


Príbalový leták k testu QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA


 2 x 96

Test IFN- γ v celej krvi s meraním reakcií na stimulatory
vrodeného a adaptívneho imunitného systému

Verzia 1

 Na diagnostické použitie in-vitro

CE

 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, USA

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NEMECKO

1079024SK Ver. 03

 www.QuantiFERON.com



Obsah

Účel použitia	4
Súhrnné informácie o teste a jeho objasnenie	4
Princípy testu	5
Čas potrebný na vykonanie testu	6
Súčasti a skladovanie	6
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú	8
Skladovanie a manipulácia	8
Varovania a preventívne opatrenia	10
Varovania	10
Preventívne opatrenia	11
Odber vzoriek a manipulácia s nimi	13
Pokyny na použitie	16
Výpočty a interpretácia testu	22
Generovanie krivky štandardu	22
Kontrola kvality testu	23
Interpretácia výsledkov	23
Obmedzenia	25
Charakteristiky účinnosti	25
Klinické štúdie	25
Charakteristiky účinnosti testu	30
Technické informácie	31
Zrazené plazmové vzorky	31
Spríevodca riešením problémov	32
Referenčná literatúra	34
Symboly	35
Kontaktné informácie	35
Skrátený postup testu	36

Účel použitia

Test QuantiFERON Monitor (QFM) je diagnostický test in vitro určený na detekciu fungovania bunkami sprostredkovaných imunitných reakcií meraním úrovni interferónu gama (IFN- γ) v plazme pomocou enzymatickej imunosorbénčnej analýzy (ELISA) po vykonaní inkubácie heparinizovanej celej krvi so stimulátormi vrodeneho a adaptívneho imunitného systému. Tento test sa používa na detekciu bunkami sprostredkovaných imunitných reakcií v populácii príjemcov transplantovaných tuhých orgánov s imunosupresívnou terapiou.

Test QFM sa má používať v súčinnosti s hodnotením rizika a ďalšími zdravotníckymi a diagnostickými hodnoteniami.

Súhrnné informácie o teste a jeho objasnenie

Imunodeficiencia je charakterizovaná zníženou schopnosťou spustenia účinnej imunitnej reakcie. Táto oslabená alebo neprítomná reakcia môže byť spôsobená primárnou alebo získanou (sekundárnou) imunodeficienciou (1).

Primárne imunodeficiencie sú geneticky zdedené a sú charakterizované nedostatočnosťou konkrétnych častí adaptívneho alebo vrodeneho imunitného systému (1). Väčšina imunodeficiencií je však získaná (sekundárna) a môže byť spôsobená patogénmi, liekmi (napríklad imunosupresívnou terapiou nasadenou po transplantácii orgánu), ochorením (napríklad karcinómom – leukémiou alebo lymfómom) alebo znečisteným životným prostredím (1).

Molekulárny základ imunodeficiencie sa môže líšiť, avšak kľúčovú rolu vo vyvolávaní množstva z pozorovaných klinických prejavov hraje bunková imunita. Diagnóza a riadenie syndrémov imunodeficiencie v súčasnosti závisí od pôvodcu (2, 3).

Napríklad, v prípade pacientov, ktorí podstúpili transplantáciu tuhých orgánov a ktorí dostávajú lieky na potlačenie ich imunitného systému, sa štandardne používa ad hoc riadenie a monitoruje sa stav bunkovej imunodeficiencie. Stav imunitnej reakcie pacienta sa bežne meria monitorovaním farmakologických hladín liečiv a klinickým/patologickým hodnotením fungovania transplantovaného orgánu (2, 3).

Veľké množstvo testov funkcie T-buniek meria bunkovú imunitu voči mitogénom, ako sú fytohemaglutinín (PHA), mitogén líčidla amerického a konkanavalín A (ConA). Tieto testy však merajú funkčnosť T-buniek, ktoré sú len podskupinou buniek tvoriacich bunkovú imunitu. Je čoraz viac zrejmé, že mechanizmy vrodeneho imunitného systému výrazne prispievajú k celkovej obranyschopnosti jedinca, a to buď samostatne, alebo zlepšovaním reakcií T-buniek. Funkčné reakcie buniek vrodeneho (prirodzené zabíjače [NK]) a adaptívneho (T-bunky) imunitného systému spolu tvoria komplexnejšiu analýzu bunkovej imunity (2, 3).

Test QFM je diagnostický test in vitro, ktorý využíva kombináciu stimulátorov (vo forme granuly LyoSphere™), ktoré špecificky stimulujú rôzne typy buniek tvoriacich vrodený a adaptívny imunitný systém. Funkčný stav imunitného systému pacienta sa určuje meraním reakcie na stimuláciu vrodeného a adaptívneho imunitného systému agonistami receptorov TLR a TCR. Detekcia interferónu gama (IFN- γ) pomocou analýzy ELISA poskytuje kvalitatívne i kvantitatívne hodnotenie fungovania bunkami sprostredkovaných imunitných reakcií.

Princípy testu

Test QFM využíva lyofilizované stimulatory (granuly QFM LyoSphere™), ktoré sa pridávajú do heparinizovanej celej krvi. Inkubácia krvi sa vykonáva po dobu 16 až 24 hodín. Po ukončení inkubácie sa odoberie plazma a plazma sa testuje na prítomnosť IFN- γ vytvoreného ako reakcia na stimulatory.

Test QFM sa vykonáva v etapách. Najskôr sa odoberie celá krv do skúmavky na odber krvi QFM. Potom sa do skúmavky pridajú granuly QFM LyoSphere a skúmavka sa čo najskôr inkubuje pri teplote 37 °C (najneskôr však do 8 hodín od odberu). Po uplynutí inkubačnej doby 16 až 24 hodín sa skúmavky odstredia, plazma sa odoberie a pomocou testu ELISA sa odmeria množstvo IFN- γ (v medzinárodných jednotkách na jeden mililiter, IU/ml). Výsledky sa následne porovnávajú s rozsahom očakávaných hodnôt a charakterizuje sa tak imunitná reakcia pacienta.

QFM je test, ktorý poskytuje kvalitatívne i kvantitatívne hodnotenie fungovania imunitného systému. Výsledky testu QFM nemusia priamo kvantifikovať úroveň potlačenia imunity.

Množstvo IFN- γ v plazmových vzorkách môže často presahovať horné limitné hodnoty väčšiny čítačiek ELISA, a to aj v prípade, ak jednotlivci podstupujú stredne intenzívnu imunosupresívnu terapiu. Odporúčame, aby ste plazmové vzorky zriedili v zelenom riedidle v pomere 1:10 respektíve 1:100 a analyzovali ich pomocou testu ELISA spolu s nezriedenou plazmou.

Poznámka: Prahová hodnota testu QFM sa môže líšiť v závislosti od úrovne potlačenia imunity a individuálnych podmienok transplantácie u jednotlivých pacientov.

Prečítajte si časť „Interpretácia výsledkov“ na strane 23 tohto príbalového letáka, v ktorej nájdete informácie o spôsobe interpretácie výsledkov testu QFM.

Čas potrebný na vykonanie testu

Odhad času potrebného na vykonanie testu QFM je uvedený nižšie. Súčasťou týchto informácií je aj čas potrebný na testovanie viacerých vzoriek v dávkach.

Inkubácia krvných skúmaviek pri teplote 37 °C: 16 až 24 hodín

ELISA: Približne 3 hodiny/jedna doštička ELISA
(až 88 vzoriek)

Práca < 1 hod.

Pre každú ďalšiu doštičku pridajte 10 až 15 minút

Súčasti a skladovanie

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Katalógové číslo	0650-0701
Počet príprav	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 liekoviek
<i>Príbalový leták k testu QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
Skúmavky na odber krvi QuantiFERON Monitor	
Katalógové číslo	0650-0101
Počet príprav	100
Skúmavky na odber krvi QuantiFERON Monitor (biele viečko, biely prstenec)	100 skúmaviek
<i>Príbalový leták k skúmavkám na odber krvi QuantiFERON Monitor</i>	1

Súčasti súpravy QuantiFERON Monitor ELISA s 2 doštičkami	Súprava ELISA s 2 doštičkami
Katalógové číslo	0650-0201
Mikrotitračné prúžky, 12 × 8 kalíškov (s myšacou antihumánnou monoklonálnou protilátkou IFN- γ)	2 súpravy 12 mikrotitračných prúžkov s 8 kalíškami
IFN- γ Standard, lyophilized (Štandard IFN- γ , lyofylizovaný; obsahuje rekombinantný ľudský IFN- γ , hovädzí kazeín, Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 liekovka (8 IU/ml po zriedení)
Green Diluent (Zelené riedidlo; obsahuje hovädzí kazeín, štandardné myšacie sérum, Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 × 30 ml liekovka
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (Konjugát s koncentráciou 100×; myšacie antihumánne IFN- γ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 × 0,3 ml po zriedení
Wash Buffer 20× Concentrate (Premývací roztok s koncentráciou 20×; pH 7,2, obsahuje ProClin® 300 – 0,05 % obj. hm.)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymatický substrátový roztok; obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametylbenzidín)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymatický tlmiaci roztok; obsahuje 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
Príbalový leták k testu QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Obsahuje kyselinu sírovú. Informácie o preventívnych opatreniach nájdete na strane 11.

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

- Inkubátor 37 °C*, CO₂ sa nevyžaduje
- Kalibrované pipety s variabilným objemom*
- Kalibrované multikanálové pipety† s možnosťou aplikácie objemu 50 µl a 100 µl s jednorazovými hrotmi
- Trepáčka na mikrotitračné doštičky†
- Deionizovaná alebo destilovaná voda, 2 litre
- Umývačka mikrotitračných doštičiek (odporúčame používať automatickú umývačku)
- Čítačka mikrotitračných† doštičiek s filtrom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 až 650 nm
- Odmerný valec
- Absorpčné utierky nezanechávajúce vlákna

Skladovanie a manipulácia

Skúmavky na odber krvi

Skúmavky na odber krvi QFM skladujte pri teplote 4 až 25 °C. V čase plnenia krvou a miešania má byť teplota skúmaviek na odber krvi QFM 17 – 25 °C.

LyoSpheres

Granuly QFM LyoSpheres skladujte pri teplote 2 až 8 °C.

Činidlá súpravy ELISA

Činidlá súpravy ELISA skladujte pri teplote 2 až 8 °C.

Enzymatický substrátový roztok vždy chráňte pred priamym slnečným svetlom.

* Overte, či boli zariadenia skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

Zriedené a nepoužívané činidlá ELISA

Pokyny na prípravu (riedenie) činidiel ELISA nájdete v časti „Fáza 2 – analýza ELISA IFN- γ “ na strane 17.

- Zriedený štandard zo súpravy je možné uchovávať po dobu 3 mesiacov pri teplote 2 až 8 °C.

Zaznamenajte si dátum zriedenia štandardu súpravy.

- Nepoužitý konjugát s koncentráciou 100 \times je po zriedení potrebné uchovávať pri teplote 2 až 8 °C a spotrebovať ho do 3 mesiacov.

Zaznamenajte si dátum zriedenia konjugátu.

- Konjugát s požadovanou koncentráciou je potrebné spotrebovať do 6 hodín od prípravy (pozrite tabuľku 1).
- Premývací roztok s požadovanou koncentráciou môžete uchovávať pri izbovej teplote (22 \pm 5 °C) po dobu max. 2 týždne.

Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické použitie in-vitro

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (SDS). Tieto materiály sú k dispozícii online v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (SDS) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

Varovania

- QFM je test, ktorý poskytuje kvalitatívne i kvantitatívne hodnotenie fungovania imunitného systému. Výsledky testu QFM nemusia priamo kvantifikovať úroveň potlačenia imunity.
- Pri určovaní stavu imunitného systému pacienta sa majú výsledky testu QFM používať spolu s klinickým obrazom, anamnézou a ďalšími klinickými ukazovateľmi.
- Prahová hodnota testu QFM sa môže líšiť v závislosti od úrovne potlačenia imunity a individuálnych podmienok transplantácie u jednotlivých pacientov.

Preventívne opatrenia

Iba na diagnostické použitie in-vitro.



UPOZORNENIE: S ľudskou krvou a plazmou manipulujte ako s potenciálne infekčným materiálom. Dodržiavajte príslušné pokyny na manipuláciu s krvou a krvnými produktmi. Všetky vzorky a materiály, ktoré prišli do styku s krvou alebo krvnými produktmi, zlikvidujte v súlade s platnými federálnymi, štátnymi a miestnymi predpismi.

Na používanie súčastí súpravy QuantiFERON Monitor ELISA sa vzťahujú nasledujúce bezpečnostné vyhlásenia a preventívne opatrenia.

Bezpečnostné vyhlásenia



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Enzymatický tlmiaci roztok QuantiFERON)

Obsahuje: kyselina sírová. Pozor! Môže byť korozívna pre kovy. Dráždi kožu. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Noste ochranné rukavice/ ochranný odev/ ochranné okuliare/ ochranu tváre.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (Enzymatický substrátový roztok QuantiFERON)

Pozor! Vyvoláva mierne podráždenie pokožky. Noste ochranné rukavice/ ochranný odev/ ochranné okuliare/ ochranu tváre.



QuantiFERON Green Diluent (Zelené riedidlo QuantiFERON)

Obsahuje: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Obsahuje: tartrazín. Pozor! Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Noste ochranné rukavice/ ochranný odev/ ochranné okuliare/ ochranu tváre.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (Premývací roztok QuantiFERON, koncentrácia 20×)

Obsahuje: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H -isothiazol-3-one (3:1). Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia.

Ďalšie informácie

Karty bezpečnostných údajov: www.qiagen.com/safety

- Odchýlky od postupov uvádzaných v *príbalovom letáku k analýze QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* môžu viesť k chybným výsledkom. Pred začatím si dôkladne prečítajte príslušné pokyny.
- **Dôležité:** Pred použitím skontrolujte liekovky. Nepoužívajte liekovky Conjugate (Konjugát), IFN- γ Standard ani QFM LyoSphere, ak liekovky alebo gumené tesnenie vykazujú znaky poškodenia. Nepracujte s poškodenými liekovkami. Liekovky bezpečne zlikvidujte v súlade s príslušnými bezpečnostnými opatreniami. Odporúčanie: Aby ste minimalizovali riziko poranenia od kovovej poistky na viečkach, použite na otvorenie liekoviek Conjugate (Konjugát), IFN- γ Standard alebo QFM LyoSphere špeciálny nástroj na otváranie (de-crimper).
- Súpravu ELISA nepoužívajte, ak niektorá z fliaš s činidlami pred použitím vykazuje znaky poškodenia alebo únikov.
- Nemiešajte ani spolu nepoužívajte mikrotitračné prúžky, štandard IFN- γ , zelené riedidlo alebo konjugát s koncentráciou 100 \times z rôznych dávok súprav QFM ELISA. Ďalšie činidlá (premývací roztok s koncentráciou 20 \times , enzymatický substrátový roztok a enzymatický tlmiači roztok) je možné zamieňať medzi jednotlivými súpravami za predpokladu, že neuplynul dátum expirácie činidiel a sú zaznamenané podrobné informácie o šarži.
- Nepoužitú činidlá a biologické vzorky zlikvidujte v súlade s miestnymi a národnými bezpečnostnými nariadeniami a predpismi na ochranu životného prostredia.
- Nepoužívajte skúmavky na odber krvi QFM, granuly QFM LyoSphere ani súpravu QFM ELISA po uplynutí dátumu expirácie.
- Overte, či sú laboratórne zariadenia kalibrované a schválené na používanie.

Odber vzoriek a manipulácia s nimi

Test QFM by sa musí vykonávať len s použitím celej krvi odobratej buď do lítium-heparínovej skúmavky na odber krvi, alebo priamo do skúmavky na odber krvi QFM. Na test je potrebný 1 ml celej krvi. Skúmavky na odber krvi sa musia príslušne označiť a musí na nich byť uvedený čas odobratia krvi.

Dôležité: Stimulácia krvných vzoriek QFM (t. j. prídanie granúl QFM LyoSphere do alikvótného objemu krvi 1 ml) a ich následná inkubácia pri teplote 37 °C sa obe musia uskutočniť do 8 hodín od odberu krvi.

Pred začatím inkubácie uchovávajúte krvné vzorky pri izbovej teplote (22 ±5 °C).

Na dosiahnutie optimálnych výsledkov je potrebné postupovať podľa nasledovných postupov:

1. Skúmavky správnym spôsobom označte.

Uistite sa, že každá skúmavka na odber krvi QFM je príslušne označená a sú na nej uvedené údaje o pacientovi a čas odberu krvi.

2. Každému pacientovi odoberte 1 ml krvi formou venepunkcie priamo do skúmavky na odber krvi QFM. Tento postup má vykonávať vyškolený flebotomista.

Dôležitá poznámka: V čase plnenia krvou má byť teplota skúmaviek 17 – 25 °C.

Skúmavky na odber krvi QFM sa môžu používať v nadmorskej výške do 810 m.

Keďže do skúmaviek s objemom 1 ml sa krv odoberá relatívne pomaly, ponechajte skúmavku pripojenú k ihle približne 2 – 3 sekundy po dokončení odberu. Tým sa zabezpečí odber správneho objemu.

Čierna značka na bočnej strane skúmavky na odber krvi QFM označuje objem plnenia 1 ml. Skúmavky na odber krvi QFM sú vyrobené na odber krvi v objeme 1 ml ±10 % a v rámci tohto rozsahu fungujú optimálne. Ak je hladina krvi mimo rozsah vyznačený čiarou, je nutné získať novú vzorku krvi.

Ak sa na odber krvi používa ihla s „krídelkami“, je potrebné použiť „odvzdušňovacu“ skúmavku na odber krvi na zabezpečenie naplnenia hadičky krvou pred tým, než použijete skúmavky na odber krvi QFM.

Ak sa budú skúmavky na odber krvi QFM používať v nadmorskej výške nad 810 metrov alebo ak bude odobratý iba malý objem krvi, vykonajte odber krvi pomocou striekačky a okamžite preneste 1 ml krvi do skúmavky na odber krvi QFM. Z bezpečnostných dôvodov sa tento postup najlepšie vykonáva tak, že odpojíte ihlu striekačky (s prihliadnutím na príslušné bezpečnostné pokyny), odpojíte viečko zo skúmavky na odber krvi QFM a pridáte do nej 1 ml krvi (až po stred čiernej značky na bočnej strane

štítku skúmavky). Skúmavku riadne uzavrite viečkom a podľa pokynov uvádzaných nižšie riadne premiešajte jej obsah.

Ak používate škrtidlo, povoľte ho ihneď po tom, ako ihla prenikne do žily, aby ste zabránili nežiaducim zmenám tlaku, ktoré by mohli ovplyvniť objem krvi.

Krv je alternatívne možné odobrať aj pomocou bežnej skúmavky na odber krvi s obsahom lítium-heparínu (antikoagulant). Následne krv preneste do skúmavky na odber krvi QFM. Lítium-heparín používajte ako výlučný krvný antikoagulant, pretože iné antikoagulanty rušia priebeh testu. Naplňte skúmavku na odber krvi (minimálny objem 3 ml) a opatrným miešaním formou preklápania skúmavky rozpustíte heparín. Krv je potrebné uchovávať pri izbovej teplote (22 ± 5 °C) pred jej prenosom do skúmaviek na odber krvi QFM na stimuláciu granulami QFM LyoSphere. Dbajte na riadne premiešanie krvi opatrným preklápaním skúmavky bezprostredne pred prenosom. Preneste alikvótny objem 1 ml krvi do skúmavky na odber krvi QFM. Prenos vykonávajte asepticky so zabezpečením vhodných bezpečných postupov formou odpojenia viečka zo skúmavky na odber krvi QFM a pridania 1 ml krvi (až po čiernu značku na boku štítku skúmavky). Riadne uzavrite skúmavky viečkami a podľa pokynov uvádzaných nižšie premiešajte ich obsah.

3. Ihneď po naplnení skúmaviek skúmavku opatrne niekoľkokrát prevráťte, aby sa heparín rozpustil.

Dôležité: Nadmerne silné trepanie môže viesť k rozkladu gélu a k abnormálnym výsledkom.

4. Tesne pred použitím nechajte granuly QFM LyoSphere, aby sa prispôbili izbovej teplote (22 ± 5 °C).

5. Asepticky pridajte jednu granulu QFM LyoSphere do 1 ml krvi.

Otvorte skúmavku na odber krvi.

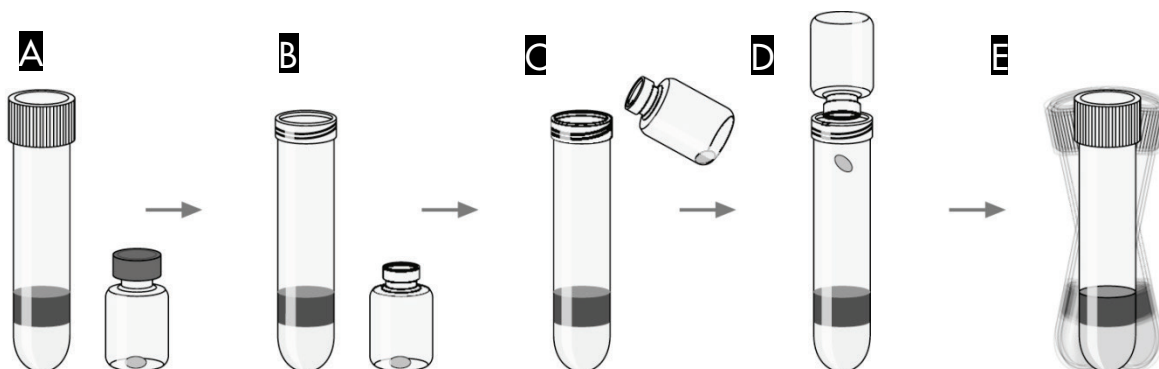
Poklepte liekovku QFM LyoSphere jemne na pevný povrch, aby ste zabezpečili, že sa granula QFM LyoSphere bude nachádzať na spodku liekovky. Otvorte liekovku QFM LyoSphere tak, že najskôr odstránite kovový uzáver a potom gumenú zátku.

Opatrne nechajte spadnúť granulu QFM LyoSphere do 1 ml krvnej vzorky tak, že okraj sklenej liekovky zarovnáte s okrajom skúmavky na odber krvi QFM a potom opatrne preklopite liekovku, aby granula QFM LyoSphere spadla do skúmavky na odber krvi QFM (pozrite obrázok 1).

Dôležité: Ak granula QFM LyoSphere spadne mimo skúmavku na odber krvi QFM, zlikvidujte ju a otvorte novú liekovku QFM LyoSphere.

Dôležité: Liekovku QFM LyoSphere neponechávajte otvorenú po dlhšiu dobu. Granulu QFM LyoSphere je nutné pridať do krvi ihneď po otvorení liekovky.

Ak granuly QFM LyoSphere pridávate do krvi, ktorá bolo odobratá do skúmavky na odber krvi QFM, viečka skúmaviek vráťte späť na správne vzorky.



Obrázok 1. Pridanie granuly QFM LyoSphere. **A** Skúmavka na odber krvi QFM a liekovka QFM LyoSphere. **B** Odstráňte viečko zo skúmavky na odber krvi QFM a odstráňte kovový uzáver a gumenú zátku z liekovky QFM LyoSphere. **C** Ihneď pridajte granulu QFM LyoSphere do krvi – zarovnajzte okraj liekovky s okrajom skúmavky na odber krvi. **D** Opatrne preklopte liekovku, aby granula LyoSphere spadla do skúmavky na odber krvi. **E** Uzavrite skúmavku na odber krvi QFM a 5 až 10-krát pretrepte jej obsah.

6. Uzavrite skúmavku na odber krvi QFM a 5 až 10-krát pretrepte jej obsah, aby ste sa uistili, že sa granula QFM LyoSphere úplne rozpustila.

Ak sa granula QFM LyoSphere prichytí k vnútornému povrchu skúmavky, možno ju rozpustiť jej namáčaním v krvi tým, že budete skúmavku prevracat'.

Po pridaní granuly QFM LyoSphere skúmavku uzavrite, aby ste zabránili náhodnému pridaniu druhej granuly QFM LyoSphere do tej istej skúmavky.

Poznámka: Keďže je granula QFM LyoSphere biela, po jej rozpustení ju nebude v krvi vidieť.

Dôležité: Nadmerne silné trepanie môže viesť k rozkladu gélu a k abnormálnym výsledkom.

7. Po pridaní a rozpustení granuly QFM LyoSphere je skúmavky na odber krvi QFM potrebné čo najskôr preniesť do inkubátora s teplotou 37 ± 1 °C, najneskôr však do 8 hodín od odberu.

Pokyny na použitie

Fáza 1 – inkubácia krvi a odber plazmy

Dodávané materiály

- Skúmavky na odber krvi QFM (prečítajte si časť „Súčasťi a skladovanie“ na strane 6)

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

- Prečítajte si časť „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“ na strane 8

Postup

1. **Skúmavky na odber krvi QFM obsahujúce alikvótny objem krvi 1 ml s granulou QFM LyoSphere inkubujte vo VZPRIAMENEJ POLOHE pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 16 až 24 hodín.**

Poznámka: Inkubátor nevyžaduje použitie CO₂ ani zvlhčovanie.

Po inkubácii je možné uchovávať skúmavky na odber krvi QFM pri teplote od 4 do 27 °C po dobu max. 3 dní pred odstredovaním.

2. **Po dokončení inkubácie skúmaviek sa odber plazmy vykonáva odstredovaním skúmaviek na odber krvi QFM po dobu 15 minút s otáčkami 2 000 až 3 000 × g (RCF). Gélová zátka oddelí bunky od plazmy. Ak k tomu nedôjde, skúmavky je potrebné znova odstrediť.**

Plazmu je možné odobrať bez odstredovania, ale na odstránenie plazmy bez poškodenia buniek sa vyžaduje väčšia pozornosť.

3. **Plazmové vzorky je potrebné odoberať iba pomocou pipety.**

Dôležité: Po dokončení odstredovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.

Plazmové vzorky je možné preniesť priamo z odstredených skúmaviek na odber krvi QFM na doštičky QFM ELISA aj vtedy, keď sa používajú automatizované pracovné stanice ELISA.

Plazmové vzorky je možné uchovávať po dobu 28 dní pri teplote 2 až 8 °C. Po odbere je možné ich dlhodobo uchovávať pri teplote nižšej než –20 °C. Alikvótné objemy odobratých plazmových vzoriek je nutné pred uskladnením uzavrieť.

Ak odoberáte plazmové vzorky, odoberte minimálne 150 µl plazmy, aby bolo v prípade potreby možné zopakovať testovanie.

Množstvo IFN- γ v plazmových vzorkách môže často presahovať horné limitné hodnoty väčšiny čítačiek ELISA, a to aj v prípade, ak jednotlivci

podstupujú stredne intenzívnu imunosupresívnu terapiu. Odporúčame, aby ste plazmové vzorky zriedili v zelenom riedidle v pomere 1:10 respektíve 1:100 a analyzovali ich pomocou testu ELISA spolu s nezriedenou plazmou (pozrite si Fáza 2 – analýza ELISA IFN- γ).

Fáza 2 – analýza ELISA IFN- γ

Dodávané materiály

- Súprava QuantiFERON Monitor ELISA s 2 doštičkami (prečítajte si časť „Súčasť a skladovanie“ na strane 6)

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

- Prečítajte si časť „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“ na strane 8

Príprava

IFN- γ v plazme môže často presahovať horné limitné hodnoty väčšiny čítačiek ELISA, a to aj v prípade, ak jednotlivci podstupujú stredne intenzívnu imunosupresívnu terapiu. Odporúčanie: zriedte plazmové vzorky v zelenom riedidle v pomere 1:10 respektíve 1:100 a analyzujte ich pomocou testu ELISA spolu s nezriedenou plazmou.

Ak pacient podstupuje veľmi intenzívnu imunosupresívnu terapiu, môže na získanie kvantitatívneho výsledku postačovať príprava a testovanie samotnej nezriedenej plazmovej vzorky.

Poznámka: Na interpretáciu výsledkov sa majú používať výsledky vzoriek, ktoré sú v rozsahu testu QFM ELISA (t. j. do 10 IU/ml). Ak sú hodnoty plazmy nad rozsahom testu QFM ELISA, ako dosiahnutý výsledok sa použije najmenší pomer riedenia, pri ktorom výsledok spadá do rozsahu testu QFM ELISA (so zohľadnením faktora riedenia).

Postup

1. Je potrebné, aby všetky plazmové vzorky a činidlá (okrem konjugátu s koncentráciou 100 \times) pred použitím nadobudli izbovú teplotu (22 \pm 5 °C). Ekvilibrácia by mala trvať najmenej 60 minút.
2. Z mikrotitračného rámu odstráňte prúžky, ktoré nepotrebujete, uzavrite fóliové vrečko a vráťte ho do chladničky na uskladnenie až do doby nasledujúceho použitia.

Použite najmenej jeden prúžok pre štandardy testu QFM a dostatočný počet prúžkov vzhľadom na počet testovaných pacientov. Po dokončení si ponechajte rám a viečko na použitie s ďalšími prúžkami.

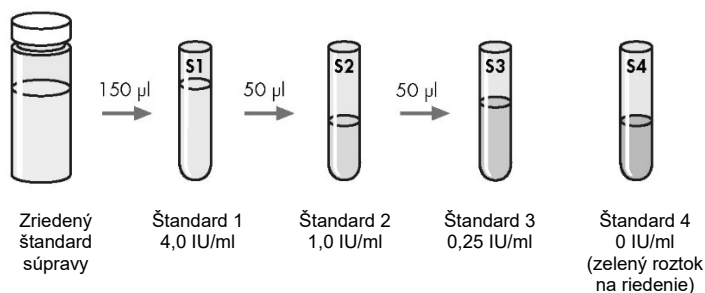
3. Zried'te lyofilizovaný štandard IFN- γ s deionizovanou alebo destilovanou vodou s objemom vyznačeným na štítku liekovky. Jemne obsah premiešajte, aby sa nezačala tvoriť pena a zabezpečte úplné rozpustenie. Zriedenie štandardu na uvedený objem vedie k získaniu roztoku s koncentráciou 8,0 IU/ml.

Dôležité: Objem riedenia štandardu IFN- γ sa bude medzi jednotlivými dávkami líšiť. Pozrite si štítok na liekovke štandardu, aby ste sa uistili, že použijete správny objem deionizovanej alebo destilovanej vody.

Pomocou zriedeného štandardu súpravy vytvorte riedenie 1 v 2 nasledované sériou riedenia 1 v 4 IFN- γ v zelenom riedidle (GD) (pozrite obrázok 2). S1 (štandard 1) obsahuje 4,0 IU/ml, S2 (štandard 2) obsahuje 1,0 IU/ml, S3 (štandard 3) obsahuje 0,25 IU/ml a S4 (štandard 4) obsahuje 0 IU/ml (iba GD). Štandardy je potrebné analyzovať duplicitne. Pripravte si čerstvé zriedené roztoky štandardu súpravy na každú analytickú reláciu ELISA.

Odporúčaný postup pre duplicitné štandardy

- Označte 4 skúmavky ako „S1“, „S2“, „S3“ a „S4“.
- Pridajte 150 μ l GD do S1, S2, S3 a S4.
- Pridajte 150 μ l štandardu súpravy do S1 a zmes riadne premiešajte.
- Preneste 50 μ l zo S1 do S2 a zmes riadne premiešajte.
- Preneste 50 μ l zo S2 do S3 a zmes riadne premiešajte.
- Samotné zelené riedidlo (GD) slúži ako nulový štandard (S4).



Obrázok 2. Príprava krivky štandardu.

4. **Zried'te lyofilizovaný konjugát s koncentráciou 100× s 0,3 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Jemne obsah premiešajte, aby sa minimalizovala tvorba peny a zabezpečte úplné rozpustenie konjugátu.**

Konjugát s požadovanou (pracovnou) koncentráciou sa pripravuje zriedením požadovaného objemu konjugátu s koncentráciou 100× v zelenom riedidle (tabuľka 1 – príprava konjugátu). Nepoužitý konjugát s koncentráciou 100× ihneď po použití vráťte do skladovacieho priestoru s teplotou 2 až 8 °C. Používajte iba zelené riedidlo.

Tabuľka 1. Príprava konjugátu

Počet prúžkov	Objem konjugátu s koncentráciou 100×	Objem zeleného riedidla
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. **V prípade plazmových vzoriek odobratých zo skúmaviek na odber krvi a následne skladovaných alebo zmrazených tieto vzorky riadne premiešajte pred tým, než ich pridáte do kalíška ELISA.**

Dôležité: Ak pridávate plazmové vzorky priamo z odstredených skúmaviek QFM, nesmiete plazmu miešať. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.

6. Odporúčanie: Plazmové vzorky zriedte v pomere 1:10.

- Do skúmavky označenej údajmi pacienta a pomerom „1:10“ pridajte 90 µl zeleného riedidla (GD).
- Potom pridajte 10 µl premiešaných plazmových vzoriek (pozrite si krok 5, kde nájdete podrobnosti o rozdieloch medzi premiešanými plazmovými vzorkami a vzorkami pridávanými priamo z odstredených skúmaviek QFM).
- Zmes dôkladne premiešajte pipetou a snažte sa minimalizovať vznik peny.

7. Odporúčanie: Plazmové vzorky zriedte v pomere 1:100.

- Pripravte si roztok zriedený v pomere 1:10 (pozrite si krok 6 uvedený vyššie).
- Do skúmavky označenej údajmi pacienta a pomerom „1:100“ pridajte 90 µl zeleného riedidla.
- Pridajte 10 µl roztoku zriedeného v pomere 1:10.
- Zmes dôkladne premiešajte pipetou a snažte sa minimalizovať vznik peny.

Odporúčanie: Otestujte nasledujúce vzorky paralelne a v uvedenom poradí:

- nezriedená vzorka, 1:10, 1:100

Analytický softvér QFM taktiež podporuje použitie nasledovných typov vzoriek pacientov:

- nezriedená vzorka
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- nezriedená vzorka, 1:10

8. Pomocou multikanálovej pipety pridajte 50 µl čerstvo pripraveného konjugátu s požadovanou koncentráciou do príslušných kalíškov ELISA.

9. Pomocou multikanálovej pipety pridajte 50 µl testovacej plazmovej vzorky do príslušných kalíškov. Potom pridajte 50 µl štandardov 1 až 4. Štandardy analyzujte duplicitne.

10. Zakryte každú doštičku vekom a pomocou trepačky na mikrotitračné doštičky dôkladne premiešajte konjugát a plazmové vzorky/štandardy (1 minútu). Dávajte pozor, aby ste nerozliali obsah.

11. Vykonajte inkubáciu pri izbovej teplote (22 ± 5 °C) po dobu 120 ± 5 minút.

Doštičky počas inkubácie nesmú byť vystavené priamemu slnečnému žiareniu.

12. Počas inkubácie zriedte 1 diel premývacieho roztoku s koncentráciou $20\times$ s 19 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody a zmes riadne premiešajte. K dispozícii je dostatok premývacieho roztoku s koncentráciou $20\times$ na prípravu 2 litrov premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou.

Prepláchnite kalíšky $400 \mu\text{l}$ premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou (najmenej 6 cyklov v umývačke mikrotitračných doštičiek). Odporúčame používať automatizovanú umývačku doštičiek.

Dôkladné prepláchnutie je veľmi dôležité z hľadiska účinnosti testu. Dbajte na **úplné naplnenie** každého kalíška premývacím roztokom v každom premývacom cykle. Odporúčanie: Najlepšie výsledky dosiahnete, ak budú kalíšky medzi jednotlivými cyklami namočené po dobu aspoň 5 sekúnd.

Do odpadovej nádoby pridajte štandardný laboratórny dezinfekčný prostriedok a v prípade dekontaminácie potenciálne infekčného materiálu postupujte podľa stanovených procedúr.

13. Vyklepaním doštičiek na absorpčnú utierku nezanechávajúcu vlákna odstráňte zvyškový premývací roztok. Do každého kalíška pridajte $100 \mu\text{l}$ enzymatického substrátového roztoku, zakryte každú doštičku vekom a premiešajte ich pomocou trepačky na mikrotitračné doštičky.

14. Vykonajte inkubáciu pri izbovej teplote (22 ± 5 °C) po dobu 30 minút.

Doštičky počas inkubácie nesmú byť vystavené priamemu slnečnému žiareniu.

15. Po dokončení inkubácie pridajte do každého kalíška $50 \mu\text{l}$ enzymatického tlmiaceho roztoku a premiešajte ich pomocou trepačky na mikrotitračné doštičky.

Enzymatický tlmiaci roztok je potrebné pridávať do kalíškov v rovnakom poradí a približne rovnako rýchlo ako enzymatický substrátový roztok v kroku 13.

16. Odmerajte optickú hustotu (OD) do 5 minút od zastavenia reakcie pomocou čítačky mikrotitračných doštičiek vybavenej filtrom s filtračným rozsahom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 až 650 nm. Hodnoty OD sa používajú na výpočet výsledkov.

Výpočty a interpretácia testu

Analytický softvér QuantiFERON Monitor sa používa na analýzu nespracovaných údajov a na výpočet výsledkov. Je k dispozícii na lokalite www.QuantiFERON.com. Vždy overte, či používate najnovšiu verziu analytického softvéru QuantiFERON Monitor.

Tento softvér slúži na hodnotenie kontroly kvality testu, generovanie krivky štandardu a poskytuje výsledok testu každého pacienta v súlade s informáciami uvádzanými v časti Interpretácia výsledkov.

Ak sú hodnoty nezriedenej plazmy nad horným rozsahom testu QFM ELISA (t. j., > 10 IU/ml), analytický softvér QuantiFERON Monitor uvedie najmenší pomer riedenia, pri ktorom výsledok spadá do rozsahu testu QFM ELISA, pričom zohľadní faktor riedenia.

Okrem použitia analytického softvéru QuantiFERON Monitor je možné výsledky stanoviť aj pomocou nasledujúcej metódy.

Generovanie krivky štandardu

(Ak sa nepoužíva analytický softvér QuantiFERON Monitor)

Stanovte stredné hodnoty OD replikátov štandardu súpravy na každej doštičke.

Vytvorte logaritmickú ($\log_{(e)}$ – $\log_{(e)}$) krivku štandardu zakreslením hodnoty $\log_{(e)}$ priemeru OD (os y) voči hodnote $\log_{(e)}$ koncentrácie IFN- γ štandardov v IU/ml (os x) a z týchto výpočtov vynechajte nulový štandard. Pomocou regresnej analýzy vypočítajte čiaru najlepšieho umiestnenia (prispôsobenia) krivky štandardu.

Pomocou krivky štandardu stanovte koncentráciu IFN- γ (IU/ml) každej z testovaných plazmových vzoriek a použite hodnotu OD každej vzorky.

Tieto výpočty je možné vykonávať pomocou softvérových balíkov dostupných spolu s čítačkami mikrotitračných doštičiek a štandardného tabuľkového alebo štatistického softvéru (napríklad Microsoft® Excel®). Odporúčame používať tieto balíky na výpočet regresnej analýzy, koeficientu variácie (% CV) štandardov a koeficientu korelácie (r) krivky štandardu.

Ak sú hodnoty nezriedenej plazmy nad rozsahom testu QFM ELISA, ako dosiahnutý výsledok sa použije najmenší pomer riedenia, pri ktorom výsledok spadá do rozsahu testu QFM ELISA (so zohľadnením faktora riedenia).

Kontrola kvality testu

Správnosť výsledkov testu závisí od generovania správnej krivky štandardu. Z tohto dôvodu je výsledky odvodené od štandardov potrebné preskúmať pred tým, než budete môcť interpretovať výsledky testovacej vzorky.

Zabezpečenie platnosti analýzy ELISA:

- Stredná hodnota OD štandardu 1 musí byť $\geq 0,600$.
- % CV hodnôt OD replikátu štandardu 1 a štandardu 2 musí byť $\leq 15\%$.
- Hodnoty OD replikátu štandardov 3 a 4 sa nesmú odlišovať o viac než 0,040 jednotky optickej hustoty od ich strednej hodnoty.
- Koeficient korelácie (r) vypočítaný zo stredných hodnôt absorbancie štandardov musí byť $\geq 0,98$.

Analytický softvér QuantiFERON Monitor počíta a vykazuje tieto parametre kontroly kvality.

Ak vyššie uvedené kritériá nie sú splnené, cyklus testovania je neplatný a je potrebné ho zopakovať.

Stredná hodnota OD nulového štandardu (zelené riedidlo) by mala byť $\leq 0,150$. Ak je stredná hodnota OD $> 0,150$, je potrebné preskúmať postup premývania doštičky.

Interpretácia výsledkov

Výsledky testu QFM sa interpretujú v závislosti od reakcie IFN- γ na stimulatory vrodeného a adaptívneho imunitného systému. Test QFM poskytuje kvalitatívne i kvantitatívne hodnotenie fungovania imunitného systému. Výsledky testu QFM nemusia priamo kvantifikovať úroveň potlačenia imunity.

Dôležité: Pri určovaní stavu imunitného systému pacienta sa musí nameraná úroveň IFN- γ používať spolu s klinickým obrazom, anamnézou a ďalšími diagnostickými hodnoteniami (tabuľka 2). Prahová hodnota testu QFM sa môže líšiť v závislosti od úrovne potlačenia imunity a individuálnych podmienok transplantácie u jednotlivých pacientov.

Tabuľka 2. Interpretácia výsledkov

Výsledok QFM IFN- γ (IU/ml)	Klasifikácia	Interpretácia
< 15	slabá	Pacient vykazuje slabú reakciu IFN- γ na stimulátory vrodeného a adaptívneho imunitného systému
15 – 1 000	stredná	Pacient vykazuje strednú reakciu IFN- γ na stimulátory vrodeného a adaptívneho imunitného systému
> 1 000	silná	Pacient vykazuje silnú reakciu IFN- γ na stimulátory vrodeného a adaptívneho imunitného systému

Ak je nameraná úroveň IFN- γ nezriedenej plazmovej vzorky nižšia než 0,1 IU/ml:

- Skontrolujte, či bola do krvnej vzorky pridaná granula QFM LyoSphere a či bola skúmavka inkubovaná podľa pokynov uvedených v tomto príbalovom letáku.
- Uistite sa, že nameraná úroveň IFN- γ zodpovedá aktuálnemu klinickému stavu pacienta.

Ak predpokladáte, že počas odberu krvi alebo manipulácie s krvnými vzorkami došlo k technickým problémom, zopakujte celý test QFM s novými krvnými vzorkami. Ak predpokladáte, že počas pôvodného testovania neboli dodržané pokyny uvedené v tomto príbalovom letáku (podrobnosti nájdete v časti Kontrola kvality testu), zopakujte testovanie stimulovaných plazmových vzoriek pomocou analýzy ELISA.

Lekár možno bude chcieť zopakovať test, ak výsledky nebudú zodpovedať aktuálnemu klinickému stavu pacienta.

Obmedzenia

Výsledky testovania QFM sa musia používať spolu s klinickou anamnézou, aktuálnym zdravotným stavom a ďalšími diagnostickými hodnoteniami každého pacienta. Laboratóriá si môžu zvoliť vlastné rozsahy pre analýzu.

Laboratóriá sa tiež môžu rozhodnúť, že paralelne so vzorkami pacientov budú spracovávať externú kontrolnú vzorku získanú od zdravej osoby.

Nespoľahlivé alebo nepresné výsledky sa môžu vyskytnúť ako následok:

- Použitia nesprávneho krvného antikoagulantu – ako krvný antikoagulant používajte len lítium-heparín, pretože iné antikoagulanty nežiadúco ovplyvňujú analýzu.
- Nedodržania postupov uvádzaných v tomto príbalovom letáku.
- Nadmernej cirkulácie IFN- γ alebo prítomnosti heterofilných protilátok.
- Uplynutia viac než 8 hodín medzi odberom krvnej vzorky a inkubáciou pri teplote 37 °C.
- Nedostatočného naplnenia alebo preplnenia skúmaviek na odber krvi QFM mimo rozsah od 0,9 do 1,1 ml.

Charakteristiky účinnosti

Klinické štúdie

Uskutočnili sa dve klinické štúdie na porovnanie reakcií zjavne zdravých osôb (n = 114) s reakciami príjemcov transplantovaných orgánov (n = 30). Zo skupiny príjemcov transplantovaných orgánov bolo 18 z kohorty príjemcov, u ktorých bola transplantácia vykonaná nedávno (Nedávno po transplantácii, do 3 mesiacov od transplantácie) a 12 bolo z kohorty príjemcov, u ktorých bola transplantácia vykonaná dávno alebo z tzv. stabilnej kohorty (Dávno po transplantácii, viac než 12 mesiacov od transplantácie).

- Od každej osoby zo skupiny Nedávno po transplantácii (kohorta príjemcov, u ktorých bola transplantácia vykonaná do 3 mesiacov, počet vzoriek n = 64) sa až v 5 rôznych časových úsekoch odobrali vzorky.
- Od každej osoby zo skupiny Dávno po transplantácii (kohorta príjemcov, u ktorých bola transplantácia vykonaná dávno, počet vzoriek n = 12) sa vzorky odobrali len raz.
- Od každej osoby v kohorte zjavne zdravých osôb (počet vzoriek n = 114) sa vzorky odobrali len raz.

V prípade vzoriek z oboch skupín, Nedávno po transplantácii i Dávno po transplantácii, boli reakcie na QFM v rozsahu od slabej až po strednú reakciu. Skupina Nedávno po transplantácii vykazovala vyššie percento (93,8 %) reakcií v rozsahu slabej reakcie a nižšie percento reakcií (6,3 %) v rozsahu strednej reakcie v porovnaní s reakciami zo skupiny Dávno po transplantácii,

v rámci ktorej bolo 25 % reakcií v rozsahu slabej reakcie a 66,7 % v rozsahu strednej reakcie (tabuľka 3). Žiadne reakcie zo skupiny Nedávno po transplantácii nespádali do rozsahu silnej reakcie, zatiaľčo len 1 reakcia (8,3 %) zo vzoriek zo skupiny Dávno po transplantácii spadala do rozsahu silnej reakcie. Reakcie QFM v kohorte zjavne zdravých osôb spadali najmä do rozsahu strednej reakcie (83,3 %) a silnej reakcie (15,8 %) (tabuľka 3).

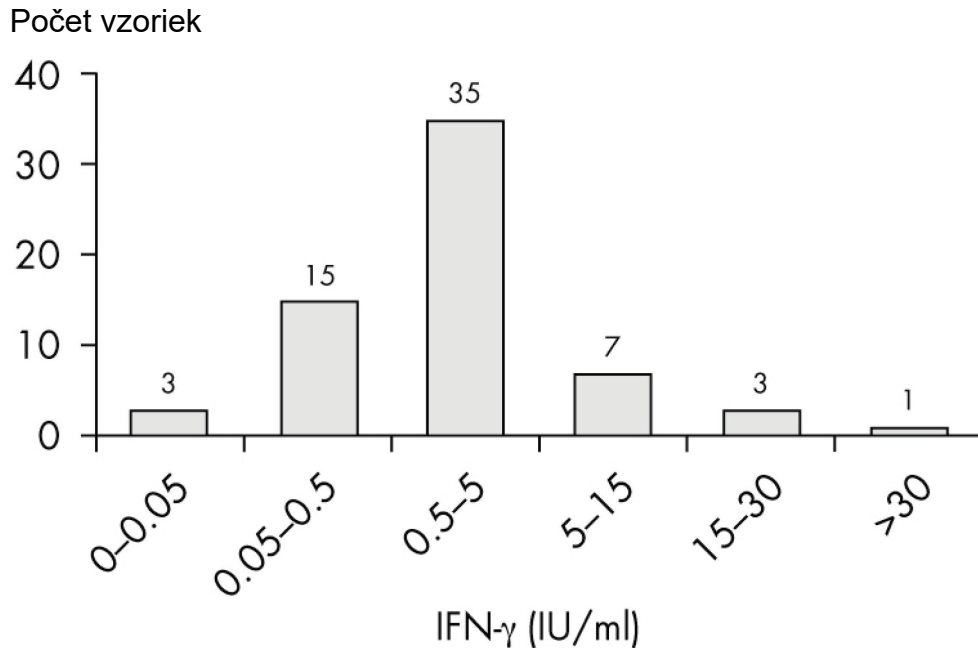
Tabuľka 3. Porovnanie rozsahu reakcií QFM u zjavne zdravých osôb a u príjemcov transplantovaných orgánov

IFN- γ (IU/ml)	Kategória výsledkov	Nedávno po transplan- tácii %* 95 % CI n	Dávno po transplan- tácii %* 95 % CI n	Zjavne zdravé osoby %* 95 % CI n	Celkové výsledky
< 15	slabá	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 – 1 000	stredná	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
> 1 000	silná	0,0 % 0 – 5,7 n = 0	8,3 % 1,5 – 35,4 n = 1	15,8 % 10,2 – 23,6 n = 18	19
Celkový počet vzoriek		64	12	114	190

* Percentá označujú podiel vzoriek v rámci každej kohorty darcov vzoriek, ktoré spadajú do príslušného rozsahu reakcií.

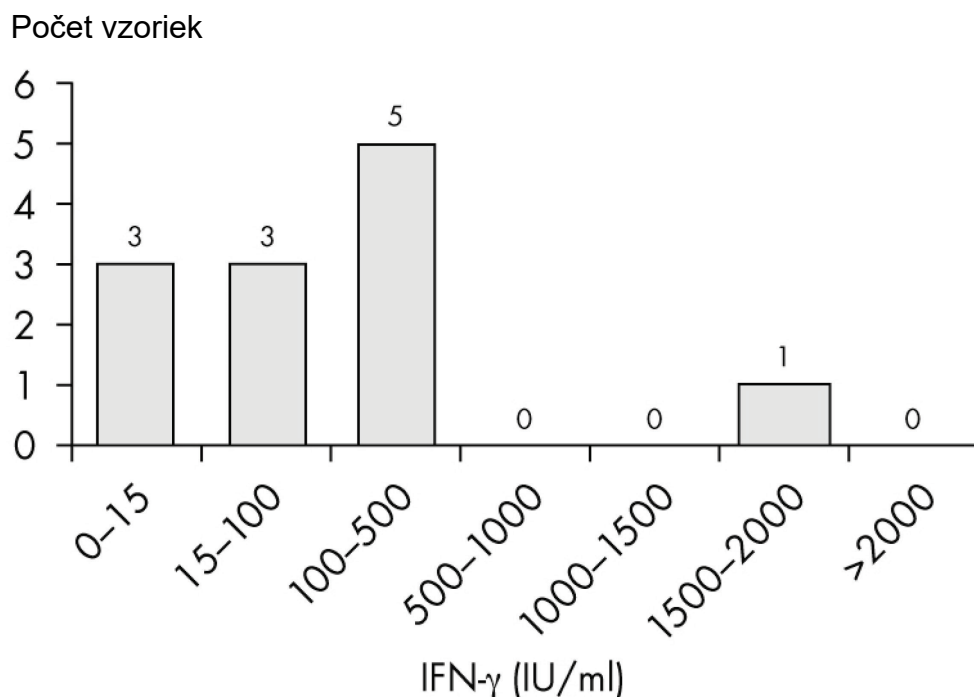
Predpokladané hodnoty

Distribúcia reakcií IFN- γ na QFM u pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná nedávno (do 3 mesiacov od transplantácie) bola stanovená na základe 64 vzoriek odobratých od 18 príjemcov pomocou testu QFM ELISA (obrázok 3).



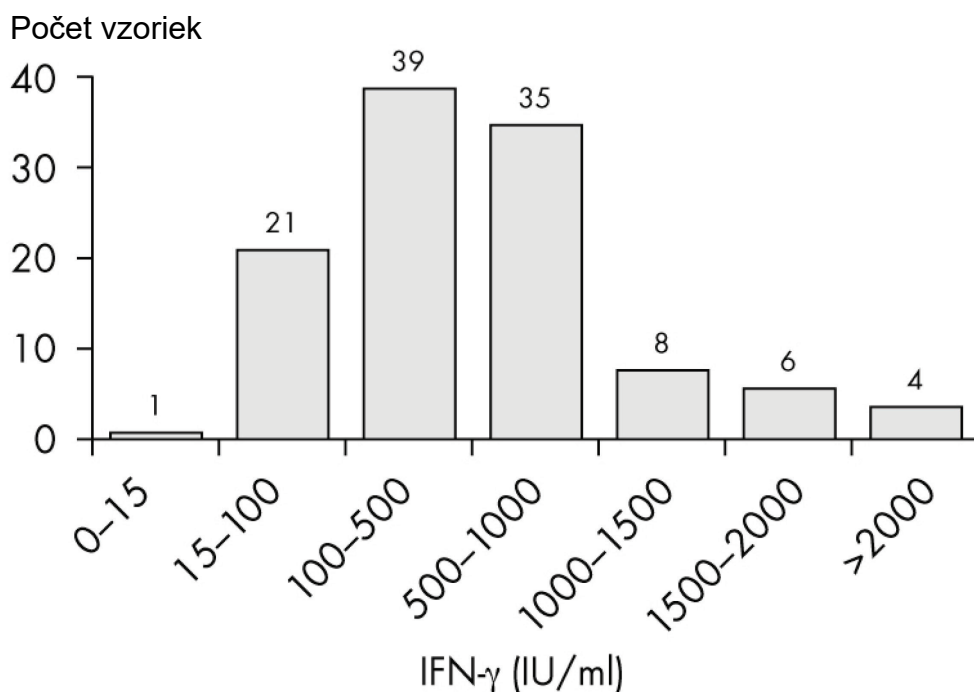
Obrázok 3. Distribúcia reakcií IFN- γ na QFM u pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná nedávno (n = 64; medián = 1,5 IU/ml).

Distribúcia reakcií IFN- γ na QFM u pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná dávno (viac než 12 mesiacov od transplantácie) bola stanovená na základe 12 vzoriek pomocou testu QFM ELISA (obrázok 4).



Obrázok 4. Distribúcia reakcií IFN- γ na QFM u pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná dávno (n = 12; medián = 98,8 IU/ml).

Distribúcia reakcií IFN- γ na QuantiFERON Monitor u zjavne zdravých osôb bola stanovená na základe 114 vzoriek pomocou testu QFM ELISA (obrázok 5).



Obrázok 5. Distribúcia reakcií IFN- γ na QFM u zjavne zdravých osôb (n = 114; medián = 400,5 IU/ml).

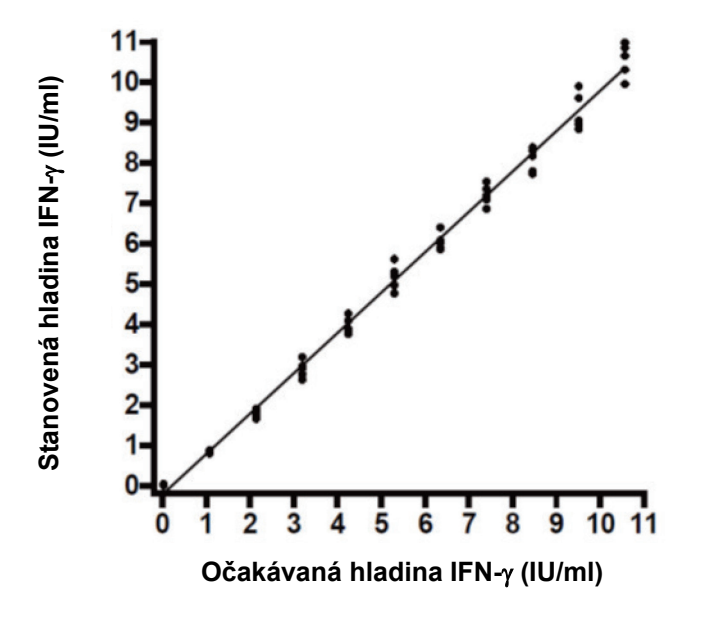
Reakcie QFM u pacientov s transplantáciou tuhých orgánov

Test QFM bol hodnotený v rámci výskumnej prierezovej štúdie so zameraním na pacientov s transplantáciou tuhých orgánov (4). Štúdia zahŕňala: 212 zdravých osôb s kontrolnou podskupinou 30 osôb s rovnakým vekom a pohlavím, 30 pacientov pred transplantáciou, 18 pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná nedávno (66 vzoriek; medián času po transplantácii = 21 dní) a 11 pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná dávno (medián času po transplantácii = 2 290 dní). Stredná hodnota produkcie IFN- γ bola 555,2 IU/ml u zdravej kontrolnej skupiny a 614,6 IU/ml u kontrolnej skupiny osôb s rovnakým vekom a pohlavím. Bolo preukázané, že stredná hodnota produkcie IFN- γ bola výrazne nižšia u pacientov pred transplantáciou (IFN- γ = 89,3 IU/ml) i pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná nedávno (IFN- γ = 3,76 IU/ml) v porovnaní s pacientmi v kontrolnej skupine osôb s rovnakým vekom a pohlavím ($p < 0,001$). Bolo pozorované a preukázané, že obnovenie fungovania imunitného systému u pacientov, u ktorých bola transplantácia vykonaná dávno (stredná hodnota IFN- γ = 256,1 IU/ml) bolo oveľa výraznejšie v porovnaní s pacientmi, u ktorých bola transplantácia vykonaná nedávno ($p < 0,05$). Táto štúdia naznačuje, že test QFM možno používať na hodnotenie fungovania bunkami sprostredkovaných imunitných reakcií v populácii príjemcov transplantovaných tuhých orgánov s imunosupresívnou terapiou.

Charakteristiky účinnosti testu

Uskutočnila sa štúdia lineárnosti, v rámci ktorej bolo náhodným spôsobom umiestnených 5 replikátov z 11 skupín plazmových vzoriek so známou koncentráciou IFN- γ na analytickú doštičku ELISA a bolo dokázané, že analýza QFM ELISA je lineárna. Čiara lineárnej regresie má strmosť $1,002 \pm 0,011$ a koeficient korelácie s hodnotou 0,99 (obrázok 6).

Limit detekcie analýzy QFM ELISA je 0,065 IU/ml a neuvádza sa žiadny výskyt hákového efektu vysokej dávky (prozónový efekt) pri koncentráciách IFN- γ do 10 000 IU/ml.



Obrázok 6. Profil lineárnosti analýzy QFM ELISA stanovený pomocou testovania 5 replikátov z 11 plazmových vzoriek so známou koncentráciou IFN- γ .

Reprodukovateľnosť testu QFM (fáza 1) bola stanovená pomocou krvných vzoriek od 20 zdravých osôb. Počas tohto stanovovania reprodukovateľnosti sa použili traja rôzni operátori, šarže granúl QFM LyoSphere a súpravy analytických zariadení. Priemerný koeficient variácie úrovni reakcií IFN- γ stanovený pomocou testu QFM ELISA pre všetky tri šarže granúl QFM LyoSphere a všetky tri uvedené podmienky bol 22,22 % (95 % CI: 17,20 – 27,25).

Opakovateľnosť testu QFM (fáza 1) bola hodnotená meraním variability 5 až 6 opakovaných stimulácií krvi pomocou granúl QFM LyoSphere u rovnakého darcu v rámci 14 pacientov. Priemerný koeficient variácie v rámci 14 testovaných pacientov bol 14,7 % (95 % CI: 10,2 – 19,2). Hodnota % CV jednotlivých pacientov bola nižšia než 30 %.

Reprodukovateľnosť testu QFM ELISA (fáza 2) bola odhadnutá formou testovania 20 plazmových vzoriek s premenlivými koncentraciami IFN- γ s 3 replikátmi v 3 laboratóriách v priebehu 3 po sebe nenasledujúcich dní a 3 operá-

tormi. To znamená, že každá vzorka bola testovaná 27-krát v rámci 9 nezávislých analytických cyklov. Jedna vzorka bola nulová kontrola s vypočítanou koncentráciou IFN- γ 0,08 IU/ml (95 % CI: 0,07 – 0,09). V rámci zvyšných 19 plazmových vzoriek bol rozsah koncentrácií od 0,33 (95 % CI: 0,31 – 0,34) do 7,7 IU/ml (95 % CI: 7,48 – 7,92).

Nepresnosť v rámci cyklu (vnútroanalytická nepresnosť) bola odhadnutá formou výpočtu priemeru hodnôt % CV pre každú testovanú plazmu obsahujúcu IFN- γ z každého cyklu spracovania doštičky (n = 9). Rozsah nepresnosti bol 4,1 až 9,1 % CV. Priemerná hodnota % CV v rámci cyklu (± 95 % CI) bola $6,6 \pm 0,6$ %. Priemerná hodnota % CV v plazme bez obsahu IFN- γ bola 14,1.

Celková alebo medzianalytická nepresnosť bola stanovená formou porovnania 27 vypočítaných koncentrácií IFN- γ pre každú plazmovú vzorku. Rozsah medzianalytickej nepresnosti bol 6,6 až 12,3 % CV. Celková priemerná hodnota % CV (± 95 % CI) bola $8,7 \pm 0,7$ %. Hodnota % CV v plazme bez obsahu IFN- γ bola 26,1. Túto úroveň variability je potrebné predpokladať, pretože vypočítaná koncentrácia IFN- γ je nízka a nízky predpoklad koncentrácie bude vyšší než v prípade vyšších koncentrácií.

Technické informácie

Zrazené plazmové vzorky

Ak v prípade dlhodobého uchovávanía plazmových vzoriek dôjde k vytvoreniu fibrínových zrazenín, odstredení vzoriek oddelíte zrazený materiál a zjednodušíte prenos plazmy pipetou.

Spríevodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Ďalšie informácie nájdete aj v technických informáciách na webovej lokalite: www.QuantiFERON.com. Kontaktné informácie nájdete na zadnej strane.

Riešenie problémov s analýzou ELISA

Vytvorenie nešpecifickej farby

Možná príčina	Riešenie
a) Neúplné prepláchnutie doštičky	Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát so 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
b) Krížová kontaminácia kalíškov ELISA	Počas pipetovania a miešania vzorky postupujte opatrne, aby ste minimalizovali riziko.
c) Uplynul dátum expirácie súpravy/ komponentov	Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do 3 mesiacov od dátumu zriedenia.
d) Overta, či enzymatický substrátový roztok nie je kontaminovaný	Ak sa vytvorí modré sfarbenie, substrát zlikvidujte. Používajte výlučne čisté nádoby na činidlá.
e) Miešanie plazmy v skúmavkách QFM pred jej odberom	Po dokončení odstredovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.

Nízke hodnoty optickej hustoty štandardov

Možná príčina	Riešenie
a) Chyba riedenia štandardu	Dbajte na to, aby ste pripravovali roztoky štandardu súpravy v súlade s informáciami v tomto príbalovom letáku.
b) Chyba pipetovania	Pipety musia byť kalibrované a je potrebné ich používať v súlade s pokynmi výrobcu.
c) Príliš nízka teplota inkubácie	Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote (17 °C až 27 °C).

Riešenie problémov s analýzou ELISA

- | | |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d) Príliš krátka doba inkubácie | Inkubujte doštičku s konjugátom, štandardmi a vzorkami po dobu 120 ± 5 minút. Inkubujte enzymatický substrátový roztok na doštičke po dobu 30 minút. |
| e) Nesprávny použitý filter čítačky doštičky | Doštička by sa mala načítať s vlnovou dĺžkou 450 nm s referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 až 650 nm. |
| f) Činidlá sú príliš studené | Všetky činidlá s výnimkou konjugátu s koncentráciou $100\times$ musia nadobudnúť izbovú teplotu pred tým, než začnete s testom. Trvá to približne jednu hodinu. |
| g) Uplynul dátum expirácie súpravy/komponentov | Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou $100\times$ do 3 mesiacov od dátumu zriedenia. |

Vysoké hodnoty na pozadí

- | Možná príčina | Riešenie |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Neúplné prepláchnutie doštičky | Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát so $400 \mu\text{l}$ premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia. |
| b) Príliš vysoká teplota inkubácie | Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote (17 až $27 \text{ }^\circ\text{C}$). |
| c) Uplynul dátum expirácie súpravy/komponentov | Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou $100\times$ do troch mesiacov od dátumu riedenia. |
| d) Overte, či enzymatický substrátový roztok nie je kontaminovaný | Ak sa vytvorí modré sfarbenie, substrát zlikvidujte. Používajte výlučne čisté nádoby na činidlá. |

Riešenie problémov s analýzou ELISA

Nelineárna krivka štandardu a variabilita duplikátu

Možná príčina	Riešenie
a) Neúplné prepláchnutie doštičky	Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát so 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
b) Chyba riedenia štandardu	Dbajte na to, aby ste pripravovali roztoky štandardu v súlade s informáciami v tomto príbalovom letáku.
c) Nedostatočné miešanie	Činidlá riadne premiešajte preklápaním alebo jemným premiešaním pred ich pridaním na doštičku.
d) Nekonzistentný postup pipetovania alebo prerušenie počas realizácie (prípravy) analýzy	Pridávanie vzoriek a štandardov by ste mali vykonávať kontinuálne. Všetky činidlá je potrebné pripraviť pred začatím testu.

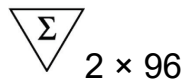
Bezplatné informácie o produkte a technické príručky získate od spoločnosti QIAGEN, svojho distribútora alebo po návšteve lokality www.QuantiFERON.com.

Referenčná literatúra

Komplexný zoznam referencií QFM získate na portáli Gnowee v referenčnej knižnici QuantiFERON na lokalite www.gnowee.net.

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

Symbols



Postačuje na prípravu 2 × 96 vzoriek



Výrobca



Symbol CE-IVD



Na diagnostické použitie in-vitro



Číslo šarže



Katalógové číslo



Dátum použiteľnosti



Teplotné obmedzenia



Prečítajte si návod na použitie



Nepoužívať opakovane



Chráňte pred slnečným svetlom



Autorizované zastúpenie v Európskom spoločenstve

Kontaktné informácie

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate na bezplatnom telefónnom čísle 00800 22 44 6000. Môžete tiež navštíviť naše centrum technickej podpory na adrese www.qiagen.com/contact alebo sa obrátiť na niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú stranu alebo navštívte lokalitu www.qiagen.com).

Skrátený postup testu

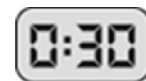
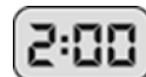
Fáza 1 – inkubácia krvi

1. Odoberte krv pacienta buď do skúmavky na odber krvi QFM, alebo do lítium-heparínovej skúmavky na odber krvi. Označte skúmavky údajmi pacienta a časom odberu krvi a potom ich pri teplote okolia do 8 hodín od odberu dopravte do laboratória.
 - a. Ak bola krv odobratá do lítium-heparínovej skúmavky na odber krvi, preneste alikvótny objem 1 ml krvi do skúmavky na odber krvi QFM a označte skúmavku údajmi pacienta a časom odberu krvi.
2. Pridajte 1 granulu QFM LyoSphere do každej skúmavky na odber krvi QFM obsahujúcej 1 ml krvi, rozpustíte granulu LyoSphere a potom skúmavky čo najskôr inkubujte (do 8 hodín od odberu krvi) **vo vzpriamenej polohe** po dobu 16 až 24 hodín pri teplote 37 °C.
3. Po dokončení inkubácie odstredujte skúmavky 15 minút pri otáčkach 2 000 až 3 000 × g (RCF), aby sa oddelila plazma a červené krvinky.
4. Po dokončení odstredovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.



Fáza 2 – analýza ELISA IFN- γ

1. Vykonajte ekvilibračiu komponentov ELISA s výnimkou konjugátu s koncentráciou 100 \times na izbovú teplotu po dobu najmenej 60 minút.
2. Zriedte štandard súpravy na 8,0 IU/ml s destilovanou alebo deionizovanou vodou. Pripravte si 4 roztoky štandardu.
3. Rozriedte mrazom vysušený konjugát s koncentráciou 100 \times s destilovanou alebo deionizovanou vodou.
4. Pripravte si konjugát požadovanej koncentrácie v zelenom riedidle a pridajte 50 μ l do všetkých kalíškov.
5. Pridajte 50 μ l testovaných plazmových vzoriek (podľa potreby – nezriedené, zriedené v pomere 1:10 alebo 1:100) a 50 μ l štandardov do príslušných kalíškov. Obsah premiešajte pomocou trepačky.
6. Inkubujte 120 \pm 5 minút pri izbovej teplote.
7. Doštičky prepláchnite najmenej 6-krát so 400 μ l premývacieho roztoku na jeden kalíšok.
8. Do kalíškov pridajte 100 μ l enzymatického substrátového roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.
9. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote.
10. Do všetkých kalíškov pridajte 50 μ l enzymatického tlmiaceho roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.
11. Načítajte výsledky pri vlnovej dĺžke 450 nm s použitím referenčného filtra s filtračným výkonom 620 až 650 nm.
12. Analyzujte výsledky.



Poznámky

Významné zmeny

Významné zmeny v tomto vydaní príbalového letáku k testu QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA sú uvedené v tabuľke nižšie:

Časť	Strana	Zmeny
Preventívne opatrenia	11	Nové informácie GHS
Preventívne opatrenia	12	Pridané bezpečnostné pokyny týkajúce sa liekoviek, ktoré majú poistky na viečkach.

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

Obmedzená licenčná zmluva vzťahujúca sa na súpravu QuantiFERON Monitor

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a touto príručkou, a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeluje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy s akýmkoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tejto príručke a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com. Niektoré z týchto protokolov boli poskytnuté používateľmi produktov od spoločnosti QIAGEN pre používateľov produktov od spoločnosti QIAGEN. Tieto protokoly neboli podrobne testované ani optimalizované spoločnosťou QIAGEN. Spoločnosť QIAGEN na ne neposkytuje žiadne záruky a neručí za to, že ich použitím nedôjde k porušeniu práv tretích strán.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese www.qiagen.com.

Autorské práva © 2014 QIAGEN. Všetky práva vyhradené.

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

