


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

Täisvere IFN- γ test mõõdab kaasasündinud ja omandatud
immuunstimulante

1. versioon

 Kasutamiseks in vitro diagnostikas



 0650-0201

 QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, USA

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, SAKSAMAA

1079024ET Vers. 03

 www.QuantiFERON.com



Sisukord

Sihtotstarve	4
Testi ülevaade ja selgitus	4
Analüüsi põhimõtted	5
Analüüsimiseks kuluv aeg	6
Komponendid ja säilitamine	6
Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid	8
Säilitamine ja käsitsemine	8
Hoiatused ja ettevaatusabinõud	10
Hoiatused	10
Ettevaatusabinõud	11
Proovide võtmine ja käsitsemine	13
Kasutusjuhised	16
Arvutused ja analüüsi tõlgendamine	22
Standardkövera moodustamine	22
Analüüsi kvaliteedikontroll	23
Tulemuste tõlgendamine	23
Piirangud	24
Sooritusnäitajad	25
Kliinilised uuringud	25
Analüüsi sooritusnäitajad	30
Tehniline teave	31
Plasmaproovide hüübimine	31
Tõrkeotsingujuhend	32
Viited	34
Tähised	35
Kontaktteave	35
Testi lühikirjeldus	36

Sihtotstarve

QuantiFERON Monitor (QFM) analüüs on in vitro diagnostiline test, mis on mõeldud rakulise immuunfunktsiooni tuvastamiseks plasma gamma-interferooni (IFN- γ) abil, analüüsidens ensüüm-immuunsorptsioonimeetodil (ELISA) kaasasündinud ja omandatud immuunvastuse stimulantidega inkubeeritud hepariniseeritud täisverd. Analüüsi kasutatakse rakulise immuunvastuse tuvastamiseks soliidorganite transplantatsiooni läbi teinud immuunsupresseeritud isikutel.

QFM on mõeldud kasutamiseks koos riskianalüüsiga ja muude meditsiiniliste ja diagnostiliste hindamistega.

Testi ülevaade ja selgitus

Immuunpuudulikkust iseloomustab efektiivse immuunvastuse moodustamise võime vähenemine. Immuunvastuse häirimine või puudumine võib olla tingitud primaarsest või omandatud (sekundaarsest) immuunpuudulikkusest (1).

Primaarne immuunpuudulikkus on geneetiliselt edasi kanduv ja seda iseloomustab omandatud või kaasasündinud immuunsuse kindlate komponentide puudulikkus (1). Enamasti on immuunpuudulikkus aga omandatud (sekundaarne) ja seda võivad tekitada patogeenid, ravimid (nt elundi siirdamise järel kasutatav immunosupressiivne ravi), haigusseisundid (nt vähk, sh leukeemia ja lümfoom) või keskkonnas leiduvad saasteained (1).

Immuunpuudulikkuse molekulaarsed ilmingud on väga mitmekesised; siiski on just rakulisel immuunsusel võtmeroll paljude kliiniliste nähtude tekkes. Hetkel sõltub immuunpuudulikkuse sündroomide diagnostika ja ravi sündroomi põhjusest (2, 3).

Näiteks soliidorganite transplantatsiooni (SOT) läbinud ja immunosupressante saavate isikute rakulise immuunsuse jälgimises on tavapärane spetsiifiline ravi. Uuritava immuunvastust mõõdetakse üldiselt ravimite farmakoloogiliste kontsentratsioonide jälgimise abil ja siiriku kliinilisel/patoloogilisel hindamisel (2, 3).

Mitmesugused T-rakkude funktsioonide testid mõõdavad rakulist immuunsust mitogeenide (nt fütohemaglutiniin (PHA)), *Phytolacca Americana* mitogeenid ja konkavaiin A (ConA) suhtes; kuid need mõõdavad vaid T-rakkude funktsionaalset võimekust, kusjuures T-rakud on vaid üks rakkude alamhulk, mis on seotud rakulise immuunsusega. On järjest ilmsem, et kaasasündinud immuunmehhanismid on suunatud suurel määral peremeesorganismi kaitsele, kas toimides üksi või tõhustades T-rakkude spetsiifilisi vastuseid. Seetõttu annavad kaasasündinud immuunsust esitavate rakkude (loomulikud tapjarakud [NK]) ja omandatud immuunsust esitavate rakkude (T-rakud) funktsionaalsed vastused üheskoos täielikuma ülevaate rakulisest immuunsusest (2, 3).

QFM on in vitro diagnostiline test, mis kasutab kombinatsiooni stimulantidest (LyoSphere™ pelletitena), mis stimuleerivad spetsiifiliselt erinevaid rakutüüpe, mis määravad nii kaasasündinud kui omandatud immuunsuse. Isiku immuunsüsteemi funktsionaalset olekut hinnatakse, mõõtes vastust kaasasündinud ja omandatud immuunsuse stimulatsioonile, milleks kasutatakse vastavalt Toll Like retseptorite (TLR) ja T-rakkude retseptorite (TCR) agoniste. Interferoon-gamma (IFN- γ) tuvastamine ELISA-meetodil annab rakulise immuunsuse funktsiooni kohta nii kvalitatiivse kui kvantitatiivse tulemuse.

Analüüsi põhimõtted

QFM-analüüsis kasutatakse lüofiliseeritud stimulante (QFM LyoSpheres™), mis lisatakse hepariniseeritud täisverele. Vereproove inkubeeritakse 16–24 tundi. Seejärel eraldatakse verest plasma ning uuritakse, kas selles leidub IFN- γ , mis moodustus vastusena stimulantidele.

QFM-analüüs viiakse läbi etapiviisiliselt. Esiteks kogutakse täisveri QFM-verevõtukatsutisse. Seejärel lisatakse katsutisse QFM LyoSphere, mida seejärel inkubeeritakse niipea kui võimalik ja 8 tunni jooksul alates proovi võtmisest temperatuuril 37 °C. 16- kuni 24-tunnise inkubatsiooniperioodi järel katsutid tsentrifuugitakse, plasma eemaldatakse ja IFN- γ (ühikuks rahvusvahelist ühikut milliliitris: RÜ/ml) hulk mõõdetakse ELISA-meetodil ning tulemust võrreldakse mitmesuguste oodatavate väärtustega, andes ülevaate uuritava immuunvastusest.

QFM on analüüs, mis annab immuunfunktsiooni kohta nii kvalitatiivse kui kvantitatiivse tulemuse. QFM-i tulemused ei pruugi immunosupressiooni kvantitatiivselt näidata.

IFN- γ hulk plasmaproovides võib sageli ületada enamiku ELISA-analüüsi riiderite ülempiiri, isegi siis, kui isikute immunosupressioon on mõõdukas. Soovitav on plasmaproovid lahjendada vahekorras 1:10 ja/või 1:100 lahustis Green Diluent ja analüüsida ELISA-meetodil koos lahjendamata plasmaga.

Märkus. QFM-analüüsi lävi võib varieeruda sõltuvalt isiku immunosupressiooni määrast ja siiriku omadustest.

QFM-i tulemuste tõlgendamise kokkuvõte on toodud pakendi infolehe jaotises „Tulemuste tõlgendamine” lk 23.

Analüüsimiseks kuluv aeg

QFM-analüüsi tegemiseks kuluva aja kohta on umbkaudne hinnang antud allpool. Näidatud on ka testimiseks kuluvat aega, kui proove on mitu.

Verekatsutite inkubeerimine temperatuuril 37 °C: 16 kuni 24 tundi

Ensüüm-immunosorptsiooni analüüs:

umbes 3 tundi ühe ELISA plaadi kohta
(kuni 88 proovi)

< 1 tund tööaega

Lisaks 10–15 minutit iga lisaplaadi kohta

Komponendid ja säilitamine

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Katalooginr	0650-0701
Preparaatide arv	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 viaali
<i>QuantiFERON Monitor LyoSpheres infoleht</i>	1
QuantiFERON Monitor verevõtukatsuteid	
Katalooginr	0650-0101
Preparaatide arv	100
QuantiFERON Monitor verekogumiskatsutid (valge kork, valge rõngas)	100 katsutit
<i>QuantiFERON Monitor-verevõtukatsutite infoleht</i>	1

Komplekti QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA komponendid	Kahest plaadist koosnev ELISA komplekt
Katalooginr	0650-0201
Mikroplaadiribad, 12 × 8 süvendiga (kaetud anti-humaanse IFN- γ monoklonaalse antikehaga (hiir))	2 komplekti 12 × 8 süvendiga mikroplaadiriba
IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ standardkontsentratsioon, lüofiliseeritud; sisaldab rekombinantset humaanset IFN- γ , veise kaseiini, 0,01% mass/maht timerosaali)	1 viaal (8 RÜ/ml pärast rekonstitueerimist)
Green Diluent (Roheline lahjendi; sisaldab veise kaseiini, tavalist hiireseerumit, 0,01% mass/maht timerosaali)	1 × 30 ml viaal
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (Konjugaadikontsentraat (100-kordne), lüofiliseeritud; anti-humaanne (hiir) IFN- γ HRP, sisaldab 0,01% mass/maht timerosaali)	1 × 0,3 ml, pärast rekonstitueerimist
Wash Buffer 20× Concentrate (Pesupuhvri kontsentraat (20-kordne kontsentraat); pH 7,2; sisaldab 0,05 mahu% ProClin [®] 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Ensüümsubstraadi lahus; sisaldab H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametüülbensidiini)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Ensüümi deaktiveerimislahus; sisaldab 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
QuantiFERON Monitor ELISA infoleht	1

* Sisaldab väävelhapet. Ettevaatusabinõude kohta vt lk 11.

Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid

- 37 °C inkubaator*; CO₂ pole nõutav
- Kalibreeritud muutuva mahuga pipettide jaoks*
- Kalibreeritud mitme kanaliga pipetid† (50–100 µl, ühekordse otsaga)
- Mikroplaadi raputi†
- Deioniseeritud või destilleeritud vesi, 2 liitrit
- Mikroplaatide pesuseade (soovitavalt automaatne)
- Mikroplaadilugeja† 450 nm filtri ja 620–650 nm referentsfiltriga
- Gradueeritud silinder (mõõtesilinder)
- Ebemevabad imavad lapid

Säilitamine ja käsitsemine

Verevõtukatsutid

Säilitage QFM-i verevõtukatsuteid temperatuuril vahemikus 4–25 °C. QFM-i verevõtukatsutid peavad verega täitmise ja segamise ajal olema temperatuuril vahemikus 17–25 °C.

LyoSpheres

Säilitage komplekti QFM LyoSpheres temperatuuril vahemikus 2–8 °C.

Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsikomplekti reaktiivid

Säilitage ELISA komplekti reaktiive temperatuuril 2–8 °C.

Kaitske ensüüm-substraadi lahust alati otsese päikesevalguse eest.

Rekonstitueeritud ja kasutamata ELISA reaktiivid

Juhiseid ELISA reaktiivide segamiseks vt jaotisest „2. etapp – IFN- γ ensüüm-immunosorptsiooni analüüs” lk 17.

- Rekonstitueeritud reaktiivikomplekt säilib temperatuuril 2–8 °C 3 kuud. Märkige üles reaktiivikomplekti rekonstitueerimise kuupäev.
- Ülejäänud kontsentraati (100-kordne) tuleb pärast rekonstitueerimist säilitada temperatuuril 2–8 °C ning see tuleb ära kasutada 3 kuu jooksul. Märkige üles konjugaadi rekonstitueerimise kuupäev.

* Veenduge, et seadmed on kontrollitud ja vastavalt tootja soovitudele kalibreeritud.

- Kasutusvalmis konjugaat tuleb ära tarvitada 6 tunni jooksul pärast valmistamist (vt tabel 1).
- Kasutusvalmis pesupuhver säilib toatemperatuuril ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) kuni 2 nädalat.

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Kasutamiseks in vitro diagnostikas

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge vastava ohutuskaardiga (SDS). Need on saadaval mugavas ja kompaktses PDF-vormingus veebiaadressil www.qiagen.com/safety. Seal saate vaadata kõiki QIAGEN-i komplekti ja selle osade ohutuskaarte ning need välja printida.

Hoiatused

- QFM on analüüs, mis annab immuunfunktsiooni kohta nii kvalitatiivse kui kvantitatiivse tulemuse. QFM-i tulemused ei pruugi immunosupressiooni kvantitatiivselt näidata.
- QFM-analüüsi tulemusi tuleb kasutada, arvestades patsiendi immuunsüsteemi seisundi hindamisel kliinilist pilti, haiguste anamneesi ja muid kliinilisi näitajaid.
- QFM-analüüsi lävi võib varieeruda sõltuvalt isiku immunosupressiooni määrast ja siiriku omadustest.

Ettevaatusabinõud

Kasutamiseks ainult in vitro diagnostikas.



ETTEVAATUST! Käsitsege inimverd ja plasmat kui potentsiaalselt nakkusohtlikku. Jälgige asjakohaseid vere ja veretoodete käsitsemise juhiseid. Vere ja veretoodetega kokku puutunud proovid ja materjalid tuleb kõrvaldada kooskõlas föderaalsete, riiklike ja kohalike nõuetega.

QuantiFERON Monitor ELISA analüüsikomplekti komponentidele kehtivad järgmised ohu- ja hoiatuslaused.

Ohulaused



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON ensüümi deaktiveerimislahus)

Sisaldab: sulfuric acid. Hoiatus! Võib söövitada metalle. Põhjustab nahaärritust. Põhjustab tugevat silmade ärritust. Kanda kaitsekindaid/ kaitserõivastust/ kaitseprille/ kaitsemaski.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON ensüümsubstraadi lahus)

Hoiatus! Põhjustab keskmist naha ärritust. Kanda kaitsekindaid/ kaitserõivastust/ kaitseprille/ kaitsemaski.



QuantiFERON Green Diluent (QuantiFERON roheline lahjendi)

Sisaldab: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Sisaldab: tartrazine. Hoiatus! Võib põhjustada allergilist nahareaktsiooni. Kanda kaitsekindaid/ kaitserõivastust/ kaitseprille/ kaitsemaski.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (QuantiFERON pesupuhver, 20-kordne kontsentraat)

Sisaldab: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Ohtlik veeorganismidele, pikaajaline toime. Vältida sattumist keskkonda.

Lisateave

Ohutuskaardid: www.qiagen.com/safety

- *QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA infolehel* kirjeldatud meetoditest ja juhistest kõrvalekaldumine võib tingida valede tulemuste saamise. Lugege juhised enne analüüsi kasutamist tähelepanelikult läbi.
- **NB!** Enne kasutamist vaadake viaalid üle. Ärge kasutage konjugaadi, IFN- γ standardi või QFM LyoSphere viaali, millel on märke kahjustustest või mille kummikork on rikutud. Ärge kasutage purunenud viaale. Rakendage vajalikud meetmed viaalide ohutuks hävitamiseks. Soovitus. Konjugaadi, IFN- γ standardi või QFM LyoSphere viaalide avamiseks kasutage viaalide avajat, et minimeerida risk vigastada end metallkorgi äärisega.
- Ärge kasutage ELISA komplekti, kui mõni reaktiivipudel on enne kasutamist kahjustatud või lekib.
- Ärge segage ega kasutage erinevatest QFM ELISA komplektipartiidest pärit mikroplaadiribasid, IFN- γ standardkomplekti, rohelist lahjendit ega 100-kordset konjugaadikontsentrati. Muid erinevatest komplektidest pärit reaktiive (pesupuhvri kontsentrati (20-kordne kontsentratsioon), ensüümsubstraadi lahust ja ensüümi deaktiveerimislahust) võib kasutada eeldusel, et nende reaktiivide säilivusaeg pole ületatud ja partii üksikasjad on üles kirjutatud.
- Kõrvaldage ülejäänud reaktiivid ja bioloogilised proovid kohalike ja riiklike ohutus- ja keskkonnaalaste määruste kohaselt.
- Ärge kasutage QFM-i verevõtukatsuteid, katsuteid QFM LyoSpheres, ega QFM ELISA pärast aegumiskuupäeva.
- Veenduge, et laboriseadmed on kasutamise jaoks kalibreeritud ja valideeritud.

Proovide võtmine ja käsitlemine

QFM-analüüsi tohib teha vaid täisverest, mis on võetud kas liitiumhepariiniga verevõtukatsutisse või otse QFM-i verevõtukatsutisse; ühe testi jaoks on vaja 1 ml täisverd. Verevõtukatsutid tuleb märgistada ja lisada ka verevõtu aeg.

NB! Nii QFM-i vereproovide stimulatsioon (st QFM LyoSphere pelletite lisamine 1 ml verele) kui nende inkubeerimine temperatuuril 37 °C peab toimuma 8 tunni jooksul alates vere võtmisest.

Hoidke vereproove enne inkubeerimist toatemperatuuril (22 ± 5 °C).

Optimaalsete tulemuste saamiseks tuleb kinni pidada järgmistest juhistest.

1. Sildistage katsutid vastavalt nõuetele.

Veenduge, et igale QFM-i verevõtukatsutile on korralikult märgitud isikuandmed ja verevõtmise aeg.

2. Võtke igalt patsiendilt otse QFM-i verevõtukatsutisse 1 ml veeniverd. Seda protseduuri tohib sooritada vaid koolitatud veenipunkteerija.

Oluline märkus: katsutite temperatuur peab verevõtmise ajal olema vahemikus 17–25 °C.

QFM-katsuteid võib kasutada kuni 810 meetri kõrgusel merepinnast.

Kuna veri voolab 1 ml katsutitesse suhteliselt aeglaselt, jätke katsuti pärast näilise täituvustaseme saavutamist veel 2–3 sekundiks nõela otsa. Sellega on tagatud vajaliku verekoguse saamine.

QFM-i verevõtukatsuti küljel olev must märgistus tähistab 1 ml täituvustaset. QFM-i verevõtukatsutid on valmistatud nii, et need võtavad verd 1 ml ± 10% ja toimivad selles ulatuses optimaalselt. Kui vere tase on mõnes katsutis väljaspool indikaatorjoone vahemikku, tuleb võtta uus vereproov.

Kui verevõtmisel kasutatakse libliknõela, tuleb tühja katsuti abil veenduda, et toru oleks enne QFM-i verevõtukatsutite kasutamist verrega täidetud.

QFM-i verevõtukatsutite kasutamisel kõrgemal kui 810 meetrit või kui veremaht on väike, võivad kasutajad verd võtta süstlaga ja kanda 1 ml verd kohe igasse QFM-i verevõtukatsutisse. Et seda oleks turvaline ja mugav teha, tuleb süstlanõel nõuetekohaselt eemaldada, võtta kõigilt QFM-i verevõtukatsutitelt korgid ära ning viia süstlaga katsutisse 1 ml verd (kuni katsutisildi küljel oleva musta tähise keskkohani). Pange katsutikork kindlalt peale ja segage, nagu allpool kirjeldatud.

Žguti kasutamisel laske žgutt lahti kohe, kui nõel on veeni sisestatud, vältimaks rõhumuutusi, mis võivad veremahtu mõjutada.

Alternatiivselt võib verd võtta ühte üldisesse verevõtukatsutisse, milles sisalduv antikoagulant on liitiumhepariin ja millest veri viiakse seejärel QFM-i verevõtukatsutisse. Antikoagulandina kasutage ainult liitium-

hepariini, kuna muud antikoagulandid võivad analüüsitulemusi moonutada. Täitke verevõtukatsuti (miinimumkogus 3 ml) ja segage hepariini lahustamiseks ettevaatlikult (pöörates katsutit mitu korda tagurpidi). Säilitage verd toatemperatuuril ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$), enne kui viite selle stimuatsiooniks QFM LyoSphere pelletitega QFM-i verevõtukatsutitesse. Veenduge, et veri on vahetult enne teise katsutisse viimist põhjalikult segatud (kergelt loksutades). Viige 1 ml verd QFM-i verevõtukatsutisse. Vere viimine katsutitesse peab toimuma vajalike ohutusabinõude rakendamisel, eemaldades QFM-i verevõtukatsuti korki ja lisades sinna 1 ml verd (kuni musta märgistuseni katsuti etiketil). Pange katsutikorgid kindlalt peale ja segage, nagu järgnevas osas kirjeldatud.

3. Pöörake kohe pärast katsutite täitmist katsutit paar korda õrnalt ringi, et hepariin lahustuks.

NB! Liiga energiline raputamine võib geeli lagundada ja põhjustada valesid tulemusi.

4. Vahetult enne kasutamist laske QFM LyoSpheres pelletitel seista toatemperatuuril ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).

5. Aseptikareegleid järgides lisage QFM LyoSphere 1 ml verele.

Eemaldage verevõtukatsutilt kork.

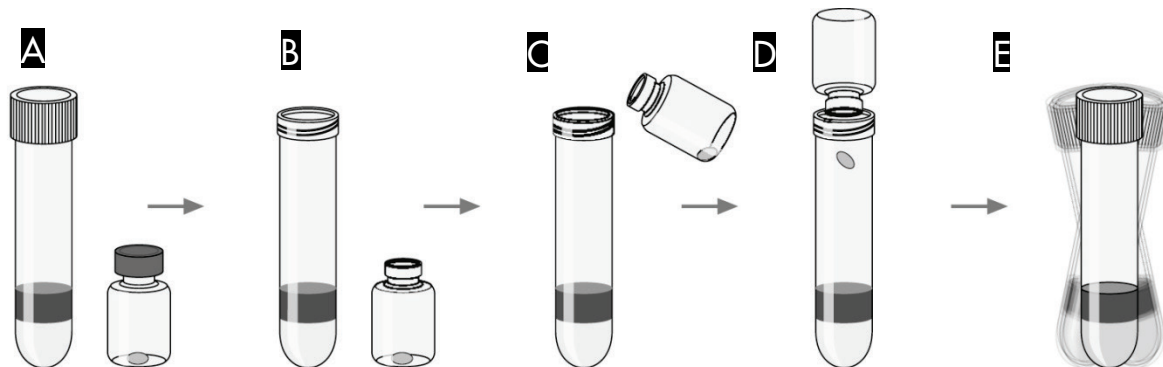
Koputage QFM LyoSphere viaali õrnalt vastu tugevat pinda, et QFM LyoSphere viaali põhja vajuks. Avage QFM LyoSphere viaal, eemaldades kõigepealt metalläärise ja seejärel kummikorgi.

Puistake QFM LyoSphere pelleteid ettevaatlikult 1 ml vereproovi, joondades klaasviaali serva QFM-i verevõtukatsuti servaga ja seejärel kallutage viaali õrnalt, nii et QFM LyoSphere QFM-i verevõtukatsutisse voolaks (vt joonis 1).

NB! Kui QFM LyoSphere kukub QFM-i verevõtukatsutist mööda, hävitage see ja avage uus QFM LyoSphere viaal.

NB! Ärge jätke QFM LyoSphere viaali pikemaks ajaks avatuks. QFM LyoSphere tuleb verele lisada kohe, kui viaali avate.

Kui QFM LyoSphere pelleteid lisatakse QFM-i verevõtukatsutisse kogutud verele, veenduge, et igale katsutile asetatakse selle kork tagasi.



Joonis 1. QFM LyoSphere pelletite lisamine. **A** QFM-i verevõtukatsuti ja QFM LyoSphere pelletite viaal. **B** Eemaldage QFM-i verevõtukatsuti kork ja eemaldage QFM LyoSphere viaalilt metalläärts ja kummikork. **C** Lisage QFM LyoSphere pelletid kohe verele, joondades klaasviaali serva kogumiskatsuti servaga. **D** Järgmiseks pöörake viaali õrnalt, et LyoSphere kogumiskatsutisse satuks. **E** Asetage QFM-i verevõtukatsutile kork ja raputage 5–10 korda.

6. Asetage QFM-i verevõtukatsutile kork ja raputage seda 5–10 korda piisavalt tugevasti, et QFM LyoSphere pelletid täielikult lahustuksid.

Kui QFM LyoSphere pelletid kinnituvad katsuti siseküljele, lahustuvad need, kui need katsuti pööramisel verega kokku puutuvad.

Kui QFM LyoSphere pelletid on lisatud, veenduge, et te samasse katsutisse kogemata teist viaali LyoSphere pelleteid ei lisa.

Märkus. Kuna QFM LyoSphere pelletid on valged, ei ole see pärast lahustumist veres enam nähtav.

NB! Liiga energiline raputamine võib geeli lagundada ja põhjustada valesid tulemusi.

7. Pärast QFM LyoSphere pelletite lisamist tuleb QFM-i verevõtukatsutid võimalikult kiiresti ja 8 tunni jooksul alates vere võtmisest asetada inkubaatorisse temperatuuril 37 ± 1 °C.

Kasutusjuhised

1. etapp – vere inkubeerimine ja plasma eraldamine

Kaasasolevad materjalid

- QFM-i verevõtukatsutid (vt „Komponendid ja säilitamine” lk 6)

Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid

- Vt „Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid” lk 8

Protseduur

1. Inkubeerige 1 ml verd ja QFM LyoSphere pelleteid sisaldavaid QFM-i verevõtukatsuteid PÜSTIASENDIS temperatuuril 37 ± 1 °C 16 kuni 24 tundi.

Märkus. Inkubaator ei vaja CO₂ ega niisutamist.

Pärast inkubeerimist võib QFM-i verevõtukatsuteid enne tsentrifuugimist hoida temperatuuril 4–27 °C kuni 3 ööpäeva.

2. Pärast inkubeerimist võib plasma eraldada, tsentrifuugides QFM-i verevõtukatsuteid 15 minutit kiirusel 2000 kuni 3000 × g (RCF, suhteline tsentrifugaaljõud). Moodustuv hüüvis eraldab rakud plasmast. Kui plasma ei eraldu, tsentrifuugige katsuteid uuesti.

Plasmat on võimalik eraldada ka tsentrifuugimata, kuid seejuures peab toimima äärmise ettevaatusega, et plasma võtmisel rakke mitte kaasa haarata.

3. Kasutage plasmaproovi võtmiseks alati pipetti.

NB! plasmaproove ei tohi pärast tsentrifuugimist ja enne plasma eraldamist mingil juhul üles või alla pipeteerida ega segada. Toimige suure ettevaatusega, et materjal hüüvise pinnaga ei seguneks.

Plasmaproovid võib tsentrifuugitud QFM verevõtukatsutitest kanda otse QFM ELISA ensüüm-immunosorptsiooni analüüsiplaadile; sama kehtib ka ensüüm-immunosorptsiooni ELISA analüüsiautomaatide kasutamise korral.

Plasmaproove võib säilitada kuni 28 päeva temperatuuril 2–8 °C või temperatuuril –20 °C pärast plasma eraldamist ka pikema aja jooksul. Saadud plasmaproovid tuleb enne hoiustamist korgiga sulgeda.

Plasma eraldamisel püüdke saada vähemalt 150 µl plasmat, mis vajadusel võimaldaks korduvtestimist.

IFN-γ hulk plasmaproovides võib sageli ületada enamiku ELISA-analüüsi riiderite ülempiiri, isegi siis, kui isikute immunosupressioon on mõõdukas. Soovitav on plasmaproovid lahjendada vahekorras 1:10 ja/või 1:100

lahustis Green Diluent ja analüüsida ELISA-meetodil koos lahjendamata plasmaga (vt „2. etapp – IFN- γ ensüüm-immunosorptsiooni analüüs”).

2. etapp – IFN- γ ensüüm-immunosorptsiooni analüüs

Kaasasolevad materjalid

- QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA (vt „Komponendid ja säilitamine” lk 6)

Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid

- Vt „Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid” lk 8

Valmistamine

IFN- γ hulk plasmaproovides võib sageli ületada enamiku ELISA-analüüsi riiderite ülempiiri, isegi siis, kui isikute immunosupressioon on mõõdukas. Soovitatav on plasmaproovid lahjendada vahekorras 1:10 ja/või 1:100 lahustis Green Diluent ja analüüsida ELISA-meetodil koos lahjendamata plasmaga.

Olukorras, kus patsiendil võib esineda tugev immunosupressioon, võib vaid lahjendamata plasmaproovi valmistamine ja analüüsimine olla piisav, et saada kvantitatiivset tulemust.

Märkus. Tulemusi, mis jäävad QFM ELISA analüüsivahemikku (st kuni 10 RÜ/ml), tuleks kasutada tulemuste tõlgendamisel. Juhul, kui lahjendamata plasma analüüsitulemus jääb väljapoole QFM ELISA vahemikku, tuleks analüüsitulemuseks anda madalaima lahjendusega proovi analüüsitulemus, mis jääb QFM ELISA analüüsivahemikku (arvestada tuleks ka lahjendustegurit).

Protseduur

1. **Kõik plasmaproovid ja reaktiivid, välja arvatud 100-kordne konjuugaadikontsentraat, peavad olema enne kasutamist saavutanud toatemperatuuri (22 ± 5 °C). Kavandage selleks vähemalt 60 minutit.**
2. **Võtke kasutamata ribad mikroplaadi raamist välja, pange kilepakendisse tagasi ja säilitage kuni kasutamiseni külmikus.**

Varuge QFM-standarditele vähemalt üks riba ja analüüsivatele patsientidele piisav arv ribasid. Hoidke raam ja kaas pärast kasutamist ülejäänud ribade jaoks alles.

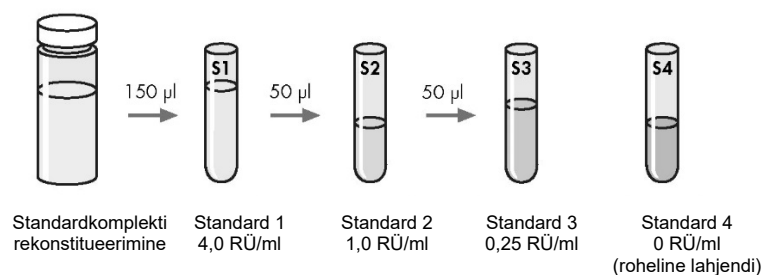
3. Rekonstitueerige lüofiliseeritud IFN- γ Standard viaal viaali etiketile märgitud koguse desioniseeritud või destilleeritud veega. Segage viaali sisu ettevaatlikult (et tekiks võimalikult vähe vahtu) ning veenduge, et sisu oleks täielikult lahustunud. Standardi rekonstitueerimine ettenähtud mahuni annab tulemuseks 8,0 RÜ/ml kontsentratsiooniga lahuse.

NB! Viaali IFN- γ Standard rekonstitutsioonimaht on erinevatel partiidel erinev. Veendumaks, et kasutate õiges koguses desioniseeritud või destilleeritud vett, vaadake standardlahuse viaali etiketti.

Kasutage rekonstitueeritud standardkomplekti IFN- γ ja rohelist lahjendit (GD) lahuste valmistamiseks vahekorras 1:2 ja järgnevalt vahekorras 1:4 (vt joon 2). S1 (standard 1) sisaldab 4,0 RÜ/ml, S2 (standard 2) sisaldab 1,0 RÜ/ml, S3 (standard 3) sisaldab 0,25 RÜ/ml ja S4 (standard 4) sisaldab 0 RÜ/ml (ainult GD). Standardeid tuleb testida kahekordselt. Valmistage igaks ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi seansiks ette standardkomplekti uus lahus.

Soovituslik kahekordne menetlus

- Pange 4 katsutile sildid „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.
- Valage katsutitesse S1, S2, S3 ja S4 150 μ l GD-i.
- Valage katsutisse S1 150 μ l standardlahust ja segage korralikult.
- Valage katsutist S1 50 μ l katsutisse S2 ja segage korralikult.
- Valage katsutist S2 50 μ l katsutisse S3 ja segage korralikult.
- Roheline lahjendi (GD) üksi on nullstandard (S4).



Joonis 2. Standardkõvera ettevalmistamine.

4. Rekonstitueerige lüofiliseeritud 100-kordne konjugaadikontsentraat 0,3 ml deioniseeritud või destilleeritud veega. Segage pudeli sisu ettevaatlikult (et tekiks võimalikult vähe vahtu) ning veenduge, et konjugaat oleks täielikult lahustunud.

Kasutusvalmis konjugaadi valmistamiseks lahjendatakse vajalik kogus rekonstitueeritud 100× konjugaadikontsentraati rohelises lahjendis (tabel 1 Konjugaadi ettevalmistamine). Paigutage ülejäänud 100-kordne konjugaadikontsentraat kohe pärast kasutust uuesti temperatuurile 2–8 °C. Kasutage ainult rohelist lahjendit.

Tabel 1. Konjugaadi ettevalmistamine

Ribade arv	100-kordse konjugaadikontsentraadi kogus	Rohelise lahjendi kogus
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. Verekatsutitest eraldatud ja seejärel külmutatud või hoiule pandud plasmaproove tuleb enne ELISA automaati panemist hoolikalt loksutada.

NB! Kui plasmaproovid pannakse automaati otse tsentrifuugitud QFM-katsutitest, tuleb hoiduda plasmat loksutamast. Toimige suure ettevaatusega, et materjal hüüvise pinnaga ei seguneks.

6. Soovitus: lahjendage plasmaproove vahekorras 1:10.

- Lisage katsutile, millel on patsiendi andmed, 90 µl lahustit Green Diluent (GD) ja märkige etiketile „1:10”.
- Seejärel lisage 10 µl segatud plasmaproovi (täpsemalt segatud plasmaproovide ja otse tsentrifuugitud QFM-katsutitest võetud plasma kohta vt punkt 5).
- Segage hoolikalt pipetiga, vältides vahu teket.

7. Soovitus: plasmaproovide lahjendus vahekorras 1:100.

- Valmistage lahjendus vahekorras 1:10 (vt punkt 6 ülalpool).
- Lisage katsutile, millel on patsiendi andmed, 90 µl lahustit Green Diluent ja märkige etiketile „1:100”.
- Lisage 10 µl lahust lahjendusest 1:10.
- Segage hoolikalt pipetiga, vältides vahu teket.

Soovitus: testige paralleelselt ja just selles järjekorras järgmisi proove:

- lahjendamata, 1:10, 1:100

Analüüsitarkvara QFM Analysis Software toetab ka järgmisi patsiendi proovikombinatsioone:

- lahjendamata
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- lahjendamata, 1:10

8. Tilgutage mitmekanalilise pipetiga igasse ELISA süvendisse 50 µl valmis konjugaati.

9. Tilgutage mitmekanalilise pipetiga vastavatesse mikrolohukestesse 50 µl analüüsitavat plasmaproovi. Seejärel lisage igasse mikrolohukesse 50 µl standardeid 1–4. Analüüsige standardlahuseid duplikaatidena.

10. Katke kõik plaadid kaanega ja segage konjugaati ja plasmaproove/standardeid korralikult 1 minuti vältel mikroplaatide raputis. Vältige pritsimist.

11. Inkubeerige toatemperatuuril (22 ± 5 °C) 120 ± 5 minutit.

Inkubeerimise ajal tuleb plaate kaitsta otsese päikese kiirguse eest.

- 12. Lahjendage inkubeerimise ajal 1 osa 20-kordset pesupuhvri-kontsentraati 19 osa deioniseeritud või destilleeritud veega ja segage korralikult läbi. Analüüsiga on kaasas piisav kogus 20-kordset pesupuhvrikontsentraati, millest piisab 2 liitri kasutusvalmis pesupuhvri valmistamiseks.**

Peske süvendeid mikroplaatide pesuris vähemalt 6 korda 400 µl kasutusvalmis pesupuhvriga. Soovitatav on kasutada automaatset pesemisseadet.

Korralik pesemine on analüüsi tulemuste seisukohast väga tähtis. Kontrollige iga pesutsükli korral, et kõik süvendid oleksid kuni pesupuhvriga **täielikult kaetud**. Soovitus: parimate tulemuste saamiseks leotage mikrolohukesi iga tsükli järel vähemalt 5 sekundit.

Võimaliku nakkusohtliku materjali eemaldamiseks lisage heitveemahutile tavapärasest laboris kasutatavat desinfektante ja järgige vastavaid eeskirju.

- 13. Koputage plaate väheste ebemetega paberrätiku peal, et eemaldada nendesse jäänud pesupuhvri jäägid. Tilgutage igasse mikrolohukesse 100 µl ensüümsubstraadi lahust, katke kõik plaadid kaanega ja segage plaadid raputis.**

- 14. Inkubeerige toatemperatuuril (22 ± 5 °C) 30 minutit.**

Inkubeerimise ajal tuleb plaate kaitsta otsese päikese kiirguse eest.

- 15. Pärast inkubeerimist tilgutage igasse mikrolohukesse 50 µl ensüümi desaktiveerimislahust Enzyme Stopping Solution ja segage plaadid raputis.**

Ensüümi desaktiveerimislahus Enzyme Stopping Solution tuleb viia süvenditesse samas järjekorras ja umbes samas tempos kui lahust Enzyme Substrate Solution (vt punkt 13).

- 16. Mõõtke optilist tihedust (OT) 5 minuti jooksul pärast desaktivaatori lisamist mikroplaatide lugejaga ja kasutage selleks 450 nm filtrit ning 620–650 nm referentsfiltrit. OT-väärtusi on hiljem vaja tulemuste arvutamiseks.**

Arvutused ja analüüsi tõlgendamine

QuantiFERON Monitor analüüsitarkvara kasutatakse algandmete analüüsimiseks ja tulemuste arvutamiseks. See on saadaval veebisaidil www.QuantiFERON.com. Veenduge, et kasutate QuantiFERON Monitor analüüsitarkvara uusimat versiooni.

Tarkvara teeb analüüsi kvaliteedikontrolli, koostab standardkõvera ja väljastab iga analüüsitud katseisiku kohta tulemuse, mida kirjeldatakse üksikasjalikumalt teemas „Tulemuste tõlgendamine”.

Kui lahjendatud plasma analüüs annab QFM ELISA-meetodil tulemuse, mis jääb analüüsivahemiku ülempiiri juurde (st > 10 RÜ/ml), annab analüüsitarkvara QuantiFERON Monitor Analysis Software madalaima lahjenduse tulemuse, mis annab tulemuse QFM ELISA analüüsivahemikus, arvestades ka lahjendustegurit.

QuantiFERON Monitor analüüsitarkvara kasutamise alternatiivina on tulemusi võimalik kindlaks teha ka järgmise meetodi abil.

Standardkõvera moodustamine

(Kui ei kasutata QuantiFERON Monitor analüüsitarkvara)

Leidke iga plaadi standardkomplekti korduste keskmised OT-väärtused.

Konstrueerige $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardkõver, kandes (y-teljele) OT keskmise väärtuse $\log_{(e)}$ ja (x-teljele) standardite IFN- γ kontsentratsiooni (RÜ/ml) $\log_{(e)}$, jättes arvutustest välja nullstandardi. Arvutage regressioonianalüüsi kaudu standardkõvera parim kontuur.

Leidke standardkõvera abil kõikide analüüsitud plasmaproovide IFN- γ kontsentratsioon (RÜ/ml), kasutades iga proovi OT-väärtust.

Nendeks arvutusteks võib kasutada mikroplaatide lugemisseadmetele pakutavaid tarkvarapakette ja standardseid arvutustabeleid või statistikaprogramme (nt Microsoft® Excel®). Soovitatav on selliseid tarkvarapakette kasutada regressioonianalüüsi tegemiseks, standardite variatsioonikoefitsiendi (%VK) ja standardkõvera korrelatsioonikoefitsiendi (r) leidmiseks.

Kui lahjendamata plasmaga saadakse tulemus, mis jääb QFM ELISA analüüsivahemikust kõrgemale, võetakse esitatud tulemus madalaimast lahjendusest, mis annab tulemuse, mis jääb QFM ELISA analüüsivahemikku (arvestades lahjendustegurit).

Analüüsi kvaliteedikontroll

Analüüsi tulemuste täpsus sõltub korrektse standardkõvera moodustamisest. Seetõttu tuleb enne proovide analüüsitulemuste tõlgendamist kontrollida standarditest tuletatud tulemusi.

Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi tulemused on valiidsed, kui on täidetud järgmised tingimused.

- Standardi 1 keskmine OT-väärtus peab olema $\geq 0,600$.
- Standardi 1 ja standardi 2 korduvate OT-väärtuste protsendis peab %VK olema $\leq 15\%$.
- Standardi 3 ja standardi 4 korduvad OT-väärtused ei tohi hälbida keskmisest väärtusest rohkem kui 0,040 OT-ühikut.
- Standardite keskmiste ekstinktsiooniväärtuste põhjal arvatud korrelatsioonikoefitsient (r) peab olema $\geq 0,98$.

QuantiFERON Monitor analüüsitarkvara arvutab ja esitab need kvaliteedikontrolli parameetrid.

Kui nimetatud kriteeriumid pole täidetud, on analüüsipartii kehtetu ja seda tuleb korrata.

Nullstandardi (roheline lahjendi) keskmine OT-väärtus peab olema $\leq 0,150$. Kui keskmine OT-väärtus on $> 0,150$, tuleks kontrollida, kuidas toimub plaatide pesemine.

Tulemuste tõlgendamine

QFM-i tulemusi tõlgendatakse sõltuvalt IFN- γ vastusest kaasasündinud ja omandatud immuunsuse stimulantidele. QFM-analüüs annab immuunfunktsiooni kohta nii kvalitatiivse kui kvantitatiivse tulemuse. QFM-i tulemused ei pruugi immunosupressiooni kvantitatiivselt näidata.

NB! Isiku immuunsüsteemi hindamisel tuleb IFN- γ mõõdetud tulemust hinnata koos kliinilise pildi, haiguste anamneesi ja muude diagnostiliste meetmete foonil (tabel 2). QFM-analüüsi lävi võib varieeruda sõltuvalt isiku immunosupressiooni määrast ja siiriku omadustest.

Tabel 2. Tulemuste tõlgendamine

QFM-i tulemus IFN- γ (RÜ/ml)	Klassifikatsioon	Tõlgendus
< 15	Madal	Isikul on madal IFN- γ -vastus kaasasündinud ja omandatud immuunsuse stimulantidele
15–1000	Mõõdukas	Isikul on mõõdukas IFN- γ -vastus kaasasündinud ja omandatud immuunsuse stimulantidele
> 1000	Kõrge	Isikul on tugev IFN- γ -vastus kaasasündinud ja omandatud immuunsuse stimulantidele

Kui lahjendatud plasmaproovi mõõdetud IFN- γ tulemus on vähem kui 0,1 RÜ/ml:

- veenduge, et vereproovile lisati QFM LyoSphere pelletid ja katsutit inkubeeriti vastavalt käesolevas infolehes olevatele juhistele.
- Veenduge, et IFN- γ tulemus vastab isiku kliinilisele hetkeolukorrale.

Kui peate võimalikuks, et verevõtmisel või vereproovide käsitlemisel võis tekkida tehnilisi probleeme, tuleb tervet QFM-analüüsi uue vereprooviga korrata. Kui tekib kahtlus, et testimisprotseduuri pole sooritatud vastavalt käesolevas infolehes olevatele juhistele, korrake stimuleeritud plasmaproovide analüüsimist ELISA-meetodil (vt täpsemalt jaotist testi kvaliteedikontrolli kohta).

Arstil võib tekkida soov testi korrata, kui testi tulemused ei vasta isiku kliinilisele hetkeolukorrale.

Piirangud

QFM-testi tulemusi tuleb vaadelda koos iga patsiendi kliinilise anamneesi, tema aktuaalse tervisliku seisundi ja muude diagnostiliste uuringutega. Laborid võivad analüüsile sisse seada oma vahemikud.

Laborid võivad teha ka väliseid kontrollanalüüse, kasutades paralleelselt patsientide proovidega tervetelt isikutelt võetud proove.

Ebausaldusväärsed või ebatäpsed tulemused võidakse saada järgmistel põhjustel.

- Ebaõige antikoagulant – kasutada vaid liitiumhepariini, kuna teised antikoagulandid mõjutavad analüüsitulemusi.

- Kõrvalekalded infolehel kirjeldatud protseduurist.
- Tsirkuleeriva IFN- γ ülikõrge kontsentratsioon või heterofiilsete antikehade esinemine.
- Vereproovi võtmise ja temperatuuril 37 °C inkubeerimise vahe on pikem kui 8 tundi.
- QFM-i katsutites on liiga palju või liiga vähe verd, st väljaspool vahemikku 0,9 kuni 1,1 ml.

Sooritusnäitajad

Kliinilised uuringud

Kaks kliinilist uuringut viidi läbi, et võrrelda näiliselt tervete isikute (n = 114) ja siirikuga patsientide (n = 30) vastust. Siiriku retsipientidest 18 olid varases siirdamisjärgses kohordis (Early Post-Tx, 3 kuud pärast siirdamist) ja 12 olid hilises siirdamisjärgses või stabiilses kohordis (Late Post-Tx, > 12 kuud pärast siirdamist).

- Proove võeti igalt isikult grupis Early Post-Tx (3 kuud siirdamisest, n = 64 proovi) kuni 5 ajahetkel.
- Proove võeti igalt isikult grupis Late Post-Tx (hiline siirdamisjärgne periood, n = 12 proovi) 1 ajahetkel
- Proove võeti igalt isikult näiliselt tervete isikute grupis (n = 114) 1 ajahetkel

Vastused QFM-le jäid nii grupis Early Post-Tx (varane siirdamisjärgne periood) kui Late Post-Tx (hiline siirdamisjärgne periood) madalasse ja mõõdukas vahemikku. Grupis Early Post-Tx oli suurem protsent (93,8%) madala vahemiku vastuseid ja madalam protsent (6,3%) mõõduka vahemiku vastuseid, samas kui Late Post-Tx grupis oli 25% vastustest madalas vahemikus ja 66,7% mõõdukas vahemikus (tabel 3). Grupis Early Post-Tx ei jäänud ükski vastus kõrgesse vahemikku, samas kui vaid 1 (8,3%) grupi Late Post-Tx vastustest jäi kõrgesse vahemikku. QFM-i vastused näiliselt tervete inimeste kohordis jäid peamiselt mõõdukas (83,3%) ja kõrgesse vahemikku (15,8%) (tabel 3).

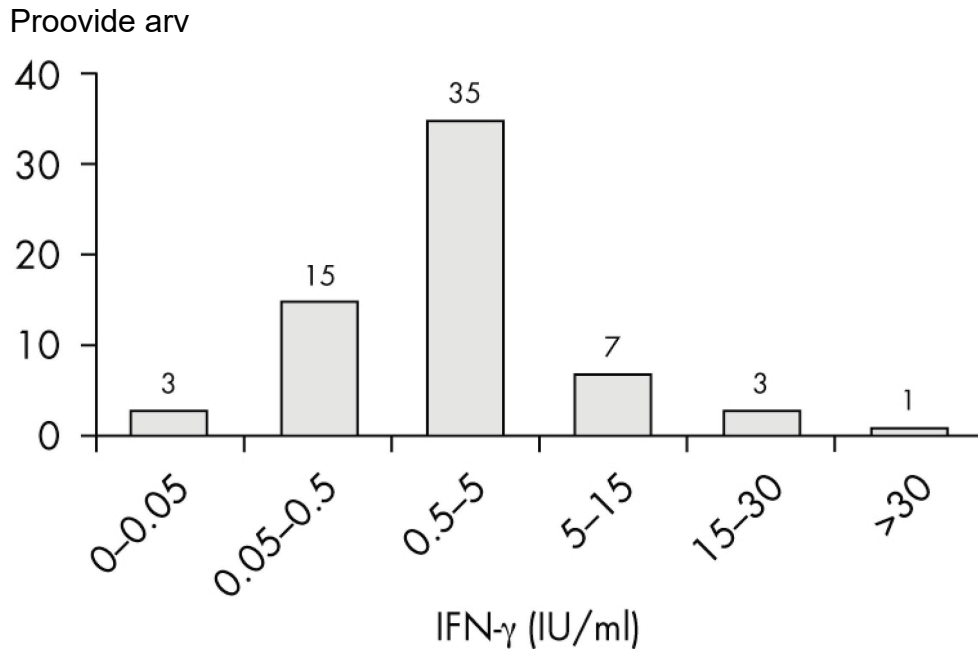
Tabel 3. QFM-i vastuste vahemik näiliselt tervetel isikutel võrrelduna vastusega siirikute retsipientidel

IFN- γ (RÜ/ml)	Tulemuste kategooria	Varane siirdamis- järgne %* 95% CI n	Hiline siirdamis- järgne %* 95% CI n	Näiliselt terve %* 95% CI n	Tulemused kokku
< 15	Madal	93,8% 85,0–97,5 n = 60	25,0% 8,9–53,2 n = 3	0,9% 0,2–4,8 n = 1	64
15–1000	Mõõdukas	6,3% 2,5–15,0 n = 4	66,7% 39,1–86,2 n = 8	83,3% 75,4–89,1 n = 95	107
> 1000	Kõrge	0,0% 0–5,7 n = 0	8,3% 1,5–35,4 n = 1	15,8% 10,2–23,6 n = 18	19
Proove kokku		64	12	114	190

* Protsendid näitavad proovide proportsiooni igas doonorikohordis, mis jäävad vastavasse vastusevahemikku.

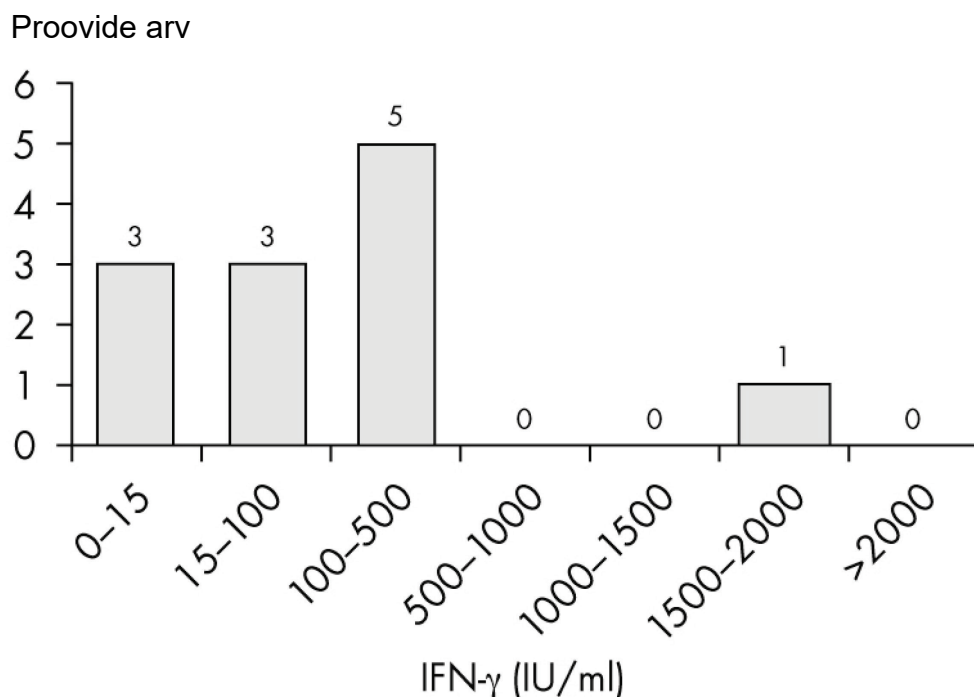
Eeldatavad väärtused

IFN- γ vastuste jaotus QFM-analüüsi puhul varases siirdamisjärgses perioodis olevatel patsientidel (kuni 3 kuud pärast siirdamist) määrati 64 proovi põhjal, mis võeti 18 siiriku retsiptiendilt, kasutades meetodit QFM ELISA (joonis 3).



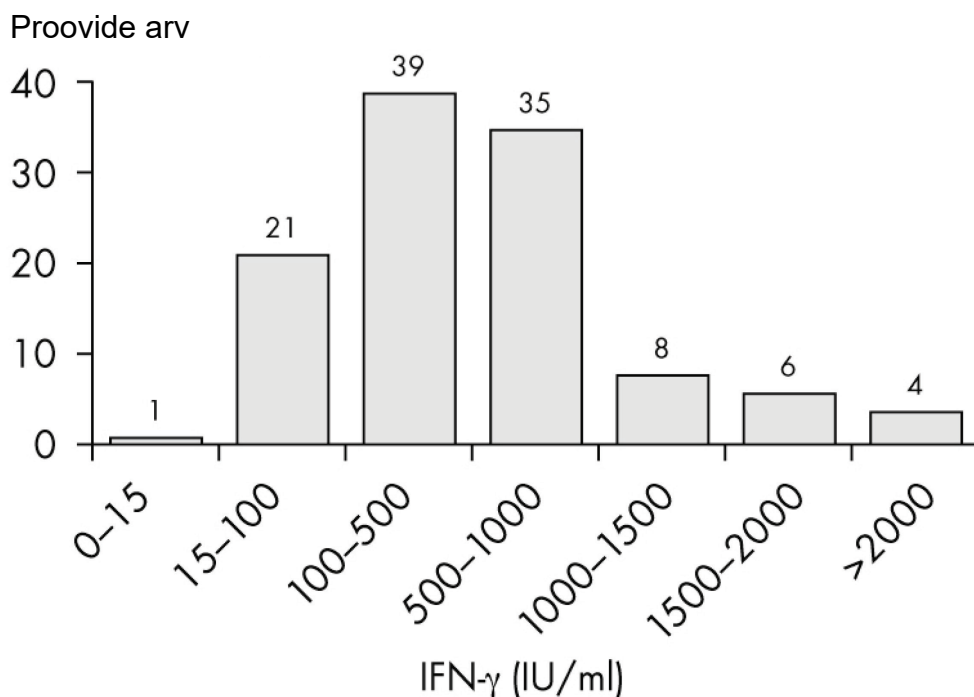
Joonis 3. QFM IFN- γ vastuste jaotus varases siirdamisperioodis patsientidel (n = 64; mediaanväärtus = 1,5 RÜ/ml).

IFN- γ vastuste jaotus QFM-analüüsi puhul hilises siirdamisjärgses perioodis olevatel patsientidel (> 12 kuud pärast siirdamist) määrati 12 proovi põhjal kasutades meetodit QFM ELISA (joonis 4).



Joonis 4. QFM IFN- γ vastuste jaotus hilises siirdamisperioodis patsientidel (n = 12; mediaanväärtus = 98,8 RÜ/ml).

IFN- γ vastuste jaotus analüüsi QuantiFERON Monitor puhul näiliselt tervetel isikutel määrati 114 proovi põhjal, kasutades QFM ELISA meetodit (joonis 5).



Joonis 5. QFM IFN- γ vastuste jaotus näiliselt tervetel isikutel (n = 114; mediaanväärtus = 400,5 RÜ/ml).

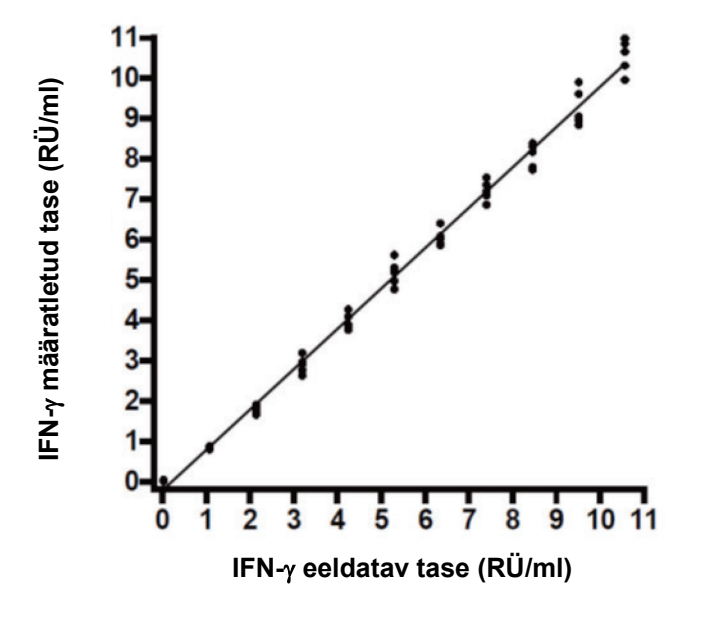
QFM vastused soliidorganite transplantatsiooni patsientidel

QFM hinnati soliidorganite transplantatsiooni läbinud patsientidega tehtud vaatlevas läbilõikeuuringus (4). Uuringusse kaasati: 212 tervet uuritavat, mille alamgrupiks oli 30 uuritavaga vanuse ja soo poolest samasuguste parameetritega kontrollgrupp, 30 siirdamiseelset patsienti, 18 varases siirdamisperioodis olevat patsienti (66 proovi; keskmine siirdamisjärgne periood 21 päeva) ja 11 hilises siirdamisjärgses perioodis olevat patsienti (keskmine siirdamisjärgne aeg 2290 päeva). Keskmine IFN- γ toodang oli tervetest isikutest koosnevas kontrollgrupis 555,2 RÜ/ml ja vanuse ja soo poolest ühildatud grupis 614,6 RÜ/ml. Keskmine IFN- γ toodang oli märkimisväärselt madalam nii siirdamiseelses (IFN- γ = 89,3 RÜ/ml) kui ka varases siirdamisjärgses (IFN- γ = 3,76 RÜ/ml) grupis olevatel patsientidel, võrrelduna soo ja vanuse poolest ühildatud grupiga ($p < 0,001$). Täheledatai immuunfunktsiooni taastumist hilises siirdamisjärgses perioodis olevatel patsientidel (keskmine IFN- γ = 256,1 RÜ/ml) ja näidati, et see on märkimisväärselt kõrgem kui varases siirdamisjärgses perioodis olevatel patsientidel ($p < 0,05$). See uuring näitab, et QFM-i võib kasutada rakulise immuunvastuse hindamiseks soliidorganite transplantatsiooni läbi teinud immuunsupresseeritud isikutel.

Analüüsi sooritusnäitajad

QFM ELISA on lineaarne. Teadaoleva IFN- γ kontsentratsiooniga 11 plasma-proovi 5 paralleelproovi paigutati juhuslikus järjestuses ELISA-plaadile. Lineaarsel regressioonisirgel on kalle $1,002 \pm 0,011$ ja korrelatsioonikordaja 0,99 (joonis 6).

QFM ELISA tuvastuspiir on 0,065 RÜ/ml ja analüüs ei näita IFN- γ kuni 10 000 RÜ/ml kontsentratsiooni juures mingeid ülisuure kontsentratsiooniga seotud negatiivseid tulemusi.



Joonis 6. QFM ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi lineaarsusprofiil, mis määratleti teadaoleva IFN- γ kontsentratsiooniga 11 plasmaproovi 5 paralleelproovi analüüsimise teel.

QFM-analüüsi korratavust (etapp 1) määrati 20 tervelt uuritavalt võetud vereproovide alusel. Hinnati kolme erinevat operaatorit, QFM LyoSphere partiid ja varustuse komplekti. IFN- γ vastuse kontsentratsioonide keskmine variatsioonikoefitsient QFM ELISA-meetodil oli kõigis kolmes QFM LyoSpheres pelletite partiis ja ka muudes testitavates parameetrites 22,22% (95% CI: 17,20–27,25).

QFM-analüüsi korratavust (etapp 1) hinnati, mõõtes tulemuste varieeruvust sama doonori vere 5–6 korduval stimuleerimisel QFM LyoSphere pelletitega 14 uuritaval. Keskmine variatsioonikoefitsient oli 14 testitud uuritaval 14,7% (95% CI: 10,2–19,2). Üksikisikute %CV oli väiksem kui 30%.

QFM ELISA-meetodi korratavust (etapp 2) hinnati 20 erineva IFN- γ kontsentratsiooniga plasmaproovi analüüsimisel 3-kaupa, 3 laboris 3 järjestikusel päeval ja 3 operaatori poolt. Seega analüüsiti igat proovi 27 korda 9 eraldi analüüsipartiis. Üks proov oli kontroll-lahus ja selle arvutatud IFN- γ kontsentratsioon oli 0,08 RÜ/ml (95% CI: 0,07–0,09). Ülejäänud 19 plasmaproovi

kontsentratsioonid olid vahemikus 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) kuni 7,7 RÜ/ml (95% CI: 7,48–7,92).

Analüüsipartii või analüüsisisest ebatäpsust hinnati iga plaadipartii IFN- γ sisaldava analüüsitava plasmaproovi keskmise %VK leidmise teel (n = 9) ja selle ebatäpsuse vahemik %VK oli 4,1–9,1%. Analüüsipartii keskmine %VK ($\pm 95\%$ CI) oli 6,6% $\pm 0,6\%$. IFN- γ nullplasmaproovi keskmine %VK oli 14,1%.

Kogu- või analüüsidevaheline ebatäpsus määratleti iga plasmaproovi 27 arvutatud IFN- γ kontsentratsiooni võrdlemise teel. Ebatäpsuse vahemik %VK oli 6,6–12,3%. Üldine keskmine %VK ($\pm 95\%$ CI) oli 8,7% $\pm 0,7\%$. IFN- γ nullplasmaproovi %VK oli 26,1%. Selline varieerumistase oli eeldatav, kuna IFN- γ arvutatud kontsentratsioon on madal ja madala kontsentratsiooni varieeruvus on suurem kui kõrgemate kontsentratsioonide puhul.

Tehniline teave

Plasmaproovide hübimine

Kui plasmaproovide pikemaajalisel säilitamisel tekib nendes fibrinide hübimine, tuleb proove tsentrifuugida, kuni tekib sete; see hõlbustab plasma pipeteerimist.

Tõrkeotsingujuhend

See tõrkeotsingujuhend võib aidata tekkivaid probleeme lahendada. Lisateavet leiate ka tehnilisest teabest veebisaidil: www.QuantiFERON.com. Kontaktteabe leiate tagakaanelt.

ELISA analüüsi tõrkeotsing

Mittespetsiifiline värvireaktsioon

Võimalik põhjus	Lahendus
a) Plaadid pole piisavalt puhtad	Peske plaati vähemalt 6 korda, kasutades iga süvendi kohta 400 µl pesupuhvrit. Sõltuvalt kasutatavast pesuseadmest võib osutuda vajalikuks üle 6 pesutsükli. Iga pesutsükli vahele tuleb jätta vähemalt 5 sekundi pikkune leotusaeg.
b) ELISA süvendite ristsaastumine	Proovide hoolikas pipeteerimine ja segamine minimeerib saastumisohu.
c) Komplekt/ komponendid on aegunud	Kontrollige, et komplekti säilivusaeg poleks möödas. Tagage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentraat on ära kasutatud 3 kuu jooksul pärast rekonstitueerimist.
d) Ensüüm-substraadi lahus on saastunud	Kui substraat muutub sinakaks, tuleb see kõrvaldada. Kontrollige, et kasutatavad reaktiivimahutid oleksid puhtad.
e) Plasmad on enne eraldamist QFM-katsutites loksutatud	plasmaproove ei tohi pärast tsentrifuugimist ja enne plasma eraldamist mingil juhul üles või alla pipeteerida ega segada. Toimige suure ettevaatusega, et materjal hüüvise pinnaga ei seguneks.

Standardite halvad optilise tiheduse näidud

Võimalik põhjus	Lahendus
a) Viga standardi lahjendamisel	Veenduge, et standardkomplekti lahused valmistataks õigesti vastavalt selle infolehe juhistele.
b) Pipeteerimisviga	Veenduge, et pipetid oleks kalibreeritud ja neid kasutataks vastavalt tootja juhistele.
c) Inkubeerimis-temperatuur on liiga madal	Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi inkubeerimine tuleb teha toatemperatuuril (17–27 °C).

ELISA analüüsi tõrkeotsing

- | | |
|--|---|
| d) Inkubeerimisaeg on liiga lühike | Inkubeerige konjugaadi, standardlahuste ja proovidega plaati 120 ± 5 minutit. Inkubeerige lahust Enzyme Substrate Solution plaadil 30 minutit. |
| e) Kasutati valet plaadilugemisfiltrit | Mikroplaati tuleb lugeda 450 nm filtri ja 620–650 nm referentsfiltri abil. |
| f) Reaktiivid on liiga külmad | Kõik reaktiivid (välja arvatud 100-kordne konjugaadikontsentraat) peavad enne analüüsi tegemist olema saavutanud toatemperatuuri. See võtab aega umbes 1 tund. |
| g) Komplekt/ komponendid on aegunud | Kontrollige, et komplekti säilivusaeg poleks möödas. Tagage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentraat on ära kasutatud 3 kuu jooksul pärast rekonstitueerimist. |

Tausta tugev värvumus

- | Võimalik põhjus | Lahendus |
|--|--|
| a) Plaadid pole piisavalt puhtad | Peske plaati vähemalt 6 korda, kasutades iga süvendi kohta 400 µl pesupuhvrit. Sõltuvalt kasutatavast pesuseadmest võib osutada vajalikuks üle 6 pesutsükli. Iga pesutsükli vahele tuleb jätta vähemalt 5 sekundi pikkune leotusaeg. |
| b) Inkubeerimis-temperatuur on liiga kõrge | Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi inkubeerimine tuleb teha toatemperatuuril (17–27 °C). |
| c) Komplekt/ komponendid on aegunud | Kontrollige, et komplekti säilivusaeg poleks möödas. Tagage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentraat on ära kasutatud kolme kuu jooksul pärast rekonstitueerimist. |
| d) Ensüümsubstraadi lahus on saastunud | Kui substraat muutub sinakaks, tuleb see kõrvaldada. Kontrollige, et kasutatavad reaktiivimahutid oleksid puhtad. |

ELISA analüüsi tõrkeotsing

Mittelineaarne standardkõver ja kahekordsete testide vahelised hälbed

Võimalik põhjus	Lahendus
a) Plaadid pole piisavalt puhtad	Peske plaati vähemalt 6 korda, kasutades iga süvendi kohta 400 µl pesupuhvrit. Sõltuvalt kasutatavast pesuseadmest võib osutuda vajalikuks üle 6 pesutsükli. Iga pesutsükli vahele tuleb jätta vähemalt 5 sekundi pikkune leotusaeg.
b) Viga standardi lahendamisel	Veenduge, et standardi lahused valmistataks vastavalt selle infolehe juhistele õigesti.
c) Reaktiivid ei ole läbi segatud	Segage reaktiive enne süvenditesse jaotamist kergelt või loksutage nende anumaid.
d) Ebaühtlane pipeteerimine või katkestused testi läbiviimisel	Proovide ja standardite jaotamine peab toimuma katkestusteta. Kõik reaktiivid peavad olema enne testi alustamist kasutamiseks ette valmistatud.

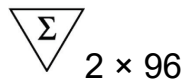
Tooteteave ja tehnilised juhendid on QIAGENist tasuta saadaval edasimüüjate kaudu või veebisaidil www.QuantiFERON.com.

Viited

QFM materjalide täielik loend asub saidil Gnowee – QuantiFERON-i viiteteegis, mis on saadaval veebiaadressil www.gnowee.net.

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

Tähised



Piisav 2 × 96 proovi ettevalmistamiseks



Seaduslik tootja



CE-IVD-ga märgitud tähis



Kasutamiseks in vitro diagnostikas



Partii kood



Katalooginumber



Kõlblik kuni



Temperatuuripiirangud



Kasutamiseks tutvuge juhistega



Mitte uuesti kasutada



Hoida otsese päikesevalguse eest



Euroopa Ühenduse volitatud esindaja

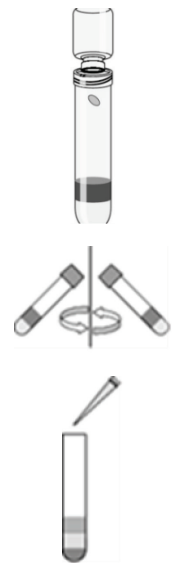
Kontaktteave

Tehnilise toe ja lisateabe saamiseks helistage tasuta numbril 00800-22-44-6000, vt meie tehnilise toe keskust veebiaadressil www.qiagen.com/contact või võtke ühendust mõne QIAGENi tehnilise toe osakonnaga (vt tagakaant või külastage veebilehte www.qiagen.com).

Testi lühikirjeldus

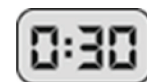
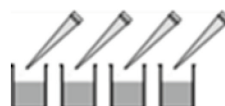
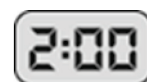
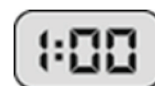
1. etapp – vereproovi inkubeerimine

1. Võtke veri QFM-i verevõtukatsutisse või liitiumhepariiniga verevõtukatsutisse. Märkige katsutitele patsientide andmed ning vere võtmise aeg, seejärel transportige toatemperatuuril 8 tunni jooksu alates vere võtmisest.
 - a. Kui veri võeti liitiumhepariiniga verevõtukatsutisse, viige 1 ml verd QFM-i verevõtukatsutisse ja märkige katsutile patsiendi andmed ja verevõtu aeg.
2. Lisage igale QFM-i verevõtukatsutile, milles on 1 ml verd, 1 QFM LyoSphere viaali sisu ja lahustage LyoSphere, seejäres inkubeerige katsuteid niipea kui võimalik (8 tunni jooksul alates vere võtmisest) **püstiasendis** 16–24 tundi temperatuuril 37 °C.
3. Tsentrifugeerige katsuteid pärast inkubeerimist 15 minutit 2000–3000 × *g* (RCF) juures, et plasma ja punalibled eraldada.
4. Pärast tsentrifugimist ja enne plasma eraldamist ei tohi seda mingil juhul üles või alla pipeteerida ega segada. Olge hoolikas, et plasma ei seguneks hüüvise pinnaga.



2. etapp – IFN- γ ensüüm-immunosorptsiooni analüüs

1. Ensüüm-immunosorptsiooni analüüsi komponentidel (välja arvatud 100-kordne konjugaadikontsentraat) tuleb lasta vähemalt 60 minutit toatemperatuuril stabiliseeruda.
2. Rekonstitueerige standardkomplekt destilleeritud või deioniseeritud veega 8,0 RÜ/ml-ni. Valmistage 4 standardlahust.
3. Rekonstitueerige lüofiliseeritud 100-kordne konjugaadikontsentraat destilleeritud või deioniseeritud veega.
4. Valmistage roheline lahjendiga konjugaat ja valage igasse süvendisse 50 μ l.
5. Lisage vastavatesse mikrolohukestesse 50 μ l testitavat plasmaproovi (lahjendamata, lahjendused vastavalt 1:10 ja 1:100) ja 50 μ l standardlahuseid. Segage raputis.
6. Inkubeerige 120 \pm 5 minutit toatemperatuuril.
7. Peske süvendeid vähemalt 6 korda, kasutades iga süvendi kohta 400 μ l pesupuhvrit.
8. Tilgutage igasse süvendisse 100 μ l ensüümsubstraadi lahust. Segage raputis.
9. Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril.
10. Tilgutage igasse süvendisse 50 μ l deaktivaatorit. Segage raputis.
11. Mõõtke tulemusi 450 nm filtri ja 620–650 nm referentsfiltriga.
12. Analüüsige tulemusi.



Märkused

Olulised muudatused

QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA infolehe selle väljaande olulised muudatused on esitatud kokkuvõtvalt järgmises tabelis.

Peatükk	Lehekülg	Muudatus(ed)
Ettevaatusabinõud	11	Uus GHS teave
Ettevaatusabinõud	12	Lisatud ohutusjuhised, mis on seotud äärisega korkidega viaalidega.

Kaubamärgid: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (QIAGENi kontsern); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLymph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

QuantiFERON Monitor Kit piiratud litsentsileping

Selle toote kasutamine tähendab, et toote ostja või kasutaja nõustub järgmistega tingimustega.

1. Toodet tohib kasutada ainult vastavalt tootega kaasas olevatele protokollidele ja sellele käsiraamatule ning ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna oma intellektuaalse omandi all litsentse komplekti komponentide kasutamiseks või ühendamiseks sellesse komplekti mittekuuluvate komponentidega, välja arvatud toote protokollides, selles käsiraamatus ja veebisaidil www.qiagen.com. Mõne neist lisaprotokollidest on lisanud QIAGEN-i kasutajate jaoks teised QIAGEN-i kasutajad. QIAGEN pole neid protokolle põhjalikult testinud ega optimeerinud. QIAGEN ei garanteeri, et need ei riku kolmandate osapoolte õigusi.
2. QIAGEN ei anna garantiid, et komplekt ja/või selle kasutus ei riku kolmandate osapoolte õigusi, v.a selgesõnalised litsentsid.
3. Komplekt ja selle osad on litsentsitud ühekordseks kasutuseks ning neid ei tohi taaskasutada, parandada ega edasi müüa.
4. QIAGEN ütleb lahti muudest väljendatud või kaudsetest litsentsidest, v.a selgesõnalistest litsentsidest.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustuvad, et ei tee ise ega luba kellelgi teisel teha midagi, mis võiks kaasa aidata või viia ülaltoodud keelatud toiminguteni. QIAGEN võib selle piiratud litsentsilepingu keelde jõustada mis tahes kohtus ning taotleda tagasi kõik piiratud litsentsilepingu või komplekti ja/või selle komponentidega seotud mis tahes intellektuaalse omandi õiguste jõustamiseks kulunud juurdlus- ja kohtukulud, sh advokaaditasud.

Uuendatud litsentsitingimused leiata veebilehelt www.qiagen.com.

© 2014, QIAGEN. Kõik õigused kaitstud.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

