u svaku od epruveta za uzimanje krvi QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes, što uključuje Nil epruvetu, epruvetu Ag1, epruvetu Ag2 i Mitogen epruvetu. Druga je mogućnost prikupljanje krvi u jednu epruvetu za uzimanje krvi koja sadržava litij-heparin ili natrij-heparin kao antikoagulans, nakon čega se krv prenosi u epruvete QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes.

Epruvete QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes trebaju se protresti kako bi se antigen izmiješao s krvi te ih treba što prije i u roku od 16 sati od prikupljanja krvi inkubirati na temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon inkubacije u trajanju od 16 do 24 sata epruvete se centrifugiraju, plazma se obrađuje te se ELISA testom mjeri količina IFN- $\gamma$  (IU/ml). U QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA testu upotrebljava se rekombinantni humani IFN- $\gamma$  standard, koji je ispitan u odnosu na referentni IFN- $\gamma$  pripravak (NIH ref.: Gxg01-902-535). Rezultati testnih uzoraka izražavaju se u međunarodnim jedinicama po mililitru (IU/ml) u odnosu na standardnu krivulju pripremljenu testiranjem razrjeđivanja standarda isporučenog s kompletom.

---

Heterofilna (npr. humana anti-mišja) protutijela u serumu ili plazmi određenih osoba mogu uzrokovati smetnje u imunoispitivanjima. Djelovanje heterofilnih protutijela u QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA testu umanjeno je dodavanjem običnog mišjeg seruma u Green Diluent i uporabom fragmenata F(ab')<sub>2</sub> monoklonskog protutijela kao protutijela za hvatanje IFN- $\gamma$  koje je naneseo u jažice na mikrotitar pločicama.

Uzorak plazme iz Mitogen epruvete služi kao pozitivna kontrola IFN- $\gamma$  svakog testiranog ispitka. Nil epruveta prilagođava se za pozadinu (npr. povišene razine cirkulirajućeg IFN-g ili prisutnost heterofilnih protutijela). Razina IFN- $\gamma$  u Nil epruveti oduzima se od razine IFN- $\gamma$  za epruvete Ag1, Ag2 i Mitogen.



# Uključeni materijali

## Sadržaj kompleta

<b>ELISA komponente</b>	<b>Komplet s 2 pločice</b>
<b>Kataloški br.</b>	<b>626420</b>
Microplate strips (Mikrotitar stripovi) (12 x 8 jažica) obloženi mišjim antihumanim IFN- $\gamma$ monoklonskim protutijelom	2 kompleta mikrotitar stripova s 12 x 8 jažica
IFN- $\gamma$ Standard (IFN- $\gamma$ standard), liofiliziran (sadržava rekombinantni humani IFN- $\gamma$ , goveđi kazein, 0,01 % w/v timerosala)	1 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituira)
Green Diluent (Zeleni diluents) (sadržava goveđi kazein, obični serum miša, 0,01 % w/v timerosala)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (100x koncentrirani konjugat), liofiliziran (mišji antihumani IFN- $\gamma$ HRP, sadržava 0,01 % timerosala)	1 x 0,3 ml (kada se rekonstituira)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x koncentrirani pufer za ispiranje) (pH 7,2, sadržava 0,05 % v/v sredstva ProClin <sup>®</sup> 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Otopina enzimskog supstrata) (sadržava H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimaska otopina za zaustavljanje reakcije) (sadržava 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )*	1 x 15 ml
<i>Upute za uporabu za komplet QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit</i>	1

\* Sadržava sumpornu kiselinu

---

## Dijelovi kompleta

### Kontrole i kalibratori

U QFN SARS ELISA testu upotrebljava se rekombinantni humani IFN- $\gamma$  standard, koji je ispitan u odnosu na referentni IFN- $\gamma$  pripravak (NIH ref.: Gxg01-902-535).

### Platforma i softver

Softver za analizu QFN SARS Analysis Software opcionalan je za uporabu i može se upotrebljavati za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata. Dostupan je za preuzimanje na **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

## Dodatni reagensi

- deionizirana ili destilirana voda, 2 litre

## Oprema\*

- inkubator za temperaturu od  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  (s ili bez  $\text{CO}_2$ )
- kalibrirane pipete s varijabilnim volumenom za doziranje od 10  $\mu\text{l}$  do 1000  $\mu\text{l}$ , s jednokratnim vršcima
- kalibrirane višekanalne pipete za doziranje 50  $\mu\text{l}$  i 100  $\mu\text{l}$  s jednokratnim vršcima
- tresilica za mikrotitar pločice brzine od 500 i 1000 o/min
- uređaj za ispiranje mikrotitar pločica (radi sigurnosti prilikom rukovanja uzorcima plazme preporučuje se automatizirani uređaj za ispiranje pločica)
- čitač mikrotitar pločica s filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm
- vorteks miješalica varijabilne brzine
- centrifuga koja može centrifugirati epruvete za uzimanje krvi pri najmanje 3000 RCF (g)
- menzura, 1 litra ili 2 litre
- poklopac pločice
- upijajući ručnici koji ne otpuštaju vlakna

\* Prije uporabe provjerite jesu li instrumenti provjereni i kalibrirani prema preporukama proizvođača.

# Upozorenja i mjere opreza

Imajte na umu da kupci u Europskoj uniji ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s uređajem moraju prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj se korisnik i/ili pacijent nalaze.


## Sigurnosne informacije

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list za svaki komplet i komponentu kompleta QIAGEN.

- Sve kemikalije i biološki materijali potencijalno su opasni. Ispitci i uzorci potencijalno su zarazni te se njima mora rukovati kao biološki opasnim materijalom.
- Odlazite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim postupcima.
- Ispitci i uzorci potencijalno su zarazni. Odlazite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim postupcima.
- Ispitivanje QFN SARS trebalo bi se upotrebljavati u kombinaciji s drugim laboratorijskim testovima te epidemiološkom/kliničkom procjenom za procjenu imunskog odgovora osobe uslijed cijepljenja protiv bolesti COVID-19.
- Nereaktivni rezultat ispitivanja QFN SARS ne isključuje mogućnost infekcije virusom SARS-CoV-2 niti utvrđuje djelotvornost cjepiva protiv bolesti COVID-19. Lažni nereaktivni rezultati mogu biti posljedica neispravnog rukovanja epruvetama za uzimanje krvi nakon venepunkcije, neispravnog provođenja ispitivanja ili drugih pojedinačnih imunskih varijabli uključujući one koje se odnose na bilo kakve komorbiditete. Proizvodnja heterofilnih protutijela ili nespecifičnog IFN- $\gamma$  uzrokovana drugim upalnim stanjima može prikriti specifične odgovore na peptide virusa SARS-CoV-2.

- Reaktivan rezultat ispitivanja QFN SARS ne bi trebao biti jedina ili definitivna osnova za utvrđivanje djelotvornosti cjepiva protiv bolesti COVID-19. Neispravno provođenje ispitivanja može prouzročiti lažno reaktivne rezultate ispitivanja QFN SARS.
- Lažno reaktivni rezultat ispitivanja QFN SARS može biti uzrokovan neispravnim uzimanjem uzorka krvi ili neispravnim rukovanjem ispitkom koji utječu na funkciju limfocita. Pogledajte odjeljak „Postupak: izvođenje ELISA testa” na stranici 18 za ispravno rukovanje ispitcima krvi. Kašnjenje u inkubaciji može uzrokovati lažno nereaktivne ili neodređene rezultate, a drugi tehnički parametri mogu utjecati na sposobnost otkrivanja znatnog odgovora IFN- $\gamma$ .
- Slab odgovor na Mitogen ( $< 0,5$  IU/ml) ukazuje na neodređeni rezultat ako uzorak krvi pokazuje i nereaktivni odgovor na proteine virusa SARS CoV-2. Taj obrazac može nastati u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita zbog nepravilnog postupanja s ispitkom, punjenja/miješanja Mitogen epruvete ili nemogućnosti limfocita pacijenta da stvore IFN- $\gamma$ . Do povišenih razina IFN- $\gamma$  u Nil uzorku može doći u slučaju prisutnosti heterofilnih protutijela ili intrinzičnog lučenja IFN- $\gamma$ .

## Mjere opreza

<p><b>OPREZ</b></p> 	<p>S ljudskom krvlju postupajte kao s potencijalno infektivnom.</p> <p>Pridržavajte se odgovarajućih smjernica o postupanju s krvlju. Uzorke i materijale koji dolaze u kontakt s krvlju ili krvnim proizvodima zbrinite sukladno državnim i lokalnim propisima.</p>
---	--

### QuantIFERON Enzyme Stopping Solution



Sadržava: sumpornu kiselinu. Upozorenje! Može imati korozivno djelovanje na metale. Uzrokuje nadraživanje kože. Uzrokuje ozbiljno nadraživanje očiju. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

### QuantIFERON Enzyme Substrate Solution

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

### QuantIFERON Green Diluent



Sadržava: tartrazin. Upozorenje! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

### QuantIFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Izbjegavajte ispuštanje u okoliš.

## Dodatne informacije

Sigurnosno-tehnički listovi: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- Timerosal se upotrebljava kao konzervans u nekim QFN SARS reagensima. Može biti otrovan ako ga se proguta, udahne ili u dodiru s kožom.
- Odstupanja od *Uputa za uporabu za komplet QuantIFERON ELISA Kit* mogu dati pogrešne rezultate. Prije upotrebe pažljivo pročitajte upute.
- Nemojte upotrebljavati komplet ako bilo koja bočica reagensa pokazuje znakove oštećenja ili curenja prije upotrebe.
- **Važno:** pregledajte bočice prije upotrebe. Nemojte upotrebljavati bočice za konjugat ili IFN- $\gamma$  standard ako bočice pokazuju znakove oštećenja ili ako je gumena brtva oštećena. Nemojte rukovati razbijenim bočicama. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza i odložite bočice na siguran način. Preporučuje se da bočice za konjugat ili IFN- $\gamma$  standard otvarate s pomoću alata za skidanje osigurača na bočicama radi smanjenja opasnosti od ozljeda uzrokovanih poklopcem s metalnim osiguračem.

- 
- Nemojte miješati ili upotrebljavati mikrotitar stripove, IFN- $\gamma$  standard, diluens Green Diluent ili 100x koncentrirani konjugat iz različitih serija kompleta QFN SARS. Ostali reagensi (20x koncentrirani pufer za ispiranje, otopina enzimskog supstrata i enzimska otopina za zaustavljanje odgovora) iz drugih kompleta mogu se mijenjati, pod uvjetom da reagensi ne prekoračuju datum isteka roka trajanja i da se podaci o seriji zabilježe.
  - Odložite neupotrijebljene reagense i biološke uzorke u skladu s lokalnim i državnim propisima.
  - Nemojte upotrebljavati komplet QFN SARS ELISA nakon datuma isteka roka trajanja.
  - Uvijek se morate pridržavati pravilnih laboratorijskih postupaka.
  - Provjerite je li laboratorijska oprema kao što su uređaji za ispiranje i čitači pločica kalibrirana/potvrđena za upotrebu.

---

# Pohrana i rukovanje reagensima

Potrebno je paziti na rokove trajanja i uvjete pohrane ispisane na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.

## Stabilnost tijekom uporabe

- Čuvajte komplet ELISA na temperaturi od 2 – 8 °C.
- Otopinu enzimskog supstrata uvijek zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.

## Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi

- Upute o rekonstituiranju reagensa potražite u odjeljku „Postupak: izvođenje ELISA testa” na stranici 18.
- Rekonstituirani standard iz kompleta može se čuvati do 3 mjeseca ako je pohranjen na temperaturi od 2 – 8 °C.  
Zabilježite datum rekonstitucije standarda iz kompleta.
- Rekonstituirani 100X koncentrirani konjugat mora se i dalje čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C i potrošiti u roku od 3 mjeseca.  
Zabilježite datum rekonstitucije konjugata.
- Konjugat jakosti za upotrebu mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
- Pufer za ispiranje jakosti za upotrebu može se čuvati na sobnoj temperaturi do 2 tjedna.



---

## Pohrana i rukovanje ispocima

Pogledajte *Upute za uporabu za QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes* (1124422) za pojedinosti o tijeku rada za uzimanje krvi za QFN SARS test.

# Postupak: izvođenje ELISA testa

## Protokol: IFN- $\gamma$ ELISA

### Važne točke

- Pogledajte Sadržaj kompleta na stranici 9 i Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni na stranici 11 za materijale potrebne za izvođenje ELISA testa.

### Postavljanje (vrijeme potrebno za izvođenje ispitivanja)

Da bi dobio valjane rezultate ispitivanja QFN SARS assay, rukovatelj treba izvršiti određene zadatke unutar zadanog vremena. Preporučuje se da rukovatelj prije uporabe ispitivanja pomno isplanira svaku fazu ispitivanja kako bi si ostavio dovoljno vremena da provede svaku fazu. U nastavku se navodi procijenjeno potrebno vrijeme; naznačeno je i vrijeme testiranja većeg broja uzoraka metodom skupne obrade.

- približno 3 sata za jednu ELISA pločicu
- < 1 sat rada
- dodajte 10 do 15 minuta za svaku dodatnu pločicu

### Postupak

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, prije uporabe moraju postići sobnu temperaturu ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ostavite najmanje 60 minuta za postizanje toplinske ravnoteže.
2. Uklonite nepotrebne stripove ELISA pločice s okvira, vratite ih u vrećicu od folije i pohranite ih do uporabe u hladnjaku.
3. Pripremite najmanje 1 strip za QFN SARS standarde i dovoljan broj stripova za broj ispitanika koji se testiraju (pogledajte sliku 2. za preporučeni format pločice). Nakon upotrebe sačuvajte okvir i poklopac za uporabu s preostalim stripovima.

- 3a. Rekonstituirajte IFN- $\gamma$  standard količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na naljepnici bočice. Pažljivo promiješajte kako biste stvaranje pjene sveli na najmanju moguću mjeru i provjerite je li cijeli sadržaj bočice potpuno otopljen. Rekonstitucijom IFN- $\gamma$  standarda na točan volumen dobivamo otopinu koncentracije 8,0 IU/ml.
- 3b. S pomoću rekonstituiranog standarda pripremite niz razrjeđivanja od 4 koncentracije IFN- $\gamma$  (pogledajte sliku 1.).
- 3c. Trebala bi se generirati standardna krivulja sa sljedećim koncentracijama IFN- $\gamma$ :
- S1 (Standard 1) sadržava 4,0 IU/ml
  - S2 (Standard 2) sadržava 1,0 IU/ml
  - S3 (Standard 3) sadržava 0,25 IU/ml
  - S4 (Standard 4) sadržava 0 IU/ml (samo zeleni diluens [Green Diluent, GD]).
- 3d. Standardi se moraju ispitati barem u duplikatu.
- 3e. Pripremite svježe razrijeđene otopine standarda iz kompleta za svaki postupak ELISA.

Postupak	
A	Označite 4 epruvete: S1, S2, S3, S4
B	Dodajte 150 $\mu$ l GD-a u S1, S2, S3, S4
C	Dodajte 150 $\mu$ l standarda iz kompleta u S1 i dobro promiješajte
D	Prenesite 50 $\mu$ l iz S1 u S2 i dobro promiješajte
E	Prenesite 50 $\mu$ l iz S2 u S3 i dobro promiješajte
F	Samo GD služi kao nulti standard (S4)



**Slika 1. Pripremanje niza razrjeđivanja standardne krivulje.**

4. Rekonstituirajte liofilizirani 100x koncentrirani konjugat s 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Pažljivo promiješajte kako biste stvaranje pjene sveli na najmanju moguću mjeru i provjerite je li cijeli sadržaj bočice potpuno otopljen.
  - 4a. Konjugat jakosti za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100x koncentriranog konjugata razrijedi u diluensu Green Diluent (tablica 1.).
  - 4b. Konjugat jakosti za upotrebu treba se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
  - 4c. Neupotrijebljeni 100x koncentrirani konjugat odmah nakon upotrebe vratite na temperaturu od 2 – 8 °C.

**Tablica 1. Priprema konjugata (jakosti za upotrebu)**

Broj stripova	Volumen konjugata (koncentriran 100x)	Količina diluensa Green Diluent
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. Kad je riječ o uzorcima plazme izdvojenima iz epruveta za uzimanje krvi i zatim pohranjenima (u hladnjak ili zamrzivač), prije dodavanja u ELISA jažicu dobro promiješajte pohranjeni uzorak. Uzorci plazme mogu se čuvati u centrifugiranim epruvetama QFN SARS Blood Collection Tubes do 28 dana na temperaturi od

2 – 8 °C, a uzorci izdvojene plazme mogu se čuvati do 28 dana na temperaturi od 2 – 8 °C. Uzorci izdvojene plazme mogu se čuvati i na temperaturi ispod –20 °C (po mogućnosti nižoj od –70 °C) maksimalno 24 mjeseca.

Uzorci plazme mogu se prenijeti/upotrijebiti izravno iz centrifugiranih epruveta za uzimanje krvi radi mjerenja na QFN SARS ELISA pločici.

**Važno:** ako se uzorci plazme planiraju izravno prenijeti iz centrifugiranih epruveta QFN SARS Blood Collection Tubes, potrebno je izbjegavati bilo kakvo miješanje plazme.

Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

6. Dodajte 50 µl svježe pripremljenog konjugata jakosti za upotrebu u svaku jažicu ELISA pločice.
7. Dodajte 50 µl testnih uzoraka plazme u odgovarajuće jažice (pogledajte preporučeni raspored na ELISA pločici na slici 2.).
8. Konačno, dodajte 50 µl svakog standarda od 1 do 4 u odgovarajuće jažice na pločici (pogledajte preporučeni raspored na ELISA pločici na slici 2.). Standarde treba ispitati najmanje u duplikatu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
<b>B</b>	1 Ag1	3 Ag1	5 Ag1	7 Ag1	9 Ag1	S2	S2	13 Ag1	15 Ag1	17 Ag1	19 Ag1	21 Ag1
<b>C</b>	1 Ag2	3 Ag2	5 Ag2	7 Ag2	9 Ag2	S3	S3	13 Ag2	15 Ag2	17 Ag2	19 Ag2	21 Ag2
<b>D</b>	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
<b>E</b>	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
<b>F</b>	2 Ag1	4 Ag1	6 Ag1	8 Ag1	10 Ag1	11 Ag1	12 Ag1	14 Ag1	16 Ag1	18 Ag1	20 Ag1	22 Ag1
<b>G</b>	2 Ag2	4 Ag2	6 Ag2	8 Ag2	10 Ag2	11 Ag2	12 Ag2	14 Ag2	16 Ag2	18 Ag2	20 Ag2	22 Ag2
<b>H</b>	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

**Slika 2. Preporučeni raspored ELISA pločice. S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (Uzorak 1. Nil kontrolni uzorak plazme), 1 Ag1 (Uzorak 1. Ag1 plazma), 1 Ag2 (Uzorak 1. Ag2 plazma), 1M (Uzorak 1. Mitogen plazma).**

9. Prekrijte ELISA pločicu i dobro promiješajte konjugat i uzorke plazme / standarde u tresilici za mikrotitar pločice u trajanju od 1 minute na 500 do 1000 o/min. Izbjegavajte prskanje.

10. Prekrijte ELISA pločicu i inkubirajte na sobnoj temperaturi ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) u trajanju od  $120 \pm 5$  minuta. Za vrijeme inkubacije ELISA pločica se ne bi trebala izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti. Odstupanje od navedenog temperaturnog raspona može rezultirati pogrešnim rezultatima.
11. Za vrijeme inkubacije ELISA pločice pripremite pufer za ispiranje jakosti za upotrebu. Razrijedite jedan dio 20x koncentriranog pufera za ispiranje s 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro promiješajte. U kompletu se nalazi dovoljno 20x koncentriranog pufera za ispiranje da bi se dobile 2 litre pufera za ispiranje jakosti za upotrebu.
12. Nakon završetka inkubacije ELISA pločice isperite jažice ELISA pločice s 400  $\mu\text{l}$  pufera za ispiranje jakosti za upotrebu. Provedite korak ispiranja najmanje 6 puta. Automatizirani uređaj za ispiranje pločica preporučuje se iz sigurnosnih razloga prilikom rukovanja uzorcima plazme.

Temeljito ispiranje vrlo je važno za učinak ispitivanja. Pazite da pri svakom ciklusu ispiranja sve jažice budu do vrha potpuno napunjene puferom za ispiranje. Preporučujemo da između svakog ciklusa ispiranja ostavite najmanje 5 sekundi za namakanje.

U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati standardni dezinficijens koji se upotrebljava u laboratorijima. Pridržavajte se propisanih uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.
13. Lupkanjem istresite ELISA pločicu okrenutu prema dolje na upijajućem ručniku (koji ne otpušta vlakna) kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100  $\mu\text{l}$  otopine enzimskog supstrata u svaku jažicu pločice, prekrijte pločicu i dobro promiješajte s pomoću tresilice za mikrotitar pločice 1 minutu na 500 do 1000 o/min.
14. Prekrijte ELISA pločicu i inkubirajte je na sobnoj temperaturi ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) u trajanju od 30 minuta. Za vrijeme inkubacije ELISA pločica se ne bi trebala izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti.
15. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta dodajte 50  $\mu\text{l}$  enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu na pločici istim redoslijedom kojim ste dodavali supstrat i dobro promiješajte na 500 do 1000 o/min s pomoću tresilice za mikrotitar pločice.
16. Izmjerite optičku gustoću (Optical Density, OD) jažica ELISA pločice u roku od 5 minuta od zaustavljanje reakcije s pomoću čitača mikrotitar pločica opremljenog filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm. Izračunavanje rezultata izvodi se s pomoću vrijednosti OD-a.

# Rezultati (izračuni)

Za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata može se upotrijebiti QFN SARS Analysis Software. Dostupan je na **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**. Obvezno upotrebljavajte najnoviju verziju softvera QFN SARS Analysis Software.

Softver provodi procjenu kontrole kvalitete ispitivanja, generira standardnu krivulju i daje rezultat testa za svakog ispitanika, kao što je opisano u odjeljku „Tumačenje rezultata” na stranici 27. Softver prijavljuje sve koncentracije veće od 10 IU/ml kao „> 10” jer te vrijednosti prelaze potvrđeni linearni raspon testa ELISA.

Kao alternativa uporabi softvera QFN SARS Analysis Software, rezultati se mogu utvrditi i na osnovu sljedeće metode.

## Generiranje standardne krivulje i vrijednosti uzoraka

### Ako se ne upotrebljava QFN SARS Analysis Software

Određivanje standardne krivulje i određivanje vrijednosti IU/ml uzorka zahtijevaju program za rad s proračunskim tablicama kao što je Microsoft® Excel® ako se ne upotrebljava QFN SARS Analysis Software.

### Uporaba programa za rad s proračunskim tablicama

1. Utvrdite srednje vrijednosti OD-a replika standarda iz kompleta na svakoj pločici.
2. Izradite standardnu krivulju  $\log_{(e)} - \log_{(e)}$  grafičkim prikazom  $\log_{(e)}$  srednje vrijednosti OD-a (y os) u odnosu na  $\log_{(e)}$  IFN- $\gamma$  koncentracije standarda u IU/ml (x os), izostavivši nulti standard iz izračuna. Izračunajte liniju najboljeg oblika standardne krivulje regresijskom analizom.
3. Upotrebljavajte standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- $\gamma$  koncentracije (IU/ml) za svaki testni uzorak plazme s pomoću vrijednosti OD-a svakog uzorka.

4. Za te izračune mogu se upotrijebiti softverski paketi koji su dostupni uz čitače mikrotitar pločica, kao i standardne proračunske tablice ili programi za statistiku (kao npr. Microsoft Excel). Preporučujemo primjenu tih paketa za izračunavanje regresijske analize, koeficijenta varijacije standarda (Coefficient of Variation, % CV), kao i koeficijenta korelacije ( $r$ ) za standardnu krivulju.

### Izračun uzorka

Ako su za standarde dobivena sljedeća OD očitavanja, izračuni u kojima se upotrebljava  $\log(e)$  slijede ona u tablici 2.

**Tablica 2. Standardna krivulja**

Standard	IU/ml	Vrijednosti OD-a a i b	Srednja vrijednost OD	% CV	$\text{Log}_{(e)}$ IU/ml	$\text{Log}_{(e)}$ – srednja vrijednost (OD)
Standard 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Standard 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Standard 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	NP	-1,386	-2,079
Standard 4	0	0,034, 0,037	0,036	NP	NP	NP

Jednadžba krivulje je  $y = 0,7885(X) - 0,9837$ , pri čemu je „m” = 0,7885, a „c” = -0,9837. Te se vrijednosti upotrebljavaju u jednadžbi  $X = (Y - c)/m$  kako bi se dobila vrijednost X. Na temelju standardne krivulje izračunati koeficijent korelacije ( $r$ ) = 1,000. **NP**: nije primjenjivo.

Valjanost ispitivanja određuje se s pomoću kriterija navedenih pod „Kontrola kvalitete testa” na stranici 25.

Standardna krivulja (tablica 2.) upotrebljava se za pretvaranje odgovora OD-a antigena u međunarodne jedinice (IU/ml).



**Tablica 3. Izračun uzorka**

Antigen	Vrijednost OD	Log <sub>(e)</sub> OD vrijednost	X	e <sup>x</sup> (IU/ml)	Antigen – Nil (IU/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	–
Ag1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,15
Ag2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Vrijednosti IFN- $\gamma$  (u IU/ml) za Ag1, Ag2 i Mitogen ispravljene su za pozadinu oduzimanjem vrijednosti IU/ml dobivene za odgovarajuću kontrolu Nil. Te se ispravljene vrijednosti upotrebljavaju za tumačenje rezultata testa.

## Kontrola kvalitete testa

Točnost rezultata testa ovisi o formiranju točne standardne krivulje. Stoga se rezultati izvedeni iz standarda moraju preispitati prije tumačenja rezultata testnog uzorka.

Test ELISA valjan je ako su ispunjeni sljedeći kriteriji:

- Srednja vrijednost OD-a Standarda 1 mora biti  $\geq 0,600$ .
- % CV za vrijednosti replika za Standard 1 i Standard 2 mora biti  $\leq 15$  %.
- Replicirane vrijednosti OD-a Standarda 3 i Standarda 4 ne smiju odstupati od srednjih vrijednosti za više od 0,040 OD jedinica.
- Koeficijent korelacije ( $r$ ) dobiven iz srednjih vrijednosti apsorbancije standarda mora biti  $\geq 0,98$ .
- Ako ovi kriteriji nisu ispunjeni, test nije valjan i mora se ponoviti.
- Srednja vrijednost OD-a nultog standarda (Green Diluent) trebala bi biti  $\leq 0,150$ . Ako je srednja vrijednost OD-a  $> 0,150$ , preporučuje se kontrola postupka ispiranja pločica.

---

QFN SARS Analysis Software izračunava i izvješćuje o tim parametrima za kontrolu kvalitete.

Svaki bi laboratorij trebao odrediti odgovarajuće vrste kontrolnih materijala i učestalost testiranja u skladu s lokalnim, državnim ili drugim primjenjivim akreditacijskim organizacijama. Potrebno je razmotriti vanjsku procjenu kvalitete i alternativne postupke validacije.

**Napomena:** plazme u koje je dodan rekombinantni IFN- $\gamma$  pokazale su smanjenja koncentracije do 50 % kada su se čuvale na temperaturi od 2 – 8 °C te –20 °C. Rekombinantni IFN- $\gamma$  ne preporučuje se za utvrđivanje kontrolnih standarda u uzorcima plazme.

# Tumačenje rezultata

Rezultati QFN SARS testa tumače se na temelju sljedećih kriterija (tablica 4.):

**Važno:** ispitivanje QFN SARS trebalo bi se upotrebljavati u kombinaciji s drugim laboratorijskim testovima te epidemiološkom/kliničkom procjenom za procjenu imunskog odgovora osobe uslijed cijepljenja protiv bolesti COVID-19.

**Tablica 4. Tumačenje rezultata QFN SARS testa**

Nil (IU/ml)	Ag1 antigen minus Nil (IU/ml)	Ag2 antigen minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Rezultat testa QFN SARS	Izvešće/tumačenje
≤ 8,0	≥ 0,15 i ≥ 25 % vrijednosti Nil	Svejedno koliko	Svejedno koliko	Reaktivno	<i>Otkriven je odgovor na SARS-CoV-2</i>
	Svejedno koliko	≥ 0,15 i ≥ 25 % vrijednosti Nil			
	< 0,15 ili ≥ 0,15 i < 25 % vrijednosti Nil	< 0,15 ili ≥ 0,15 i < 25 % vrijednosti Nil	≥ 0,50	Nereaktivno	<i>NIJE otkriven odgovor na SARS-CoV-2</i>
	< 0,15 ili ≥ 0,15 i < 25 % vrijednosti Nil	< 0,15 ili ≥ 0,15 i < 25 % vrijednosti Nil	< 0,50	Neodređen <sup>‡</sup>	<i>Nije moguće otkriti odgovor na SARS-CoV-2 i Mitogen</i>
> 8,0 <sup>§</sup>	Svejedno koliko				

\* Odgovori na Mitogen pozitivnu kontrolu (i povremeno odgovori na Ag antigen) mogu biti izvan raspona čitača mikrotitar pločica. To ne utječe na rezultate testa. Softver QFN SARS vrijednosti > 10 IU/ml navodi kao > 10 IU/ml.

<sup>‡</sup> Pogledajte „Vodič za rješavanje problema” na stranici 50 za moguće uzroke.

<sup>§</sup> U kliničkim je ispitivanjima manje od 0,25 % ispitanika imalo razine IFN- $\gamma$  u vrijednosti od > 8,0 IU/ml za vrijednost Nil.

---

# Ograničenja

Rezultati QFN SARS testiranja moraju se upotrebljavati u kombinaciji s epidemiološkom anamnezom svake osobe, njezinim trenutačnim zdravstvenim stanjem i drugim dijagnostičkim pretragama.

Osobe s Nil vrijednostima većima od 8 IU/ml klasificiraju se kao „Neodređeni” jer 25 % viši odgovor na Ag antigene može biti izvan raspona mjerenja ispitivanja.

- Nereaktivni rezultat potrebno je razmotriti uzimajući u obzir medicinske podatke i podatke iz povijesti bolesti osobe koji se odnose na vjerojatnost imunosnog odgovora na cijepljenje, pogotovo za osobe s narušenom funkcijom imunosnog sustava.
- Ispitivanje QFN SARS trebalo bi se upotrebljavati u kombinaciji s drugim laboratorijskim testovima te epidemiološkom/kliničkom procjenom za procjenu imunosnog odgovora osobe uslijed cijepljenja protiv bolesti COVID-19.

Do nepouzdanih ili neodređenih rezultata može doći iz sljedećih razloga:

- odstupanja od postupka opisanog u ovim Uputama za uporabu
- neispravnog transporta/rukovanja ispitkom krvi
- povišenih razina cirkulirajućeg IFN- $\gamma$  ili prisutnosti heterofilnih protutijela
- premašivanja potvrđenih vremena za krv od uzimanja ispitka krvi do inkubacije. Pogledajte *Upute za uporabu za epruvete QFN SARS Blood Collection Tubes* (1124422).

---

# Radne značajke ispitivanja

## Analitičke radne značajke

### Granična vrijednost ispitivanja

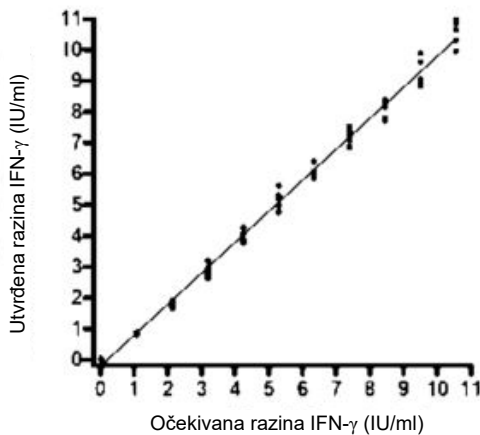
Granična vrijednost ispitivanja QFN SARS assay utvrđena je primjenom podataka od dvadeset (20) ispitanika koji su na RT-PCR testu ili na serološkom testu bili nereaktivni na SARS-CoV-2 i dvadeset (20) davatelja koji su bili u potpunosti cijepljeni (između 2 – 16 tjedana nakon statusa potpune cijepjenosti) cjepivom za koje je Agencija za hranu i lijekove SAD-A (FDA) izdala odobrenje EUA za hitnu uporabu. Analizirani su osjetljivost i specifičnost podataka te točni dvostrani 95-postotni intervali pouzdanosti (confidence interval, CI) te su pokazali da je optimalna granična vrijednost ELISA testa iznosila 0,15 IU/mL (pogledajte tablicu 5.).

**Tablica 5. Granične vrijednosti ispitivanja QFN SARS (IU/mL) s odgovarajućom osjetljivošću i specifičnošću s točnim dvostranim 95-postotnim intervalom pouzdanosti**

Granična vrijednost	Osjetljivost			Specifičnost		
	Vrijednost	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI	Vrijednost	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI
0,1	1,000	0,940	1,000	0,933	0,838	0,982
0,15	0,983	0,911	1,000	1,000	0,940	1,000
0,2	0,900	0,795	0,962	1,000	0,940	1,000
0,25	0,733	0,603	0,839	1,000	0,940	1,000
0,3	0,717	0,586	0,825	1,000	0,940	1,000
0,35	0,650	0,516	0,769	1,000	0,940	1,000
0,4	0,600	0,465	0,724	1,000	0,940	1,000
0,45	0,567	0,432	0,694	1,000	0,940	1,000
0,5	0,467	0,337	0,600	1,000	0,940	1,000
0,55	0,433	0,306	0,568	1,000	0,940	1,000
0,6	0,400	0,276	0,535	1,000	0,940	1,000
0,65	0,333	0,217	0,467	1,000	0,940	1,000
0,7	0,317	0,203	0,450	1,000	0,940	1,000
0,75	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000
0,8	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000

## Linearnost

Test QFN SARS ELISA pokazao se linearnim postavljanjem 5 replika 11 poolova plazme poznatih koncentracija IFN- $\gamma$  nasumično na pločici ELISA. Linija linearne regresije ima nagib od  $1,002 \pm 0,011$  i koeficijent korelacije od 0,99 (slika 3.).



**Slika 3. Ilustracija regresijske analize studije linearnosti.**

## Obnovljivost

Studija obnovljivosti u više laboratorija provedena je kako bi se procijenile radne značajke ispitivanja QFN SARS assay u različitim laboratorijima s više rukovatelja. Ta je studija provedena u tri laboratorija u okviru društva QIAGEN. Uključena su ukupno tri (3) ispitanika u studiji reaktivna na SARS-CoV-2 i (3) ispitanika u studiji nereaktivna na SARS-CoV-2 (što je utvrđeno RT-PCR testom ili serološkim testom).

Krv je prikupljena u četiri (4) epruvete za uzimanje krvi s litij-heparinom dobivene od svakog ispitanika u studiji. Epruvete za uzimanje krvi s litij-heparinom potom su prevezene u jedan od laboratorija za testiranje gdje je krv alikvotirana u tri (3) seta epruveta QFN SARS Blood Collection Tubes (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen i Nil). Po jedan set svake od epruveta QFN

SARS Blood Collection Tubes (BCT) prevezen je do svakog laboratorija za testiranje te je potom testiran u skladu s postupkom ispitivanja QFN SARS assay. Svaki je ispitanik testiran s deset (10) replika (pet (5) replika za Ag1 i pet (5) replika za Ag2) u svakom laboratoriju. U svakom je laboratoriju jedan (1) rukovatelj neovisno analizirao QFN SARS test. Nijednome rukovatelju nisu otkriveni rezultati koje su dobili drugi rukovatelji niti rezultati RT-PCR ili serološkog testa ispitanika u studiji.

Generirano je 30 rezultata u svakom od triju (3) laboratorija za testiranje, čime je dobiveno ukupno 90 podatkovnih točaka. Sažetak rezultata studije obnovljivosti prikazan je u tablici 6.

**Tablica 6. Sažetak rezultata studije obnovljivosti – N = 30 uzoraka pacijenta**

Laboratorij 1 – 1 rukovatelj	Laboratorij 2 – 1 rukovatelj	Laboratorij 3 – 1 rukovatelj
25/30 = 83 %	30/30 = 100 %	30/30 = 100 %
Slaganje kvalitativnih rezultata	Slaganje kvalitativnih rezultata	Slaganje kvalitativnih rezultata

Ukupno postotno slaganje među svim reaktivnim i nereaktivnim uzorcima s očekivanim kvalitativnim rezultatima (reaktivni ispitanik čiji je rezultat bio reaktivan i nereaktivni ispitanik čiji je rezultat bio nereaktivan na temelju rezultata referentne metode ispitanika) iznosilo je 94,4 % (85/90) u sva tri (3) laboratorija.

### Ponovljivost unutar serije

Provedena je studija kako bi se utvrdila varijabilnost epruveta QFN SARS Blood Collection Tubes unutar serije. Testirana su ukupno dva (2) ispitanika u studiji reaktivna na SARS-CoV-2 i tri (3) ispitanika u studiji nereaktivna na SARS-CoV-2 (što je utvrđeno RT-PCR testom ili serološkim testom). Tri (3) odvojene serije svake od epruveta QFN SARS Ag1 i Ag2 Blood Collection Tubes uključene su u ovu studiju. Testirano je pet (5) replika po davatelju po seriji epruvete za uzimanje krvi. Sažetak rezultata studije preciznosti unutar serije prikazan je u tablici 7.



**Tablica 7. Sažetak rezultata studije preciznosti unutar serije – ukupno postotno slaganje za QFN SARS Ag1 i Ag2 Blood Collection Tubes; N = 25**

QFN SARS BCT	Broj serije epruvete BCT	Broj kvalitativnih rezultata koji se slažu / Ukupan broj rezultata	Omjer	Donja granica pouzdanosti	Gornja granica pouzdanosti
Ag1	1	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	2	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	3	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
Ag2	1	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	2	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	3	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %

Ukupno postotno slaganje među svim reaktivnim i nereaktivnim uzorcima s očekivanim rezultatima (reaktivni ispitanik čiji je rezultat bio reaktivan i nereaktivni ispitanik čiji je rezultat bio nereaktivan na temelju rezultata referentne metode ispitanika) iznosilo je 100 % u sve tri (3) serije epruveta QFN SARS Ag1 i Ag2 BCT.

#### Granica slijepe probe (Limit of Blank, LoB)

Granica slijepe probe (Limit of Blank, LoB) procijenjena je za ispitivanje QFN SARS assay. Po dvije (2) replike četrnaest (14) pojedinačnih normalnih uzoraka humane plazme (kao slijepe probe) testirane su s pomoću dvije (2) serije testa QFN SARS ELISA, a testiranje su provela tri (3) rukovatelja u tri (3) dana testiranja, jedan (1) rukovatelj po danu testiranja za ukupno 84 replike iz svake serije kompleta ELISA.

Vrijednosti LoB (IU/mL) za dvije (2) serije kompleta ELISA izračunate su odvojeno kako je prikazano u tablici 8.

**Tablica 8. Vrijednosti LoB (IU/mL) za dvije (2) serije kompleta QFN SARS ELISA Kit**

<b>QFN SARS ELISA Kit</b>	<b>Procijenjena vrijednost LoB (IU/ml)</b>
Komplet 1	0,030
Komplet 2	0,040

Veća vrijednost LoB, 0,040 IU/mL, u obje serije kompleta QFN SARS ELISA Kit prijavljena je kao konačna vrijednost LoB.

### Granica detekcije (Limit of Detection, LoD)

Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) procijenjena je za ispitivanje QFN SARS assay. Pool humane plazme generiran je kombiniranjem četrnaest (14) pojedinačnih uzoraka plazme. Svaki od triju (3) rukovatelja pripremio je referentnu standardnu otopinu IFN- $\gamma$  vrijednosti 1,0 IU/mL razrijeđenu u puferu. Serija razrjeđivanja s osam (8) koncentracija izvedena je u plazmi. Studija se provodila tijekom tri (3) dana, a provodila su je tri (3) naizmjenična rukovatelja s pomoću dvije (2) serije kompleta QFN SARS ELISA. Svaki dan testiranja pet (5) replika svake koncentracije unutar svakog kompleta niza serijskih razrjeđivanja testirano je da bi se dobilo ukupno 45 replika za svako razrjeđivanje koncentracije IFN- $\gamma$  za svaku seriju kompleta QFN SARS ELISA.

Vrijednost LoD za svaku testiranu seriju kompleta QFN SARS ELISA kit izračunata je odvojeno kako je prikazano u tablici 9. LoD je procijenjen primjenom modela probit regresije. LoD se temeljio na procijenjenoj koncentraciji (IU/mL) koja je dala 95-postotnu procijenjenu vjerojatnost dobivanja stope pogodaka veće od 0,04 IU/mL (utvrđeno s pomoću vrijednosti LoB).

**Tablica 9. Procijenjene vrijednosti LoD (IU/mL) za dvije (2) serije kompleta QFN SARS ELISA Kit**

<b>QFN SARS ELISA Kit</b>	<b>Vjerojatnost</b>	<b>Procijenjena koncentracija (IU/ml)</b>	<b>Donja granica 95-postotne pouzdanosti za procjenu</b>	<b>Gornja granica 95-postotne pouzdanosti za procjenu</b>
Komplet 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Komplet 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Veća vrijednost LoD izračunata u obje serije kompleta QFN SARS ELISA od 0,065 IU/mL prijavljena je kao konačna vrijednost LoD.

### Interferirajuće tvari

Provedena je studija kako bi se utvrdili učinci potencijalnih interferirajućih tvari na radne značajke ispitivanja QFN SARS ELISA prilikom otkrivanja IFN- $\gamma$ . Interferirajuće tvari uključene u ovo testiranje bile su sljedeće: trigliceridi (ukupni), hemoglobin, protein (ukupni u serumu), bilirubin (konjugirani), bilirubin (nekonjugirani), abakavir sulfat, ciklosporin i prednizolon. Pet (5) poolova plazme poznatih koncentracija IFN- $\gamma$  pripremljeno je primjenom različitih koncentracija interferirajućih tvari. Razina IFN- $\gamma$  u osnovnom poolu prethodno je pripremljena s pomoću unaprijed određene količine prisutnog IFN- $\gamma$  (približno 0,21, 0,45 i 1,4 IU/mL). Taj je pool potom upotrijebljen za pripremu poolova s interferirajućim tvarima. Testirano je pet različitih razina koncentracije interferirajućih tvari koje su se temeljile na referentnim intervalima, patološkim vrijednostima, terapijskim rasponima i toksičnim rasponima ili na preporuci dobavljača ili općenitim kliničkim razinama. Po šest (6) replika testirano je za svaku razinu koncentracije interferirajuće tvari u uzorku.

Za svaku koncentraciju uzorka proveden je T-test kojim se usporedila razlika srednje vrijednosti log<sub>10</sub> (IU/mL) visoke razine interferirajuće tvari (10) i kontrole (tj. razine bez interferirajuće tvari). Procijenjena razlika srednjeg odgovora, zajedno s odgovarajućim granicama dvostrane 95-postotne pouzdanosti i p-vrijednosti prijavljena je u tablici.

**Tablica 10. Log10 IU/mL: Tablica sažetka T-testa za razlike u srednjim vrijednostima između kontrolne i visoke razine interferirajuće tvari za svaku interferirajuću tvar i razinu koncentracije IFN- $\gamma$**

Interferirajuća tvar	Razina interferirajuće tvari	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Razlika srednje vrijednosti	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI	P-vrijednost
Trigliceridi	Visoka	1,4	0,053	-0,004	0,110	0,063
		0,45	0,039	-0,021	0,058	< 0,001
		0,21	0,034	-0,002	0,071	0,061
Hemoglobin	Visoka	1,4	-0,001	-0,042	0,040	0,967
		0,45	0,016	-0,007	0,040	0,152
		0,21	0,014	-0,030	0,059	0,489
Protein	Visoka	1,4	-0,030	-0,071	0,011	0,136
		0,45	0,000	-0,046	0,046	0,992
		0,21	-0,045	-0,103	0,012	0,109
Konjugirani bilirubin	Visoka	1,4	0,001	-0,046	0,048	0,961
		0,45	0,012	-0,043	0,067	0,639
		0,21	0,015	-0,044	0,074	0,586
Nekonjugirani bilirubin	Visoka	1,4	0,015	-0,011	0,042	0,231
		0,45	0,015	-0,023	0,052	0,411
		0,21	0,012	-0,033	0,057	0,566
Abakavir	Visoka	1,4	0,013	-0,015	0,040	0,322
		0,45	0,015	-0,014	0,044	0,283
		0,21	0,008	-0,034	0,050	0,677

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

Tablica se nastavlja s prethodne stranice

**Tablica 10. Log<sub>10</sub> IU/mL: Tablica sažetka T-testa za razlike u srednjim vrijednostima između kontrolne i visoke razine interferirajuće tvari za svaku interferirajuću tvar i razinu koncentracije IFN- $\gamma$**

Interferirajuća tvar	Razina interferirajuće tvari	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Razlika srednje vrijednosti	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI	P-vrijednost
Ciklosporin	Visoka	1,4	0,002	-0,019	0,024	0,816
		0,45	0,007	-0,030	0,043	0,682
		0,21	0,015	-0,007	0,038	0,155
Prednizolon	Visoka	1,4	0,007	-0,016	0,030	0,518
		0,45	-0,001	-0,034	0,033	0,964
		0,21	0,021	-0,025	0,068	0,334

Rezultati nisu pokazali statistički značajne razlike između najviše testirane razine interferirajuće tvari i kontrole (razine bez interferirajuće tvari) osim za razinu koncentracije triglicerida od 0,45 IU/mL. Utvrđeno je da je srednja razlika za tu vrijednost unutar  $\pm 2$  standardne devijacije mjerenja srednje razine kontrole, čime se pokazalo da je zabilježena razlika u okviru očekivane varijabilnosti ispitivanja te da se ne očekuje da će klinički značajne razine triglicerida ometati ispitivanje QFN SARS ELISA.

# Kliničke radne značajke

Kliničke radne značajke ispitivanja QFN SARS assay procijenjene su prospektivnom opservacijskom studijom koja je provedena od lipnja do listopada 2021. na ispitanicima bez povijesti infekcije virusom SARS-CoV-2 i cijepljeni su protiv bolesti COVID-19 cjepivima koja ciljaju na virusni protein S virusa SARS-CoV-2, kao i na onima bez povijesti infekcije virusom SARS-CoV-2 koji nisu cijepljeni protiv bolesti COVID-19.

Ispitanici koji su dali privolu procijenjeni su po pitanju kriterija uključivanja i isključivanja za studiju te su samo ispitanici koji su zadovoljavali sve kriterije za uključivanje te koji nisu zadovoljavali nijedan kriterij za isključivanje uključeni te im je uzeta krv za QFN SARS.

Sažetak uključene populacije nalazi se u nastavku:

- Skupina 1: uključivala je ispitanike bez povijesti prirodne infekcije virusom SARS-CoV-2, koji nisu cijepljeni protiv bolesti COVID-19 u vrijeme uzimanja krvi za QFN SARS, nisu nikad na testu bili pozitivni na infekciju virusom SARS-CoV-2, prijavili su nereaktivni rezultat serološkog testa te nisu imali znakove ili simptome bolesti COVID-19 unutar 4 tjedna prije uključivanja u studiju.
- Skupina 2: uključivala je ispitanike bez povijesti infekcije virusom SARS-CoV-2, koji su cijepljeni protiv bolesti COVID-19 cjepivom koje cilja na protein S virusa SARS-CoV-2 u vrijeme uzimanja krvi za QFN SARS i koji nikad nisu na testu bili pozitivni na infekciju virusom SARS-CoV-2.
- Nijedan od ispitanika nije bio primatelj u transplantaciji (čvrstih organa ili stanica) niti je primao bilo kakvu terapiju za karcinom za vrijeme sudjelovanja u studiji.

U Skupinu 1 uključeno je ukupno 218 ispitanika, dok je u Skupinu 2 uključen ukupno 171 ispitanik. Nakon uzimanja krvi za ispitivanje QFN SARS utvrđeno je da četiri ispitanika iz Skupine 1 nisu zadovoljavala kriterije za uključivanje zbog reaktivnog rezultata serološkog testa dobivenog na uzorku koji je uzet tijekom posjeta na kojem se uzimala krv za ispitivanje QFN SARS te su oni naknadno isključeni iz analize.

Uzorci su prikupljeni, epruvete za uzimanje krvi QFN SARS su obrađene i plazma je pohranjena na temperaturi od  $\leq -20$  °C sve dok nije bila spremna za testiranje s pomoću ispitivanja QFN SARS ELISA. Sve analize QFN SARS ELISA pločice bile su valjane i nije dobiven nijedan neodređeni rezultat, što je rezultiralo s 214 odnosno 171 uzorkom koji se mogao procjenjivati u Skupini 1 odnosno Skupini 2.

## Demografski podaci

Broj uzoraka uzetih u svakoj zemlji i postotak u odnosu na ukupan broj za svaku ispitivanu skupinu prikazani su u tablici 11.

**Tablica 11. Sažetak uzimanja uzoraka po zemljama**

Zemlja uzimanja uzorka	Skupina 1		Skupina 2	
	N	%	N	%
<b>Nizozemska</b>	214	100,00 %	153	89,47 %
<b>SAD</b>	0	0,00 %	18	10,53 %

Sažetak dobi ispitanika, uključujući srednju vrijednost, medijan, minimalnu i maksimalnu dob te standardnu devijaciju (Standard Deviation, SD) dobi, prikazan je u tablici 12.

**Tablica 12. Sažetak dobi ispitanika (godine)**

N	Srednja vrijednost	Medijan	SD	Minimalna	Maksimalna
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Sažetak spola ispitanika prikazan je u tablici 13.

**Tablica 13. Sažetak spola ispitanika**

Spol	N	%
Ženski	234	60,78 %
Muški	151	39,22 %

### Specifičnost

Kliničko slaganje kojim se uspoređuju rezultati ispitivanja QFN SARS u odnosu na rezultate referentne metode prikazano je u tablici 14.

**Tablica 14. Kliničko slaganje: rezultat ispitivanja QFN SARS u odnosu na referentnu metodu**

		Rezultat referentne metode		
		Skupina 1 (- cijepljenje, - infekcija)	Skupina 2 (+ cijepljenje, - infekcija)	Ukupno
Rezultat testa QFN SARS	Nereaktivno	199	34	233
	Reaktivno	15	137	152
	Ukupno	214	171	385

Kod necijepljenih ispitanika (Skupina 1), 199 od 214 bilo je nereaktivno prilikom testiranja ispitivanjem QFN SARS, dok je preostalih 15 bilo reaktivno. Kod cijepljenih ispitanika (Skupina 2), 137 od 171 bilo je reaktivno prilikom testiranja ispitivanjem QFN SARS, dok je preostalih 34 bilo nereaktivno. Nijedan od 15 i 34 nepodudarna uzorka u Skupini 1 odnosno Skupini 2 nije prošao dodatno testiranje nepodudarnom metodom.

Negativno postotno slaganje (Negative Percent Agreement, NPA) (specifičnost) izračunato je za necijepljene ispitanike (Skupina 1), zajedno s dvostranim 95-postotnim točnim intervalom pouzdanosti (confidence interval, CI) te je prikazano u tablici 15.



**Tablica 15. Negativno postotno slaganje (specifičnost)**

<b>Br. skupine</b>	<b>NPA (specifičnost)</b>	<b>95-postotni CI</b>
Skupina 1 (- cijepljenje, - infekcija)	92,99 % (199/214)	88,70 – 96,02 %

## Osjetljivost

Pozitivno postotno slaganje (Positive Percent Agreement, PPA) (osjetljivost) izračunato je za cijepljene ispitanike (Skupina 2), zajedno s dvostranim 95-postotnim točnim intervalom pouzdanosti (CI) te je prikazano u tablici 16.

**Tablica 16. Pozitivno postotno slaganje (osjetljivost)**

<b>Br. skupine</b>	<b>PPA (osjetljivost)</b>	<b>95-postotni CI</b>
Skupina 2 (+ cijepljenje, - infekcija)	80,12 % (137/171)	73,34 – 85,82 %

## Pozitivno postotno slaganje prema dobi

Kod cijepljenih je ispitanika (Skupina 2) pozitivno postotno slaganje stratificirano prema dobi < 60 i ≥ 60 godina te je prikazano u tablici 17.

**Tablica 17. Pozitivno postotno slaganje prema dobnim skupinama < 60 i ≥ 60 godina**

<b>Dobni raspon (godine)</b>	<b>PPA (osjetljivost)</b>	<b>95-postotni CI</b>
< 60	85,33 % (128/150)	78,78 – 90,64 %
≥ 60	42,86 % (9/21)	21,82 – 65,98 %

## Pozitivno postotno slaganje prema cjevivu protiv bolesti COVID-19

Kod cijepljenih je ispitanika (Skupina 2) pozitivno postotno slaganje stratificirano prema primljenom cjevivu protiv bolesti COVID-19 te je prikazano u tablici 18.

**Tablica 18. Pozitivno postotno slaganje prema cjevivu protiv bolesti COVID-19**

<b>Cjevivo</b>	<b>PPA (osjetljivost)</b>	<b>95-postotni CI</b>
Astra Zeneca	62,50 % (5/8)	24,49 – 91,48 %
Janssen (Johnson & Johnson)	86,67 % (13/15)	59,54 – 98,34 %
Moderna	77,27 % (17/22)	54,63 – 92,18 %
Pfizer - BioNTech	80,95% (102/126)	73,00 – 87,40 %

## Čimbenici povezani s nereaktivnim rezultatima u cijepljenih ispitanika

Da bi se utvrdilo jesu li starija dob, vrijeme od završetka cijepljenja protiv bolesti COVID-19, primljeno cjevivo i spol povezani s nereaktivnim rezultatima u cijepljenih ispitanika (Skupina 2), provedena je univarijatna logistička regresijska analiza. Povezanost između svakog čimbenika i nereaktivnih rezultata izračunata je kao omjer izgleda (Odds Ratio, OR), a rezultati su prikazani u tablici 19.

**Tablica 19. Povezanost čimbenika i nereaktivnih rezultata u cijepljenih ispitanika**

Čimbenik		OR (95-postotni CI)	p-vrijednost
Dob (godine)		1,08 (1,05 – 1,12)	< 0,001
Vrijeme od cijepjenja do uzimanja krvi za ispitivanje QFN SARS (dani)		1,02 (1,01 – 1,03)	< 0,001
Cjepivo	Pfizer – BioNTech	1	–
	Astra Zeneca	2,55 (0,57 – 11,42)	0,221
	Janssen (Johnson & Johnson)	0,65 (0,14 – 3,09)	0,592
	Moderna	1,25 (0,42 – 3,72)	0,689
Spol	Ženski	1	–
	Muški	1,25 (0,59 – 2,65)	0,565

Jedini čimbenici koji su značajno povezani s nereaktivnim rezultatima u cijepljenih ispitanika bili su dob i vrijeme proteklo od cijepjenja.

Budući da je studija provedena u zemljama gdje su cjepiva protiv bolesti COVID-19 bila prvo dostupna starijim osobama, dob je možda utjecala na povezanost između vremena od cijepjenja i nereaktivnih rezultata. U tablici 20 prikazana je regresijska analiza s dobi kao kovarijatom.

**Tablica 20. Povezanost čimbenika i nereaktivnih rezultata kontroliranih u pogledu dobi**

Čimbenik	OR (95-postotni CI)	p-vrijednost
Dob (godine)	1,07 (1,03 – 1,11)	< 0,001
Vrijeme od cijepjenja do uzimanja krvi za ispitivanje QFN SARS (dani)	1,01 (1,00 – 1,02)	0,214

---

Kada se dob kontrolira, povezanost između vremena od cijepljenja i nereaktivnih rezultata više nije značajna, međutim, dob je ostala značajno povezana.

---

## Referencije

1. Goletti D., Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, et al. The potential clinical utility of measuring SARS-CoV-2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Jul [cited 2021 Jul 13];0(0). Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X21003785/fulltext>
2. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*. 2021
3. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021
4. Shrotri M., van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-Cov-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE*. 2021
5. Alessandra D'Abramo, Serena Vita, Gaetano Maffongelli, Andrea Mariano , Chiara Agrati , Concetta Castilletti ,Delia Goletti, Giuseppe Ippolito, Emanuele Nicastrì SC-19 CIT. Prolonged and severe SARS-CoV-2 infection inpatients under B-cell-depleting drug successfully treated: A tailored approach. *Int J Infect Dis*. 2021;(107):247–50
6. Soresina A, Moratto D, Chiarini M, Paolillo C, Baresi G, Focà E, et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020
7. Quinti I, Lougaris V, Milito C, Cinetto F, Pecoraro A, Mezzaroma I, et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2020

8. Geers D, Shamier MC, Bogers S, den Hartog G, Gommers L, Nieuwkoop NN, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *Sci Immunol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 30];6(59). Available from: <http://immunology.sciencemag.org/>
9. Alter G, Yu J, Liu J, Chandrashekar A, Borducchi EN, Tostanoski LH, McMahan K, Jacob-Dolan C, Martinez DR, Chang A, Anioke T, Lifton M, Nkolola J, Stephenson KE, Atyeo C, Shin S, Fields P, Kaplan I, Robins H, Amanat F, Krammer F, Baric RS, Le Gars M, Sado BD. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature*. 2021
10. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80- ) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Jun 30];371(6529). Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
11. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, Leruez-Ville M, Villain E, Baaziz M, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2021 Jul 1];2. Available from: [https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor\\_Anti\\_SARS\\_CoV\\_2\\_Humoral\\_and\\_T\\_cell\\_Responses.95281.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor_Anti_SARS_CoV_2_Humoral_and_T_cell_Responses.95281.aspx)
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020
13. Alberto M, Borobia, Antonio J Carcas, Mayte Pérez-Olmeda, Luis Castaño, María Jesús Bertran, Javier García-Pérez, Magdalena Campins, Antonio Portolés, María González-Pérez, María Teresa García Morales, Eunáte Arana-Arri, Marta Aldea, Francisco Díez-Fuerte CSG. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-

- 
- primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021
14. Mónica Martínez-Gallo, Juliana Esperalba-Esquerria, Ricardo Pujol-Borrell, Víctor Sandá, Iria Arrese-Muñoz, Candela Fernández Naval, Andrés Antón Pagarolas, Victoria Cardona, Moisés Labrador-Horrillo, Tomás Pumarola-Suñé MH-G. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in Health Care Workers
  15. Van Praet JT, Vandecasteele S, De Roo A, De Vriese AS, Reynders M. Humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in nursing home residents. *Clin Infect Dis*. 2021
  16. Pedersen RM, Tornby DS, Bistrup C, Johansen IS, Andersen TE JU. Negative SARS-CoV-2 antibodies, T cell response and virus neutralization following full vaccination in a renal transplant recipient: a call for vigilance. *Clin Microbiol Infect*. 2021
  17. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020
  18. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020
  19. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021
  20. Aiello A, Najafi Fard S, Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Farroni C, et al. Spike is the most recognized antigen in the whole-blood platform in both acute and convalescent COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 2021

- 
21. Soumya Jaganathan, Francis Stieber, Sonia N. Rao, Vladyslav Nikolayevskyy, Nadia Allen, Jeff Boyle JH. Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals. 2021
  22. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*. 2020
  23. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. 2020
  24. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020
  25. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020
  26. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020
  27. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020
  28. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020
  29. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2020



- 
30. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020
  31. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020
  32. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020
  33. Ryu MR, Park MS, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative evaluation of quantiFERON-TB gold in-tube and quantiFERON-TB gold plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Jul 1];56(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30135226/>
  34. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. 2017

# Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i stranicu s najčešćim pitanjima u našem Centru za tehničku podršku: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Znanstvenici u Tehničkim službama tvrtke QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja biste mogli imati, a koja se odnose na informacije i/ili postupke u ovom priručniku ili na tehnologije za uzorke i ispitivanja (za informacije za kontakt posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentari i prijedlozi

---

### Rješavanje problema na ELISA testu

#### Nespecifična boja reakcije

- |   |  |
|---|--|
| a) Nepotpuno ispiranje pločice  | Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. Ovisno o primijenjenom uređaju za ispiranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Unakrsna kontaminacija ELISA jažica  | Pažljivo pipetirajte i miješajte uzorak da biste smanjili rizik.   |
| c) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao                                     | Pobrinite se da se komplet upotrijebi prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100X koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od tri mjeseca od datuma rekonstitucije.   |
| d) Otopina enzimskog supstrata kontaminirana                                      | Bacite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Pobrinite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.  |
| e) Miješanje plazme u epruvetama QFN SARS Blood Collection Tubes prije izdvajanja | Nakon centrifugiranja izbjegavajte pipetiranje prema gore i prema dolje ili bilo kakvo miješanje plazme prije izdvajanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.   |

## Komentari i prijedlozi

---

### Niska očitavanja optičke gustoće za standarde

- |   |  |
|---|--|
| a) Pogreška pri razrjeđivanju standarda           | Razrjeđivanja standarda iz kompleta pripremajte točno prema ovoj Uputi za uporabu.   |
| b) Pogrešno pipetiranje                           | Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača.  |
| c) Temperatura inkubacije preniska                | Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ).   |
| d) Vrijeme inkubacije prekratko                   | Inkubacija pločice s konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati $120 \pm 5$ minuta. Otopina enzimskog supstrata treba se inkubirati na pločici 30 minuta.                            |
| e) Upotrijebljen pogrešan filtar za čitač pločica | Pločicu treba čitati na 450 nm s referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm.  |
| f) Reagensi su prehladni                          | Svi reagensi, osim 100X koncentriranog konjugata, moraju postići sobnu temperaturu prije početka ispitivanja. To traje oko 1 sat.  |
| g) Vijek trajanja kompleta/komponenti je istekao  | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100X koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon datuma rekonstitucije. |

### Jaka obojenost pozadine

- |   |  |
|---|--|
| a) Nepotpuno ispiranje pločice                | Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 $\mu$ l pufera za ispiranje po jažici. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Temperatura inkubacije previsoka           | Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ).   |
| c) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet unutar roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100X koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od tri mjeseca od datuma rekonstitucije.                          |

## Komentari i prijedlozi

---





- d) Otopina enzimskog supstrata kontaminirana Bacite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Pobrinite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.


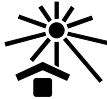

### **Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između duplikata**

- a) Nepotpuno ispiranje pločice Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja.
- b) Pogreška pri razrjeđivanju standarda Pobrinite se da se razrjeđivanja standarda pripremaju točno prema ovoj Uputi za uporabu.
- c) Nedovoljno miješanje Prije nego što ih dodate na pločicu, dobro promiješajte reagense okretanjem ili laganim kružnim mućkanjem.
- d) Nedosljedna tehnika pipetiranja ili prekid tijekom pripremanja ispitivanja Uzorke i standarde treba dodavati kontinuirano. Svi reagensi trebaju biti pripremljeni prije početka ispitivanja.

# Simboli

U uputama za uporabu ili na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
 <N>	Sadržava reagensa dovoljno za <N> reakcija
	Upotrijebiti do
<b>IVD</b>	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
<b>REF</b>	Kataloški broj
<b>LOT</b>	Broj serije
<b>MAT</b>	Broj materijala (tj. oznaka komponente)
<b>COMP</b>	Komponente
<b>CONT</b>	Sadržava
<b>NUM</b>	Broj
<b>GTIN</b>	Globalni broj trgovačke jedinice
<b>ECREP</b>	Ovlašteni predstavnik
Rn	R se odnosi na reviziju uputa za uporabu, a n je broj revizije
	Ograničenje temperature
	Proizvođač

Simbol	Definicija simbola
	Pročitajte upute za uporabu
	Čuvajte podalje od sunčeve svjetlosti
	Upozorenje/oprez

## Kontaktni podaci

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku pomoć na [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), nazovite broj 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili lokalnim distributerima (pogledajte poledinu ili posjetite stranicu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

---

# Dodatak A: Tehnički podaci

## Neodređeni rezultati

Neodređeni su rezultati neuobičajeni i mogu biti povezani s imunosnim statusom testirane osobe, a mogu biti i povezani s brojnim tehničkim čimbenicima (npr. neodgovarajuće rukovanje/pohrana epruveta za uzimanje krvi, nepotpuno ispiranje ELISA pločice) u slučaju nepridržavanja prethodno navedenih uputa za uporabu.

Ako se sumnja na tehnički problem pri pohrani reagensa, uzimanju krvi ili rukovanju uzorcima krvi, treba ponoviti cijeli QFN SARS test s novim ispitcima krvi. ELISA test sa stimuliranim uzorcima plazme može se ponoviti ako se sumnja u neodgovarajuće ispiranje ili druga odstupanja od propisane ELISA metode testiranja. Liječnik po potrebi može odlučiti uzeti novi ispitak krvi ili provesti druge postupke.

## Zgrušani uzorci plazme

Ako pri duljem pohranjivanju uzoraka plazme nastanu ugrušci fibrina, centrifugirajte uzorke kako bi se zgrušani materijal nataložio i plazma lakše pipetirala.

## Uzorci lipemične plazme

Potrebno je paziti prilikom pipetiranja lipemičnih uzoraka jer masne naslage mogu blokirati vrške pipeta.

## Dodatak B: Skraćeni testni postupak ELISA

1. ELISA komponente, osim 100x koncentriranog konjugata, ostavite da se stabiliziraju na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.



2. Rekonstituirajte standard iz kompleta destiliranom ili deioniziranom vodom na 8,0 IU/ml. Pripremite četiri (4) standardna razrjeđivanja.



3. Rekonstituirajte 100x koncentrirani konjugat osušen u zamrznutom stanju s pomoću destilirane ili deionizirane vode.

4. Pripremite konjugat jakosti za upotrebu s pomoću diluenta Green Diluent i dodajte 50 µl u svaku jažicu.



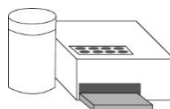
5. Dodajte 50 µl testnog uzorka plazme i 50 µl standarda u odgovarajuće jažice. Izmiješajte tresilicom.



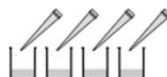
6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.



7. Isperite jažice najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici.



8. Dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata u svaku jažicu. Izmiješajte tresilicom.

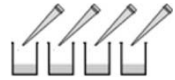




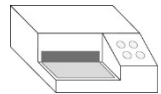
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.



10. Dodajte 50  $\mu$ l enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu. Izmiješajte tresilicom.



11. Očitajte rezultate na 450 nm s referentnim filtrom od 620 do 650 nm.



12. Analizirajte rezultate.



## Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	Komplet ELISA s 2 pločice	626420
<b>Povezani proizvodi</b>		
QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 epruveta (50 od kojih svaka sadržava Nil, Ag1, Ag2 and Mitogen)	626725

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za QIAGEN komplet ili korisničkom priručniku. Priručnici za komplete tvrtke QIAGEN i korisnički priručnici dostupni su na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ili ih možete zatražiti od Tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

## Povijest revizija dokumenta

<b>Datum</b>	<b>Opis</b>
R1, listopad 2021.	Prvo izdanje
R2, studeni 2021.	Ažurirani odjeljci Radne značajke i Kliničke radne značajke
R3, travanj 2022.	Ažuriran odjeljak Analitičke radne značajke za Interferirajuće tvari

---

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom.

---

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom.

---

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom.

#### **Ugovor o ograničenoj licenciji za QuantiFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit**

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane na panelu. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog panela s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom panelu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na stranici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ovaj panel i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj panel i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, preradivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog panela potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s panelom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (Grupa QIAGEN) Proclin®, Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, sva prava pridržana.

