

# Uputa za upotrebu proizvoda QuantiFERON Monitor<sup>®</sup> (QFM<sup>®</sup>) ELISA


 2 × 96

IFN- $\gamma$  test mjerenja pune krvi, mjeri reakcije na urođene  
i prilagodljive imunostimulanse

Verzija 1

 Za in vitro dijagnostičku namjenu



 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, SAD

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, NJEMAČKA

1079024HR ver. 03

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





# Sadržaj

<b>Namjena</b>	<b>4</b>
<b>Sažetak i objašnjenje testa</b>	<b>4</b>
Načela testa	5
Vrijeme potrebno za testiranje	5
<b>Sastojci i pohranjivanje</b>	<b>6</b>
Potrebni materijali, koji nisu isporučeni	8
Pohranjivanje i rukovanje	8
<b>Upozorenja i mjere opreza</b>	<b>10</b>
Upozorenja	10
Mjere opreza	11
<b>Uzimanje uzoraka i rukovanje</b>	<b>13</b>
<b>Upute za upotrebu</b>	<b>16</b>
<b>Izračunavanje i tumačenje rezultata</b>	<b>22</b>
Stvaranje standardne krivulje	22
Kontrola kvalitete testa	23
Tumačenje rezultata	23
<b>Ograničenja</b>	<b>25</b>
<b>Radne značajke</b>	<b>25</b>
Klinička istraživanja	25
Značajke testa	30
<b>Tehnički podaci</b>	<b>31</b>
Zgrušani uzorci plazme	31
<b>Vodič za rješavanje problema</b>	<b>32</b>
<b>Bibliografija</b>	<b>34</b>
<b>Oznake</b>	<b>35</b>
<b>Informacije za kontakt</b>	<b>35</b>
<b>Skraćeni testni postupak</b>	<b>36</b>

## Namjena

QuantiFERON Monitor (QFM) test je in vitro dijagnostički test namijenjen otkrivanju stanično posredovane imunološke funkcije pomoću mjerenja interferon gama (IFN- $\gamma$ ) faktora u plazmi putem enzim-vezujućeg imunosorbentnog testa (ELISA) nakon inkubacije heparinizirane pune krvi s urođenim i prilagodljivim imunostimulansima. Test se koristi za otkrivanje stanično posredovane imunološke reakcije kod populacije s transplantiranim solidnim organima i s imunosupresijom.

QFM je namijenjen za korištenje s ocjenom rizika i ostalim medicinskim i dijagnostičkim procjenama.

## Sažetak i objašnjenje testa

Imunodeficijenciju karakterizira smanjena mogućnost učinkovitog stvaranja imunološke reakcije. Ova kompromitirana ili izostavljena reakcija može biti rezultat primarne ili stečene (sekundarne) imunodeficijencije (1).

Primarne imunodeficijencije genetički su naslijeđene i karakterizirane deficijencijama specifičnih komponenata prilagodljivog ili urođenog imunološkog sustava (1). Svejedno, većina imunodeficijencija stečene su (sekundarne) i mogu ih izazvati patogeni agensi, lijekovi (imunosupresivna terapija nakon transplantacije organa), stanja bolesti (poput raka, npr. leukemija i limfom) ili kontaminanti iz okoliša (1).

Molekularna osnova za imunodeficijenciju raznovrsna je; međutim, stanično posredovani imunitet igra ključnu ulogu u uzrokovanju mnogih zamijećenih kliničkih manifestacija. Trenutačno, dijagnoza i liječenje sindroma imunodeficijencije ovise o uzročnom čimbeniku (2, 3).

Primjerice, ad hoc liječenje je normativno u nadzoru stanja stanične imunodeficijencije pacijenata koji su prošli transplantaciju solidnih organa (SOT) i primaju lijekove za supresiju imunološkog sustava. Status pacijentove imunološke reakcije obično se mjeri nadzorom razine farmakoloških lijekova i kliničke/patološke procjene funkcije grafta (2, 3).

Nekoliko testova funkcije T-stanica ispituju stanično posredovani imunitet na mitogene poput fitohemaglutinina (PHA), mitogena američkog kermesa i konkanavalina A (ConA); međutim, oni ispituju funkcionalnu mogućnost T-stanica i podskup su stanica uključenih u stanično posredovani imunitet. Sve je jasnije da urođeni imunološki mehanizmi značajno doprinose obrani domaćina ili samostalno ili pomoću jačanja specifičnih reakcija T-stanica. Stoga, funkcionalna reakcija urođenih (prirodne stanice ubojice [NK]) i prilagodljivih (T-stanice) imunoloških stanica zajedno čini detaljniju analizu stanično posredovanog imuniteta (2, 3).

QFM je in vitro dijagnostički test koji koristi kombinaciju stimulansa (u obliku LyoSphere™ tablete) koji specifično stimuliraju različite tipove stanica uključenih u urođeni i prilagodljivi imunološki sustav. Stanje funkcionalnog

imuniteta pacijenta ispituje se mjerenjem reakcije na stimulaciju urođenog i prilagodljivog imunološkog sustava pomoću agonista Toll Like Receptora (TLR), odnosno receptora T-stranica (TCR). Otkrivanje interferon-gama faktora (IFN- $\gamma$ ) pomoću ELISA testa pruža kvalitativno i kvantitativno mjerenje stanično posredovane imunološke funkcije.

## Načela testa

QFM test koristi liofilizirane stimulanse (QFM LyoSpheres™) koji se dodaju hepariniziranoj punoj krvi. Inkubacija krvi traje od 16 do 24 sata, a zatim se prikupi plazma i ispita prisutnost IFN- $\gamma$ , koji je eventualno nastao kao reakcija na stimulanse.

QFM test provodi se u fazama. Prvo se prikuplja puna krv u QFM epruvetu za uzimanje krvi. Zatim se u epruvetu dodaje QFM LyoSphere tableta, koja se zatim inkubira na 37 °C čim je prije moguće, unutar 8 sati od prikupljanja. Nakon perioda inkubacije od 16 do 24 sata, epruvete se centrifugiraju, plazma se uklanja i količina IFN- $\gamma$  (izmjerena u međunarodnim jedinicama po ml; IU/ml) izmjerena ELISA testom i uspoređuje se s nizom očekivanih vrijednosti za karakterizaciju imunološke reakcije pacijenta.

QFM je test koji pruža kvalitativno i kvantitativno mjerenje imunološke funkcije. QFM rezultati možda neće izravno mjeriti razinu imunološke supresije.

Količina IFN- $\gamma$  u uzorcima plazme može se često nalaziti iznad gornjih granica većine čitača ELISA, čak i kada su osobe umjereno imunosupresivne. Preporučuje se razrjeđivanje uzoraka plazme 1 na 10 i/ili 1 na 100 u zelenom diluensu i ispitivanje ELISA testom zajedno s nerazrijeđenom plazmom.

**Napomena:** Prag QFM testa može ovisiti o pacijentovoj razini imunosupresije i postavkama pojedinačne transplantacije.

Pogledajte „Tumačenje rezultata” na stranici 23 ovih uputa za upotrebu za opis interpretacije QFM rezultata.

## Vrijeme potrebno za testiranje

Vrijeme potrebno za obavljanje QFM testa procijenjeno je u nastavku. Navedeno je i vrijeme ispitivanja većeg broja uzoraka.

Inkubacija epruveta s uzorcima krvi pri 37 °C: 16 do 24 sata

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

< 1 sat rada

dodajte od 10 do 15 minuta za svaku dodatnu ploču

## Sastojci i pohranjivanje

<b>QuantiFERON Monitor LyoSpheres</b>	
<b>Kataloški br.</b>	<b>0650-0701</b>
<b>Broj preparata</b>	<b>10</b>
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 bočica
<i>Uputa za upotrebu proizvoda QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
<b>QuantiFERON Monitor epruvete za uzimanje krvi</b>	
<b>Kataloški br.</b>	<b>0650-0101</b>
<b>Broj preparata</b>	<b>100</b>
QuantiFERON Monitor epruvete za uzimanje krvi (bijeli čep s bijelim prstenom)	100 epruveta
<i>Uputa za upotrebu QuantiFERON Monitor epruveta za uzimanje krvi</i>	1

<b>Komplet QuantiFERON Monitor ELISA komponenta s 2 ploče</b>	<b>Komplet ELISA s 2 ploče</b>
<b>Kataloški br.</b>	<b>0650-0201</b>
Mikrotitar pločice, 12 × 8 udubljenja (obložene anti-humanim mišjim IFN- $\gamma$ monoklonalnim antitijelom)	2 kompleta mikrotitar pločica s 12 × 8 udubljenja
IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (IFN- $\gamma$ standard, liofiliziran; sadrži rekombinantni humani IFN- $\gamma$ , goveđi kazein, 0,01% w/v timerosala)	1 × bočica (8 IJ/ml kada se rekonstituira)
Green Diluent (Zeleni diluens; sadrži goveđi kazein, obični serum miša, 0,01% w/v timerosala)	1 × 30 ml bočica
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (100 × koncentrirani konjugat, liofiliziran; anti-humanu mišji IFN- $\gamma$ HRP, sadrži 0,01% w/v timerosala)	1 × 0,3 ml kada se rekonstituira
Wash Buffer 20× Concentrate (20 × koncentrirani pufer za ispiranje; pH 7,2, sadrži 0,05% v/v ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Otopina enzimskog supstrata; sadrži H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimska otopina za zaustavljanje reakcije; sadrži 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )*	1 × 15 ml
Uputa za upotrebu proizvoda QuantiFERON Monitor ELISA	1

\* Sadrži sumpornu kiselinu. O mjerama opreza pogledajte na str. 11.

## Potrebni materijali, koji nisu isporučeni

- 37 °C inkubator\*; CO<sub>2</sub> nije potreban
- Kalibrirane pipete s varijabilnim volumenom\*
- Kalibrirane višekanalne pipete† za doziranje 50 µl i 100 µl, s jednokratnim vrhovima
- Tresilica za mikrotitar ploče†
- Deionizirana ili destilirana voda, 2 litre
- Uređaj za ispiranje mikrotitar ploča (po mogućnosti automatiziran)
- Čitač mikrotitar† ploča s filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm
- Razvrstani cilindar (cilindar za mjerenje)
- Upijajući netkani ručnici

## Pohranjivanje i rukovanje

### Epruvete za uzimanje krvi

Čuvajte QFM epruvete za uzimanje krvi na temperaturi od 4 °C do 25 °C. QFM epruvete za uzimanje krvi trebaju biti na temperaturi od 17–25 °C u vrijeme punjenja i miješanja krvi.

### LyoSpheres

Čuvajte QFM LyoSphere tablete na temperaturi od 2 do 8 °C.

### Reagensi kompleta ELISA

Čuvajte komplet ELISA na temperaturi od 2 do 8 °C.

Otopinu enzimskog supstrata uvijek zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.

\* Provjerite jesu li instrumenti pregledani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.



## Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi ELISA

Upute o rekonstituiranju reagensa ELISA pogledajte „Faza 2 – IFN- $\gamma$  ELISA”, str. 17.

- Rekonstituirani komplet Standard može se držati do 3 mjeseca pohranjen na temperaturi od 2 do 8 °C.  
Zabilježite datum rekonstitucije kompleta standard.
- Nakon rekonstitucije nepotrebni 100 × koncentrirani konjugat mora se i dalje čuvati na temperaturi od 2 do 8 °C i potrošiti u roku od 3 mjeseca.  
Zabilježite datum rekonstitucije konjugata.
- Konjugat spreman za upotrebu mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme (pogledajte tablicu 1).
- Pufer za ispiranje koji je pripremljen za uporabu održiv je na sobnoj temperaturi (22 ± 5 °C) do 2 tjedna.

# Upozorenja i mjere opreza

## Za in vitro dijagnostičku namjenu

Prilikom rada s kemikalijama uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku zaštitnu odjeću, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa sigurnosnim podacima. Oni su dostupni na mreži, u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati list sa sigurnosnim podacima za svaki komplet i komponentu kompleta QIAGEN.

## Upozorenja

- QFM je test koji pruža kvalitativno i kvantitavno mjerenje imunološke funkcije. QFM rezultati možda neće izravno mjeriti razinu imunološke supresije.
- Rezultati QFM ispita trebaju se koristiti zajedno s kliničkom prezentacijom, povijesti bolesti i drugim kliničkim indikatorima kod utvrđivanja stanja imuniteta pacijenta.
- Prag QFM testa može ovisiti o pacijentovoj razini imunosupresije i postavkama pojedinačne transplantacije.

## Mjere opreza

Samo za in vitro dijagnostičku namjenu.



**OPREZ: S ljudskom krvlju i plazmom postupajte kao da su potencijalno infektivne. Pridržavajte se smjernica za rukovanje krvlju i proizvodima od krvi. Uzorke i materijale koji su bili u kontaktu s krvlju ili proizvodima od krvi odlažite u skladu s državnim i lokalnim propisima.**

Sljedeće izjave o opasnosti i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta QuantiFERON Monitor ELISA.

### Izjave o opasnosti



**QuantiFERON Enzyme Stopping Solution  
(enzimska otopina za zaustavljanje reakcije QuantiFERON)**

Sadrži: sumporna kiselina. Pozor! Može nagrizzati metale. Nadražuje kožu. Uzrokuje jako nadraživanje oka. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

**QuantiFERON Enzyme Substrate Solution  
(otopina enzimskog supstrata QuantiFERON)**

Pozor! Uzrokuje blagu iritaciju kože. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.



**QuantiFERON Green Diluent  
(QuantiFERON zeleni diluens)**

Sadrži: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Sadrži: tartrazin. Pozor! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.



**QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate  
(pufer za ispiranje QuantiFERON 20 × koncentriran)**

Sadrži: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Izbjegavati ispuštanje u okoliš.

## Dodatne informacije

Listovi sa sigurnosnim podacima: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- Odstupanja od postupka opisanog u *Uputi za upotrebu proizvoda QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* mogu dovesti do pogrešnih rezultata. Prije upotrebe pažljivo pročitajte upute.
- **Važno:** Pregledajte bočice prije upotrebe. Nemojte upotrebljavati bočice za konjugat, IFN- $\gamma$  standard ili QFM LyoSphere bočice ako bočice pokazuju znakove oštećenja ili ako je gumena brtva oštećena. Nemojte rukovati slomljenim bočicama. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza i odložite bočice na siguran način. Preporuka: S pomoću alata za skidanje osigurača na bočicama otvorite bočice za konjugat, IFN- $\gamma$  standard ili QFM LyoSphere bočice radi smanjenje opasnosti od ozljeda uzrokovanih poklopcem s metalnim osiguračem.
- Komplet ELISA nemojte upotrebljavati ako bilo koja bočica reagensa pokazuje znakove oštećenja ili curenja prije upotrebe.
- Nemojte upotrebljavati ili miješati Mikrotitar trake, IFN- $\gamma$  standard, Zeleni diluens ili 100  $\times$  koncentrirani konjugat iz drugih serija kompleta QFM ELISA. Ostali reagensi (20  $\times$  koncentrirani pufer za ispiranje, Otopina enzimskog supstrata i Enzimska otopina za zaustavljanje reakcije) iz drugih kompleta mogu se mijenjati, pod uvjetom da ne prekoračuju datum isteka i da odgovaraju zabilježenim podacima o seriji.
- Odložite neupotrijebljene reagente i biološke uzorke u skladu s lokalnim i državnim propisima i regulativama za zaštitu okoliša.
- Nemojte upotrebljavati QFM epruvete za uzimanje krvi, QFM LyoSphere tablete ili QFM ELISA komplet nakon datuma isteka.
- Provjerite je li laboratorijska oprema kalibrirana/odobrena za upotrebu.

## Uzimanje uzoraka i rukovanje

QFM test treba obavljati samo s punom krvi prikupljenom u epruvetu s litij-heparinom ili izravno u QFM epruvetu za prikupljanje krvi; za svaki test potreban je 1 ml pune krvi. Epruvete za uzimanje krvi moraju se označiti na odgovarajući način i uključiti vrijeme prikupljanja krvi.

**Važno:** I stimulacija QFM uzoraka krvi (tj. dodatak QFM LyoSphere tablete u 1 ml alikvot krvi) i naknadna inkubacija na 37 °C moraju se obaviti unutar 8 sati od prikupljanja krvi.

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

**Optimalni rezultati postižu se pridržavanjem sljedećih uputa:**

**1. Označite epruvete na odgovarajući način.**

Provjerite je li svaka QFM epruveta za uzimanje krvi označena na odgovarajući način s podacima o pacijentu i vremenu uzimanja krvi.

**2. Uzmite od svakog pacijenta 1 ml venske krvi izravno u QFM epruvetu za uzimanje krvi. Taj bi postupak trebao provoditi tehničar osposobljen za vađenje krvi.**

**Važna napomena:** U vrijeme punjenja krvlju epruvete moraju biti na temperaturi od 17 do 25 °C.

QFM epruvete za uzimanje krvi mogu se upotrebljavati do 810 m nadmorske visine.

Budući da se epruvete od 1 ml relativno polako pune krvlju, ostavite epruvetu nakon postizanja razine punjenja još 2 do 3 sekunde na igli. Tako ćete osigurati uzimanje potrebne količine.

Crna oznaka s bočne strane QFM epruveta za uzimanje krvi označava razinu punjenja od 1 ml. QFM epruvete za uzimanje krvi proizvode se za uzimanje 1 ml ± 10% i najbolje rade unutar ovog raspona. Ako je razina krvi izvan označene razine punjenja, mora se uzeti novi uzorak krvi.

Ako za uzimanje krvi upotrebljavate leptirastu iglu, najprije treba upotrijebiti praznu epruvetu kako bi se osiguralo da je napunjena krvlju prije upotrebe QFM epruveta za uzimanje krvi.

Ako se QFM epruvete za uzimanje krvi upotrebljavaju na nadmorskoj visini višoj od 810 metara ili ako je količina izvađene krvi malena, korisnici krv mogu uzeti štrcaljkom i odmah prebaciti 1 ml krvi u QFM epruvetu za uzimanje krvi. Iz sigurnosnih razloga, najbolje je ukloniti iglu iz štrcaljke, pridržavajući se odgovarajućih sigurnosnih mjera, ukloniti čep s QFM epruvete za uzimanje krvi i dodati 1 ml krvi (do sredine crne oznake s bočne strane naljepnice na epruveti). Nakon toga epruvetu treba dobro začeptiti i promiješati, kao što je opisano u nastavku.

Ako koristite podvezicu, otpustite je čim je igla umetnuta u venu kako biste izbjegli varijacije u tlaku koje mogu utjecati na volumen krvi.

Ili, krv možete izvaditi u jednu epruvetu koja sadrži litij-heparin kao antikoagulans, a zatim je prenijeti u QFM epruvetu za uzimanje krvi. Upotrebjavajte samo litij-heparin kao krvni antikoagulans jer ostali antikoagulansi mogu utjecati na rezultate testa. Napunite epruvetu za uzimanje krvi (s najmanje 3 ml krvi) i blago promiješajte nekoliko je puta preokrećući da bi se heparin otopio. Čuvajte krv na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) prije prebacivanja u QFM epruvete za uzimanje krvi za stimulaciju QFM LyoSphere tabletama. Pazite da se krv dobro izmiješa tako što ćete lagano okrenuti epruvetu neposredno prije pretakanja. Rasporedite 1 ml alikvota krvi u QFM epruvetu za uzimanje krvi. Raspodjelu je najbolje obaviti sterilno, uz pridržavanje odgovarajućih sigurnosnih mjera prilikom uklanjanja čepova s QFM epruvete za uzimanje krvi i dodavanja 1 ml krvi (do sredine crne oznake s bočne strane naljepnice na epruveti). Na siguran način uklonite čepove s epruveta i promiješajte prema uputama koje slijede u nastavku.

**3. Odmah nakon punjenja epruveta, pažljivo okrenite epruvetu nekoliko puta kako biste otopili heparin.**

**Važno:** Prejako protresanje može poremetiti gel i dovesti do pogrešnih rezultata.

**4. Prije upotrebe, stabilizirajte QFM LyoSphere tablete na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).**

**5. Sterilno dodajte jednu QFM LyoSphere tabletu u 1 ml krvi.**

Odčepite epruvetu za uzimanje krvi.

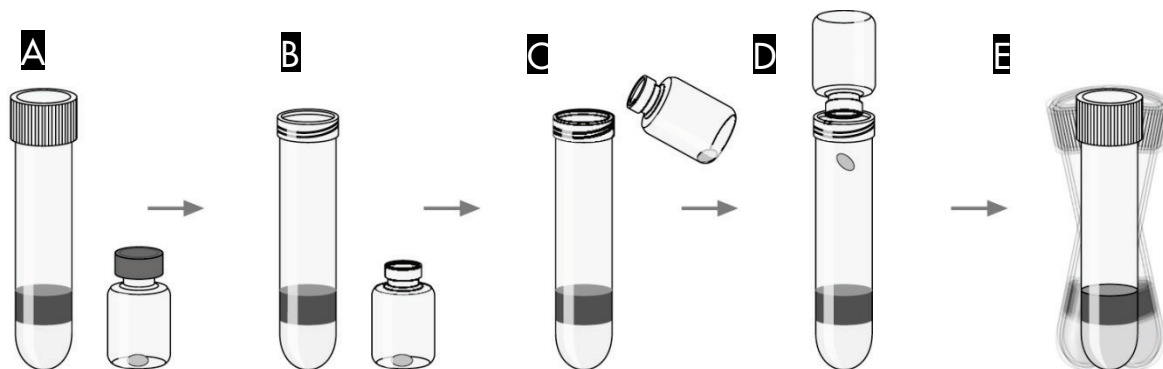
Lupkanjem QFM LyoSphere bočice o čvrstu površinu osigurajte da je QFM LyoSphere tableta na dnu bočice. Odčepite QFM LyoSphere bočicu uklanjanjem poklopca s metalnim osiguračem, i gumene zaštite.

Pažljivo ubacite QFM LyoSphere tabletu u uzorak krvi od 1 ml poravnavanjem ruba staklene bočice s rubom QFM epruvete za uzimanje krvi i potom pažljivo izvrnite bočicu kako biste prenijeli QFM LyoSphere tabletu u QFM epruvetu za uzimanje krvi (pogledajte sliku 1).

**Važno:** Ako QFM Lyosphere tableta padne izvan QFM epruvete za uzimanje krvi, bacite je i otvorite novu QFM LyoSphere bočicu.

**Važno:** Ne ostavljajte QFM LyoSphere bočicu otvorenu na duže vremenske periode. QFM LyoSphere tableta treba se dodati u krv čim otvorite bočicu.

Ako se QFM LyoSphere tablete dodaju krvi koja je prikupljena u QFM epruvete za uzimanje krvi, provjerite jesu li poklopci epruveta vraćeni na ispravne uzorke.



**Slika 1. Dodavanje QFM Lyosphere tableta.** **A** QFM epruveta za uzimanje krvi i QFM LyoSphere bočica. **B** Uklonite poklopac s QFM epruvete za uzimanje krvi i uklonite metalni osigurač i gumenu zaštitu s QFM LyoSphere bočice. **C** Odmah dodajte QFM LyoSphere tabletu u krv poravnavanjem ruba staklene bočice s rubom epruvete za uzimanje krvi. **D** Zatim nježno izvrnite bočicu kako biste prenijeli LyoSphere tablete u epruvetu za uzimanje krvi. **E** Začepite QFM epruvetu za uzimanje krvi i protresite 5–10 puta.

**6. Začepite QFM epruvetu za uzimanje krvi i protresite 5–10 puta, samo toliko da osigurate da se QFM LyoSphere tableta rastopila.**

Ako se QFM LyoSphere tableta zalijepi na unutarnju površinu epruvete, može se rastopiti premazivanjem krvlju dok okrećete epruvetu.

Pripazite da je epruveta zatvorena kada je dodana QFM LyoSphere tableta kako biste spriječili slučajno dodavanje druge LyoSphere tablete istoj epruveti.

**Napomena:** Budući da je QFM LyoSphere tableta bijele boje, neće se više vidjeti kad se rastopi u krvi.

**Važno:** Prejako protresanje može poremetiti gel i dovesti do pogrešnih rezultata.

**7. Nakon dodavanja i rastapanja QFM LyoSphere tablete, QFM epruvete za uzimanje krvi moraju se što prije prenijeti u inkubator na temperaturu od  $37 \pm 1$  °C, u roku od 8 sati od uzimanja uzoraka.**

# Upute za upotrebu

## Faza 1 – inkubacija krvi i prikupljanje plazme

### Materijali koje komplet sadrži

- QFM epruvete za uzimanje krvi (pogledajte „Sastojci i pohranjivanje”, stranica 6)

### Potrebni materijali (koji nisu isporučeni)

- Pogledajte „Potrebni materijali, koji nisu isporučeni”, stranica 8

### Postupak

- 1. Inkubirajte QFM epruvete za uzimanje krvi s 1 ml alikvota krvi s QFM LyoSphere tabletama okrenutima PREMA GORE na  $37 \pm 1$  °C od 16 do 24 sata.**

**Napomena:** Za inkubator nisu potrebni CO<sub>2</sub> ni ovlaživanje.

Nakon inkubacije, QFM epruvete za uzimanje krvi mogu se držati na temperaturama od 4 do 27 °C, najduže 3 dana do početka centrifugiranja.

- 2. Nakon inkubacije, prikupljanje plazme obavlja se centrifugiranjem QFM epruveta za uzimanje krvi na 15 minuta pri 2000 do 3000 × g (RCF). Čep od gela odvojiti će stanice od plazme. Ako se ovo ne dogodi, ponovno centrifugirajte epruvete.**

Plazma se može uzeti i bez centrifugiranja, ali treba pažljivo ukloniti plazmu bez poremećaja stanica.

- 3. Uzorke plazme uzimajte samo pipetom.**

**Važno:** Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati ni miješati plazmu prije uzimanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

Uzorci plazme mogu se prenijeti izravno iz centrifugiranih QFM epruveta na QFM ELISA ploču, uključujući i situacije kada se upotrebljavaju ELISA automati.

Uzorci plazme mogu se čuvati do najviše 28 dana na temperaturama od 2 do 8 °C ili, ako se uzimaju na temperaturama nižim od -20 °C, duže vrijeme. Alikvoti prikupljenih uzoraka plazme moraju se zapečatiti prije pohrane.

Ako prikupljate uzorke plazme, prikupite barem 150 µl plazme kako biste po potrebi mogli ponoviti testiranje.

Količina IFN- $\gamma$  u uzorcima plazme može se često nalaziti iznad gornjih granica većine čitača ELISA, čak i kada su osobe umjereno imunosupresivne. Preporučuje se razrjeđivanje uzoraka plazme 1 na 10 i/ili 1 na 100



u zelenom diluensu i ispitivanje ELISA testom zajedno s nerazrijeđenom plazmom (pogledajte Faza 2 – IFN- $\gamma$  ELISA).

## Faza 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

### Materijali koje komplet sadrži

- Komplet QuantiFERON Monitor ELISA komponenta s 2 ploče (pogledajte „Sastojci i pohranjivanje”, stranica 6)

### Potrebni materijali (koji nisu isporučeni)

- Pogledajte „Potrebni materijali, koji nisu isporučeni”, stranica 8

### Priprema

IFN- $\gamma$  u plazmi može se često nalaziti iznad gornjih granica većine čitača ELISA, čak i kada su osobe umjereno imunosupresivne. Preporučuje se razrjeđivanje uzoraka plazme 1 na 10 i/ili 1 na 100 u zelenom diluensu i ispitivanje ELISA testom zajedno s nerazrijeđenom plazmom.

U situacijama gdje pacijent ima veliku imunosupresiju, samo priprema i ispitivanje nerazrijeđenog uzorka plazme mogu biti dovoljni za dobivanje kvantitativnog rezultata.

**Napomena:** Rezultati uzoraka koji su unutar raspona QFM ELISA testa (tj. do 10 IU/ml) trebaju se koristiti za interpretaciju rezultata. Najniža otopina koja pruža rezultate u rasponu QFM ELISA testa treba se koristiti za rezultat za izvješće (uzimanjem faktora razrjeđivanja u obzir) ako je nerazrijeđena plazma iznad raspona QFM ELISA testa.

### Postupak

- 1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100 × koncentriranog konjugata, moraju prije upotrebe postići sobnu temperaturu ( $22 \pm 5$  °C). Ostavite najmanje 60 minuta za postizanje toplinske ravnoteže.**
- 2. Uklonite nepotrebne trake s okvira mikrotitar pločica, vratite ih u foliju i pohranite ih do upotrebe u hladnjaku.**  
Pripremite najmanje jednu traku za QFM standarde i dovoljan broj traka za testiranje pacijenata. Nakon upotrebe sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.

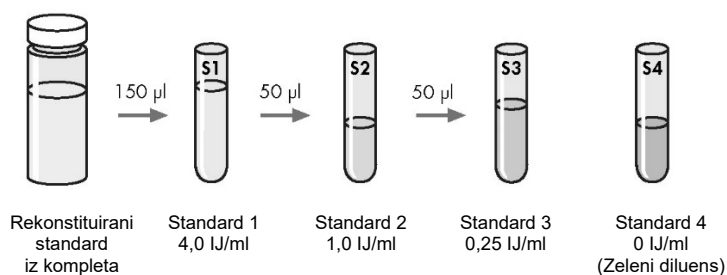
3. **Rekonstituirajte liofilizirani IFN- $\gamma$  standard količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na etiketi standardne bočice. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice, minimizirajući stvaranje pjene, i provjerite je li se sadržaj potpuno rastopio. Rekonstitucijom standarda na naznačeni volumen dobivamo otopinu s koncentracijom od 8,0 IJ/ml.**

**Važno:** Volumen potreban za rekonstituciju IFN- $\gamma$  standarda nije isti za svaku seriju. Provjerite oznaku standardne bočice da biste osigurali upotrebu ispravne količine deionizirane ili destilirane vode.

Upotrijebite rekonstituirani standard iz kompleta za pripravljanje serije otopine od 1:2 te potom serije otopine od 1:4 IFN- $\gamma$  u Zelenom diluensu (GD) (pogledajte sliku 2.). S1 (Standard 1) sadrži 4,0 IJ/ml, S2 (Standard 2) sadrži 1,0 IJ/ml, S3 (Standard 3) sadrži 0,25 IJ/ml i S4 (Standard 4) sadrži 0 IJ/ml (samo GD). Standarde treba testirati u duplikatu. Za svaki ELISA postupak pripremite novu otopinu kompleta standard.

#### Preporučeni postupak za udvostručene standarde

- Označite 4 epruvete sa „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.
- Dodajte 150  $\mu$ l GD-a u S1, S2, S3 i S4.
- Dodajte 150  $\mu$ l standarda iz kompleta u S1 i dobro promiješajte.
- Prenesite 50  $\mu$ l iz S1 u S2 i dobro promiješajte.
- Prenesite 50  $\mu$ l iz S2 u S3 i dobro promiješajte.
- Zeleni diluens (GD) služi kao nulti standard (S4).



**Slika 2. Pripremanje standardne krivulje.**

4. **Rekonstituirajte liofilizirani 100 × koncentrirani konjugat s 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice, minimizirajući stvaranje pjene, i provjerite je li se sadržaj potpuno rastopio.**

Konjugat spreman za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100 × koncentriranog konjugata razrijedi zelenim diluansom (tablica 1. Pripremanje konjugata). Neupotrijebljeni 100 × koncentrirani konjugat odmah nakon upotrebe vratite na temperaturu od 2 do 8 °C. Upotrebljavajte samo zeleni diluens.

**Tablica 1. Pripremanje konjugata**

Broj traka	Količina 100 × koncentriranog konjugata	Količina zelenog diluensa
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. **Uzorke plazme koji su prikupljeni iz epruveta za uzimanje krvi te potom pohranjeni ili zamrznuti promiješajte prije dodavanja u ELISA udubljenje.**

**Važno:** Ako se uzorci plazme dodaju neposredno iz centrifugiranih QFM epruveta, potrebno je izbjegavati bilo kakvo miješanje plazme. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

**6. Preporučuje se: Razrijedite uzorke plazme 1:10.**

- Dodajte 90 µl zelenog diluensa (GD) u epruvetu s oznakom pacijenta i „1:10”.
- Zatim dodajte 10 µl pomiješanih uzoraka plazme (pogledajte korak 5 za detalje o miješanju uzoraka plazme za razliku od onih izravno dodanih iz centrifugiranih QFM epruveta).
- Temeljito promiješajte pipetom, ali nemojte stvarati pjenu.

**7. Preporučuje se: Razrijedite uzorke plazme 1:100.**

- Pripremite otopinu 1:10 (pogledajte korak 6 iznad).
- Dodajte 90 µl zelenog diluensa u epruvetu s oznakom pacijenta i „1:100”.
- Dodajte 10 µl u otopinu 1:10.
- Temeljito promiješajte pipetom, ali nemojte stvarati pjenu.

**Preporučuje se: Ispitajte sljedeće uzorke paralelno, ovim redoslijedom:**

- Nerazrijeđeno, 1:10, 1:100

Softver za analizu QFM podržava i sljedeće opcije pacijentovih uzoraka:

- Nerazrijeđeno
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Nerazrijeđeno, 1:10

- 8. Višekanalnom pipetom dodajte 50 µl svježe pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuće ELISA udubljenje.**
- 9. Dodajte 50 µl testnog uzorka plazme u odgovarajuća udubljenja pomoću višekanalne pipete. Zatim dodajte 50 µl svakog od standarda 1 do 4. Ispitajte standarde u duplikatima.**
- 10. Svaku ploču prekriti poklopcem i dobro izmiješajte uzorke/standarde konjugata i plazme u tresilici za mikrotitar ploče u trajanju od 1 minute. Izbjegavajte mućkanje.**
- 11. Inkubirajte na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 5$  °C) u trajanju  $120 \pm 5$  minuta.**

Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.

- 12. Za vrijeme inkubacije razrijedite 1 dio 20 × koncentriranog pufera za ispiranje s 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro promiješajte. U kompletu se nalazi dovoljno 20 × koncentriranog pufera za ispiranje da bi se dobilo 2 litre gotovog pufera za ispiranje.** Isperite udubljenja u uređaju za ispiranje mikrotitar ploča s 400 µl pufera za ispiranje spremnog za upotrebu kroz najmanje 6 ciklusa. Preporučujemo upotrebu automatskog uređaja za pranje mikrotitar ploča. Pažljivo ispiranje veoma je važno za učinak testa. Pazite da pri svakom ispiranju sva udubljenja budu **potpuno napunjena** puferom za ispiranje. Preporučuje se: za postizanje najboljih rezultata, napunite udubljenja na barem 5 sekundi između svakog ciklusa.
- U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu dodajte dezinfekcijsko sredstvo koje se upotrebljava u laboratorijima i slijedite propisane postupke za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.
- 13. Lupkanjem istresite ploče prema dolje na upijajući netkani ručnik kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata u svaku udubinu, svaku ploču prekrijte poklopcem i promiješajte ploče pomoću tresilice.**
- 14. Inkubirajte na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 5$  °C) u trajanju 30 minuta.** Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.
- 15. Nakon inkubacije dodajte 50 µl enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svaku udubinu i promiješajte ploče pomoću tresilice.** Enzimsku otopinu za zaustavljanje reakcije dodajte u udubljenja po istom redoslijedu i približno istom brzinom kao što ste učinili s otopinom enzimskog supstrata u koraku 13.
- 16. Izmjerite optičku gustoću (OD) u roku od 5 minuta nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije pomoću čitača za mikrotitar ploče, primjenom 450 nm filtra i 620 nm do 650 nm referentnog filtra. Izračunavanje rezultata izvodi se pomoću očitane vrijednosti optičke gustoće.**

## Izračunavanje i tumačenje rezultata

Softver za analizu QuantiFERON Monitor služi za analizu sirovih podataka i izračun rezultata. Dostupan je na web-adresi [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Obavezno upotrijebite najnoviju verziju Softvera za analizu QuantiFERON Monitor.

Softver provodi kontrolu kvalitete testa, formira standardnu krivulju i daje rezultat za svakog testiranog pacijenta, kao što je objašnjeno u odjeljku Tumačenje rezultata.

Ako je nerazrijeđena plazma iznad gornjeg raspona (tj. > 10 IJ/ml) QFM ELISA testa, softver za analizu QuantiFERON Monitor izvješćuje najnižu otopinu koja daje rezultat u rasponu QFM ELISA testa, uzimajući u obzir faktor razrijeđivanja.

Kao alternativa Softveru za analizu QuantiFERON Monitor, rezultati se mogu utvrditi i na osnovi sljedeće metode.

## Stvaranje standardne krivulje

### (Ako se ne upotrebljava Softver za analizu QuantiFERON Monitor)

Utvrđite srednju vrijednost optičke gustoće replikata standarda iz kompleta na svakoj ploči.

Izradite  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  standardnu krivulju grafičkim prikazom  $\log_{(e)}$  srednje vrijednosti optičke gustoće (y-os) u usporedbi s  $\log_{(e)}$  IFN- $\gamma$  krivuljom koncentracije standarda u IJ/ml (x-os), izostavivši nulti standard. Izračunajte liniju najboljeg oblika standardne krivulje regresijskom analizom.

Upotrebljavajte standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- $\gamma$  koncentracije (IJ/ml) za svaki testirani uzorak plazme pomoću vrijednosti optičke gustoće za svaki uzorak.

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

Rezultati se trebaju uzeti od najniže otopine koja daje rezultat u rasponu QFM ELISA (uzimajući u obzir faktor razrijeđivanja) ako je nerazrijeđena plazma iznad raspona QFM ELISA testa.

## Kontrola kvalitete testa

Točnost rezultata testa ovisi od pravilnog formiranja standardne krivulje. Stoga se rezultati izvedeni iz standarda moraju preispitati prije tumačenja rezultata testa.

ELISA je valjan ako su ispunjeni sljedeći kriteriji:

- Srednja vrijednost optičke gustoće Standarda 1 mora biti  $\geq 0,600$ .
- %CV repliciranih vrijednosti optičke gustoće Standarda 1 i Standarda 2 mora biti  $\leq 15\%$ .
- Replicirane vrijednosti optičke gustoće Standarda 3 i Standarda 4 od srednjih vrijednosti ne smiju odstupati više od 0,040 OD jedinica.
- Koeficijent korelacije ( $r$ ), dobiven iz srednjih vrijednosti apsorpcije standarda mora biti  $\geq 0,98$ .

Softver za analizu QuantiFERON Monitor izračunava i izvješćuje o tim parametrima za kontrolu kvalitete.

Ako ovi kriteriji nisu ispunjeni, test nije valjan i mora se ponoviti.

Srednja vrijednost optičke gustoće Nultog standarda (Zeleni diluens) trebala bi biti  $\leq 0,150$ . Ako je srednja vrijednost optičke gustoće  $> 0,150$ , preporučuje se kontrola postupka ispiranja ploča.

## Tumačenje rezultata

QFM rezultati tumače se ovisno o IFN- $\gamma$  reakciji na urođene i prilagodljive imunološke stimulanse. QFM test pruža kvalitativno i kvantitativno mjerenje imunološke funkcije. QFM rezultati možda neće izravno mjeriti razinu imunološke supresije.

**Važno:** Tijekom utvrđivanja imunološkog stanja pacijenta, mjerena IFN- $\gamma$  razina treba se koristiti u sklopu s kliničkom prezentacijom, povijesti bolesti i drugim dijagnostičkim pretragama (tablica 2). Prag QFM testa može ovisiti o pacijentovoj razini imunosupresije i postavkama pojedinačne transplantacije.

**Tablica 2. Tumačenje rezultata**

<b>QFM rezultat IFN-<math>\gamma</math> (IJ/ml)</b>	<b>Klasifikacija</b>	<b>Tumačenje</b>
< 15	Niska	Pacijent ima nisku IFN- $\gamma$ reakciju na urođene i prilagodljive imunološke stimulanse
15–1000	Umjerena	Pacijent ima umjerenu IFN- $\gamma$ reakciju na urođene i prilagodljive imunološke stimulanse
> 1000	Visoka	Pacijent ima visoku IFN- $\gamma$ reakciju na urođene i prilagodljive imunološke stimulanse

Ako je izmjerena IFN- $\gamma$  razina uzorka nerazrijeđene plazme manja od 0,1 IJ/ml:

- Provjerite je li QFM LyoSphere tableta dodana uzorku krvi i je li epruveta inkubirana prema ovim uputama.
- Provjerite odgovara li IFN- $\gamma$  rezultat trenutačnom kliničkom stanju pacijenta.

Ako se sumnja na tehnički problem prilikom uzimanja krvi ili rukovanja uzorcima, ponovite cijeli QFM test s novim uzorkom krvi. Ponovite ELISA testiranje stimuliranog uzorka plazme ako sumnjate da je originalni test odstupao od postupka koji je opisan u ovim uputama (za detalje pogledajte odjeljak s kontrolom kvalitete testa).

Liječnik može ponoviti test ako rezultati nisu u skladu s trenutačnim kliničkim stanjem pacijenta.



## Ograničenja

Rezultate QFM testa treba promatrati u kombinaciji s povijesti bolesti svakog pacijenta, njegovim trenutačnim zdravstvenim stanjem i rezultatima drugih dijagnostičkih pretraga. Laboratoriji mogu odabrati utvrđivanje vlastitih raspona za test.

Laboratoriji također mogu odabrati i paralelnu upotrebu vanjskog kontrolnog uzorka od zdravog pacijenta s uzorcima pacijenata.

Do nepouzdanih ili nepreciznih rezultata može doći iz sljedećih razloga:

- Neispravni krvni antikoagulans – koristite samo litij heparin jer ostali antikoagulanti mogu utjecati na test.
- Odstupanja od postupka opisanog u priloženoj uputi za uporabu.
- Prevelika koncentracija cirkulirajućeg IFN- $\gamma$  ili prisutnost heterofilnih antitijela.
- Prekoračenje roka od 8 sati između uzimanja uzorka krvi i inkubacije na temperaturi od 37 °C.
- Pretjerano ili nedovoljno punjenje QFM epruveta za uzimanje krvi izvan raspona od 0,9 do 1,1 ml.

## Radne značajke

### Klinička istraživanja

Izvršena su dva klinička istraživanja kako bi se procijenile reakcije prividno zdravih pojedinaca ( $n = 114$ ) u odnosu na primatelje organa ( $n = 30$ ). Od primatelja organa, 18 ih je u ranoj posttransplantacijskoj skupini (rana Post-Tx, unutar 3 mj. od transplantacije) i 12 je u kasnoj posttransplantacijskoj ili stabilnoj skupini (kasna Post-Tx, > 12 mjeseci nakon transplantacije).

- Uzorci su prikupljeni od svakog pacijenta u do 5 vremenskih točaka u ranoj Post-Tx fazi (skupina posttransplantacije u 3 mj.,  $n = 64$  uzoraka).
- Uzorci su jednom prikupljeni od svakog pacijenta u kasnoj Post-Tx fazi (skupina kasne posttransplantacije,  $n = 12$  uzoraka)
- Uzorci su jednom prikupljeni od svakog pacijenta u prividno zdravoj skupini ( $n = 114$  uzoraka)

Reakcije na QFM varirale su između niskih i umjerenih kod uzoraka u ranoj Post-Tx i kasnoj Post-Tx fazi. Rana Post-Tx faza imala je veći postotak (93,8%) reakcije u niskom rasponu, a niži postotak reakcija (6,3%) u umjerenom rasponu u usporedbi s reakcijama iz kasne Post-Tx faze, s 25% reakcija u niskom rasponu i 66,7% u umjerenom rasponu (tablica 3). Nijedna reakcija rane Post-Tx faze nije bila u visokom rasponu reakcija, dok je samo 1 (8,3%) reakcija u uzorcima kasne Post-Tx faze bila u visokom rasponu

reakcije. QFM reakcije u prividno zdravoj skupini uglavnom su bile u umjerenom rasponu (83,3%) i visokom rasponu reakcije (15,8%) (tablica 3).

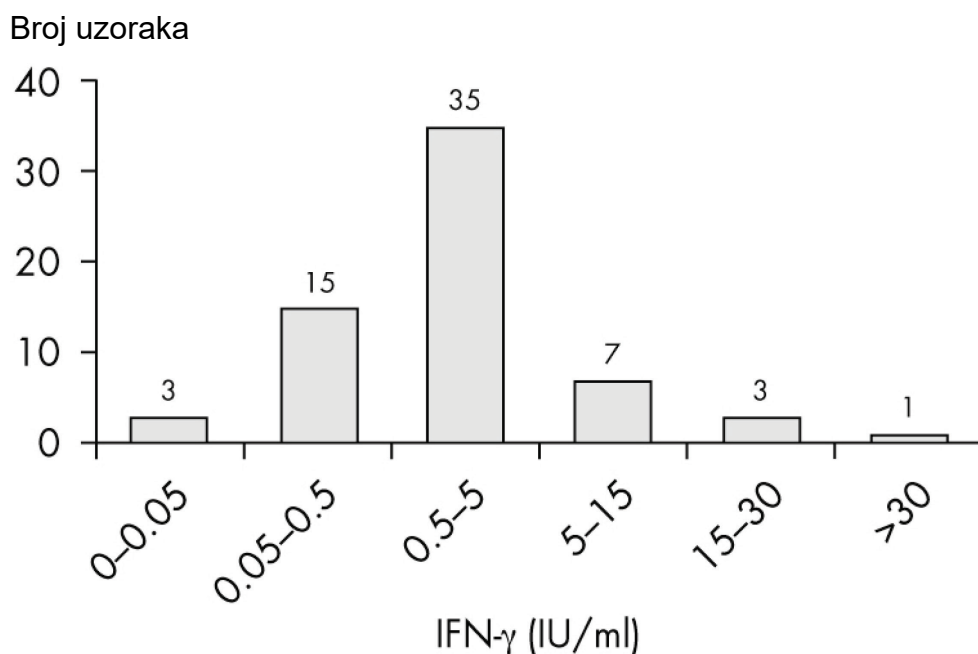
**Tablica 3. Raspon QFM reakcija kod prividno zdravih pacijenata u usporedbi s primateljima organa**

IFN- $\gamma$ (IJ/ml)	Kategorija rezultata	Rana	Kasna	Prividno	Ukupno
		Post-Tx %*	Post-Tx %*	zdravi %*	
		95% CI	95% CI	95% CI	
		n	n	n	
< 15	Niska	93,8% 85,0–97,5 n = 60	25,0% 8,9–53,2 n = 3	0,9% 0,2–4,8 n = 1	<b>64</b>
15–1000	Umjerena	6,3% 2,5–15,0 n = 4	66,7% 39,1–86,2 n = 8	83,3% 75,4–89,1 n = 95	<b>107</b>
> 1000	Visoka	0,0% 0–5,7 n = 0	8,3% 1,5–35,4 n = 1	15,8% 10,2–23,6 n = 18	<b>19</b>
Ukupno uzoraka		<b>64</b>	<b>12</b>	<b>114</b>	<b>190</b>

\* Postoci indiciraju odnos uzoraka među pojedinim skupinama donatora koji su uvršteni u određeni raspon reakcija.

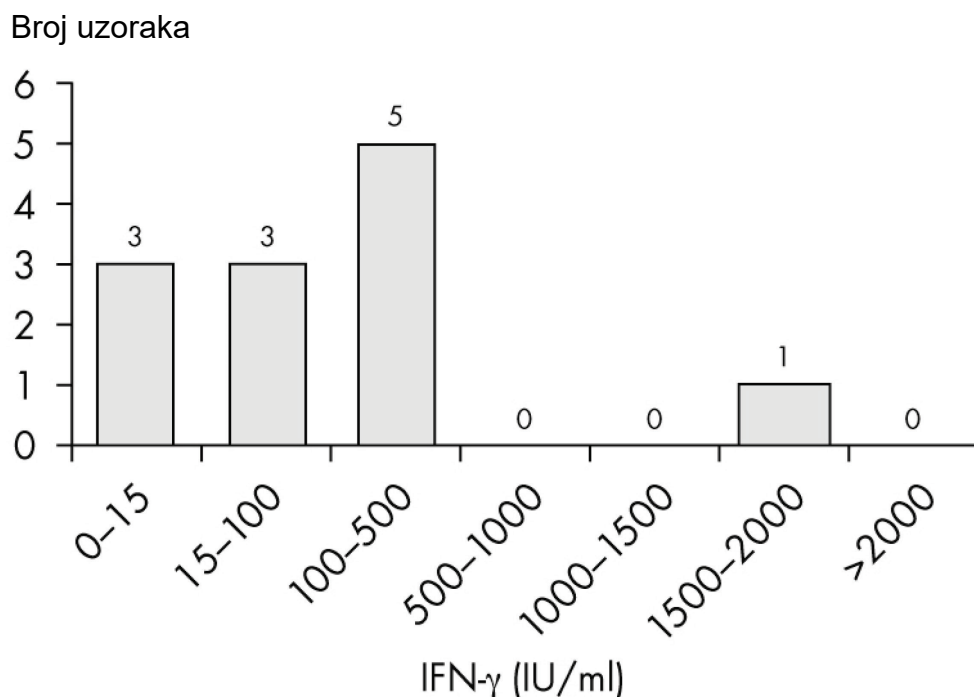
## Očekivane vrijednosti

Distribucija IFN- $\gamma$  reakcija na QFM kod pacijenata u ranoj posttransplantacijskoj fazi (do 3 mj. posttransplantacije) određena je iz 64 uzorka prikupljenih od 18 primatelja organa pomoću QFM ELISA (slika 3).



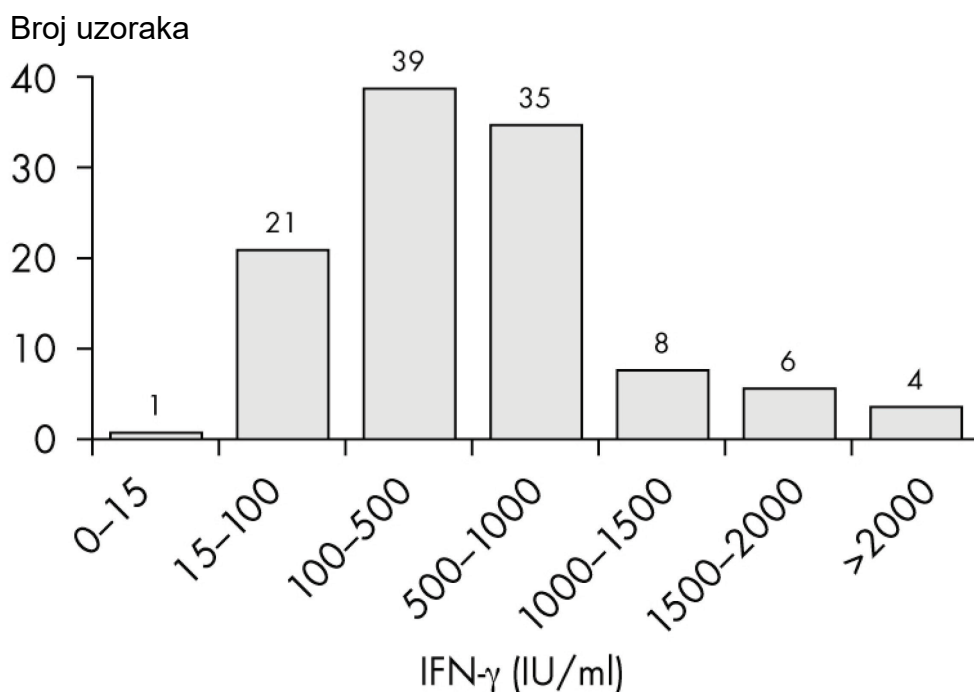
**Slika 3. Distribucija QFM IFN- $\gamma$  reakcija kod pacijenata u ranoj posttransplantacijskoj fazi (n = 64; srednja vrijednost = 1,5 IU/ml).**

Distribucija IFN- $\gamma$  reakcija na QFM kod pacijenata u kasnoj posttransplantacijskoj fazi (> 12 mj. posttransplantacije) određena je iz 12 uzoraka prikupljenih pomoću QFM ELISA (slika 4).



**Slika 4. Distribucija QFM IFN- $\gamma$  reakcija kod pacijenata u kasnoj posttransplantacijskoj fazi (n = 12; srednja vrijednost = 98,8 IJ/ml).**

Distribucija IFN- $\gamma$  reakcija na QuantiFERON Monitor kod prividno zdravih pacijenata određena je iz 114 uzoraka prikupljenih pomoću QFM ELISA (slika 5).



**Slika 5. Distribucija QFM IFN- $\gamma$  reakcija kod prividno zdravih pacijenata (n = 114; srednja vrijednost = 400,5 IJ/ml).**

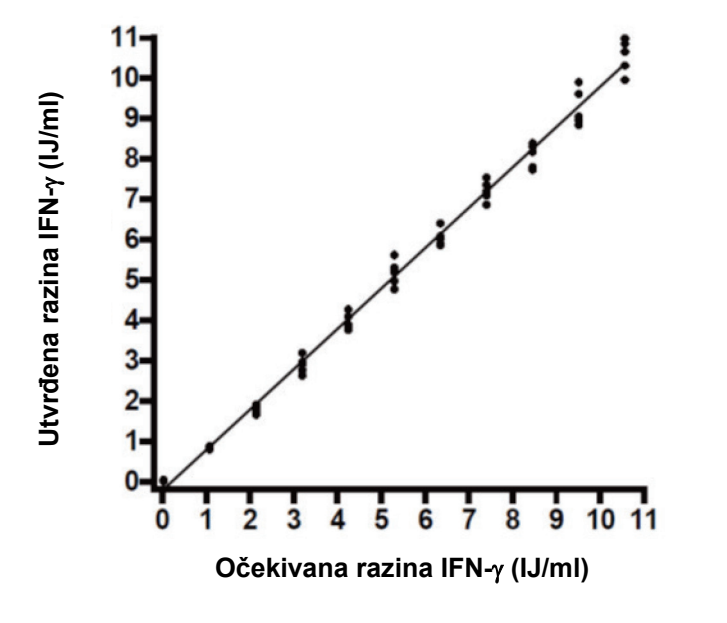
## **QFM reakcija kod pacijenta s transplantacijama organa**

QFM je procijenjen u promatranom istraživanju poprečnog presjeka kod pacijenta s transplantiranim organima (4). Istraživanje je uključivalo: 212 zdravih ispitanika s podskupinom od 30 kontrolnih ispitanika (prema dobi i spolu), 30 predtransplantacijskih pacijenata, 18 pacijenata u ranoj posttransplantacijskoj fazi (66 uzoraka; srednja vrijednost posttransplantacije = 21 dan) i 11 pacijenata u kasnoj posttransplantacijskoj fazi (srednja vrijednost = 2290 dana). Prosječna IFN- $\gamma$  obrada je 555,2 IJ/ml među zdravim ispitanicima u kontrolnoj skupini i 614,6 IJ/ml u odgovarajućoj kontrolnoj skupini (prema dobi i spolu). Prosječna IFN- $\gamma$  obrada pokazala se znatno nižom kod predtransplantacijskih pacijenata (IFN- $\gamma$  = 89,3 IJ/ml) i pacijenata u ranoj posttransplantacijskoj fazi (IFN- $\gamma$  = 3,76 IJ/ml) u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (prema dobi i spolu) ( $p < 0,001$ ). Obnavljanje imunološke funkcije među pacijentima u kasnoj posttransplantacijskoj fazi (prosječna IFN- $\gamma$  = 256,1 IJ/ml) pokazalo se znatno veće nego među pacijentima u ranoj posttransplantacijskoj fazi ( $p < 0,05$ ). Ispitivanje indicira da se QFM može koristiti za procjenu stanično posredovane imunološke funkcije kod populacije s transplantiranim solidnim organima i s imunosupresijom.

## Značajke testa

Linearnost testa QFM ELISA dokazana je nasumičnim postavljanjem 5 replika od 11 spremnika plazme poznatih IFN- $\gamma$  koncentracija na ploči ELISA. Crta linearne regresije ima nagib od  $1,002 \pm 0,011$  i koeficijent korelacije od 0,99 (slika 6).

Granica za očitavanje testa QFM ELISA iznosi 0,065 IJ/ml i nema dokaza za učinak visoke razine izlaganja (prozon) s koncentracijama za IFN- $\gamma$  do 10.000 IJ/ml.



Slika 6. Profil linearnosti QFM ELISA koji je utvrđen testiranjem 5 replika od 11 uzoraka plazme poznatih IFN- $\gamma$  koncentracija.

Ponavljanje QFM testa (faza 1) određeno je korištenjem uzoraka krvi 20 zdravih ispitanika. Izvršena je procjena tri različita operatora, serije QFM LyoSphere tableta i vrste opreme. Prosječan koeficijent varijacije razina IFN- $\gamma$  reakcije određen pomoću QFM ELISA testa na tri serije QFM LyoSphere tableta i sva tri uvjeta ispitana iznosi 22,22% (95% CI: 17,20–27,25).

Mogućnost ponavljanja QFM testa (faza 1) procijenjena je mjerenjem varijabilnosti 5–6 ponovljenih stimulacija krvi QFM LyoSphere tabletama od istog donatora na 14 ispitanika. Prosječan koeficijent varijacije na 14 ispitanika iznosi 14,7% (95% CI: 10,2–19,2). %CV pojedinačnih ispitanika manji je od 30%.

Mogućnost ponavljanja QFM ELISA testa (faza 2) procijenjena je testiranjem 20 uzoraka plazme s različitim IFN- $\gamma$  koncentracijama u replikama po 3 uzorka, u 3 laboratorija, na 3 nasumična dana, koje su testirala 3 različita operatora. Tako je svaki uzorak testiran 27 puta, u 9 neovisnih testiranja. Jedan je uzorak bio Nulta kontrola s izračunatom IFN- $\gamma$  koncentracijom od 0,08 IJ/ml (95% CI:

0,07–0,09). Od preostalih 19 uzoraka plazme, raspon koncentracija bio je 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) do 7,7 IJ/ml (95% CI: 7,48–7,92).

Nepreciznost za vrijeme rada ili testa procijenjena je izradom prosjeka %CV za svaku testnu plazmu koja sadrži IFN- $\gamma$  sa svake ploče (n = 9) s rasponom nepreciznosti od 4,1 do 9,1 %CV. Prosjek tijekom rada %CV ( $\pm$  95% CI) bio je  $6,6 \pm 0,6\%$ . Prosjek nulte IFN- $\gamma$  plazme iznosio je 14,1 %CV.

Ukupna nepreciznost ili nepreciznost za vrijeme testa određena je usporedbom 27 izračunatih koncentracija IFN- $\gamma$  za svaku testnu plazmu. Nepreciznost tijekom testa imala je raspon između 6,6 i 12,3 %CV. Opći prosjek %CV ( $\pm$  95% CI) bio je  $8,7 \pm 0,7\%$ . Nulta IFN- $\gamma$  plazma iskazala je 26,1 %CV. Ova se razina varijacije treba očekivati jer je izračunata koncentracija IFN- $\gamma$  niska i varijacija za niske procjene koncentracije bit će veća nego za više koncentracije.

## **Tehnički podaci**

### **Zgrušani uzorci plazme**

Ako pri dužem pohranjivanju plazme nastanu ugrušci fibrina, uzorke treba centrifugirati kako bi se zgrušani materijal nataložio i plazma lakše pipetirala.

## Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i tehničke podatke na stranici: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Za podatke o kontaktima pogledajte stražnje korice.

### ELISA rješavanje problema

---

#### Nespecifična boja reakcije

Mogući uzrok	Rješenje
a) Nedovoljno pranje ploča	Ploču operite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za pranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja.
b) Unakrsna kontaminacija ELISA udubljenja	Pažljivo pipetiranje i miješanje uzoraka smanjuje rizik.
c) Istekao vijek trajanja kompleta/komponenti	Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Rekonstituirani standard i 100 × koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.
d) Enzimski otopina kontaminirana	Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.
e) Miješanje plazme u QFM epruветama za centrifugiranje prije prikupljanja	Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati ni miješati plazmu prije uzimanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

#### Niska očitavanja optičke gustoće za standarde

Mogući uzrok	Rješenje
a) Greška prilikom razrjeđivanja Standarda	Razrjeđivanje kompleta standarda iz kompleta provodite točno prema ovoj priloženoj uputi.
b) Pogrešno pipetiranje	Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača.
c) Temperatura inkubacije preniska	Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi (17 do 27 °C).



## ELISA rješavanje problema

---

- |   |  |
|---|--|
| d) Vrijeme inkubacije prekratko               | Inkubirajte ploču s konjugatom, standarde i uzorke $120 \pm 5$ minuta. Inkubirajte otopinu enzimskog supstrata na ploči 30 minuta.   |
| e) Pogrešan filter za čitač ploče             | Ploču treba čitati pri 450 nm referentnim filtrom od 620 i 650 nm.   |
| f) Reagensi prehladni                         | Svi reagensi (osim $100 \times$ koncentrirani konjugat) moraju postići sobnu temperaturu prije početka testa. To traje otprilike jedan sat.                                  |
| g) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao | Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Rekonstituirani standard i $100 \times$ koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije. |

### Jaka obojenost pozadine

- | Mogući uzrok                                  | Rješenje   |
|---|--|
| a) Nedovoljno pranje ploča                    | Ploču operite najmanje 6 puta s 400 $\mu$ l pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za pranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Temperatura inkubacije previsoka           | Inkubaciju za ELISA test treba izvoditi na sobnoj temperaturi (17 do 27 °C).   |
| c) Istekao vijek trajanja kompleta/komponenti | Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Rekonstituirani standard i $100 \times$ koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.   |
| d) Enzimski otopina kontaminirana             | Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.  |

### Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između duplikata

- | Mogući uzrok               | Rješenje   |
|----------------------------|--|
| a) Nedovoljno pranje ploča | Ploču operite najmanje 6 puta s 400 $\mu$ l pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za pranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |

## ELISA rješavanje problema

---

- |   |  |
|---|--|
| b) Pogreška pri razrjeđivanju standarda                                 | Razrjeđivanje standarda provodite točno prema ovoj priloženoj uputi.   |
| c) Nedovoljno miješanje   | Prije nego što ih dodate na ploču, dobro promiješajte reagense okretanjem ili laganim mućkanjem.                 |
| d) Nedosljedna tehnika pipetiranja ili prekid tijekom pripremanja testa | Uzorke i standarde treba dodavati kontinuirano. Svi reagensi trebaju biti pripremljeni prije početka testiranja. |

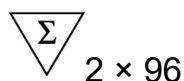
**Informacije o proizvodu i tehničke priručnike možete dobiti besplatno od tvrtke QIAGEN, od svoga distributera ili na web-adresi [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).**

## Bibliografija

Opsežan popis referenci za QFM test nalazi se na portalu Gnowee — bazi podataka za QuantiFERON, dostupnoj na web-adresi [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net).

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

## Oznake



Dovoljno za pripremanje 2 × 96 uzoraka



Proizvođač



Simbol s oznakom CE-IVD



Za in vitro dijagnostičku namjenu



Kod šarže



Broj kataloga



Upotrebljivo do



Ograničenja temperature



Prije upotrebe pročitajte upute



Za jednu upotrebu



Sklonite od sunčeva svjetla



Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici

## Informacije za kontakt

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

# Skraćeni testni postupak

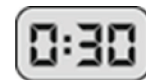
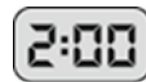
## Faza 1 – inkubacija krvi

1. Uzmite krv pacijenta ili u QFM epruvetu za uzimanje krvi ili u epruvetu s litij heparinom. Označite epruvete s informacijama o pacijentu i vremenom uzimanja krvi, a zatim ih unutar 8 sati od uzimanja odnesite u laboratorij na sobnoj temperaturi.
  - a. Ako je krv uzeta u litij heparinsku epruvetu, alikvotirajte 1 ml krvi u QFM epruvetu za uzimanje krvi i označite epruvetu s informacijama o pacijentu i vremenom uzimanja
2. Dodajte 1 QFM LyoSphere tabletu svakoj QFM epruveti za uzimanje krvi koja sadrži 1 ml krvi, rastopite LyoSphere tabletu te inkubirajte epruvete čim prije (unutar 8 sati od uzimanja krvi) **uspravno** na 37 °C u trajanju od 16–24 sata.
3. Poslije inkubacije centrifugirajte epruvete 15 minuta pri obrtaju od 2000 to 3000 × g (RCF) da biste odvojili plazmu od crvenih krvnih stanica.
4. Nakon centrifugiranja nipošto nemojte pipetirati ili miješati plazmu prije prikupljanja plazme. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.



## Faza 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

1. ELISA komponente – osim 100  $\times$  koncentriranog konjugata – ostavite da se stabiliziraju na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.
2. Rekonstituirajte standard iz kompleta destiliranom ili deioniziranom vodom na 8,0 IJ/ml. Pripremite 4 standardne otopine.
3. Rekonstituirajte liofilizirani, 100  $\times$  koncentrirani konjugat s destiliranom ili deioniziranom vodom.
4. Pripremite konjugat pomoću Zelenog diluensa i dodajte 50  $\mu$ l u svako udubljenje.
5. Dodajte 50  $\mu$ l uzoraka plazme (nerazrijeđene, otopine 1:10 i 1:100) i 50  $\mu$ l standarda u odgovarajuće udubljenje. Promiješajte tresilicom.
6. Inkubirajte 120  $\pm$  5 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Isperite udubljenja najmanje 6 puta s 400  $\mu$ l pufera za ispiranje po udubljenju.
8. Dodajte 100  $\mu$ l otopine enzimskog supstrata u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.
10. Dodajte 50  $\mu$ l enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.
11. Očitajte rezultate na 450 nm s referentnim filtrom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



## Napomene

## Značajne izmjene

Sažeti prikaz značajnih izmjena u ovom izdanju upute za upotrebu proizvoda QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA nalazi se u tablici u nastavku:

<b>Odjeljak</b>	<b>Stranica</b>	<b>Izmjena(e)</b>
Mjere opreza	11	Nove informacije u vezi s GHS-om
Mjere opreza	12	Dodane sigurnosne upute u vezi s bočicama s poklopcem s metalnim osiguračem.





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

#### **Ugovor o ograničenoj licenci za komplet QuantiFERON Monitor**

Upotrebom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik obvezuje se na pridržavanje uvjeta iz ovog ugovora:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne daje nikakvu licencu za svoje intelektualno vlasništvo za upotrebu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnim na stranici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima. Tvrtka QIAGEN nije temeljito pregledala ili optimizirala te protokole. Tvrtka QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova upotreba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu upotrebu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati ili preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi. QIAGEN može ishoditi zabranu ovog Ograničenog licencnog ugovora na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove za odvjetnika, za svako postupanje koje nije u skladu s ovim Ograničenim licencnim ugovorom ili intelektualnim pravima koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Za ažurirane uvjete licence pogledajte [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2014 QIAGEN, all rights reserved.

---

**www.qiagen.com**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

