

Mars 2018

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

IFN- γ -test för helblod som mäter responser på immunstimulantia
för medfött och förvärvat immunförsvar

Version 1

IVD För in vitro-diagnostisk användning

CE

REF 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, USA

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, TYSKLAND

1079024SV rev. 03

 www.QuantiFERON.com



www.QuantiFERON.com

Innehåll

Avsedd användning	4
Sammanfattning och förklaring av testet	4
Användningsprinciper för analysen	5
Tid som krävs för att utföra analysen	6
Komponenter och förvaring	6
Material som behövs men inte medföljer	8
Förvaring och hantering	8
Varningar och säkerhetsåtgärder	10
Varningar	10
Försiktighetsåtgärder	11
Provtagning och -hantering	13
Anvisningar för användning	16
Beräkningar och tolkningar av testet	22
Generering av standardkurva	22
Kvalitetskontroll av testet	23
Tolkning av resultat	23
Begränsningar	25
Testets egenskaper	25
Kliniska studier	25
Analyseffektens egenskaper	30
Teknisk information	31
Koagulerade plasmaprover	31
Felsökningsguide	32
Referenser	34
Symboler	35
Kontaktinformation	35
Förkortad testprocedur	36

Avsedd användning

Analysen QuantiFERON Monitor (QFM) är ett in vitro-diagnostiskt test avsett för detektion av cellmedierad immunfunktion genom mätning av gammainterferon (IFN- γ) i plasma med enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) efter inkubering av hepariniserat helblod med immunstimulantia för medfött och förvärvat immunförsvar. Analysen används för att detektera cellmedierad immunrespons hos immunsupprimerade mottagare av transplanterade fasta organ.

QFM är avsett för användning i samband med riskbedömning och andra medicinska och diagnostiska utvärderingar.

Sammanfattning och förklaring av testet

Immunbrist karakteriseras av en nedsatt förmåga till effektiv immunrespons. Den försämrade eller uteblivna responsen kan bero på primär eller sekundär immunbrist (1).

Primär immunbrist är ärftlig och karakteriseras av defekter på specifika delar av det medfödda eller förvärvade immunförsvaret (1). I de flesta fall är dock immunbristen förvärvad (sekundär) och kan orsakas av patogena ämnen, medicin (till exempel immunsupprimerande behandling efter organtransplantation), sjukdomstillstånd (som cancer, till exempel leukemi och lymfom), eller av miljöföroreningar (1).

Den molekylära orsaken till immunbrist varierar, men cellmedierad immunitet spelar en viktig roll för uppkomsten av många av de observerade kliniska symtomen. För närvarande beror diagnostiseringen och hanteringen av immunbristsyndrom på den utlösande orsaken (2, 3).

Så är till exempel ad hoc-åtgärder normen vid övervakning av status för cellulär immunbrist hos individer som genomgått transplantation av fasta organ och som får medicin som supprimerar immunsystemet. Status för individens immunrespons mäts normalt genom övervakning av medicinnivåer och klinisk/patologisk utvärdering av transplantatets funktion (2, 3).

Ett antal T-celfunktionstest mäter cellmedierad immunitet mot mitogener som fytohemagglutinin (PHA), mitogen från *Phytolacca* och konkanavalin A, men dessa mäter endast funktionsförmågan hos T-celler, som utgör en delgrupp av de celler som är inblandade i cellmedierad immunitet. Det har blivit allt mer tydligt att förvärvade immunmekanismer i hög grad bidrar till värdförsvaret, antingen självständigt eller genom att förstärka specifika T-cellresponser. Därför ger funktionsresponsen för medfödda (naturliga mördarceller [NK])

och förvärvade (T-celler) immunceller tillsammans en mer fullständig analys av cellmedierad immunitet (2, 3).

QFM är ett in vitro-diagnostiskt test som använder en kombination av stimulantia (i form av en LyoSphere™-pellet) som specifikt stimulerar olika celltyper som är inblandade i både det medfödda och i det förvärvade immunsystemet. Status för individens immunfunktion utvärderas genom att mäta responsen på stimulering av det medfödda och det förvärvade immunsystemet med TLR- (Toll-likareceptorer) respektive T-cellreceptor-agonister. Detektion av gammainterferon (IFN- γ) med ELISA ger både en kvalitativ och en kvantitativ mätning av cellmedierad immunfunktion.

Användningsprinciper för analysen

QFM-analysen använder lyofiliserade stimulantia (QFM LyoSphere™-pelletar), som tillsätts i hepariniserat helblod. Blodet inkuberas i mellan 16 och 24 timmar, och därefter samlas plasma in och provet testas för närvaro av IFN- γ som skapats som en respons på stimulantia.

QFM-testet utförs i olika steg. Först samlas helblod in med ett QFM-blodprovtagningrör. Därefter tillsätts en QFM LyoSphere-pellet i röret, som sedan inkuberas i 37 °C så snart som möjligt och inom 8 timmar efter insamlingen. Efter en inkuberingstid på 16 till 24 timmar centrifugeras rören, plasman tas bort och mängden IFN- γ (IU/ml) mäts med ELISA och jämförs med ett intervall av förväntade värden för att bedöma immunresponsen för individen.

QFM är en analys som ger både en kvalitativ och en kvantitativ mätning av immunfunktionen. QFM-resultaten kan inte kvantifiera immunsupprimeringsnivån direkt.

Mängden IFN- γ i plasmaprover kan ofta ligga ovanför den övre gränsen för de flesta ELISA-läsare, även för personer som är måttligt immunsupprimerade. Vi rekommenderar att plasmaprover späds ut 1/10 och/eller 1/100 i grön diluent, och analyseras i ELISA tillsammans med utspädd plasma.

Obs: Tröskelvärdet för QFM-analysen kan variera beroende på individens immunsupprimeringsnivå och individuella omständigheter för transplantationen.

Se "Tolkning av resultat" på sidan 23 i den här bipacksedeln för anvisningar om hur QFM-resultatet ska tolkas.

Tid som krävs för att utföra analysen

En uppskattning av den tid som krävs för att utföra QFM-analysen anges nedan. Även tiden för att utföra testserier av flera prover visas.

Inkubering av blodrör i 37 °C: 16 till 24 timmar

ELISA: Ca 3 timmar för en ELISA-platta
(upp till 88 prover)

< 1 timmes arbete

Lägg till 10 till 15 minuter för varje extra platta

Komponenter och förvaring

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Katalognr	0650-0701
Antal beredningar	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 flaskor
<i>Bipacksedel för QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
QuantiFERON Monitor-blodprovtagningsrör	
Katalognr	0650-0101
Antal beredningar	100
QuantiFERON Monitor-blodprovtagningsrör (vit kork, vit ring)	100 rör
<i>Bipacksedel för QuantiFERON Monitor-blodprovtagningsrör</i>	1

Komponenter i QuantiFERON Monitor-kit med 2 plattor, ELISA	Kit med 2 plattor, ELISA
Katalognr	0650-0201
Mikroplattremsor, 12 x 8 brunnar (belagda med murin anti-human IFN- γ monoklonal antikropp)	2 uppsättningar mikroplattremsor med 12 x 8 brunnar
IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ -standard, lyofiliserad; innehåller rekombinant human IFN- γ , bovint kasein, 0,01 % w/v tiomersal)	1 x flaska (8 IU/ml rekonstituerad)
Green Diluent (Grön diluent; innehåller bovint kasein, normalt musserum, 0,01 % w/v tiomersal)	1 x 30 ml flaska
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Konjugat 100x koncentrat, lyofiliserat; murin anti-human IFN- γ HRP, innehåller 0,01 % w/v tiomersal)	1 x 0,3 ml rekonstituerad
Wash Buffer 20x Concentrate (Tvättbuffert 20x koncentrat; pH 7,2, innehåller 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratlösning; innehåller H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametylbenzidin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymstopplösning; innehåller 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Bipacksedel för QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Innehåller svavelsyra. Information om försiktighetsåtgärder finns på sidan 11.

Material som behövs men inte medföljer

- 37 °C-inkubator; CO₂ behövs inte
- Kalibrerade pipetter med variabel volym*
- Kalibrerad flerkanalpipett† med kapacitet för tillförsel av 50 µl och 100 µl med engångspetsar
- Skakapparat för mikroplattor†
- Avjoniserat eller destillerat vatten, 2 liter
- Tvätt för mikroplattor (automatisk tvätt rekommenderas)
- Läsare för mikroplattor† utrustad med 450 nm-filter och referensfilter för 620 nm till 650 nm
- Graderad cylinder (mätcylinder)
- Absorberande lågluddande handdukar

Förvaring och hantering

Blodprovtagningsrör

Förvara QFM-blodprovtagningsrör i 4 till 25 °C. QFM-blodprovtagningsrören ska ha en temperatur på 17–25 °C när de fylls med blod och vid blandning.

LyoSpheres

Förvara QFM LyoSpheres i 2 till 8 °C.

Reagenser i ELISA-kitet

Förvara ELISA-kitreagenserna i 2 till 8 °C.

Skydda alltid enzymsubstratlösning mot direkt solljus.

* Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

Rekonstituerade och oanvända ELISA-reagenser

Instruktioner om hur ELISA-reagenserna ska rekonstitueras finns i "Steg 2 – IFN- γ ELISA" på sidan 17.

- Den rekonstituerade kit-standarden kan förvaras i upp till 3 månader om den förvaras i 2 °C till 8 °C.

Notera datumet då kit-standarden rekonstituerades.

- Efter rekonstituering måste oanvänt konjugatkoncentrat (100 \times) återföras till förvaring i 2 °C till 8 °C och det måste användas inom 3 månader.

Notera datumet då konjugatet rekonstituerades.

- Arbetsutspädning av konjugat måste användas inom 6 timmar efter beredning (se tabell 1).
- Arbetsutspädning av tvättbuffert kan förvaras i rumstemperatur (22 \pm 5 °C) i upp till 2 veckor.

Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Varningar

- QFM är en analys som ger både en kvalitativ och en kvantitativ mätning av immunfunktionen. QFM-resultaten kan inte kvantifiera immunsupprimeringsnivån direkt.
- Resultaten av QFM-analysen ska användas tillsammans med klinisk presentation, medicinsk historik och andra kliniska indikatorer vid utvärdering av immunstatus för en patient.
- Tröskelvärdet för QFM-analysen kan variera beroende på individens immunsupprimeringsnivå och individuella omständigheter för transplantationen.

Försiktighetsåtgärder

Endast för in vitro-diagnostisk användning.



WARNING: Hantera humant blod och plasma som potentiellt smittsamt. Observera relevanta riktlinjer om hantering av blod och blodprodukter. Kassera prover och material som kommit i kontakt med blod eller blodprodukter enligt gällande nationella och lokala föreskrifter.

Följande information om risker och försiktighetsåtgärder gäller komponenter till QuantiFERON Monitor ELISA.

Information om risker



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(QuantiFERON-enzymstopplösning)

Innehåller: svavelsyra. Varning! Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan vara korrosivt för metaller. Irriterar huden. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(QuantiFERON-enzymsubstratlösning)

Varning! Orsakar lätt hudirritation. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.



QuantiFERON Green Diluent
(QuantiFERON grön diluent)

Innehåller: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Innehåller: tartrazin. Varning! Kan orsaka allergisk hudreaktion. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.



QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate
(QuantiFERON-tvättbuffertkoncentrat (20x))

Innehåller: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Undvik utsläpp till miljön.

Mer information

Säkerhetsdatablad: www.qiagen.com/safety

- Avvikelser från anvisningarna på *bipacksedeln* för *QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* kan leda till felaktiga resultat. Läs anvisningarna noga före användning.
- Viktigt: Kontrollera flaskorna före användning. Använd inte Conjugate-, IFN- γ Standard- eller QFM LyoSphere-flaskor som uppvisar tecken på skador eller om gummiförslutningen är trasig. Hantera inte trasiga flaskor. Vidta tillämpliga säkerhetsåtgärder för att kassera flaskor på ett säkert sätt. Rekommendation: Använd en flaskkorksavtagare för att öppna Conjugate-, IFN- γ Standard- eller QFM LyoSphere-flaskorna för att minska risken för skador från metallkorken.
- Använd inte ELISA-kitet om någon reagensflaska uppvisar tecken på skador eller läckage.
- Blanda eller använd inte remsor för mikroplattor, IFN- γ -standard, grön diluent eller konjugatkocentrat 100 \times från olika QFM ELISA-kitbatchar. Andra reagenser (tvättbuffertkoncentrat (20 \times), enzymsubstratlösning och enzymstopplösning) kan bytas ut mellan kiten förutsatt att reagenserna inte har passerat utgångsdatum och att lotuppgifterna är sparade.
- Kassera oanvända reagenser och biologiska prover i enlighet med lokala och nationella säkerhets- och miljöföreskrifter.
- Använd inte QFM-blodprovtagningsrören, QFM LyoSphere-pelletar eller ELISA efter utgångsdatumet.
- Säkerställ att laborieutrustning har kalibrerats/validerats för användning.

Provtagning och -hantering

QFM-analysen ska endast utföras med helblod som samlats in i antingen ett blodprovtagningsrör som innehåller litiumheparin eller direkt i ett QFM-blodprovtagningsrör. 1 ml helblod krävs för varje test. Blodprovtagningsrören måste vara ordentligt märkta och visa tiden för provtagningen.

Viktigt: Både stimuleringen av QFM-blodprover (dvs. tillsättandet av en QFM LyoSphere-pellet i en blodportion om 1 ml) och den efterföljande inkuberingen vid 37 °C måste ske inom 8 timmar från provtagningen.

Fram till inkuberingen ska blodproverna förvaras vid rumstemperatur (22 ± 5 °C).

För att få ett optimalt resultat ska följande procedurer tillämpas:

1. Märk rören ordentligt.

Se till att varje QFM-blodprovtagningsrör är ordentligt märkt med patientinformation och tiden för provtagningen.

2. Använd venpunktur och samla in 1 ml blod per individ direkt i varje QFM-blodprovtagningsrör. Proceduren ska utföras av utbildad provtagningspersonal.

Viktig anmärkning: Rören ska ha en temperatur på 17–25 °C när de fylls med blod.

QFM-blodprovtagningsrören kan användas på en höjd upp till 810 meter över havet.

Eftersom 1 ml-rör samlar in blod relativt långsamt ska röret hållas kvar mot nålen i 2–3 sekunder när röret verkar vara helt fyllt. På så sätt säkerställer du att rätt volym blod har samlats in.

Det svarta märket på sidan av QFM-blodprovtagningsröret indikerar volymen 1 ml. QFM-blodprovtagningsrör tillverkas för uppsamling av volymer på 1 ml ± 10 % och fungerar optimalt inom det intervallet. Om blodnivån ligger utanför intervallinjen ska ett nytt blodprov tas.

Om en fjärilsnål används för blodprovet bör ett s.k. spolrör användas för att säkerställa att slangen fylls med blod innan QFM-blodprovtagningsrören används.

Om QFM-blodprovtagningsrören används på högre höjd än 810 meter eller om mindre blodvolym erhålls kan användaren samla in blod med en spruta och sedan omedelbart överföra 1 ml blod till QFM-blodprovtagningsröret. Av säkerhetsskäl utförs detta lämpligast genom att ta bort sprutnålen (följ de vanliga säkerhetsprocedurerna), ta bort korken från QFM-blodprov-

tagningsröret och sedan tillsätta 1 ml blod (upp till mitten av det svarta märket på sidan av röret). Sätt tillbaka korken ordentligt och blanda enligt beskrivningen nedan.

Om du använder en tourniquet lossar du den så fort nålen är insatt i venen, detta för att undvika tryckvariationer som kan påverka blodvolymen.

Alternativt kan blod samlas in med ett generiskt blodprovtagningsrör som innehåller litiumheparin som antikoagulant, och sedan överförs till QFM-blodprovtagningsrör. Använd endast litiumheparin som blodantikoagulant eftersom andra antikoagulanter kan interferera med analysen. Fyll ett blodprovtagningsrör (minimivolyt 3 ml) och blanda försiktigt genom att vända röret flera gånger för att lösa upp heparinet. Förvara blodet vid rumstemperatur ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) fram till överföringen till QFM-blodprovtagningsrör för stimulering med en QFM LyoSphere-pellet. Se till att blodet är ordentligt blandat genom att vända rören försiktigt omedelbart innan fördelning. Dosera en blodportion om 1 ml i ett QFM-blodprovtagningsrör. Doseringen ska utföras aseptiskt (relevanta säkerhetsprocedurer måste följas) genom att ta bort korken från QFM-blodprovtagningsröret och tillsätta 1 ml blod (upp till det svarta märket på sidan av röret). Sätt tillbaka korkarna ordentligt och blanda enligt beskrivningen nedan.

3. Vänd försiktigt röret flera gånger omedelbart efter det att det fyllts, detta för att lösa upp heparinet.

Viktigt: För kraftig skakning av rören kan orsaka att gelen löses upp, vilket kan leda till avvikande resultat.

4. Precis före användning ska QFM LyoSphere-pelletar ekvibreras till rumstemperatur ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).
5. Tillsätt en QFM LyoSphere-pellet i 1 ml blod aseptiskt.

Ta bort korken från blodprovtagningsröret.

Knacka försiktigt QFM LyoSphere-flaskan mot en hård yta för att säkerställa att QFM LyoSphere-pelleten ligger i botten av flaskan. Ta bort korken på QFM LyoSphere-flaskan genom att först ta bort metallförslutningen och sedan gummiproppen.

Överför försiktigt QFM LyoSphere-pelleten till blodprovet om 1 ml genom att placera kanten på glasflaskan mot kanten på QFM-blodprovtagningsröret och sedan försiktigt vända på flaskan så att QFM LyoSphere-pelleten överförs till QFM-blodprovtagningsröret (se bild 1).

Viktigt: Om QFM LyoSphere-pelleten hamnar utanför QFM-blodprovtagningsröret kasserar du den och öppnar en ny QFM LyoSphere-flaska.

Viktigt: Låt inte QFM LyoSphere-flaskan stå öppen under en längre tid. QFM LyoSphere-pelleten ska tillsättas i blod så fort du tagit av korken från flaskan.

Om QFM LyoSphere-pelletar tillsätts i blod som har samlats in i QFM-blodprovtagningsröret ser du till att placera rätt rörkork på rätt prov.

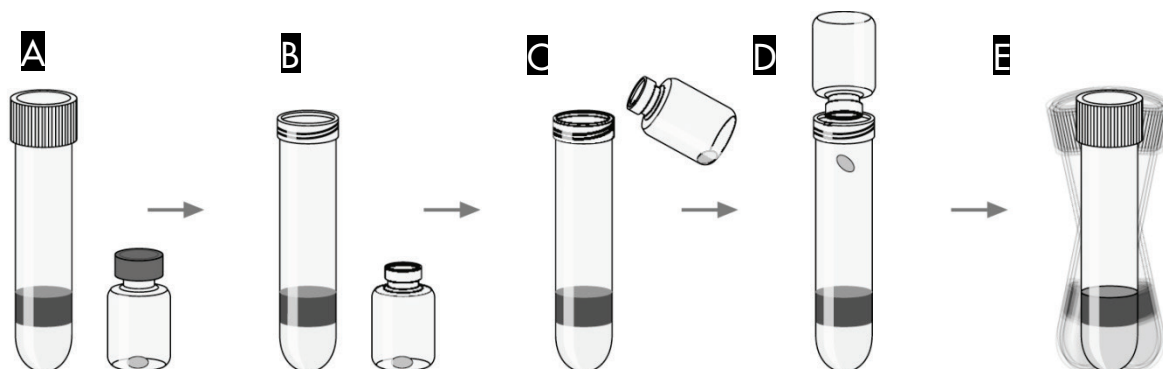


Bild 1. Tillsätta QFM LyoSphere-pellet. **A** QFM-blodprovtagningsrör och QFM LyoSphere-flaska. **B** Ta bort korken från QFM-blodprovtagningsröret och ta sedan bort metallförslutningen och gummiproppen från QFM LyoSphere-flaskan. **C** Tillsätt omedelbart QFM LyoSphere-pelleten till blodet genom att placera kanten på glasflaskan mot kanten på röret. **D** Överför LyoSphere-pelleten till röret genom att försiktigt vända flaskan upp och ned. **E** Sätt tillbaka korken på QFM-blodprovtagningsröret och skaka 5–10 gånger.

6. Sätt tillbaka korken på QFM-blodprovtagningsröret och skaka det 5–10 gånger, inte för kraftigt men tillräckligt mycket för att säkerställa att QFM LyoSphere-pelleten har lösts upp helt.

Om en QFM LyoSphere-pellet fastnar på insidan av röret kan den lösas upp genom att vända upp och ned på röret så att LyoSphere-pelleten täcks med blod.

Var noga med att sätta tillbaka korken på röret efter det att QFM LyoSphere-pelleten har tillsatts, detta för att förhindra att ytterligare en LyoSphere-pellet tillsätts i samma rör av misstag.

Obs: Eftersom QFM LyoSphere-pelleten är vit kommer den inte längre att synas i blodet när den har lösts upp.

Viktigt: För kraftig skakning av rören kan orsaka att gelen löses upp, vilket kan leda till avvikande resultat.

7. När QFM LyoSphere-pelleten har tillsatts och lösts upp ska QFM-blodprovtagningsrören flyttas till en 37 ± 1 °C-inkubator så snart som möjligt, och senast 8 timmar efter blodprovstagningen.

Anvisningar för användning

Steg 1 – inkubering av blod och insamling av plasma

Material som medföljer

- QFM-blodprovtagningsrör (se "Komponenter och förvaring" på sidan 6)

Material som behövs men inte medföljer

- Se "Material som behövs men inte medföljer", sidan 8

Procedur

1. Inkubera QFM-blodprovtagningsrör som innehåller blodportioner om 1 ml med QFM LyoSphere-pellet STÅENDE i 37 ± 1 °C i 16 till 24 timmar.

Obs: Inkubatorn behöver inte CO₂ eller fuktas.

Efter inkubering kan QFM-blodprovtagningsrören förvaras i mellan 4 °C och 27 °C i upp till 3 dagar innan centrifugering.

2. Efter inkubering ska QFM-blodprovtagningsrören centrifugeras i 15 minuter med 2 000 till 3 000 × *g* (RCF) för att underlätta insamling av plasma. Gelpluggen separerar cellerna från plasman. Om det inte sker ska rören centrifugeras om.

Plasma kan också samlas in utan centrifugering, men du måste då vara extra försiktig för att inte cellerna ska skadas när plasman avlägsnas.

3. Plasmaprover ska endast samlas in med pipett.

Viktigt: Efter centrifugering ska du undvika att pipettera upp och ned eller blanda plasman på något sätt innan insamling. Var alltid försiktig så att inte materialet på gelytan förstörs.

Plasmaprover kan laddas direkt från centrifugerade QFM-blodprovtagningsrör till QFM ELISA-plattan, även när automatiska ELISA-terminaler används.

Plasmaprover kan förvaras i upp till 28 dagar i 2 °C till 8 °C eller, om plasman har extraherats, även under längre tid vid förvaring i -20 °C. Portioner med insamlade plasmaprover måste förslutas innan förvaring.

Om plasmaprover samlas in behövs minst 150 µl plasma för att det ska gå att göra om testerna om behov uppstår.

Mängden IFN- γ i plasmaprover kan ofta ligga ovanför den övre gränsen för de flesta ELISA-läsare, även för personer som är måttligt immunsupprimerade. Vi rekommenderar att plasmaprover späds ut 1:10 och/eller 1:100 i grön

diluent, och analyseras i ELISA tillsammans med utspädd plasma (se Steg 2 – IFN- γ ELISA).

Steg 2 – IFN- γ ELISA

Material som medföljer

- Komponenter i QuantiFERON Monitor-kit med 2 plattor, ELISA (se "Komponenter och förvaring" på sidan 6)

Material som behövs men inte medföljer

- Se "Material som behövs men inte medföljer", sidan 8

Förberedning

IFN- γ i plasma kan ofta ligga ovanför den övre gränsen för de flesta ELISA-läsare, även för personer som är måttligt immunsupprimerade. Rekommendation: späd ut plasmaprover 1:10 och/eller 1:100 i grön diluent, och analysera i ELISA tillsammans med utspädd plasma.

I situationer där en patient kan vara kraftigt immunsupprimerad kan det räcka att förbereda och analysera endast ett utspätt plasmaprov för att erhålla ett kvantitativt resultat.

Obs: Provresultat som ligger inom intervallet för QFM ELISA (dvs. upp till 10 IU/ml) ska användas vid tolkning av resultatet. Den lägsta spädning som genererar ett resultat inom intervallet för QFM ELISA ska användas som rapporterat resultat (med hänsyn till spädningsfaktorn) om utspädd plasma hamnar ovanför intervallet för QFM ELISA.

Procedur

1. Alla plasmaprover och reagenser utom konjugatkoncentrat (100x) måste ha rumstemperatur (22 ± 5 °C) innan de används. Ekvilibrera i minst 60 minuter.
2. Ta bort remsor som inte används från ramen med mikropeltor. Lägg tillbaka dem i foliebehållaren, återförslut och förvara dem i kylskåp tills de behövs. Se till att det finns minst en remsa för QFM-standarder och tillräckligt många remsor för de individer som ska testas. Ramen och locket ska sparas efter användning och användas tillsammans med de oanvända remsorna.

3. Rekonstituera den lyofiliserade IFN- γ -standarden med den volym avjoniserat eller destillerat vatten som anges på etiketten till flaskan. Blanda försiktigt för att minimera skumbildning och få en fullständig solubilisering. Rekonstituering av standarden till den angivna volymen ger en lösning med en koncentration på 8,0 IU/ml.

Viktigt: Rekonstitutionsvolymen för IFN- γ -standarden varierar mellan olika batchar. Läs etiketten på standardflaskan för att försäkra dig om att du använder rätt volym avjoniserat eller destillerat vatten.

Använd den rekonstituerade kitstandarden för att skapa en 1 till 2-spädningsserie följt av en 1 till 4-spädningsserie med IFN- γ i grön diluent (GD) (se bild 2). S1 (standard 1) innehåller 4,0 IU/ml, S2 (standard 2) innehåller 1,0 IU/ml, S3 (standard 3) innehåller 0,25 IU/ml och S4 (standard 4) innehåller 0 IU/ml (bara GD). Standarderna måste analyseras som duplikat. Bered nya spädningar av kitstandarden för varje ELISA-procedur.

Rekommenderad procedur för duplikata standarder

- Märk 4 rör med "S1", "S2", "S3", "S4".
- Tillsätt 150 μ l GD i S1, S2, S3 och S4.
- Tillsätt 150 μ l kitstandard i S1 och blanda väl.
- Överför 50 μ l från S1 till S2 och blanda väl.
- Överför 50 μ l från S2 till S3 och blanda väl.
- Enbart grön diluent (GD) används som nollstandard (S4).

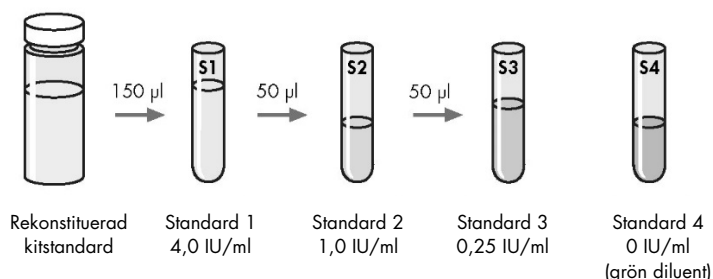


Bild 2. Beredning av standardkurva.

4. Rekonstituera lyofiliserat konjugatkoncentrat (100x) med 0,3 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda försiktigt för att minimera skumbildning och ge konjugatet en fullständig solubilisering.

Arbetsutspädning av konjugat bereds genom att erforderad mängd rekonstituerat konjugatkoncentrat (100x) späds i grön diluent (tabell 1. Beredning av konjugat). Oanvänt konjugatkoncentrat (100x) ska återföras till förvaring i 2 till 8 °C omedelbart efter användning. Använd endast grön diluent.

Tabell 1. Beredning av konjugat

Antal remsor	Volym konjugatkoncentrat (100x)	Volym grön diluent
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Plasmaprover som har samlats in från blodprovtagningsrör och som sedan har frusits in eller förvarats ska blandas noggrant innan de tillsätts i ELISA-brunnen.

Viktigt: Om plasmaprover tillsätts direkt från de centrifugerade QFM-rören ska all blandning av plasman undvikas. Var alltid försiktig så att inte materialet på gelytan förstörs.

6. Rekommendation: Späd plasmaprover 1:10.
- Tillsätt 90 µl grön diluent (GD) i ett rör märkt med patientinformation och "1:10".
 - Tillsätt sedan 10 µl blandade plasmaprover (se steg 5 för information om skillnaden mellan blandade plasmaprover och prover som tillsätts direkt från centrifugerade QFM-rör).
 - Blanda noggrant med en pipett för att minimera skumbildning.

7. Rekommendation: Späd 1:100-plasmaprover.
- Förbered en 1:10-spädning (se steg 6 ovan).
 - Tillsätt 90 µl grön diluent i ett rör märkt med patientinformation och "1:100".
 - Tillsätt 10 µl av 1:10-spädningen.
 - Blanda noggrant med en pipett för att minimera skumbildning.

Rekommendation: Testa följande prover parallellt, och i den ordning som anges:

- Outspädd, 1:10, 1:100

Följande patientprover stöds också av QFM-analysprogrammet:

- Outspädd
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Outspädd, 1:10

8. Tillsätt 50 µl nyberedd arbetsutspädning av konjugat i rätt ELISA-brunnar med hjälp av en flerkanalpipett.
9. Tillsätt 50 µl testplasmaprover i rätt brunnar med hjälp av en flerkanalpipett. Tillsätt sedan 50 µl vardera av standarderna 1 till 4. Analysera standarderna i duplikat.
10. Täck varje platta med lock och blanda konjugat- och plasmaprover/standarder noga med en skakapparat för mikroplattor under 1 minut. Undvik stänk.
11. Inkubera vid rumstemperatur (22 ± 5 °C) i 120 ± 5 minuter. Plattorna ska inte utsättas för direkt solljus under inkubering.

12. Under inkuberingen ska 1 del tvättbuffertkoncentrat (20x) spädas med 19 delar avjoniserat eller destillerat vatten och blandas väl. Tillräckligt med tvättbuffertkoncentrat (20x) medföljer för att bereda 2 l arbetsutspädning av tvättbuffert.

Tvätta brunnarna med 400 µl arbetsutspädning av tvättbuffert i minst 6 cykler i en tvätt för mikroplattor. En automatisk platttvättmaskin bör användas.

För att analysen ska bli korrekt måste brunnarna tvättas noggrant. Kontrollera att varje brunn är helt fylld med tvättbuffert under varje tvättcykel.

Rekommendation: Resultatet blir bäst om du låter brunnarna vara fyllda med tvättbuffert i minst 5 sekunder mellan varje cykel.

Tillsätt standarddesinfektionsmedel för laboratoriebruk i avloppsbehållaren. Följ fastställda rutiner för dekontaminering av potentiellt smittfarligt material.

13. Vänd plattorna med ovansidan nedåt på en absorberande lågluddande handduk för att avlägsna rester av tvättbuffert. Tillsätt 100 µl enzymsubstratlösning i varje brunn, täck varje platta med ett lock och blanda noga med en skakapparat för mikroplattor.

14. Inkubera vid rumstemperatur (22 ± 5 °C) i 30 minuter.

Plattorna ska inte utsättas för direkt solljus under inkubering.

15. Tillsätt 50 µl enzymstopplösning i varje brunn efter inkuberingen, och blanda noggrant i en skakapparat för mikroplattor.

Enzymstopplösning ska tillsättas i brunnarna i samma ordning och vid ungefär samma hastighet som när enzymsubstratlösningen tillsattes i steg 13.

16. Mät den optiska densiteten (OD) i en läsare för mikroplattor inom 5 minuter efter att reaktionen har stoppats. Läsaren ska ha ett 450 nm-filter och ett referensfilter på 620 till 650 nm. OD-värden används för att beräkna resultaten.

Beräkningar och tolkningar av testet

QuantiFERON Monitor-analysprogram används för att analysera rådata och beräkna resultaten. Det kan beställas från www.QuantiFERON.com. Kontrollera att den senaste versionen av QuantiFERON Monitor-analysprogrammet används.

Programmet gör en kvalitetsbedömning av analysen, genererar en standardkurva och ger ett testresultat för varje individ (läs mer i avsnittet *Tolkning av resultat*).

Om utspädd plasma hamnar ovanför den övre gränsen i intervallet (dvs. > 10 IU/ml) för QFM ELISA rapporterar QuantiFERON Monitor-analysprogrammet den lägsta spädning som genererar ett resultat inom intervallet för QFM ELISA, med hänsyn till spädningsfaktorn.

Istället för att använda QuantiFERON Monitor-analysprogram kan resultaten bestämmas enligt nedanstående metod.

Generering av standardkurva

(om QuantiFERON Monitor-analysprogram inte används)

Beräkna OD-medelvärdet för kitstandardreplikaten på varje platta.

Skapa en $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardkurva genom att rita ut $\log_{(e)}$ för OD-medelvärdet (y-axeln) mot $\log_{(e)}$ för IFN- γ -koncentrationen hos standarderna i IU/ml (x-axeln). Nollstandarden tas ej med i beräkningen. Beräkna standardkurvas trendlinje med regressionsanalys.

Använd standardkurvan för att bestämma IFN- γ -koncentrationen (IU/ml) för vart och ett av plasmaproverna i testet genom att använda OD-värdet för vart och ett av proverna.

Beräkningarna kan göras med hjälp av den programvara som är tillgänglig för läsare för mikropettor och vanliga kalkyl- och statistikprogram (t.ex. Microsoft® Excel®). Den här programvaran ska användas för att beräkna regressionsanalysen, variationskoefficienten (% CV) för standarderna och standardkurvas korrelationskoefficient (r).

Det rapporterade resultatet ska tas från den lägsta spädning som genererar ett resultat inom intervallet för QFM ELISA (med hänsyn till spädningsfaktorn) om utspädd plasma hamnar ovanför intervallet för QFM ELISA.

Kvalitetskontroll av testet

Hur exakt testresultatet blir beror på hur exakt standardkurvan är. Av den här anledningen måste de resultat som har beräknats från standarder utvärderas innan provresultaten från testet kan tolkas.

För att ELISA ska vara giltigt:

- Det genomsnittliga OD-värdet för standard 1 måste vara $\geq 0,600$.
- % CV för replikata OD-värden för standard 1 och standard 2 måste vara ≤ 15 %.
- Replikata OD-värden för standard 3 och standard 4 får inte variera mer än 0,040 OD-enheter från medelvärdet.
- Korrelationskoefficienten (r) som beräknas utifrån de genomsnittliga absorbansvärdena för standarderna måste vara $\geq 0,98$.

QuantiFERON Monitor-analysprogrammet beräknar och rapporterar dessa parametrar från kvalitetskontrollen.

Om körningen inte uppfyller de ovanstående kriterierna är den ogiltig och måste göras om.

Det genomsnittliga OD-värdet för nollstandarden (grön diluent) bör vara $\leq 0,150$. Om det genomsnittliga OD-värdet är $> 0,150$ bör plattrengöringsproceduren ses över.

Tolkning av resultat

QFM-resultat tolkas utifrån IFN- γ -responsen på immunstimulantia för medfött och förvärvat immunförsvar. QFM-analysen ger både en kvalitativ och en kvantitativ mätning av immunfunktionen. QFM-resultaten kan inte kvantifiera immun-supprimeringsnivån direkt.

Viktigt: När immunstatus fastställs för en individ ska den uppmätta IFN- γ -nivån användas tillsammans med klinisk presentation, medicinsk historik och andra diagnostiska utvärderingar (tabell 2). Tröskelvärdet för QFM-testet kan variera beroende på individens immunsupprimeringsnivå och individuella omständigheter för transplantationen.

Tabell 2. Tolkning av resultat

QFM-resultat IFN- γ (IU/ml)	Klassificering	Tolkning
< 15	Låg	Patienten har låg IFN- γ -respons på immunstimulantia för medfött och förvärvat immunförsvar
15–1 000	Medel	Patienten har medelgod IFN- γ -respons på immunstimulantia för medfött och förvärvat immunförsvar
> 1000	Hög	Patienten har hög IFN- γ -respons på immunstimulantia för medfött och förvärvat immunförsvar

Om den uppmätta IFN- γ -nivån för ett outspätt plasmaprov är mindre än 0,1 IU/ml:

- Kontrollera att QFM LyoSphere-pelleten har tillsatts i blodprovet och att röret inkuberats i enlighet med den här bipacksedeln.
- Kontrollera att IFN- γ -resultatet stämmer överens med patientens aktuella kliniska status.

Om det finns misstanke om tekniska problem i samband med provtagning eller hantering av blodprover ska hela QFM-testet göras om med ett nytt blodprov. Upprepa ELISA-testet för stimulerade plasmaprover ifall det finns misstankar om att det ursprungliga testet inte utförts i enlighet med den procedur som beskrivs i denna bipacksedel (se avsnittet Kvalitetskontroll av testet för detaljerad information).

Läkaren kan vilja upprepa ett test om resultatet inte överensstämmer med patientens aktuella kliniska status.

Begränsningar

Resultaten av QFM-testerna måste användas tillsammans med den enskilda patientens kliniska historik, aktuella medicinska status och andra diagnostiska bedömningar. Laboratorier kan välja att bestämma egna intervall för analysen.

Laboratorier kan också välja att köra ett externt kontrollprov som samlats in från en frisk individ parallellt med patientprover.

Ej tillförlitliga eller felaktiga resultat kan bero på:

- Fel blodantikoagulant – använd endast litiumheparin eftersom andra antikoagulanter kan interferera med analysen.
- Avvikelser från proceduren som beskrivs i denna bipacksedel.
- Onormalt höga nivåer cirkulerande IFN- γ eller förekomst av heterofila antikroppar.
- Det tog mer än 8 timmar från det att blodprovet togs tills det inkuberades vid 37 °C.
- Under- eller överfyllning av QFM-blodprovtagningsrören, utanför intervallet 0,9 till 1,1 ml.

Testets egenskaper

Kliniska studier

Två kliniska studier utfördes för att utvärdera responsen hos upplevt friska personer (n = 114) jämfört med transplantationsmottagare (n = 30). Av transplantationsmottagarna var 18 i kohorten patienter som genomfört transplantation nyligen (Early Post-Tx, inom 3 månader efter transplantation) och 12 i kohorten längre tid efter transplantation eller i den stabila kohorten (Late Post-Tx, > 12 månader efter transplantation).

- Prover samlades in vid upp till 5 olika tillfällen från varje individ i kohorten Early Post-Tx (3 månader efter transplantation, n = 64 prover).
- Prover samlades in 1 gång från varje individ i kohorten Late Post-Tx (längre tid efter transplantation, n = 12 prover).
- Prover samlades in 1 gång från varje individ i kohorten upplevt friska personer (n = 114).

Respons på QFM hamnade på mellan låg och medel för både Early Post-Tx-prover och Late Post-Tx-prover. Early Post-Tx hade en högre procentandel (93,8 %) respons inom det lägre intervallet och en lägre procentandel respons

(6,3 %) inom medelintervallet jämfört med respons från Late Post-Tx, med 25 % av responsen inom det lägre intervallet och 66,7 % i medelintervallet (tabell 3). För Early Post-Tx hamnade ingen respons inom intervallet för hög respons, medan endast 1 (8,3 %) respons från Late Post-Tx-proverna hamnade i intervallet för hög respons. QFM-responsen för kohorten med upplevt friska personer hamnade i huvudsak inom medelintervallet (83,3 %) och i intervallet för hög respons (15,8 %) (tabell 3).

Tabell 3. QFM-responsintervall för upplevt friska personer jämf med transplantationsmottagare

IFN- γ (IU/ml)	Resultat- kategori	Early Post-Tx %* 95 % CI n	Late Post-Tx %* 95 % CI n	Upplevt friska 95 % CI n	Totalt resultat
< 15	Låga	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	Medel	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	Höga	0,0 % 0–5,7 n = 0	8,3 % 1,5–35,4 n = 1	15,8 % 10,2–23,6 n = 18	19
Totalt antal prover		64	12	114	190

* Procentvärdena anger den andel av proverna inom varje donatorkohort som faller inom respektive responsintervall.

Förväntade värden

Distributionen av IFN- γ -responser på QFM hos Early Post-Tx (upp till 3 månader efter transplantation) fastställdes utifrån 64 prover insamlade från 18 transplantationsmottagare, med användning av QFM ELISA (bild 3).

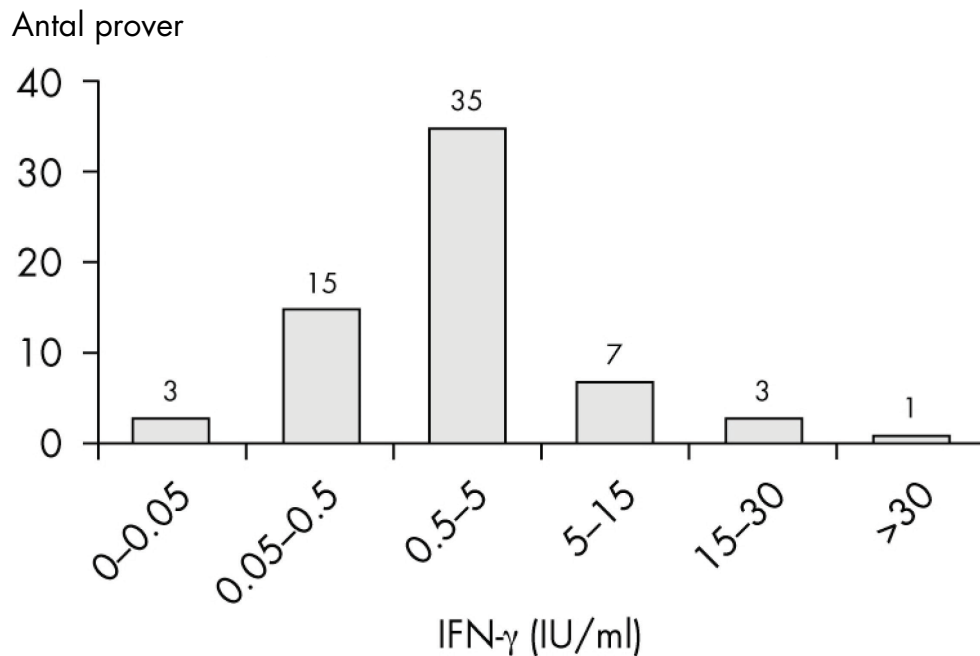


Bild 3. Distributionen av QFM IFN- γ -responser hos Early Post-Tx-patienter (n = 64; median = 1,5 IU/ml).

Distributionen av IFN- γ -responser på QFM hos Late Post-Tx (> 12 månader efter transplantation) fastställdes utifrån 12 prover, med användning av QFM ELISA (bild 4).

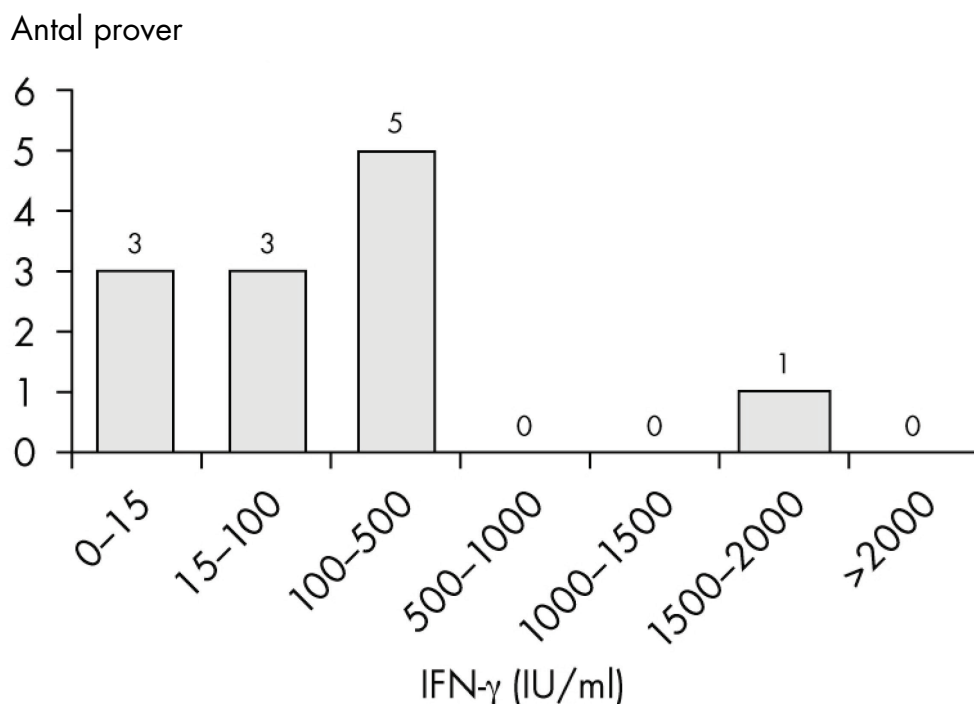


Bild 4. Distributionen av QFM IFN- γ -responser hos Late Post-Tx-patienter (n = 12; median = 98,8 IU/ml).

Distributionen av IFN- γ -responser på QuantiFERON Monitor hos upplevt friska personer fastställdes utifrån 114 prover, med användning av QFM ELISA (bild 5).

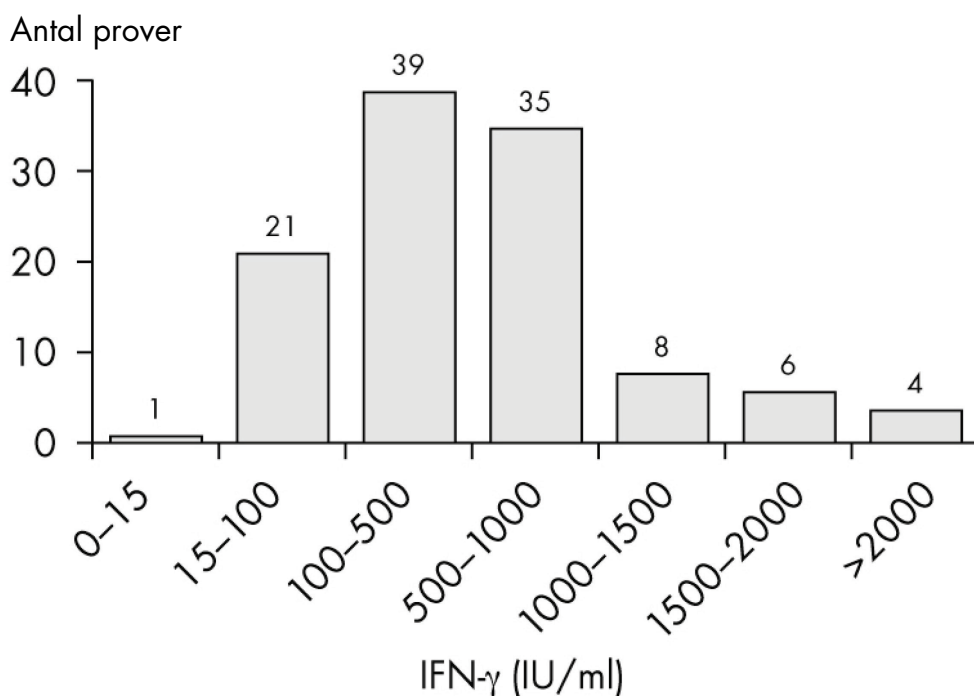


Bild 5. Distributionen av QFM IFN- γ -responser hos upplevt friska personer (n = 114; median = 400,5 IU/ml).

QFM-responser hos patienter med transplanterade fasta organ

QFM utvärderades i en observationsstudie, med en tvärsnittsstudie av patienter med transplanterade fasta organ (4). I studien ingick: 212 friska individer med en delgrupp om 30 ålders- och könsmatchade kontroller, 30 pre-transplantationspatienter, 18 Early Post-Tx-patienter (66 prover; mediantid efter transplantation = 21 dagar) och 11 Late Post-Tx-patienter (mediantid efter transplantation = 2 290 dagar). Genomsnittlig IFN- γ -produktion var 555,2 IU/ml för friska individer och 614,6 IU/ml för ålders- och könsmatchade kontroller. Genomsnittlig IFN- γ -produktion visade sig vara signifikant lägre hos både pre-transplantationspatienter (IFN- γ = 89,3 IU/ml) och Early Post-Tx-patienter (IFN- γ = 3,76 IU/ml) jämfört med ålders- och könsmatchade kontroller ($p < 0,001$). Återställande av immunfunktionen hos Late Post-Tx-patienter (genomsnittligt IFN- γ = 256,1 IU/ml) observerades och visade sig vara signifikant större än för Early Post-Tx-patienter ($p < 0,05$). Studien indikerar att QFM kan användas för att bedöma cellmedierad immunfunktion hos immunsupprimerade mottagare av transplanterade fasta organ.

Analyseffektens egenskaper

QFM ELISA har visat sig vara linjär vid placering av 5 replikat av 11 plasma-pooler av kända IFN- γ -koncentrationer slumpvis på ELISA-plattan. Den linjära regressionslinjen har en lutning på $1,002 \pm 0,011$ och en korrelationskoefficient på 0,99 (bild 6).

Detektionsgränsen för QFM ELISA är 0,065 IU/ml och det finns inga tecken på en hög hookeffekt (prozone) med koncentrationer på IFN- γ upp till 10 000 IU/ml.

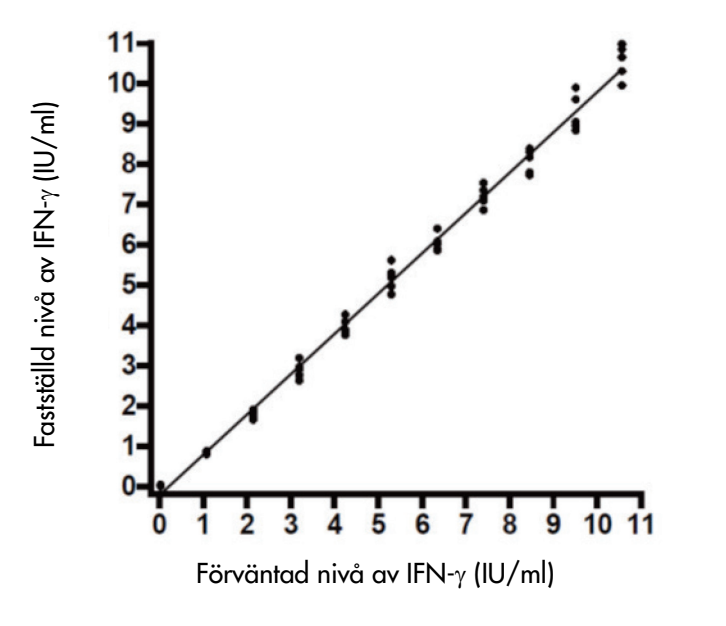


Bild 6. Linjäritetsprofil för QFM ELISA fastställd genom testning av 5 replikat av 11 plasmaprover med kända IFN- γ -koncentrationer.

Reproducerbarheten för QFM-analysen (steg 1) fastställdes med användning av blodprover från 20 friska individer. Tre olika operatörer, QFM LyoSphere-loter och uppsättningar av utrustning utvärderades. Den genomsnittliga variationskoefficienten för IFN- γ -responsnivåerna som fastställdes genom användning av QFM ELISA med alla tre QFM LyoSpheres-loter och alla de tre testade varianterna var 22,22 % (95 % CI: 17,20–27,25).

Reproducerbarheten för QFM-analysen (steg 1) bedömdes genom mätning av variationen för 5–6 upprepade QFM LyoSphere-blodstimuleringar per donator för 14 individer. Den genomsnittliga variationskoefficienten för de 14 testade individerna var 14,7 % (95 % CI: 10,2–19,2). % CV för enskilda individer var lägre än 30 %.

Reproducerbarheten för QFM ELISA (steg 2) uppskattades genom att testa 20 plasmaprover med varierande IFN- γ -koncentrationer i 3 exemplar,

i 3 laboratorier, under 3 dagar (ej i följd) av 3 operatörer. Varje prov har således testats 27 gånger i 9 oberoende analyskörningar. Ett prov var en Nil-kontroll och hade en beräknad IFN- γ koncentration på 0,08 IU/ml (95 % CI: 0,07–0,09). Av de återstående 19 plasmaproverna var intervallet för koncentrationerna 0,33 (95 % CI: 0,31–0,34) till 7,7 IU/ml (95 % CI: 7,48–7,92).

Variationer inom körning eller inom analys uppskattades genom att ta medelvärdet för % CV för varje testplasma innehållande IFN- γ från varje plattkörning (n = 9), och variationen låg mellan 4,1 och 9,1 % CV. Medelvärdet inom körning %CV (\pm 95 % CI) var $6,6 \pm 0,6$ %. Medelvärdet för noll IFN- γ -plasma var 14,1 % CV.

Variationer totalt eller mellan analyser bestämdes genom att jämföra de 27 beräknade koncentrationerna av IFN- γ för varje plasmaprov. Variationer mellan analyser låg mellan 6,6 och 12,3 % CV. Det generella medelvärdet % CV (\pm 95 % CI) var $8,7 \pm 0,7$ %. Noll IFN- γ -plasma visade 26,1 % CV. Den här variationsnivån är förväntad eftersom den beräknade koncentrationen av IFN- γ är låg och variationen vid en låg koncentration uppskattning är större än vid högre koncentrationer.

Teknisk information

Koagulerade plasmaprover

Om fibrin bildas under lågvarig lagring av plasmaprover ska proverna centrifugeras för att det koagulerade materialet ska sedimenteras och för att underlätta pipettering av plasman.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns också i den tekniska informationen på: www.QuantiFERON.com. Kontaktinformation finns på baksidan.

Felsökning av ELISA

Icke-specifik färgutveckling

Möjlig orsak	Lösning
a) Bristfällig rengöring av plattan	Tvätta plattan minst 6 gånger med 400 µl tvättbuffert per brunn. Det kan krävas fler än 6 tvättcykler beroende på vilken tvättmaskin som används. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
b) Korskontaminering av ELISA-brunnarna	Var försiktig när du pipetterar och blandar proverna för att minimera riskerna.
c) Kitets/komponenternas utgångsdatum har passerats	Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100x) används inom 3 månader efter rekonstituering.
d) Enzymsubstratlösningen är kontaminerad	Kassera substratet om det är blåfärgat. Kontrollera att reagenserna endast förvaras i rena behållare.
e) Blandning av plasma i QFM-rör före insamling	Efter centrifugering ska du undvika att pipettera upp och ned eller blanda plasman på något sätt innan insamling. Var alltid försiktig så att inte materialet på gelytan förstörs.

Låga avläsningar av optisk densitet i standarder

Möjlig orsak	Lösning
a) Spädningsfel i standard	Kontrollera att spädningsav kitstandarderna bereds enligt denna bipacksedel.
b) Pipetteringsfel	Kontrollera att pipetter kalibreras och används i enlighet med tillverkarens instruktioner.
c) För låg inkuberings-temperatur	Inkubering av ELISA ska utföras i rumstemperatur (17 till 27 °C).

Felsökning av ELISA

- | | |
|---|--|
| d) För kort inkuberingstid | Inkubera plattan med konjugat, standarder och prover i 120 ± 5 minuter. Inkubera enzym-substratlösningen på plattan i 30 minuter. |
| e) Ett felaktigt filter används i plattläsaren | Plattan ska läsas vid 450 nm med ett referensfilter på mellan 620 och 650 nm. |
| f) Reagenserna är för kalla | Alla reagenser, med undantag för konjugatkoncentrat (100x), måste ha antagit rumstemperatur innan analysen påbörjas. Detta tar ungefär en timme. |
| g) Kitets/komponenternas utgångsdatum har passerats | Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100x) används inom 3 månader efter rekonstituering. |

Högt bakgrundsvärde

Möjlig orsak

Lösning

- | | |
|---|---|
| a) Bristfällig rengöring av plattan | Tvätta plattan minst 6 gånger med 400 µl tvättbuffert per brunn. Det kan krävas fler än 6 tvättcykler beroende på vilken tvättmaskin som används. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel. |
| b) För hög inkuberings-temperatur | Inkubering av ELISA ska utföras i rumstemperatur (17 till 27 °C). |
| c) Kitets/komponenternas utgångsdatum har passerats | Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100x) används inom tre månader efter rekonstituering. |
| d) Enzymsubstratlösningen är kontaminerad | Kassera substratet om det är blåfärgat. Kontrollera att reagenserna endast förvaras i rena behållare. |

Felsökning av ELISA

Icke-linjär standardkurva och variabilitet mellan duplikat

Möjlig orsak	Lösning
a) Bristfällig rengöring av plattan	Tvätta plattan minst 6 gånger med 400 µl tvättbuffert per brunn. Det kan krävas fler än 6 tvättcykler beroende på vilken tvättmaskin som används. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
b) Spädningsfel i standard	Kontrollera att spädnings av standarden bereds enligt denna bipacksedel.
c) Bristfällig blandning	Blanda reagenserna noggrant genom vändning eller genom att vortexa försiktigt innan de appliceras på plattan.
d) Inkonsekvent pipetteringsteknik eller avbrott under pipetteringen vid beredningen av analysen	Prover och standard ska tillsättas i anslutning till varandra. Alla reagenser ska ha preparerats innan analysen påbörjas.

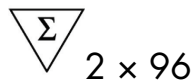
Produktinformation och tekniska guider kan erhållas kostnadsfritt från QIAGEN, din distributör eller genom att besöka www.QuantiFERON.com.

Referenser

En fullständig lista med QFM-referenser finns i referensbiblioteket för QuantiFERON hos Gnowee på adressen 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.

Symboler



Tillräckligt för 2 x 96xprovberedningar



Tillverkare



Symbol för CE-IVD-märkning



För in vitro-diagnostisk användning



Batchkod



Katalognummer



Utgångsdatum



Temperaturbegränsning



Se bruksanvisningen



Får ej återanvändas



Utsätt inte för direkt solljus



Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information, ring oss på 00800-22-44-6000, besök vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/contact eller kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Förkortad testprocedur

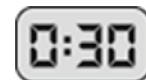
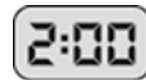
Steg 1 – blodinkubering

1. Samla in blod i antingen ett QFM-blodprovtagningsrör eller ett blodprovtagningsrör som innehåller litiumheparin. Märk rören med patientinformation och tiden för provtagningen, och transportera dem sedan till laboratorium vid rumstemperatur inom 8 timmar efter insamlingen.
 - a. Om blod samlats in i ett blodprovtagningsrör som innehåller litiumheparin ska en blodportion om 1 ml tillsättas i ett QFM-blodprovtagningsrör, och röret ska märkas med patientinformation och tiden för provtagningen.
2. Tillsätt 1 QFM LyoSphere-pellet i varje QFM-blodprovtagningsrör som innehåller 1 ml blod, lös upp LyoSphere-pelleten, och inkubera sedan rören så snart som möjligt (inom 8 timmar efter provtagningen) stående i 16–24 timmar vid 37 °C.
3. Efter inkubering ska rören centrifugeras i 15 minuter i 2 000 till 3 000 × g (RCF) för att plasman och de röda blodkropparna ska separeras.
4. Efter centrifugering ska du undvika att pipettera upp och ned eller blanda plasman på något sätt före insamling. Var alltid försiktig så att materialet i gelens yta inte skadas.



Steg 2 – IFN- γ ELISA

1. Ekvilibrera ELISA-komponenterna, med undantag för konjugatkoncentrat (100 \times), i rumstemperatur i minst 60 minuter.
2. Rekonstituera kitstandarderna till 8,0 IU/ml med destillerat eller avjoniserat vatten. Bered 4 standardspädningar.
3. Rekonstituera frystorkat konjugatkoncentrat (100 \times) med destillerat eller avjoniserat vatten.
4. Bered arbetsutspädning av konjugat i den gröna diluenten och tillsätt 50 μ l i alla brunnar.
5. Tillsätt 50 μ l av testplasmaproverna (outspädda, 1:10- och 1:100-spädningar efter vad som är lämpligt) och 50 μ l-standarder i rätt brunnar. Blanda med en skakapparat.
6. Inkubera i 120 \pm 5 minuter i rumstemperatur.
7. Tvätta brunnarna minst 6 gånger med 400 μ l tvättbuffert per brunn.
8. Tillsätt 100 μ l enzymsubstratlösning i brunnarna. Blanda med en skakapparat.
9. Inkubera i 30 minuter i rumstemperatur.
10. Tillsätt 50 μ l enzymstopplösning i brunnarna. Blanda med en skakapparat.
11. Läs av resultaten vid 450 nm med ett 620 till 650 nm referensfilter.
12. Analysera resultaten.



Anmärkningar

Betydande ändringar

Betydande ändringar i den här utgåvan av QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA-bipacksedeln sammanfattas i tabellen nedan:

Avsnitt	Sida	Ändring(ar)
Försiktighetsåtgärder	11	Ny GHS-information
Försiktighetsåtgärder	12	Säkerhetsanvisningar avseende flaskor med veckad kork har lagts till

Varumärken: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (QIAGEN-gruppen); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLyph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Avtal om begränsad licens för QuantiFERON Monitor Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kiten och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kiten godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser kiten och/eller någon av deras komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, med ensamrätt.

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

