

Kwiecień 2022 r.

QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 ELISA Kit — Instrukcja użycia



2 x 96

Wersja 1



Do diagnostyki in vitro

Do stosowania z probówkami QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 Blood
Collection Tubes



626420



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



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Niemcy



1124420PL

Zawartość

Przeznaczenie.....	5
Docelowi użytkownicy.....	6
Opis i zasada procedury.....	7
Podsumowanie i objaśnienie.....	7
Dostarczone materiały.....	9
Zawartość zestawu.....	9
Składniki zestawu.....	10
Platforma i oprogramowanie.....	10
Materiały wymagane, ale niedostarczone.....	11
Odczynniki dodatkowe.....	11
Wyposażenie.....	11
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	12
Informacje dotyczące bezpieczeństwa.....	12
Środki ostrożności.....	13
Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami.....	16
Stabilność w trakcie użytkowania.....	16
Zrekonstruowane i nieużyte odczynniki.....	16
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami.....	17
Procedura: Wykonywanie testu ELISA.....	18
Protokół: Test IFN- γ ELISA.....	18
Wyniki (Obliczenia).....	24
Generowanie krzywej wzorcowej i wartości próbki.....	24

Kontrola jakości testu	26
Interpretacja wyników	28
Ograniczenia	29
Parametry skuteczności oznaczenia	30
Skuteczność analityczna	30
Skuteczność kliniczna	39
Literatura	46
Rozwiązywanie problemów	51
Symbole	54
Informacje kontaktowe.....	55
Załącznik A: Informacje techniczne	56
Wyniki nieokreślone	56
Skrzepnięte próbki osocza	56
Lipemiczne próbki osocza	56
Załącznik B: Skrócony opis procedury testu ELISA.....	57
Dane do zamówienia	59
Historia zmian dokumentu	60

Przeznaczenie

Oznaczenie QuantiFERON SARS-CoV-2 to diagnostyczny test *in vitro* przeznaczony do jakościowego wykrywania interferonu γ (IFN- γ) wytwarzanego przez limfocyty T CD4+ i CD8+ w odpowiedzi na stymulację przez koktajl peptydowy wirusa SARS-CoV-2 w heparynizowanej krwi pełnej. Ilość wytwarzanego interferonu IFN- γ jest mierzona za pomocą oznaczenia immunoenzymatycznego ELISA.

Oznaczenie QuantiFERON SARS-CoV-2 jest przeznaczone do wspomaganie oceny odpornościowej odpowiedzi komórkowej (Cell-Mediated Immune response, CMI) występującej wśród osób, u których nie doszło do zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i które zostały zaszczepione przeciwko COVID-19 szczepionką skierowaną przeciwko białku kolca (S) wirusa SARS-CoV-2.

Oznaczenie QuantiFERON SARS-CoV-2 powinno być używane w połączeniu z innymi testami laboratoryjnymi i oceną stanu epidemiologicznego/klinicznego w celu określenia odpowiedzi odpornościowej pacjenta wywołanej szczepieniem przeciwko COVID-19.

Od wykonania szczepienia może minąć kilka dni, zanim dojdzie do rozwinięcia odpowiedzi odpornościowej limfocytów T. Czas, po którym dochodzi do odpowiedzi ze strony limfocytów T, nie został jeszcze dobrze poznany u osób zaszczepionych.

Wyniki niereaktywne nie wykluczają aktywnego zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie można za ich pomocą określać skuteczności szczepionek przeciwko COVID-19. Jeśli istnieje podejrzenie aktywnego zakażenia, należy je potwierdzić za pomocą innego molekularnego lub antygenowego testu pod kątem obecności wirusa SARS-CoV-2. Wyniki oznaczenia należy zawsze interpretować w połączeniu z wynikami oceny klinicznej, informacjami dotyczącymi historii medycznej pacjenta oraz wynikami innych badań.

Do diagnostyki *in vitro*.

Docelowi użytkownicy

Ten zestaw jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

Produkt może być obsługiwany wyłącznie przez odpowiednio poinstruowany personel przeszkolony w dziedzinie technik biologii molekularnej i zaznajomiony z tą technologią.

Opis i zasada procedury

Podsumowanie i objaśnienie

QuantIFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) to oznaczenie jakościowe, które wykorzystuje specjalne próbki do pobierania krwi zawierające antygeny peptydowe, stymulujące komórki układu odpornościowego za pomocą swoistych białek wirusa SARS-CoV-2. Inkubacja krwi w próbkach trwa od 16 do 24 godzin, po upływie których osocze jest zbierane, a następnie testowane na obecność IFN- γ wytwarzanego w odpowiedzi na antygeny peptydowe. Swoista odpowiedź komórek T na zakażenie wirusem SARS-CoV-2 została odnotowana wśród osób zaszczepionych różnymi typami szczepionek skierowanych przeciwko białku kolca [1–34].

W pierwszym etapie krew pełna jest pobierana do każdej z próbek QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube — do próbki Nil, próbki Ag1, próbki Ag2 oraz próbki Mitogen. Można również pobrać krew do jednej próbki do pobierania krwi zawierającej heparynę litową lub heparynę sodową jako antykoagulant, a następnie przenieść ją do próbek QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube.

Próbki QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube są wstrząsane w celu wymieszania antygeny z krwią, a następnie jak najszybciej powinny zostać poddane inkubacji w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania). Po upływie okresu inkubacji trwającego od 16 do 24 godzin próbki należy odwirować, osocze przetworzyć i zmierzyć stężenie IFN- γ (IU/ml) za pomocą testu ELISA. W teście QuantIFERON SARS-CoV-2 ELISA wykorzystywany jest wzorzec rekombinowanego ludzkiego IFN- γ , który oznaczono w odniesieniu do referencyjnego preparatu IFN- γ (nr ref. NIH: Gxg01-902-535). Wyniki próbek testowych są podawane w jednostkach międzynarodowych (International Unit, IU) na ml (IU/ml) w odniesieniu do krzywej wzorcowej przygotowanej poprzez przetestowanie rozcieńczeń wzorca dostarczonego razem z zestawem.

Znany jest zakłócający wpływ na testy immunologiczne przeciwciał heterofilnych (np. ludzkich przeciwciał anty-mysich), które występują w surowicy lub osoczu niektórych osób. Wpływ przeciwciał heterofilnych na test QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA można zminimalizować, dodając prawidłową surowicę mysia do zielonego rozcieńczalnika i wykorzystując fragmenty F(ab')₂ przeciwciała monoklonalnego jako przeciwciało wychwytyjące IFN γ , którymi opłaszczono są dołki mikroplastyki.

Próbka osocza z próbki Mitogen służy jako kontrola pozytywna IFN- γ dla wszystkich testowanych próbek. Probówka Nil służy do skorygowania wyników o wartość tła (np. uwzględnienie podwyższonych poziomów krążącego we krwi IFN- γ lub obecności przeciwciał heterofilnych). Poziom IFN- γ w próbce Nil odejmuje się od stężenia IFN- γ w próbkach Ag1, Ag2 i Mitogen.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

Składniki zestawu ELISA	Zestaw zawierający 2 płytki
Nr katalogowy	626420
Microplate strips (Paski mikroplótkowe) (12 x 8 dołków) opłaszczone mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko ludzkiemu IFN- γ	2 zestawy pasków mikroplótkowych (12 x 8 dołków)
IFN- γ Standard (Wzorzec IFN- γ), liofilizowany (zawiera rekombinowany ludzki IFN- γ , kazeinę bydlęcą, tiomersal w stężeniu masowo-objętościowym 0,01%)	1 x fiołka (8 IU/ml po rekonstytucji)
Green Diluent (Zielony rozcieńczalnik) (zawiera kazeinę bydlęcą, prawidłową surowicę mysia, tiomersal w stężeniu masowo-objętościowym 0,01%)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (100x stężony koncentrat koniugatu), liofilizowany (mysie przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu IFN- γ sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP), zawiera tiomersal w stężeniu 0,01%)	1 x 0,3 ml (po rekonstytucji)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x stężony koncentrat buforu płuczącego) (pH 7,2, zawiera ProClin® 300 o stężeniu objętościowym 0,05%)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztwór substratu enzymu) (zawiera H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' tetrametylobenzydynę)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Roztwór powstrzymujący działanie enzymu) (zawiera 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Zestaw <i>QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit</i> — <i>Instrukcja użycia</i>	1

* Zawiera kwas siarkowy

Składniki zestawu

Kontrole i kalibratory

W teście QFN SARS ELISA wykorzystywany jest wzorzec rekombinowanego ludzkiego IFN- γ , który oznaczono w odniesieniu do referencyjnego preparatu IFN- γ (nr ref. NIH: Gxg01-902-535).

Platforma i oprogramowanie

Oprogramowanie QFN SARS Analysis Software jest opcjonalne i może zostać użyte do analizy danych surowych i obliczania wyników. Można je pobrać ze strony **www.qiagen.com**.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Odczynniki dodatkowe

- Woda dejonizowana lub destylowana, 2 litry

Wyposażenie*

- Inkubator ustawiony na temperaturę $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (z kontrolą stężenia CO_2 lub bez takiej kontroli)
- Skalibrowane pipety o zmiennej objętości do podawania ilości wynoszącej od 10 μl do 1000 μl z jednorazowymi końcówkami
- Skalibrowane pipety wielokanałowe umożliwiające dozowanie objętości 50 μl i 100 μl , z jednorazowymi końcówkami
- Wytrząsarka do mikroplitek umożliwiająca wirowanie z prędkością od 500 do 1000 obr./min
- Płuczka mikroplitek (z przyczyn bezpieczeństwa zalecane jest używanie płuczki automatycznej podczas postępowania z próbkami osocza)
- Czytnik mikroplitek wyposażony w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm
- Wytrząsarka typu vortex o zmiennej prędkości
- Wirówka umożliwiająca wirowanie probówek do pobierania krwi przy co najmniej 3000 RCF (g)
- Cylinder miarowy o pojemności 1 lub 2 litrów
- Wieczko płytki
- Bezpyłowe ręczniki chłonne

* Przed użyciem upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Klienci na terenie Unii Europejskiej muszą pamiętać, że jest wymagane zgłaszanie poważnych incydentów, które wystąpiły w związku z wyrobem, producentowi oraz właściwemu organowi państwa członkowskiego, którego rezydentem jest użytkownik i/lub pacjent.


Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

- Wszystkie środki chemiczne i materiały biologiczne są potencjalnie niebezpieczne. Próbki są potencjalnie zakaźne i należy je traktować jako materiały stwarzające zagrożenie biologiczne.
- Pozostałości próbek i odczynników używanych do oznaczenia należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
- Próbki są potencjalnie zakaźne. Pozostałości próbek i odczynników używanych do oznaczenia należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
- Oznaczenie QFN SARS powinno być używane w połączeniu z innymi testami laboratoryjnymi i oceną stanu epidemiologicznego/klinicznego w celu określenia odpowiedzi odpornościowej pacjenta wywołanej szczepieniem przeciwko COVID-19.
- Niereaktywny wynik oznaczenia QFN SARS nie wyklucza możliwości zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie może służyć do określania skuteczności szczepionki przeciwko COVID-19. Wyniki fałszywie niereaktywne mogą być spowodowane nieprawidłowym postępowaniem z próbkami do pobierania krwi po nakłuciu żyły, nieprawidłowym działaniem oznaczenia lub innymi odrębnymi zmiennymi immunologicznymi, także tymi związanymi z wszelkimi chorobami współistniejącymi. Obecność przeciwciał heterofilnych lub nieswoista produkcja IFN- γ spowodowane innymi stanami zapalnymi mogą maskować swoiste odpowiedzi na peptydy wirusa SARS-CoV-2.

- Reaktywny wynik oznaczenia QFN SARS nie powinien stanowić jedynej podstawy ani być rozstrzygający podczas oceny skuteczności szczepionki przeciw COVID-19. Nieprawidłowe działanie oznaczenia może powodować uzyskanie fałszywie reaktywnych wyników testu QFN SARS.
- Fałszywie reaktywny wynik testu QFN SARS może być spowodowany nieprawidłowym pobieraniem próbki krwi lub nieprawidłowym postępowaniem z próbką. Nieprawidłowości te mają wpływ na funkcjonowanie limfocytów. Informacje na temat prawidłowego postępowania z próbkami krwi można znaleźć w sekcji „Procedura: Wykonywanie testu ELISA” na stronie 18. Opóźnienie w inkubacji może spowodować fałszywie niereaktywne lub nieokreślone wyniki, a inne parametry techniczne mogą wpływać na zdolność do wykrycia istotnej odpowiedzi IFN- γ .
- Słaba reakcja na mitogen (<0,5 IU/ml) wskazuje na wynik nieokreślony, w przypadku gdy próbka krwi była także niereaktywna względem białka wirusa SARS CoV-2. Taka sytuacja może wystąpić w przypadku niewystarczającej liczby limfocytów, zmniejszonej aktywności limfocytów spowodowanej nieprawidłowym postępowaniem z próbką, nieprawidłowego napełnienia/mieszania zawartości próbki Mitogen lub niezdolności do produkcji IFN- γ przez limfocyty pacjenta. Przy obecności przeciwciał heterofilnych lub wewnętrznego wydzielania IFN- γ w próbce Nil mogą wystąpić podwyższone poziomy IFN- γ .

Środki ostrożności

<p>PRZESTROGA</p> 	<p>Ludzką krew należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny.</p> <p>Należy przestrzegać odpowiednich wytycznych dotyczących postępowania z krwią. Próbki i materiały, które wejdą w kontakt z krwią lub produktami krwiopochodnymi, należy utylizować zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.</p>
--	---

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Zawiera: kwas siarkowy. Ostrzeżenie! Może powodować korozję metali. Działa drażniąco na skórę. Powoduje poważne podrażnienie oczu. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Ostrzeżenie! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

QuantiFERON Green Diluent



Zawiera: tartrazynę. Ostrzeżenie! Może powodować reakcję alergiczną skóry. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. Unikać uwalniania do środowiska.

Dodatkowe informacje

Karty charakterystyki: www.qiagen.com/safety

- Tiomersal jest wykorzystywany jako środek konserwujący w niektórych odczynnikach QFN SARS. Może okazać się toksyczny w przypadku spożycia, wdychania lub kontaktu ze skórą.
- Odstępstwa od procedur opisanych w dokumencie *QuantiFERON ELISA Kit — Instrukcja użycia* mogą prowadzić do błędnych wyników. Przed użyciem należy dokładnie przeczytać instrukcję.
- Nie korzystać z zestawu, jeśli przed użyciem którakolwiek z butelek z odczynnikami nosi ślady uszkodzeń lub wycieka z niej płyn.
- **Ważne:** Przed użyciem sprawdzić fiolki. Nie używać fiolek zawierających koniugat lub wzorzec IFN- γ , jeśli widoczne są oznaki uszkodzenia lub jeśli doszło do naruszenia gumowej plombki. Nie używać pękniętych fiolek. Aby w bezpieczny sposób zutylizować fiolki, należy postępować zgodnie z odpowiednimi środkami ostrożności. Przy otwieraniu fiolek z koniugatem lub wzorcem IFN- γ zalecane jest używanie narzędzia do zdejmowania kapsli, aby ograniczyć do minimum ryzyko urazu spowodowanego przez metalowy kapsel.

-
- Nie łączyć i nie używać pasków mikroplótkowych, wzorca IFN- γ , zielonego rozcieńczalnika lub 100x stężonego koncentratu koniugatu z różnych partii zestawów QFN SARS. Inne odczynniki (20x stężony koncentrat buforu płuczającego, roztwór substratu enzymu i roztwór powstrzymujący działanie enzymu) można wymieniać między zestawami pod warunkiem, że nie upłynęła data ważności odczynników i zarejestrowane są szczegóły serii.
 - Niezużyte odczynniki i próbki biologiczne należy zutylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi i krajowymi przepisami.
 - Nie używać zestawu QFN SARS ELISA po upływie wskazanej daty ważności.
 - Zawsze należy przestrzegać odpowiednich procedur laboratoryjnych.
 - Upewnić się, że wyposażenie laboratoryjne, takie jak płuczki do płytek i czytniki, zostało skalibrowane/zatwierdzone do użycia.

Przechowywanie i obchodzenie się z odczynnikami

Należy zwrócić uwagę na daty ważności oraz informacje o warunkach przechowywania wydrukowane na opakowaniu i etykietach wszystkich składników. Nie należy używać składników z przekroczoną datą ważności ani niewłaściwie przechowywanych.

Stabilność w trakcie użytkowania

- Należy przechowywać zestaw ELISA w temperaturze 2–8°C.
- Należy zawsze chronić roztwór substratu enzymu przed bezpośrednim światłem słonecznym.

Zrekonstruowane i nieużyte odczynniki

- Instrukcje na temat rekonstruowania odczynników znajdują się w sekcji „Procedura: Wykonywanie testu ELISA” na stronie 18.
- Zrekonstruowany wzorzec dołączony do zestawu można przechowywać przez okres maksymalnie 3 miesięcy w przypadku przechowywania w temperaturze 2–8°C. Należy zapisać datę rekonstrukcji wzorca dołączonego do zestawu.
- Zrekonstruowany 100x stężony koncentrat koniugatu należy przechowywać w temperaturze 2–8°C i zużyć w ciągu 3 miesięcy. Należy zapisać datę rekonstrukcji koniugatu.
- Koniugat w stężeniu roboczym należy zużyć w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
- Bufor płuczący w stężeniu roboczym można przechowywać w temperaturze pokojowej przez okres maks. 2 tygodni.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Szczegółowe informacje na temat procedury pobierania krwi pod kątem testu QFN SARS znajdują się w dokumencie *QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes — Instrukcja użycia (1124422)*.

Procedura: Wykonywanie testu ELISA

Protokół: Test IFN- γ ELISA

Ważne uwagi

- Informacje na temat materiałów wymaganych do przeprowadzenia testu ELISA zostały zamieszczone w sekcji Zawartość zestawu na stronie 9 oraz w sekcji Materiały wymagane, ale niedostarczone na stronie 11.

Przygotowanie (Czas wymagany do przeprowadzenia oznaczenia)

Operatorzy muszą wykonać określone zadania w ustalonym czasie, aby uzyskać ważne wyniki oznaczenia QFN SARS. Zalecane jest staranne zaplanowanie każdego etapu oznaczenia przed jego użyciem, w celu zapewnienia wystarczającej ilości czasu na przeprowadzenie każdego etapu. Szacunkowy wymagany czas został przedstawiony poniżej. Przedstawiono także czas testowania wielu próbek podzielonych na partie.

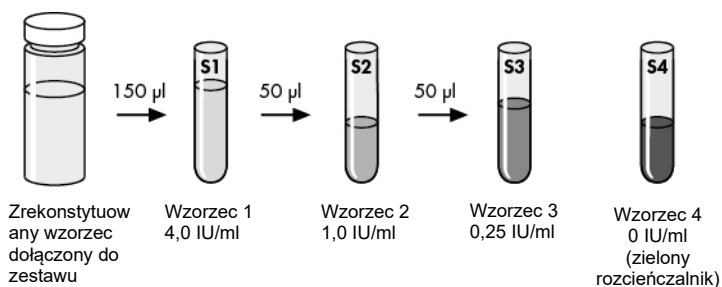
- Około 3 godziny na jedną płytkę do testu ELISA
- <1 godzina pracy
- Dodatkowy czas od 10 do 15 minut na każdą dodatkową płytkę

Procedura

1. Przed użyciem wszystkie próbki osocza i odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Odczekać przynajmniej 60 minut w celu doprowadzenia próbek do temperatury pokojowej.
2. Wyjąć z ramki zbędne paski płytki do testu ELISA, zamknąć w torebce foliowej i włożyć do lodówki w celu przechowywania ich do momentu, gdy ponownie będą potrzebne.

3. Pozostawić co najmniej jeden pasek na potrzeby wzorca QFN SARS oraz odpowiednią liczbę pasków, w zależności od liczby pacjentów biorących udział w testach (patrz zalecany układ płytki na Ryc. 2). Po użyciu należy zachować ramkę i pokrywę do ponownego użycia z pozostałymi paskami.
- 3a. Zrekonstruować wzorec IFN- γ , dodając objętość wody dejonizowanej lub destylowanej określoną na etykiecie fiołki. Delikatnie wymieszać zawartość fiołki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie zawartości. Zrekonstruowanie wzorca IFN- γ odpowiednią objętością spowoduje otrzymanie roztworu w stężeniu 8,0 IU/ml.
- 3b. Korzystając ze zrekonstruowanego wzorca, przygotować seryjny szereg rozcieńczeń o czterech stężeniach IFN- γ (patrz Ryc. 1).
- 3c. Krzywą wzorcową należy wyznaczyć z poniższymi stężeniami IFN- γ :
- S1 (wzorec 1) w stężeniu 4,0 IU/ml
 - S2 (wzorec 2) w stężeniu 1,0 IU/ml
 - S3 (wzorec 3) w stężeniu 0,25 IU/ml
 - S4 (wzorec 4) w stężeniu 0 IU/ml (sam zielony rozcieńczalnik [Green Diluent, GD]).
- 3d. Wzorce trzeba poddawać oznaczeniu przynajmniej w jednym powtórzeniu.
- 3e. Dla każdej sesji testu ELISA należy przygotowywać świeże rozcieńczenia wzorca dołączonego do zestawu.

Procedura	
A	Oznaczyć 4 próbki: S1, S2, S3, S4
B	Dodać po 150 μ l GD do próbek S1, S2, S3, S4
C	Dodać 150 μ l wzorca zestawu do próbki S1 i dokładnie wymieszać
D	Przenieść 50 μ l roztworu z próbki S1 do próbki S2 i dokładnie wymieszać
E	Przenieść 50 μ l roztworu z próbki S2 do próbki S3 i dokładnie wymieszać
F	Sam GD służy jako wzorec zerowy (S4)



Ryc. 1. Przygotowanie seryjnego szeregu rozcieńczeń do krzywej wzorcowej.

4. Zrekonstruować liofilizowany 100x stężony koncentrat koniugatu za pomocą 0,3 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Delikatnie wymieszać zawartość folki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie zawartości.
 - 4a. Koniugat w stężeniu roboczym jest uzyskiwany poprzez rozcieńczenie wymaganej ilości zrekonstruowanego 100x stężonego koncentratu koniugatu w zielonym rozcieńczalniku (Tabela 1).
 - 4b. Koniugat w stężeniu roboczym powinien zostać zużyty w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
 - 4c. Niezużyty 100x stężony koncentrat koniugatu należy przenieść do temperatury 2–8°C niezwłocznie po użyciu.

Tabela 1. Przygotowywanie koniugatu (w stężeniu roboczym)

Liczba pasków	Objętość koniugatu (koncentrat 100x)	Objętość zielonego rozcieńczalnika
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. W przypadku próbek osocza zebranych z probówek do pobierania krwi, a następnie przechowywanych (w chłodziarce lub zamrażarce) przed przeprowadzeniem testu należy je dokładnie wymieszać przed dodaniem do dołków płytki do testu ELISA. Próbkę osocza można przechowywać w poddanych wirowaniu probówkach QFN SARS Blood Collection Tube przez maksymalnie 28 dni w temperaturze 2–8°C. Zebrane próbki osocza można przechowywać przez maksymalnie 28 dni w temperaturze 2–8°C; zebrane próbki osocza można również przechowywać w temperaturze poniżej –20°C (najlepiej niższej niż –70°C) przez maksymalnie 24 miesiące.

Próbki osocza można załadować/wykorzystać bezpośrednio z probówek z odwirowaną krwią do pomiaru na płycie do testu QFN SARS ELISA.

Ważne: W przypadku przenoszenia próbek osocza bezpośrednio z odwirowanych probówek QFN SARS Blood Collection Tube należy unikać mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.

6. Dodać po 50 µl świeżo przygotowanego koniugatu w stężeniu roboczym do każdego dołka płytki do testu ELISA.
7. Za pomocą pipety wielokanałowej dodać 50 µl testowych próbek osocza do odpowiednich dołków (patrz zalecany układ płytki do testu ELISA na Ryc. 2).
8. Na końcu dodać 50 µl mieszanin wzorców od 1 do 4 do odpowiednich dołków płytki (patrz zalecany układ płytki do testu ELISA na Ryc. 2). Wzorce należy oznaczyć w przynajmniej dwóch powtórzeniach.

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

Ryc. 2. Zalecany układ płytki do testu ELISA. S1 (wzorzec 1), S2 (wzorzec 2), S3 (wzorzec 3), S4 (wzorzec 4). 1N (próbka 1. osocza kontrolnego Nil), 1 Ag1 (próbka 1. osocza dla Ag1), 1 Ag2 (próbka 1. osocza dla Ag2), 1M (próbka 1. osocza Mitogen).

9. Przykryć płytkę do testu ELISA i dokładnie mieszać roztwór koniugatu z próbkami osocza/wzorcami na wytrząsarce do mikropłytek przez 1 minutę przy od 500 do 1000 obr./min. Unikać rozbryzgiwania.
10. Przykryć płytkę do testu ELISA i inkubować w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) przez 120 ± 5 minut. Podczas inkubacji nie należy narażać płytki do testu ELISA na bezpośrednie działanie światła słonecznego. Stosowanie temperatur wykraczających poza określony zakres może spowodować otrzymanie nieprawidłowych wyników.

11. Podczas inkubacji płytki do testu ELISA należy przygotować bufor płuczący w stężeniu roboczym. Rozcieńczyć jedną objętość 20x stężonego buforu płuczącego, dodając 19 objętości dejonizowanej lub destylowanej wody, a następnie dokładnie wymieszać. Dostarczona objętość 20x stężonego koncentratu buforu płuczącego wystarcza do przygotowania 2 litrów buforu płuczącego w stężeniu roboczym.
12. Po zakończeniu inkubacji płytki do testu ELISA umyć dołki płytki do testu ELISA, wykorzystując 400 µl buforu płuczącego w stężeniu roboczym. Etap płukania przeprowadzać przynajmniej sześciokrotnie. Z przyczyn bezpieczeństwa zalecane jest używanie płuczki automatycznej podczas postępowania z próbkami osocza. Dokładne przepłukanie ma bardzo duży wpływ na skuteczność oznaczenia. Podczas każdego cyklu przemywania wszystkie dołki powinny być całkowicie wypełnione buforem płuczącym. Między cyklami zalecane jest pozostawienie roztworu w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund.
Do zbiornika na ścieki należy dodać standardowy laboratoryjny środek dezynfekujący. Należy przestrzegać obowiązujących procedur w zakresie odkażania potencjalnie zakaźnego materiału.
13. Położyć płytkę do testu ELISA skierowaną górną częścią w dół na chłonnym ręczniku (bezpylowym), aby usunąć resztki buforu płuczącego. Dodać po 100 µl roztworu substratu enzymu do każdego dołka płytki, przykryć płytkę pokrywką i dokładnie mieszać na wytrząsarce do mikroplatek przez 1 minutę przy od 500 do 1000 obr./min.
14. Przykryć płytkę do testu ELISA i inkubować ją w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) przez 30 minut. Podczas inkubacji nie należy narażać płytki do testu ELISA na bezpośrednie działanie światła słonecznego.
15. Po 30-minutowej inkubacji dodać po 50 µl roztworu powstrzymującego działanie enzymu do każdego dołka płytki, w takiej samej kolejności, w jakiej dodawano substrat, a następnie dokładnie wymieszać na wytrząsarce do mikroplatek przy 500 do 1000 obr./min.
16. W ciągu 5 minut od zatrzymania reakcji zmierzyć gęstość optyczną (Optical Density, OD) roztworu w dołkach płytki do testu ELISA, używając czytnika mikroplatek wyposażonego w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm. Wartości OD są używane do obliczenia wyników.

Wyniki (Obliczenia)

Do analizy danych surowych i obliczania wyników można użyć oprogramowania QFN SARS Analysis Software. Jest ono dostępne pod adresem **www.qiagen.com**. Należy upewnić się, że używana jest najnowsza wersja oprogramowania QFN SARS Analysis Software.

Oprogramowanie wykonuje kontrolę jakości oznaczenia, tworzy krzywą wzorcową oraz podaje wynik testu dla każdego pacjenta, co opisano w sekcji „Interpretacja wyników” na stronie 28. Oprogramowanie oznacza wszystkie stężenia większe niż 10 IU/ml jako „>10”, gdyż takie wartości przekraczają zwalidowany zakres liniowy testu ELISA.

Zamiast korzystania z oprogramowania QFN SARS Analysis Software wyniki można również uzyskać następującą metodą.

Generowanie krzywej wzorcowej i wartości próbki

Jeśli nie jest używane oprogramowanie QFN SARS Analysis Software

Określenie krzywej wzorcowej i wartości IU/ml próbki wymaga programu obsługującego arkusze kalkulacyjne, np. Microsoft® Excel®, jeśli nie jest używane oprogramowanie QFN SARS Analysis Software.

Wykorzystanie programu obsługującego arkusze kalkulacyjne

1. Określić średnie wartości OD dla powtórzeń wzorca dołączonego do zestawu znajdujących się na każdej płytce.
2. Wyznaczyć krzywą wzorcową $\log_{(e)}-\log_{(e)}$, wykreślając $\log_{(e)}$ ze średniej wartości gęstości optycznej (Optical Density, OD) (oś y) względem $\log_{(e)}$ ze stężenia wzorców IFN- γ wyrażonego w IU/ml (oś x), pomijając w tych obliczeniach wzorzec zerowy. Obliczyć linię najlepszego dopasowania dla krzywej wzorcowej, wykonując analizę regresji.

3. Na podstawie krzywej wzorcowej określić stężenie IFN- γ (IU/ml) dla każdej badanej próbki osocza, korzystając z wartości OD każdej z próbek.
4. Obliczenia te można wykonać za pomocą pakietów oprogramowania dostępnych z czytnikami do mikroplitek oraz standardowych arkuszy kalkulacyjnych lub oprogramowania statystycznego (np. Microsoft Excel). Zaleca się korzystanie z tych pakietów do wyznaczenia parametrów analizy regresji, współczynnika zmienności (Coefficient of Variation, %CV) dla wzorców oraz współczynnika korelacji (r) krzywej wzorcowej.

Wyliczenia dla próbki

Jeśli dla wzorców zostały uzyskane poniższe pomiary wartości OD, wyliczenia z wykorzystaniem $-\log(e)$ – powinny być zgodne z tymi przedstawionymi w Tabeli 2.

Tabela 2. Krzywa wzorcowa

Wzorzec	IU/ml	Wartości OD — a i b	Średnia wartość OD	Współczynnik zmienności wyrażony w %	Log _(e) IU/ml	Średnia wartość log _(e) (Optical Density, OD)
Wzorzec 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Wzorzec 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Wzorzec 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	ND.	-1,386	-2,079
Wzorzec 4	0	0,034, 0,037	0,036	ND.	ND.	ND.

Równanie krzywej wynosi $y = 0,7885(X) - 0,9837$, gdzie „m” = 0,7885, a „c” = -0,9837. Wartości te są stosowane w równaniu $X = (Y - c)/m$, aby obliczyć wartość X. Na podstawie krzywej wzorcowej obliczony współczynnik korelacji (r) = 1,000. **ND.**: Nie dotyczy.

Ważność oznaczenia jest określana na podstawie kryteriów opisanych w sekcji „Kontrola jakości testu” na stronie 26.

Krzywa wzorcowa (Tabela 2) jest wykorzystywana do przeliczania wartości OD odpowiedzi na antygeny na jednostki międzynarodowe (International Unit, IU/ml).

Tabela 3. Wyliczenia dla próbek

Antygen	Wartość OD	Wartość OD $\log_{(e)}$	X	e^x (IU/ml)	Antygen — wynik dla próbki Nil (IU/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	–
Ag1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,15
Ag2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Wartości IFN- γ (w IU/ml) dla próbek Ag1, Ag2 i Mitogen są skorygowane pod kątem interferencji tła poprzez odjęcie wartości w IU/ml uzyskanej dla odpowiedniej próbki kontrolnej Nil. Do interpretacji wyników testu stosowane są te skorygowane wartości.

Kontrola jakości testu

Dokładność wyników testu zależy od utworzenia dokładnej krzywej wzorcowej. W związku z tym przed interpretacją wyników próbek badanych należy sprawdzić wyniki otrzymane dla próbek wzorcowych.

Aby test ELISA był ważny:

- Średnia wartość OD wzorca 1 musi być $\geq 0,600$.
- %CV wartości uzyskanych dla powtórzeń wzorca 1 i 2 musi być $\leq 15\%$.
- Wartości OD uzyskane dla powtórzeń wzorca 3 i 4 nie mogą różnić się od ich średniej o więcej niż 0,040 jednostki gęstości optycznej.
- Współczynnik korelacji (r) obliczony na podstawie średnich wartości absorbancji wzorców musi być $\geq 0,98$.
- Jeśli nie są spełnione powyższe kryteria, test nie jest ważny i należy go powtórzyć.

-
- Średnia wartość OD dla wzorca zerowego (zielony rozcieńczalnik) powinna być $\leq 0,150$. Jeśli średnia wartość OD jest $>0,150$, należy sprawdzić, czy procedura płukania płytki została wykonana poprawnie.

Oprogramowanie QFN SARS Analysis Software oblicza i raportuje te parametry kontroli jakości.

Rodzaje materiałów kontrolnych i częstotliwość ich badania powinny być ustalone dla każdego laboratorium zgodnie z wymaganiami lokalnych, regionalnych, krajowych lub innych odpowiednich jednostek akredytujących. Należy rozważyć wprowadzenie zewnętrznych ocen jakościowych i alternatywnych procedur walidacji.

Uwaga: Próbkę osocza z dodatkiem rekombinowanego IFN- γ wykazały obniżenie stężenia nawet o 50% w przypadku przechowywania zarówno w temperaturze 2–8°C, jak i –20°C. Rekombinowany IFN- γ nie jest zalecany do określania wzorców kontrolnych w przypadku próbek osocza.

Interpretacja wyników

Wyniki testu QFN SARS są interpretowane z wykorzystaniem następujących kryteriów (Tabela 4).

Ważne: Oznaczenie QFN SARS powinno być używane w połączeniu z innymi testami laboratoryjnymi i oceną stanu epidemiologicznego/klinicznego w celu określenia odpowiedzi odpornościowej pacjenta wywołanej szczepieniem przeciwko COVID-19.

Tabela 4. Interpretacja wyników testu QFN SARS

Wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki z antygenami Ag1 minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki z antygenami Ag2 minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki Mitogen minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)*	Wynik testu QFN SARS	Raport/interpretacja
≤8,0	≥0,15 i ≥25% próbki Nil	Dowolny	Dowolny	Reaktywny	Wykryto odpowiedź względem wirusa SARS-CoV-2
	Dowolny	≥0,15 i ≥25% próbki Nil			
	<0,15 lub ≥0,15 i <25% próbki Nil	<0,15 lub ≥0,15 i <25% próbki Nil	≥0,50	Niereaktywny	NIE wykryto odpowiedzi względem wirusa SARS-CoV-2
	<0,15 lub ≥0,15 i <25% próbki Nil	<0,15 lub ≥0,15 i <25% próbki Nil	<0,50	Nieokreślony [‡]	Nie można wykryć odpowiedzi względem wirusa SARS-CoV-2 i próbki Mitogen
>8,0 [§]	Dowolny				

* Wyniki odpowiedzi na kontrolę pozytywną zawierającą Mitogen (i czasem odpowiedzi na próbkę z antygenami Ag) mogą wykraczać poza zakres odczytu czytnika mikroplitek. Nie ma to wpływu na wyniki testu. Wartości >10 IU/ml są zgłaszane przez oprogramowanie QFN SARS jako >10 IU/ml.

[‡] Informacje na temat możliwych przyczyn zostały zamieszczone w sekcji „Rozwiązywanie problemów” na stronie 51.

[§] W badaniach klinicznych u mniej niż 0,25% pacjentów zaraportowano stężenie IFN- γ >8,0 IU/ml dla wartości próbki Nil.

Ograniczenia

Wyniki testów QFN SARS należy wykorzystywać w kontekście historii epidemiologicznej poszczególnych osób, obecnego stanu medycznego i innych ocen diagnostycznych.

Pacjentom, u których wartości dla próbki Nil przekraczają 8 IU/ml, przypisuje się wynik testu „nieokreślony”, ponieważ wyższa o 25% reaktywność na antygeny Ag może wykraczać poza zakres pomiarowy oznaczenia.

- Wynik niereaktywny należy oceniać w kontekście danych medycznych i danych dotyczących historii medycznej pacjenta istotnych dla możliwej odpowiedzi odpornościowej na szczepionkę, zwłaszcza w przypadku osób o upośledzonej odporności.
- Oznaczenie QFN SARS powinno być używane w połączeniu z innymi testami laboratoryjnymi i oceną stanu epidemiologicznego/klinicznego w celu określenia odpowiedzi odpornościowej pacjenta wywołanej szczepieniem przeciwko COVID-19.

Niepewne lub nieokreślone wyniki mogą być spowodowane:

- nieprzestrzeganiem procedury opisanej w instrukcji użycia;
- nieprawidłowym transportowaniem/postępowaniem z próbką krwi;
- podwyższonymi poziomami krążącego we krwi IFN- γ lub obecnością przeciwciał heterofilnych;
- przekroczeniem zwalidowanego okresu między pobraniem próbki krwi a inkubacją. Więcej informacji znajduje się w dokumencie *QFN SARS Blood Collection Tubes — Instrukcja użycia* (1124422).

Parametry skuteczności oznaczenia

Skuteczność analityczna

Punkt odcięcia oznaczenia

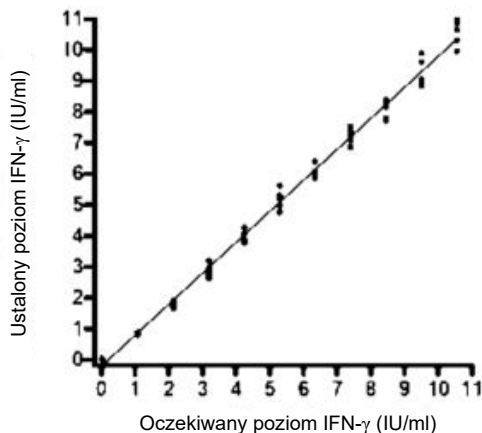
Punkt odcięcia oznaczenia QFN SARS został określony na podstawie danych uzyskanych od dwudziestu (20) pacjentów, dla których uzyskano niereaktywny wynik testu na obecność wirusa SARS-CoV-2 przy użyciu testu RT-PCR lub testu serologicznego oraz danych uzyskanych od dwudziestu (20) dawców w pełni zaszczepionych (2–16 tygodni po pełnym zaszczepieniu) szczepionką, która uzyskała zezwolenie na użycie w sytuacji wyjątkowej (Emergency Use Authorization, EUA) od agencji FDA. Dane dotyczące czułości i swoistości wraz z odpowiadającymi im dokładnymi dwustronnymi 95-procentowymi przedziałami ufności zostały przeanalizowane i na ich podstawie wykazano, że optymalny punkt odcięcia testu ELISA wynosi 0,15 IU/ml (patrz Tabela 5).

Tabela 5. Wartości punktów odcięcia oznaczenia QFN SARS (U/ml) z odpowiadającymi im wartościami czułości i swoistości z dokładnymi dwustronnymi 95-procentowymi CI

Wartość punktu odcięcia	Czułość			Swoistość		
	Wartość	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Wartość	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)
0,1	1,000	0,940	1,000	0,933	0,838	0,982
0,15	0,983	0,911	1,000	1,000	0,940	1,000
0,2	0,900	0,795	0,962	1,000	0,940	1,000
0,25	0,733	0,603	0,839	1,000	0,940	1,000
0,3	0,717	0,586	0,825	1,000	0,940	1,000
0,35	0,650	0,516	0,769	1,000	0,940	1,000
0,4	0,600	0,465	0,724	1,000	0,940	1,000
0,45	0,567	0,432	0,694	1,000	0,940	1,000
0,5	0,467	0,337	0,600	1,000	0,940	1,000
0,55	0,433	0,306	0,568	1,000	0,940	1,000
0,6	0,400	0,276	0,535	1,000	0,940	1,000
0,65	0,333	0,217	0,467	1,000	0,940	1,000
0,7	0,317	0,203	0,450	1,000	0,940	1,000
0,75	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000
0,8	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000

Liniowość

Wykazano liniowość oznaczenia QFN SARS ELISA poprzez losowe naniesienie na płytkę do testu ELISA 5 powtórzeń 11 puli osocza o znanym stężeniu IFN- γ . Prosta regresji liniowej ma nachylenie równe $1,002 \pm 0,011$ i współczynnik korelacji wynoszący 0,99 (Ryc. 3).



Ryc. 3. Ilustracja przedstawiająca analizę regresji wykonaną na potrzeby badania liniowości

Odtwarzalność

Przeprowadzono wielolaboratoryjne badanie odtwarzalności, aby ocenić skuteczność oznaczenia QFN SARS wykonywanego w różnych laboratoriach przez wielu operatorów. To badanie zostało przeprowadzone w trzech laboratoriach firmy QIAGEN. Do badania zostało włączonych trzech (3) pacjentów z reaktywnym wynikiem testu na obecność wirusa SARS-CoV-2 i trzech (3) pacjentów z niereaktywnym wynikiem testu na obecność wirusa SARS-CoV-2 (wyniki uzyskano przy użyciu testu RT-PCR lub testu serologicznego).

Od każdego pacjenta pobrano krew do czterech (4) probówek do pobierania krwi z heparyną litową. Probówki do pobierania krwi z heparyną litową zostały następnie przetransportowane do jednego z laboratoriów badawczych, gdzie krew z probówek została rozdzielona do trzech (3) zestawów probówek QFN SARS Blood Collection Tube (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen i Nil). Każde laboratorium badawcze otrzymało po jednym zestawie probówek QFN SARS Blood

Collection Tube (BCT), które następnie zostały przetestowane zgodnie z procedurą oznaczenia QFN SARS. W przypadku każdego pacjenta w każdym laboratorium wykonano badania dziesięć (10) powtórzeń (pięć (5) powtórzeń dla próbki Ag1 i pięć (5) powtórzeń dla próbki Ag2). Oznaczenie QFN SARS było niezależnie wykonywane w każdym laboratorium przez jednego (1) operatora. Żaden z operatorów nie znał wyników uzyskanych przez pozostałych operatorów ani wyników testu RT-PCR lub serologicznego pacjenta.

We wszystkich trzech (3) laboratoriach wykonujących testy otrzymano 30 wyników, co w rezultacie dało łącznie 90 punktów danych. Podsumowanie wyników badania odtwarzalności znajduje się w Tabeli 6.

Tabela 6. Podsumowanie wyników badania odtwarzalności — N = 30 próbek pacjentów

Laboratorium 1 — 1 operator	Laboratorium 2 — 1 operator	Laboratorium 3 — 1 operator
25/30= 83%	30/30= 100%	30/30= 100%
Zgodność wyników jakościowych	Zgodność wyników jakościowych	Zgodność wyników jakościowych

Procentowa zgodność wyników ogółem w przypadku wszystkich próbek z wynikiem reaktywnym i niereaktywnym z oczekiwanymi wynikami jakościowymi (reaktywny wynik próbki uzyskany u pacjenta z reaktywnym wynikiem testu referencyjnego i niereaktywny wynik próbki uzyskany u pacjenta z niereaktywnym wynikiem testu referencyjnego) wyniosła 94,4% (85/90) we wszystkich trzech (3) laboratoriach.

Powtarzalność między seriami

Zostało przeprowadzone badanie w celu określenia zmienności między seriami próbek QFN SARS Blood Collection Tube. Wykonano badania na próbkach pobranych od dwóch (2) pacjentów z reaktywnym wynikiem testu na obecność wirusa SARS-CoV-2 i trzech (3) pacjentów z niereaktywnym wynikiem testu na obecność wirusa SARS-CoV-2 (wyniki określone na podstawie testu RT-PCR lub testu serologicznego). Do przeprowadzenia badania zostały użyte trzy (3) oddzielne serie zarówno próbek QFN SARS Ag1 Blood Collection Tube, jak i próbek QFN SARS Ag2 Blood Collection Tube. Wykonano test pięć (5) powtórzeń dla każdego dawcy, dla każdej próbki do pobierania krwi. Podsumowanie wyników badania precyzji między seriami znajduje się w Tabeli 7.

Tabela 7. Podsumowanie wyników badania precyzji między seriami — procentowa zgodność wyników ogółem uzyskana dla próbek QFN SARS Ag1 Blood Collection Tube i QFN SARS Ag2 Blood Collection Tube; N = 25

QFN SARS BCT	Numer serii próbki BCT	Liczba zgodnych wyników jakościowych / łączna liczba wyników	Odsetek	Dolna granica przedziału ufności	Górna granica przedziału ufności
Ag1	1	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	2	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	3	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
Ag2	1	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	2	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	3	25/25	100,00%	86,28%	100,00%

Procentowa zgodność wyników ogółem w przypadku wszystkich próbek z wynikiem reaktywnym i niereaktywnym z wynikami oczekiwanymi (reaktywny wynik próbki uzyskany u pacjenta z reaktywnym wynikiem testu referencyjnego i niereaktywny wynik próbki uzyskany u pacjenta z niereaktywnym wynikiem testu referencyjnego) wyniosła 100% dla wszystkich trzech (3) serii próbek QFN SARS Ag1 BCT i QFN SARS Ag2 BCT.

Granica próby ślepej (Limit of Blank, LoB)

Dla oznaczenia QFN SARS określono granicę próby ślepej (Limit of Blank, LoB) Po dwa (2) powtórzenia uzyskane z czternastu (14) odrębnych próbek prawidłowego osocza ludzkiego (próby ślepe) zostały przetestowane przy użyciu dwóch (2) serii oznaczenia QFN SARS ELISA przez trzech (3) operatorów, w ciągu trzech (3) dni badań; jeden (1) operator przypadał na jeden dzień badań. Łącznie przebadano 84 powtórzenia za pomocą obu serii zestawu do wykonywania testu ELISA.

Wartości granicy LoB (IU/ml) dla dwóch (2) serii zestawu do wykonywania testu ELISA zostały obliczone osobno, jak pokazano w Tabeli 8.

Tabela 8. Wartości granicy LoB (IU/ml) dla dwóch (2) serii zestawu QFN SARS ELISA Kit

Zestaw QFN SARS ELISA Kit	Szacunkowa wartość LoB (IU/ml)
Zestaw 1	0,030
Zestaw 2	0,040

Wyższa wartość granicy LoB — 0,040 IU/ml — w przypadku obu serii zestawu QFN SARS ELISA została określona jako ostateczna wartość granicy LoB.

Granica wykrywalności (Limit of Detection, LoD)

Dla oznaczenia QFN SARS określono granicę wykrywalności (Limit of Detection, LoD). Pułę ludzkiego osocza otrzymano poprzez połączenie czternastu (14) indywidualnych próbek osocza. Każdy z trzech (3) operatorów przygotował roztwór podstawowy referencyjnego wzorca IFN- γ w stężeniu 1,0 IU/ml rozcieńczony buforem. Za pomocą osocza wykonano szereg rozcieńczeń roztworu złożony z ośmiu (8) stężeń. Testy były wykonywane w ciągu trzech (3) dni, przez trzech (3) zmieniających się operatorów przy użyciu dwóch (2) serii zestawu QFN SARS ELISA. Każdego dnia testowano po pięć (5) powtórzeń każdego stężenia z zestawu seryjnych rozcieńczeń, co dało 45 powtórzeń dla każdego rozcieńczenia IFN- γ dla każdej serii zestawu QFN SARS ELISA.

Wartość granicy LoD dla każdej przetestowanej serii zestawu QFN SARS ELISA została obliczona osobno, jak pokazano w Tabeli 9. Wartość granicy LoD została oszacowana przy użyciu modelu regresji probitowej. Wartość granicy LoD wyznaczono na podstawie oszacowanego stężenia (IU/ml), na podstawie którego oszacowano 95-procentowe prawdopodobieństwo uzyskania wskaźnika udanych odczytów wyższego niż 0,04 (IU/ml) (określonego wg granicy LoB).

Tabela 9. Szacunkowe wartości granicy LoD (IU/ml) dla dwóch (2) serii zestawu QFN SARS ELISA Kit

Zestaw QFN SARS ELISA Kit	Prawdopodobieństwo	Szacunkowe stężenie (IU/ml)	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności dla szacunkowego stężenia	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności dla szacunkowego stężenia
Zestaw 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Zestaw 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Wyższa wartość granicy LoD — 0,065 IU/ml — obliczona dla obu serii zestawu QFN SARS ELISA, została uznana jako ostateczna wartość granicy LoD.

Substancje zakłócające

Przeprowadzono badanie mające na celu określenie wpływu substancji potencjalnie zakłócających na wykrywanie IFN- γ podczas wykonywania oznaczenia QFN SARS ELISA. Do badania wykorzystano następujące substancje zakłócające: trójglicerydy (całkowite), hemoglobina, białko (całkowite w surowicy), bilirubina (związana), bilirubina (niezwiązana), siarczan abakawiru, cyklosporyna i prednizolon. Przygotowano pięć (5) pul osocza ze znanym stężeniem IFN- γ przy użyciu różnych stężeń substancji zakłócających. Pula z wyjściowym poziomem IFN- γ została wcześniej przygotowana przy użyciu uprzednio określonej ilości obecnego IFN- γ (około 0,21, 0,45 i 1,4 IU/ml). Pula została następnie wykorzystana do przygotowania pul z substancjami zakłócającymi. Przetestowano pięć różnych poziomów substancji zakłócających, które określono na podstawie zakresów referencyjnych, wartości patologicznych, zakresów terapeutycznych i zakresów toksyczności lub zgodnie z zaleceniami dostawcy lub ogólnymi poziomami klinicznymi. Przetestowano sześć (6) powtórzeń dla każdego poziomu stężenia substancji zakłócającej w próbce.

Dla każdego stężenia substancji zakłócającej w próbce przeprowadzono test T, w którym porównywano różnicę między średnią wartością log₁₀ (IU/ml) wysokiego poziomu (10) substancji zakłócającej z wartością uzyskaną dla próby kontrolnej (tj. brak substancji zakłócającej). W tabeli przedstawiono szacowane różnice w średniej odpowiedzi wraz z odpowiadającymi dwustronnymi granicami 95-procentowych przedziałów ufności oraz wartościami p.

Tabela 10. Log10 IU/ml: Tabela z podsumowaniem testu t przedstawiająca różnice w średnich między kontrolnym i wysokim poziomem substancji zakłócającej dla każdego poziomu stężenia IFN- γ i każdej substancji zakłócającej

Substancja zakłócająca	Poziom substancji zakłócającej	Stężenie próbki (IU/ml)	Różnica między średnimi	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Wartość p
Trójglicerydy	Wysoki	1,4	0,053	-0,004	0,110	0,063
		0,45	0,039	-0,021	0,058	<0,001
		0,21	0,034	-0,002	0,071	0,061
Hemoglobina	Wysoki	1,4	-0,001	-0,042	0,040	0,967
		0,45	0,016	-0,007	0,040	0,152
		0,21	0,014	-0,030	0,059	0,489
Białko	Wysoki	1,4	-0,030	-0,071	0,011	0,136
		0,45	0,000	-0,046	0,046	0,992
		0,21	-0,045	-0,103	0,012	0,109
Bilirubina związana	Wysoki	1,4	0,001	-0,046	0,048	0,961
		0,45	0,012	-0,043	0,067	0,639
		0,21	0,015	-0,044	0,074	0,586
Bilirubina niezwiązana	Wysoki	1,4	0,015	-0,011	0,042	0,231
		0,45	0,015	-0,023	0,052	0,411
		0,21	0,012	-0,033	0,057	0,566
Abakawir	Wysoki	1,4	0,013	-0,015	0,040	0,322
		0,45	0,015	-0,014	0,044	0,283
		0,21	0,008	-0,034	0,050	0,677

ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony

Tabela 10. Log10 IU/ml: Tabela z podsumowaniem testu t przedstawiająca różnice w średnich między kontrolnym i wysokim poziomem substancji zakłócającej dla każdego poziomu stężenia IFN- γ i każdej substancji zakłócającej

Substancja zakłócająca	Poziom substancji zakłócającej	Stężenie próbki (IU/ml)	Różnica między średnimi	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Wartość p
Cyklosporyna	Wysoki	1,4	0,002	-0,019	0,024	0,816
		0,45	0,007	-0,030	0,043	0,682
		0,21	0,015	-0,007	0,038	0,155
Prednizolon	Wysoki	1,4	0,007	-0,016	0,030	0,518
		0,45	-0,001	-0,034	0,033	0,964
		0,21	0,021	-0,025	0,068	0,334

Na podstawie wyników nie wykazano istotnych statystycznie różnic między najwyższym poziomem substancji zakłócających i próbą kontrolną (brak substancji zakłócających), z wyjątkiem trójglicerydów w stężeniu na poziomie 0,45 IU/ml. Wykazano, że różnica między średnimi dla tej wartości mieści się w ± 2 odchyleniach standardowych od średniej wartości poziomu kontrolnego, co wskazuje, że obserwowana różnica mieści się w oczekiwanym zakresie zmienności oznaczenia oraz, że nie oczekuje się, aby istotny klinicznie poziom trójglicerydów miał negatywny wpływ na działanie oznaczenia QFN SARS ELISA.

Skuteczność kliniczna

Skuteczność kliniczna oznaczenia QFN SARS została oceniona w prospektywnym badaniu obserwacyjnym, trwającym od czerwca do października 2021 r. W badaniu wykorzystano próbki pobrane od pacjentów, w przypadku których nigdy nie odnotowano zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i którzy zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19 szczepionką skierowaną przeciwko białku S wirusa SARS-CoV-2 oraz od pacjentów, w przypadku których nigdy nie odnotowano zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i którzy nie zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19.

Pacjenci, którzy wyrazili zgodę na badanie zostali ocenieni pod kątem kryteriów włączenia do badania oraz wykluczenia z badania. Do badania zostali włączeni wyłącznie pacjenci, którzy spełniali wszystkie kryteria włączenia i jednocześnie nie spełniali żadnego kryterium wykluczenia. Od pacjentów włączonych do badania pobrano próbki krwi w celu wykonania oznaczenia QFN SARS.

Podsumowanie informacji na temat populacji włączonej do badania zawarto poniżej:

- Grupa 1: Do grupy włączono pacjentów bez historii naturalnego zakażenia wirusem SARS-CoV-2, którzy nie zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19 do czasu pobrania krwi w celu wykonania oznaczenia QFN SARS, dla których nigdy nie uzyskano pozytywnego wyniku testu pod kątem zakażenia wirusem SARS-CoV-2 oraz dla których odnotowano niereaktywny wynik testu serologicznego i nie odnotowano żadnych przedmiotowych lub podmiotowych objawów COVID-19 w ciągu 4 tygodni przed włączeniem do badania.
- Grupa 2: Do grupy włączono pacjentów bez historii zakażenia wirusem SARS-CoV-2, którzy zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19 szczepionką skierowaną przeciwko białku S wirusa SARS-CoV-2 do czasu pobrania krwi w celu wykonania oznaczenia QFN SARS oraz dla których nigdy nie uzyskano pozytywnego wyniku testu pod kątem zakażenia wirusem SARS-CoV-2.

- Żaden z pacjentów podczas udziału w badaniu nie został poddany przeszczepowi (narządu litego lub komórek) i/lub terapii nowotworowej.

Łącznie do grupy 1 włączono 218 pacjentów, natomiast do grupy 2 włączono 171 pacjentów. Po pobraniu próbek krwi w celu wykonania oznaczenia QFN SARS okazało się, że czterech pacjentów z grupy 1 nie spełniało odpowiednich kryteriów ze względu na reaktywny wynik testu serologicznego uzyskany dla próbki pobranej w tym samym czasie co próbki krwi w celu wykonania oznaczenia QFN SARS. Ci pacjenci zostali wyłączeni z dalszej analizy.

Pobrano próbki, a następnie przetworzono je w probówkach do pobierania krwi QFN SARS. Próbki osocza były przechowywane w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$ do momentu aż były gotowe do wykonania oznaczenia QFN SARS ELISA. Wszystkie oznaczenia płytek do testu QFN SARS ELISA były ważne i nie uzyskano wyników nieokreślonych, dzięki czemu z grupy 1 i 2 otrzymano odpowiednio 214 i 171 próbek możliwych do oceny.

Dane demograficzne

Tabela 11 zawiera liczbę próbek pobranych w poszczególnych państwach oraz procentowy udział próbek z danej grupy względem wszystkich próbek.

Tabela 11. Podsumowanie danych dotyczących próbek pobranych w poszczególnych państwach

Państwo, w którym pobrano próbki	Grupa 1		Grupa 2	
	N	%	N	%
Holandia	214	100,00%	153	89,47%
USA	0	0,00%	18	10,53%

Tabela 12 zawiera podsumowanie danych dotyczących wieku pacjentów, w tym średnią i medianę wieku, wiek minimalny i maksymalny, oraz wartość odchylenia standardowego (Standard Deviation, SD) wieku.

Tabela 12. Podsumowanie dotyczące wieku pacjentów (w latach)

N	Średnia	Mediana	SD	Minimum	Maksimum
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Tabela 13 zawiera podsumowanie danych dotyczących płci pacjentów.

Tabela 13. Podsumowanie dotyczące płci pacjentów

Płeć	N	%
Kobiety	234	60,78%
Mężczyźni	151	39,22%

Swoistość

Tabela 14 zawiera dane dotyczące zgodności klinicznej między wynikami uzyskanymi przy użyciu oznaczenia QFN SARS a wynikami uzyskanymi przy użyciu metody referencyjnej.

Tabela 14. Zgodność kliniczna między wynikami uzyskanymi przy użyciu oznaczenia QFN SARS a wynikami uzyskanymi przy użyciu metody referencyjnej

		Wyniki metody referencyjnej		
		Grupa 1 (szczepienie –, zakażenie –)	Grupa 2 (szczepienie +, zakażenie –)	Łącznie
Wynik testu QFN SARS	Niereaktywny	199	34	233
	Reaktywny	15	137	152
Łącznie		214	171	385

Dla 199 z 214 niezaszczepionych pacjentów (grupa 1) przy użyciu oznaczenia QFN SARS uzyskano wynik niereaktywny, natomiast dla 15 pacjentów uzyskano wynik reaktywny. Dla 137 ze 171 zaszczepionych pacjentów (grupa 2) przy użyciu oznaczenia QFN SARS uzyskano wynik reaktywny, natomiast dla pozostałych 34 pacjentów uzyskano wynik niereaktywny. Żadna z 15 i 34 niezgodnych próbek uzyskanych odpowiednio z grupy 1 i 2 nie została poddana dodatkowym testom metodami badania niezgodności.

Zgodność procentowa wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA) (swoistość) została obliczona na podstawie wyników próbek pacjentów niezaszczepionych (grupa 1) z zachowaniem dwustronnego dokładnego 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI); dane przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Zgodność procentowa wyników ujemnych (swoistość)

Numer grupy	NPA (swoistość)	95-procentowy CI
Grupa 1 (szczepienie –; zakażenie –)	92,99% (199/214)	88,70–96,02%

Czułość

Zgodność procentowa wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) (czułość) została obliczona na podstawie wyników próbek pacjentów zaszczepionych (grupa 2) z zachowaniem dwustronnego dokładnego 95-procentowego CI; dane przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Zgodność procentowa wyników dodatnich (czułość)

Numer grupy	PPA (czułość)	95-procentowy CI
Grupa 2 (szczepienie +; zakażenie –)	80,12% (137/171)	73,34–85,82%

Zgodność procentowa wyników dodatnich wg wieku

W przypadku pacjentów zaszczepionych (grupa 2) zgodność procentowa wyników dodatnich została poddana stratyfikacji wg wieku: <60 i ≥60. Uzyskane dane przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Zgodność procentowa wyników dodatnich wg wieku: <60 oraz ≥60 lat

Zakres wiekowy (w latach)	PPA (czułość)	95-procentowy CI
<60	85,33% (128/150)	78,78–90,64%
≥60	42,86% (9/21)	21,82–65,98%

Zgodność procentowa wyników dodatnich wg producenta szczepionki przeciwko COVID-19

W przypadku pacjentów zaszczepionych (grupa 2) zgodność procentowa wyników dodatnich została poddana stratyfikacji wg producenta otrzymanej szczepionki przeciwko COVID-19. Uzyskane dane przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Zgodność procentowa wyników dodatnich wg producenta szczepionki przeciwko COVID-19

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

Czynniki związane z wynikami niereaktywnymi uzyskanymi wśród zaszczepionych pacjentów

W celu ustalenia, czy wzrastający wiek pacjentów, czas od pełnego zaszczepienia przeciwko COVID-19, typ otrzymanej szczepionki oraz płeć mają związek z uzyskiwaniem niereaktywnych wyników dla próbek pobranych od zaszczepionych pacjentów (grupa 2) przeprowadzono jednowymiarową analizę regresji logistycznej. Związek pomiędzy poszczególnymi czynnikami a wynikami niereaktywnymi obliczono w formie ilorazu szans (Odds Ratio, OR), a uzyskane wyniki zawarto w Tabeli 19.

Tabela 19. Związek pomiędzy czynnikami a wynikami niereaktywnymi uzyskanymi wśród zaszczepionych pacjentów

Czynnik		OR (95-procentowy CI)	Wartość p
Wiek (w latach)		1,08 (1,05–1,12)	<0,001
Czas od wykonania szczepienia do pobrania krwi w celu wykonania oznaczenia QFN SARS (w dniach)		1,02 (1,01–1,03)	<0,001
Szczepionka	Pfizer — BioNTech	1	–
	Astra Zeneca	2,55 (0,57–11,42)	0,221
	Janssen (Johnson & Johnson)	0,65 (0,14–3,09)	0,592
	Moderna	1,25 (0,42–3,72)	0,689
Płeć	Kobiety	1	–
	Mężczyźni	1,25 (0,59–2,65)	0,565

Jedynie czynniki, które miały istotny statystycznie wpływ na uzyskiwanie wyników niereaktywnych wśród zaszczepionych pacjentów to wiek oraz czas od wykonania szczepienia.

Badanie zostało przeprowadzone w krajach, w których szczepionki przeciwko COVID-19 zostały w pierwszej kolejności udostępnione osobom starszym, dlatego wiek mógł mieć wpływ na zależność między czasem od wykonania szczepienia a otrzymaniem wyników niereaktywnych. Tabela 20 zawiera analizę regresji, w której wiek został użyty jako zmienna towarzysząca.

Tabela 20. Związek pomiędzy czynnikami a wynikami niereaktywnymi z kontrolowaną zmienną w postaci wieku

Czynnik	OR (95-procentowy CI)	Wartość p
Wiek (w latach)	1,07 (1,03–1,11)	<0,001
Czas od wykonania szczepienia do pobrania krwi w celu wykonania oznaczenia QFN SARS (w dniach)	1,01 (1,00–1,02)	0,214

Gdy zmienna w postaci wieku jest kontrolowana, związek między czasem od wykonania szczepienia a wynikami niereaktywnymi nie jest już istotny, jednak związek między wiekiem nadal pozostaje istotny statystycznie.

Literatura

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

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

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

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

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

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji dotycząca rozwiązywania problemów może być przydatna w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy również zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN zawsze chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i/lub protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na stronie www.qiagen.com).

Komentarze i wskazówki

Rozwiązywanie problemów z testem ELISA

Rozwój niespecyficjnej barwy

- | | |
|---|--|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu płuczącego na każdy dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund. |
| b) Zanieczyszczenie krzyżowe dołków ELISA | Aby zminimalizować ryzyko, należy uważać podczas pipetowania i mieszania próbek. |
| c) Przetknięty zestaw/składniki | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności używanego zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu są używane w ciągu trzech miesięcy od daty zrekonstruowania. |
| d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu | W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki na odczynniki są czyste. |

Komentarze i wskazówki

- e) Wymieszanie osocza w probówkach QFN SARS Blood Collection Tube przed zebraniem osocza
- Po odwirowaniu i przed zebraniem osocza należy unikać pipetowania w górę i w dół i mieszania osocza w jakikolwiek sposób. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.

Niska gęstość optyczna odczytów wzorców

- a) Błąd rozcieńczania wzorca
- Sprawdzić, czy rozcieńczenia wzorca dołączonego do zestawu zostały przygotowane w prawidłowy sposób, zgodny z niniejszą instrukcją użycia.
- b) Błąd pipetowania
- Pipety należy skalibrować i używać ich zgodnie z instrukcjami producenta.
- c) Zbyt niska temperatura inkubacji
- Inkubacja płytki do testu ELISA powinna przebiegać w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
- d) Zbyt krótki czas inkubacji
- Inkubacja płytki z koniugatem, wzorcami i próbkami powinna trwać 120 ± 5 minut. Inkubacja roztworu substratu enzymu na płytce powinna trwać 30 minut.
- e) Nieprawidłowy filtr czytnika płytek
- Płytkę należy odczytać przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm.
- f) Zbyt niska temperatura odczynników
- Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową. Zajmuje to około 1 godzinę.
- g) Przeterminowany zestaw/składniki
- Upewnić się, że nie upłynęła data ważności używanego zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu są używane w ciągu 3 miesięcy od daty zrekonstruowania.

Duży szum tła

- a) Niedokładne przepłukanie płytki
- Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 μl buforu płuczącego na każdy dołek. Może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund.

Komentarze i wskazówki














- b) Zbyt wysoka temperatura inkubacji Inkubacja płytki do testu ELISA powinna przebiegać w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
- c) Przeteterminowany zestaw/składniki Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu są używane w ciągu trzech miesięcy od daty zrekonstruowania.
- d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki na odczynniki są czyste.


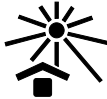

Nieliniowa krzywa wzorcowa i różnice między wynikami powtórzeń

- a) Niedokładne przepłukanie płytki Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 μl buforu płuczącego na każdy dołek. Może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund.
- b) Błąd rozcieńczania wzorca Sprawdzić, czy rozcieńczenia wzorca zostały przygotowane w prawidłowy sposób, zgodny z niniejszą instrukcją użycia.
- c) Niedokładne wymieszanie Dokładnie wymieszać odczynniki poprzez odwracanie fiolek lub łagodne wytrząsanie przed dodaniem ich na płytkę.
- d) Niespójna technika pipetowania lub przerwa podczas przeprowadzania oznaczenia Dodawanie próbki i wzorca powinno być wykonywane w sposób ciągły. Wszystkie odczynniki należy przygotować przed rozpoczęciem oznaczenia.

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się w instrukcji użycia lub na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
 Σ <N>	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Data ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału (tj. oznaczenie składnika)
	Składniki
	Zawiera
	Numer
	Globalny numer jednostki handlowej
	Upoważniony przedstawiciel
Rn	R oznacza wydanie Instrukcji użycia, a n to numer wydania
	Zakres temperatury
	Producent

Symbol	Definicja symbolu
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Chronić przed światłem słonecznym
	Ostrzeżenie/przestroga

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego centrum pomocy technicznej dostępną pod adresem **www.qiagen.com/Support**, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów serwisu technicznego firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona **www.qiagen.com**).

Załącznik A: Informacje techniczne

Wyniki nieokreślone

Wyniki nieokreślone są rzadkie i mogą być związane ze statusem immunologicznym badanych osób, lecz mogą być także związane z wieloma czynnikami technicznymi (np. nieprawidłowe postępowanie z próbką do pobierania krwi, nieprawidłowe przechowywanie próbki, niedokładne płukanie płytki do testu ELISA) w razie nieprzestrzegania przedstawionej powyżej instrukcji stosowania.

W przypadku podejrzenia problemów technicznych z przechowywaniem odczynników, pobieraniem krwi lub postępowaniem z próbkami krwi należy powtórzyć cały test QFN SARS z wykorzystaniem nowych próbek krwi. Powtórzenie testu ELISA osocza po stymulacji można wykonać w przypadku podejrzenia niedokładnego wypłukania lub innych przypadków odstąpienia od określonych procedur testu ELISA. Lekarz może zdecydować o ponownym pobraniu próbki lub wykonaniu innych procedur, odpowiednio do potrzeb.

Skrzepnięte próbki osocza

Jeśli przy długotrwałym przechowywaniu próbek osocza dojdzie do wytrącenia skrzepów fibryny, należy odwirować próbki, aby strącić skrzep i umożliwić pipetowanie osocza.

Lipemiczne próbki osocza

Podczas pipetowania lipemicznych próbek należy zachować należyłą ostrożność, ponieważ osady z tłuszczu mogą blokować końcówki do pipety.

Załącznik B: Skrócony opis procedury testu ELISA

1. Odczekać przynajmniej 60 minut, aż składniki testu ELISA, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, osiągną temperaturę pokojową.



2. Zrekonstruować wzorzec zestawu do stężenia 8,0 IU/ml, używając destylowanej lub dejonizowanej wody. Przygotować cztery (4) rozcieńczenia wzorca.

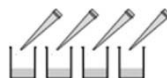


3. Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego 100x stężonego koncentratu koniugatu z wykorzystaniem wody destylowanej lub dejonizowanej.

4. Przygotować stężenie robocze koniugatu za pomocą zielonego rozcieńczalnika i dodać po 50 µl roztworu do każdego dołka.



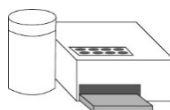
5. Dodać po 50 µl badanych próbek osocza i po 50 µl rozcieńczeń wzorca do odpowiednich dołków. Wymieszać na wytrząsarce.



6. Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej.



7. Przepłukać studzienki co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu płuczącego na każdy dołek.



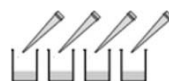
8. Dodać po 100 μ l roztworu substratu enzymu do dołków.
Wymieszać na wytrząsarce.



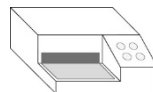
9. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.



10. Dodać po 50 μ l roztworu powstrzymującego działanie enzymu do każdego dołka. Wymieszać na wytrząsarce.



11. Odczytać wyniki przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm.



12. Przeprowadzić analizę wyników.



Dane do zamówienia

Produkt	Zawartość	Nr kat.
QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	Zestaw ELISA zawierający 2 płytki	626420
Produkty pokrewne		
QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 probówek (po 50 z każdego rodzaju — Nil, Ag1, Ag2 i Mitogen)	626725

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Historia zmian dokumentu

Data	Opis
R1, październik 2021 r.	Pierwsze wydanie
R2, listopad 2021 r.	Zaktualizowano części „Parametry skuteczności” i „Skuteczność kliniczna”
R3, kwiecień 2022 r.	Zaktualizowano część „Substancje zakłócające” w części poświęconej analitycznym parametrom skuteczności

Strona celowo pozostawiona pusta.

Strona celowo pozostawiona pusta.

Strona celowo pozostawiona pusta.

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu QuantiFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami wchodzącymi w skład tego panelu. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego panelu ze składnikami nienależącymi do panelu, z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy panel i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Panel oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji, wyrażonych ani dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik panelu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronie www.qiagen.com.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®, Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

