

2018 m.kovas

QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA pakuotės informacinis lapelis

 2 × 96

IFN- γ gryno kraujo testas reakcijai į įgimto ir įgyto imuniteto
stimulatorius nustatyti

1 versija

IVD Skirtas „in vitro“ diagnostikai

CE

REF 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, JAV

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, VOKIETIJA

1079024LT leid. 03

 www.QuantiFERON.com



www.QuantiFERON.com

Turinys

Numatytoji paskirtis	4
Tyrimo santrauka ir paaiškinimas	4
Tyrimo principai	5
Tyrimo trukmė	5
Komponentai ir laikymo sąlygos	6
Būtinoms, bet nepateikiamoms priemonėms	8
Sandėliavimas	8
Perspėjimai ir atsargumo priemonės	10
Įspėjimai	10
Atsargumo priemonės	11
Mėginių paėmimas ir apdorojimas	13
Naudojimo instrukcija	16
Skaičiavimas ir rezultatų aiškinimas	22
Standarto kreivės sudarymas	22
Testo kokybės patikrinimas	23
Rezultatų aiškinimas	23
Apribojimai	24
Efektyvumo charakteristikos	25
Klinikinės studijos	25
Tyrimo atlikimo charakteristikos	30
Techninė informacija	31
Sukrešėję plazmos mėginiai	31
Trikčių šalinimo vadovas	32
Literatūra	34
Simboliai	35
Kontaktinė informacija	35
Trumpas testo procedūros aprašas	36

Numatytoji paskirtis

QuantiFERON stebėjimo tyrimas (QFM) – tai „in vitro“ diagnostikos testas, skirtas ląsteliniam imunitetui nustatyti, išmatuojant gama interferono (IFN- γ) kiekį plazmoje imunofermentinės analizės (ELISA) metodu po gryno heparinizuoto kraujo inkubavimo įgimto ir įgyto imuniteto stimulatoriais. Tyrimas skirtas ląstelinei imuninei reakcijai nustatyti organizmuose žmonių, kuriems buvo persodinti vientisi organai ir kurių imunitetas slopinamas.

QFM turi būti naudojamas kartu atliekant rizikos įvertinimą ir kitus medicininius bei diagnostinius tyrimus.

Tyrimo santrauka ir paaiškinimas

Imunodeficitas apibūdinamas kaip sumažėjęs pajėgumas efektyviai sukelti imuninę reakciją. Tokia susilpnėjusi ar neegzistuojanti reakcija gali kilti dėl pirminio ar įgyto (antrinio) imunodeficito (1).

Pirminis imunodeficitas yra genetiškai paveldimas. Jis apibūdinamas skirtingų įgytos ar įgimtos imuninės sistemos komponentų trūkumu (1). Nepaisant to, dažniausiai imunodeficitas yra įgyjamas (antrinis) ir jį gali paskatinti patogeninės medžiagos, vaistai (pavyzdžiui, imunitetą slopinantis gydymas po organų persodinimo), ligos (pavyzdžiui, vėžys: leukemija ir limfoma) arba aplinkos teršalai (1).

Imunodeficito molekulinė bazė yra įvairi, tačiau stebimuose klinikiniuose atvejuose ląstelinis imunitetas vaidina svarbiausią skatinamąjį vaidmenį. Šiuo metu imunodeficito sindromų diagnostika ir valdymas priklauso nuo juos sukėlusių veiksnių (2, 3).

Pavyzdžiui, specifinis valdymas stebint ląstelinio imunodeficito būklę tiriamų asmenų, kuriems buvo atliktas vientisų organų persodinimas (VOP) ir kurie gauna imuninę sistemą slopinančių vaistų, yra norma. Tiriamo asmens imuninė reakcija paprastai matuojama, stebint vaistų lygį ir mediciniškai / patologiškai vertinant persodinto organo funkcionavimą (2, 3).

Keli T ląstelių veikimo testai matuoja ląstelinio imuniteto reakciją į mitogenus, pvz., fitohemagliutiną (PHA), iš fitolakos augalo išgaunamus mitogenus ir konkavaliną A (ConA), tačiau jie matuoja tik T ląstelių funkcinį pajėgumą ir tai yra tik vienas ląstelių, dalyvaujančių ląsteliniame imunitete, pogrupis. Atsiranda vis daugiau įrodymų, kad įgimto imuniteto mechanizmai daro didelę įtaką organizmo apsaugai veikdami vieni arba stiprindami specifines T ląstelių reakcijas. Todėl funkcinės įgimtų (baltųjų kraujo kūnelių) ir įgytų (T ląstelių) imuninės sistemos ląstelių reakcijos kartu sukuria visapusiškesnę ląstelinio imuniteto analizę (2, 3).

QFM – tai „in vitro“ diagnostikos testas, naudojantis stimuliatorių derinį (LyoSphere™ granulės pavidalu), kuris specialiai stimuliuoja skirtingų tipų ląsteles, dalyvaujančias ir įgimtoje, ir įgytoje imuninėje sistemoje. Tiriamojo funkcinė imuniteto būseną vertinama matuojant įgimtos ir įgytos imuninės

sistemos reakciją į stimuliaciją, atitinkamai naudojant transmembraninių atpažinimo receptorių (TLR) ir T ląstelių receptorių (TCR) agonistus. Gama interferono (IFN- γ) nustatymas ELISA metodu pateikia ir kokybinį, ir kiekybinį ląstelinio imuniteto funkcijos įvertinimą.

Tyrimo principai

QFM tyrime naudojami liofilizuoti stimulatoriai (QFM LyoSpheres™), kurių pridedama į gryną heparinizuotą kraują. Kraujo surinkimo inkubavimas trunka nuo 16 iki 24 valandų. Tada paimama plazma ir patikrinama, ar joje yra IFN- γ , kuris susidarė reakcijos į stimulatorius metu.

QFM testas atliekamas etapais. Pirmiausia į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį surenkamas kraujas. Tada į mėgintuvėlį įdedama QFM LyoSphere granulė ir jis kaip įmanoma greičiau (per 8 val. nuo surinkimo) inkubuojamas, esant 37 °C temperatūrai. Po 16–24 val. inkubavimo laikotarpio mėgintuvėliai centrifuguojami, atskiriama plazma, naudojant ELISA metodą išmatuojamas IFN- γ kiekis (pateikiama tarptautiniais vienetais viename mililitre – IU/ml) ir jis palyginamas su įvairiomis numatytais reikšmėmis, kurios apibūdina tiriamojo imuninės sistemos reakciją.

QFM – tai tyrimas, kuris pateikia tiek kokybinį, tiek kiekybinį imuniteto funkcijos įvertinimą. QFM rezultatai gali tiesiogiai neįvertinti imuninės sistemos slopinimo lygio.

IFN- γ kiekis plazmos mėginiuose dažnai gali viršyti daugelio ELISA skaitytuvų ribas, net jei asmenų imunitetas yra tik šiek tiek slopinamas. Rekomenduojama plazmos mėginius žaliame skiediklyje atskiesti santykiu 1 su 10 ir (arba) 1 su 100 ir iširti juos ELISA metodu kartu su neskiesta plazma.

Pastaba: QFM tyrimo slenkstis gali priklausyti nuo tiriamojo imuniteto slopinimo lygio ir atskirų organo persodinimo parametrų.

Žr. šios pakuotės informacinio lapelio 23 psl. esantį skyrių „Rezultatų aiškinimas“ ir sužinokite, kaip interpretuojami QFM rezultatai.

Tyrimo trukmė

Toliau rasite informaciją apie apytiksliai nustatytą QFM tyrimo trukmę. Taip pat nurodoma, kiek laiko reikia mėginių paketui testuoti.

Kraujo mėgintuvėlių inkubavimas 37 °C temperatūroje: nuo 16 iki 24 val.

ELISA: apytiksliai 3 val. vienai ELISA plokštelei
 (daugiausia 88 mėginiai)

< 1 val. darbo

plius 10–15 min. kiekvienai papildomai plokštelei

Komponentai ir laikymo sąlygos

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Katalogo Nr.	0650-0701
Paruošimų skaičius	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 buteliukų
<i>QuantiFERON Monitor LyoSpheres pakuotės informacinis lapelis</i>	1
QuantiFERON Monitor kraujo surinkimo mėgintuvėliai	
Katalogo Nr.	0650-0101
Paruošimų skaičius	100
QuantiFERON Monitor kraujo surinkimo mėgintuvėliai (baltas dangtelis, baltas žiedas)	100 mėgintuvėlių
<i>QuantiFERON Monitor kraujo surinkimo mėgintuvėlių pakuotės informacinis lapelis</i>	1

QuantiFERON Monitor 2 plokštelių komplekto ELISA komponentai	2 plokštelių komplektas ELISA
Katalogo Nr.	0650-0201
Mikroplokštelės juostelės, 12 × 8 duobutės (padengtos ne žmogaus IFN- γ monokloniniu antikūnu (pelių))	2 rinkiniai Mikroplokštelės juostelės (12 × 8)
IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ standartas, liofilizuotas) (sudėtyje yra rekombinantinio žmogaus IFN- γ , galvijų kazeino, 0,01 % w/v timerosalio)	1 buteliukas (8 IU/ml po atkūrimo)
Green Diluent (Žalias skiediklis) (sudėtyje yra galvijų kazeino, normalaus pelių serumo, 0,01 % w/v timerosalio)	1 × 30 ml buteliukas
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (Konjugatas 100× koncentratas, liofilizuotas) (ne žmogaus IFN- γ (pelių) HRP; sudėtyje yra 0,01 % w/v timerosalio)	1 × 0,3 ml po atkūrimo
Wash Buffer 20× Concentrate (Plovimo buferis 20× koncentratas) (pH 7,2; sudėtyje yra 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Fermento substrato tirpalas) (sudėtyje yra H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidino)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Fermento stabdymo tirpalas) (sudėtyje yra 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
QuantiFERON Monitor ELISA pakuotės informacinis lapelis	1

* Sudėtyje yra sieros rūgšties. Atsargumo priemonės žr. 11 psl.

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

- 37 °C inkubatorius*; CO₂ nebūtinus
- Kalibruotos reguliuojamojo tūrio pipetės*
- Kalibruota daugiakanalė pipetė† tūriui nustatyti (nuo 50 µl iki 100 µl) su vienkartiniais švirkštais
- Mikroplokštelių kratytuvast
- Dejonizuotas arba distiliuotas vanduo (2 litrai)
- Mikroplokštelių plovimo aparatas (rekomenduojamas automatizuotas plovimo aparatas)
- Skaitymo įrenginys mikroplokštelėms† su 450 nm filtru ir 620–650 nm referencijos filtru
- Graduotas cilindras (matavimo cilindras)
- Nepūkuotas, sugeriantis rankšluostis

Sandėliavimas

Kraujo surinkimo mėgintuvėliai

QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius laikykite 4–25 °C temperatūroje. Kraujo surinkimo ir maišymo metu QFM kraujo surinkimo mėgintuvėliai turi būti 17–25 °C temperatūros.

LyoSpheres

QFM LyoSpheres granules laikykite 2–8 °C temperatūroje.

ELISA komplekto reagentai

ELISA komplekto reagentus laikykite šaldytuve, 2–8 °C temperatūroje. Fermento substrato tirpalą visada saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.

* Įsitikinkite, kad visi instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

Atkurti ir nepanaudoti ELISA reagentai

Nurodymus, kaip atkurti ELISA reagentus, žr. „2 etapas. IFN- γ ELISA“, 17 psl.

- Sandėliuojant 2–8 °C temperatūroje, atkurtas komplekto standartas gali būti laikomas iki 3 mėnesių.

Užrašykite komplekto standarto atkūrimo datą.

- Nepanaudotas konjugatas (100× koncentratas) po atkūrimo turi būti vėl sandėliuojamas 2–8 °C temperatūroje ir sunaudojamas per 3 mėnesius.

Užrašykite konjugato atkūrimo datą.

- Naudoti paruoštas konjugatas turi būti sunaudojamas per 6 valandas po paruošimo (žr. 1 lentelę).
- Naudoti paruoštą plovimo buferį kambario temperatūroje (22 ± 5 °C) galima laikyti ne ilgiau nei dvi savaites.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirtas „in vitro“ diagnostikai

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

Įspėjimai

- QFM – tai tyrimas, kuris pateikia tiek kokybinį, tiek kiekybinį imuniteto funkcijos įvertinimą. QFM rezultatai gali tiesiogiai neįvertinti imuninės sistemos slopinimo lygio.
- Nustatant paciento imuniteto būseną, QFM tyrimo rezultatai turėtų būti naudojami, kartu atsižvelgiant į klinikinius simptomus, medicininę istoriją ir kitus klinikinius rodiklius.
- QFM tyrimo slenkstis gali priklausyti nuo tiriamojo imuniteto slopinimo lygio ir atskirų organo persodinimo parametrų.

Atsargumo priemonės

Skirtas tik „in vitro“ diagnostikai.



ĮSPĖJIMAS: žmogaus kraujo ir plazmos mėginius visada laikykite potencialiai užkrečiamais. Laikykitės atitinkamų kraujo ir kraujo produktų apdorojimo rekomendacijų. Su krauju ar kraujo produktais susijusius mėginius ir medžiagas išmeskite atsižvelgdami į šalies ir vietinius reikalavimus.

QuantiFERON Monitor ELISA komponentams taikomos toliau išvardytos pavojingumo ir atsargumo frazės.

Pavojingumo frazės



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON fermento stabdymo tirpalas)

Sudėtyje yra: sulfuric acid. Atsargiai! Gali ėsdinti metalus. Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (QuantiFERON fermento substrato tirpalas)

Atsargiai! Nestipriai dirgina odą. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.



QuantiFERON Green Diluent (QuantiFERON žalias skiediklis)

Sudėtyje yra: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Sudėtyje yra: tartrazine. Atsargiai! Gali sukelti alerginę odos reakciją. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.



QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate (QuantiFERON plovimo buferis (20× koncentratas))

Sudėtyje yra: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Saugoti, kad nepatektų į aplinką.

Daugiau informacijos

Saugos duomenų lapuose: www.qiagen.com/safety

- Nukrypimai nuo *QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA pakuotės informaciniame lapelyje* aprašytos instrukcijos gali lemti klaidingus rezultatus. Prieš naudojimą atidžiai perskaitykite instrukcijas.
- **Svarbu:** prieš naudojimą patikrinkite buteliukus. Nenaudokite, jei ant Conjugate, IFN- γ Standard arba QFM LyoSphere buteliuko arba guminio sandariklio matomi pažeidimo požymiai. Nenaudokite pažeistų buteliukų. Saugiai išmeskite buteliukus, laikydamiesi tinkamų atsargumo priemonių. Rekomendacija: kad nesusižalotumėte į metalinio Conjugate, IFN- γ Standard arba QFM LyoSphere dangtelio kraštą, atidarydami buteliukus naudokite specialų atidarytuvą.
- Nenaudokite ELISA komplekto, jei kuris nors reagento buteliukas yra pažeistas ar ištekėjęs.
- Nenaudokite ir nemaišykite mikroplokštelių juostelių, IFN- γ standarto, žalio skiediklio ar konjugato (100 \times koncentrato), paimtų iš skirtingų QFM ELISA komplektų siuntų. Kitus reagentus (plovimo buferį (20 \times koncentratą), fermento substrato tirpalą, fermento stabdymo tirpalą) galima imti iš skirtingų komplektų, jei reagentų galiojimo laikas yra tinkamas ir įrašoma partijos informacija.
- Nepanaudotus reagentus ir biologinius mėginius išmeskite laikydamiesi vietinių ir šalies asmeninės saugos ir aplinkosaugos įstatymų.
- Nenaudokite QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlių, QFM LyoSpheres buteliukų ar QFM ELISA pakuočių, pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Įsitikinkite, kad laboratorijos įranga buvo sukalibruota / patikrinta tinkamai naudoti.

Mėginių paėmimas ir apdorojimas

QFM tyrimas turi būti atliekamas tik naudojant gryną kraują, kuris buvo surinktas į ličio heparino kraujo surinkimo mėgintuvėlį arba tiesiai į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį. Vienam testui reikia 1 ml gyno kraujo. Kraujo surinkimo mėgintuvėliai turi būti tinkamai pažymėti, nurodant kraujo surinkimo laiką.

Svarbu: QFM kraujo mėginių stimuliacija (t. y. QFM LyoSphere granulės įdėjimas į 1 ml kraujo alikvotą) ir jų vėlesnė inkubacija, esant 37 °C temperatūrai, turi būti atliekama per 8 val. nuo kraujo surinkimo.

Prieš inkubavimą kraujo mėginius laikykite kambario temperatūroje (22 ± 5 °C).

Optimalūs rezultatai yra pasiekiami laikantis šių procedūrų:

1. Pažymėkite mėgintuvėlius tinkamomis etiketėmis.

Pasirūpinkite, kad kiekvienas QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlis būtų tinkamai pažymėtas ir nurodyta informacija apie tiriamąjį ir kraujo surinkimo laiką.

2. Iš kiekvieno tiriamojo paimkite po 1 ml veninio kraujo tiesiai į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį. Šią procedūrą turėtų atlikti kvalifikuotas flebotomijos specialistas.

Svarbi pastaba: kraujo surinkimo metu mėgintuvėliai turi būti 17–25 °C temperatūros.

QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius galima naudoti iki 810 metrų aukštyje virš jūros lygio.

1 ml mėgintuvėliai kraują įtraukia palyginti lėtai, todėl, kai atrodo, kad pasiektas reikiamas užpildymo lygis, mėgintuvėlį reikia palikti ant adatos dar 2–3 sekundes. Taip tikrai bus surinktas reikiamas kiekis.

Juoda žymė ant QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlio šoninės etiketės rodo 1 ml užpildymo tūrį. QFM kraujo surinkimo mėgintuvėliai skirti paimti 1 ml ± 10 % ir optimaliai veikti šiame diapazone. Jei kraujo lygis nepatenka į linija pažymėtą intervalą, reikia imti naują kraujo mėginį.

Jei kraujui surinkti naudojama „drugelio“ tipo adata, prieš naudodami QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius papildomu kraujo surinkimo mėgintuvėliu patikrinkite, ar jungiamasis vamzdelis užpildytas krauju.

Jei QFM kraujo surinkimo mėgintuvėliai naudojami didesniame nei 810 metrų aukštyje arba surenkama per mažai kraujo, surinkite kraują švirkštu ir iš karto perpilkite 1 ml kraujo į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį. Saugumo sumetimais reikėtų nuimti švirkšto adatą. Tačiau imkitės atitinkamų atsargumo priemonių. Nuimkite QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlio dangtelį ir pripildykite 1 ml kraujo (iki juodos žymos, esančios ant šoninės mėgintuvėlio etiketės, vidurio). Uždenkite dangtelį ir maišykite, kaip nurodyta toliau.

Jei naudojate turniketą, įdūrę į veną adatą atlaisvinkite jį, kad nepakistų spaudimas ir kraujo kiekis.

Kraują taip pat galima surinkti naudojant įprastą kraujo surinkimo mėgintuvėlį, pripildytą ličio heparino, kuris veikia kaip antikoaguliantas, tada perpilti jį į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį. Kaip kraujo antikoaguliantą naudokite tik ličio hepariną, nes kiti antikoaguliantai trukdo tyrimui. Užpildykite kraujo surinkimo mėgintuvėlį (min. 3 ml tūrio) ir atsargiai sumaišykite pavartydami jį kelis kartus, kad heparinas ištirptų. Laikykite kraują kambario temperatūroje ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) prieš perpildami jį į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius, kuriuose jis bus stimuliuojamas, naudojant QFM LyoSphere. Prieš pat kraujo paskirstymą, atidžiai sumaišykite kraujo mėginius atsargiai juos pavartydami. Perpilkite 1 ml kraujo alikvoto į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį. Perpylimą atlikite steriliai, laikydamiesi atitinkamų atsargumo priemonių. Nuimkite QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlio dangtelį ir papildykite 1 ml kraujo (iki juodos žymos, esančios ant šoninės mėgintuvėlio etiketės, vidurio). Uždenkite mėgintuvėlių dangtelius ir maišykite, kaip nurodyta toliau.

3. Pripildę mėgintuvėlius kelis kartus juos atsargiai pavartykite, kad ištirptų heparinas.

Svarbu: per stipriai pakračius gali būti suardytas gelis ir taip iškreipti rezultatai.

4. Prieš pat naudojimą palikite QFM LyoSpheres pastovėti kambario temperatūroje ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).

5. Steriliai įdėkite vieną QFM LyoSphere granulę į 1 ml kraujo.

Atidarykite kraujo surinkimo mėgintuvėlį.

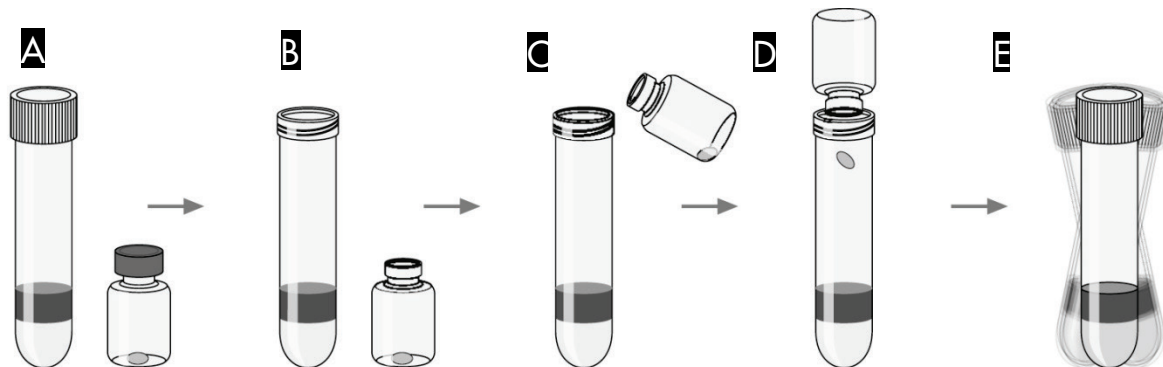
Atsargiai pastuksenkite QFM LyoSphere buteliuką į kietą paviršių, kad QFM LyoSphere granulė atsirastų ant buteliuko dugno. Atidarykite QFM LyoSphere buteliuką, pirmiausia nuimdami metalinį dangtelį, o tada – guminį kaištį.

Atsargiai įdėkite QFM LyoSphere granulę į 1 ml kraujo mėginį, priglaudami stiklinio buteliuko kraštą prie QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlio krašto ir atsargiai paversdami buteliuką, kad QFM LyoSphere granulė įkristų į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį (žr. 1 pav.).

Svarbu: jei QFM LyoSphere granulė nepataikys įkristi į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį, išmeskite ją ir atidarykite kitą QFM LyoSphere buteliuką.

Svarbu: nepalikite QFM LyoSphere buteliuko atidaryto ilgą laiką. QFM LyoSphere granulę reikėtų įdėti į kraują iš karto atidarius buteliuką.

Jei QFM LyoSpheres granulės dedamos į kraują, kuris buvo surinktas į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius, pasirūpinkite, kad mėgintuvėlių dangteliai būtų uždėti ant tinkamų mėginių.



1 pav. QFM LyoSphere granulės įdėjimas. **A** QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlis ir QFM LyoSphere buteliukas. **B** Nuimkite QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlio dangtelį ir QFM LyoSphere buteliuko metalinį dangtelį bei guminį kaištį. **C** Nedelsdami įdėkite QFM LyoSphere granulę į kraują, suliesdami stiklinio buteliuko ir surinkimo mėgintuvėlio kraštus. **D** Tada atsargiai apverskite buteliuką, kad LyoSphere granulė patektų į surinkimo mėgintuvėlį. **E** Uždarykite QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį ir papurtykite jį 5–10 kartų.

6. Uždarykite QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį ir papurtykite jį 5–10 kartų pakankamai stipriai, kad QFM LyoSphere granulė visiškai ištirptų.

Jei QFM LyoSphere granulė prilimpa prie mėgintuvėlio vidinio paviršiaus, ją galima ištirpdyti apvertus mėgintuvėlį, kad granulė būtų padengta krauju.

Įdėję QFM LyoSphere granulę uždarykite mėgintuvėlį, kad į tą patį mėgintuvėlį netyčia nebūtų įdėta dar viena LyoSphere granulė.

Pastaba: QFM LyoSphere granulė yra balta, todėl ištirpusios jos kraujyje nesimatys.

Svarbu: per stipriai pakračius gali būti suardytas gelis ir taip iškreipti rezultatai.

7. Įdėjus ir ištirpdžius QFM LyoSphere granules, QFM kraujo surinkimo mėgintuvėliai turi būti kuo greičiau (ne vėliau kaip per 8 valandas nuo kraujo surinkimo) perkelti į inkubatorių (37 ± 1 °C).

Naudojimo instrukcija

1 etapas. Kraujo mėginio inkubavimas ir plazmos paėmimas

Pateikiamos priemonės

- QFM kraujo surinkimo mėgintuvėliai (žr. „Komponentai ir laikymo sąlygos“, 6 psl.)

Būtinės, bet nepateikiamos priemonės

- Žr. „Būtinės, bet nepateikiamos priemonės“, 8 psl.

Procedūra

1. **Inkubuokite QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius, kuriuose yra 1 ml kraujo alikvoto su QFM LyoSphere granule, VERTIKALIOJE padėtyje 16–24 val., esant 37 ± 1 °C temperatūrai.**

Pastaba: CO₂ arba drėkinimas inkubuojant nėra reikalingas.

Po inkubavimo ir prieš atliekant centrifugavimą QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius galima laikyti 4–27 °C temperatūroje ne ilgiau nei 3 dienas.

2. **Atlikus inkubaciją, 15 min. centrifuguojant QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlius 2 000–3 000 × g (RCF) galingumu, paimama plazma. Susidarant gelio kamščiui ląstelės atsiskiria nuo plazmos. Jei tai neįvyksta, dar kartą centrifuguokite mėgintuvėlius.**

Plazmą galima paimti ir be centrifugavimo, tačiau tai reikia daryti labai atsargiai, kad paimant plazmos nebūtų sujudintos ląstelės.

3. **Plazmos mėginį visada imkite naudodami pipetę.**

Svarbu: po centrifugavimo ir prieš plazmos paėmimą kiekvienu atveju venkite mėginius traukyti pipete aukštyn ir žemyn arba plazmą sumaišyti. Visuomet dirbkite kruopščiai, kad nesujudintumėte medžiagos prie gelio paviršiaus.

Plazmos mėginiai iš centrifuguotų QFM kraujo paėmimo mėgintuvėlių gali būti perkelti tiesiai į QFM ELISA plokštelę. Tai galioja ir tais atvejais, kai yra naudojami ELISA automatai.

Plazmos mėginiai 2–8 °C temperatūroje gali būti laikomi iki 28 dienų; arba paėmus plazmą ją galima laikyti dar ilgiau –20 °C temperatūroje. Paimtų plazmos mėginių alikvotus prieš padedant saugoti būtina sandariai uždaryti.

Jei imate plazmos mėginius, paimkite bent 150 μl plazmos, jei reikėtų atlikti papildomų testų.

IFN-γ kiekis plazmos mėginiuose dažnai gali viršyti daugelio ELISA skaitytuvų ribas, net jei asmenų imunitetas yra tik šiek tiek slopinamas.

Rekomenduojama plazmos mėginį žaliame skiediklyje atskiesti santykiu 1:10 ir (arba) 1:100 ir ištirti juos ELISA metodu kartu su neskiesta plazma (žr. „2 etapas. IFN- γ ELISA“).

2 etapas. IFN- γ ELISA

Pateikiamos priemonės

- QuantiFERON Monitor 2 plokštelių komplektas ELISA (žr. „Komponentai ir laikymo sąlygos“, 6 psl.)

Būtinės, bet nepateikiamos priemonės

- Žr. „Būtinės, bet nepateikiamos priemonės“, 8 psl.

Paruošimas

IFN- γ kiekis plazmoje dažnai gali viršyti daugelio ELISA skaitytuvų ribas, net jei asmenų imunitetas yra tik šiek tiek slopinamas. Rekomenduojama plazmos mėginį žaliame skiediklyje atskiesti santykiu 1:10 ir (arba) 1:100 ir ištirti juos ELISA metodu kartu su neskiesta plazma.

Kai paciento imunitetas yra labai nuslopintas, gali pakakti paruošti ir ištirti tik neskiestos plazmos mėginį, kad būtų gautas kiekybinis rezultatas.

Pastaba: mėginio rezultatai, patenkantys į QFM ELISA diapazoną (t. y. daugiausia 10 IU/ml), turėtų būti naudojami rezultatams aiškinti. Mažiausias atskiedimo koeficientas, pagal kurį sugeneruojamas į QFM ELISA diapazoną patenkantis rezultatas, turi būti naudojamas kaip pateiktas rezultatas (atsižvelgiant į atskiedimo koeficientą), jei neskiestos plazmos rodiklis viršija QFM ELISA diapazoną.

Procedūra

1. **Visi plazmos mėginiai ir reagentai, išskyrus konjugato 100 \times koncentratą, prieš naudojimą turi pasiekti kambario temperatūrą (22 ± 5 °C). Temperatūrai išlyginti skirkite ne mažiau nei 60 minučių.**
2. **Nereikalingas juosteles išimkite iš mikroplokštelės dėmelio, įdėkite jas atgal į folijos pakuotę ir iki naudojimo laikykite šaldytuve.**

Mažiausiai vieną juostelę paskirkite QFM standartams ir paimekite dar pakankamą juostelių skaičių tiriamiems pacientams. Po naudojimo dėmelį ir dangtelį palikite kitam kartui su likusiomis juostelėmis.

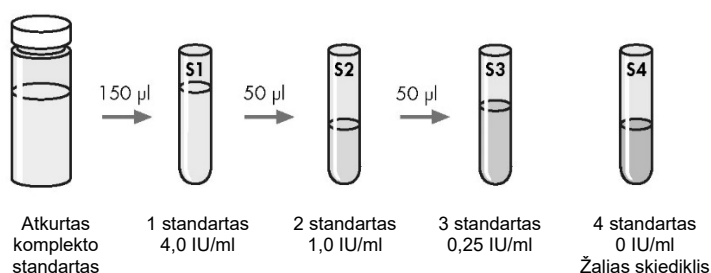
3. **Atkurkite liofilizuotą IFN- γ standartą su ant buteliuko etiketės nurodytu dejonizuoto arba distiliuoto vandens kiekiu. Atsargiai maišykite buteliuko turinį (vengdami putų susidarymo) ir įsitikinkite, kad turinys visai ištirpęs. Atkūrus standartą iki nurodyto tūrio, gaunamas tirpalas, kurio koncentracija yra 8,0 IU/ml.**

Svarbu: atkurto IFN- γ standarto tūris partijose bus skirtingas. Reikiamą dejonizuoto arba distiliuoto vandens kiekį rasite ant buteliuko etiketės.

Atkurta komplekto standartą naudokite norėdami paruošti 1:2 skiedimo, tada 1:4 skiedimo seriją iš IFN- γ žaliame skiediklyje (ŽS) (žr. 2 pav.). S1 (1 standarto) sudėtyje yra 4,0 IU/ml, S2 (2 standarto) sudėtyje yra 1,0 IU/ml, S3 (3 standarto) sudėtyje yra 0,25 IU/ml, o S4 (4 standarto) sudėtyje yra 0 IU/ml (tik ŽS). Standartai turėtų būti ištirti du kartus. Kiekvienam ELISA seansui paruoškite naujus komplekto standarto skiedinius.

Rekomenduojama procedūra dvigubam standartui

- Užrašykite ant 4 mėgintuvėlių: S1, S2, S3, S4.
- Įpilkite 150 μ l ŽS į S1, S2, S3, ir S4.
- Įpilkite 150 μ l komplekto standarto į S1 ir kruopščiai sumaišykite.
- Perkelkite 50 μ l iš S1 į S2 ir kruopščiai sumaišykite.
- Perkelkite 50 μ l iš S2 į S3 ir kruopščiai sumaišykite.
- Tik žalias skiediklis (ŽS) veikia kaip nulinis standartas (S4).



2 pav. Standarto kreivės paruošimas.

4. **Atkurkite liofilizuotą konjugato 100 \times koncentratą su 0,3 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens. Atsargiai sumaišykite buteliuko turinį (vengdami putų susidarymo) ir įsitikinkite, kad konjugatas visiškai ištirpo.**

Naudoti tinkamą konjugatą pagaminsite skiesdami reikiamą atkurto konjugato 100 \times koncentrato kiekį žaliu skiedikliu (1 lentelė. Konjugato

paruošimas). Nesunaudotą konjugato 100× koncentratą nedelsiant grąžinkite į 2–8 °C temperatūrą. Skiesdami naudokite tik žalią skiediklį.

1 lentelė. Konjugato paruošimas

Juostelių skaičius	Konjugato 100× koncentrato kiekis	Žalio skiediklio kiekis
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. Jei naudojate plazmos mėginius, paimtus iš kraujo surinkimo mėgintuvėlių ir tada laikomus arba užšaldomus, prieš pridėdami į ELISA duobutes juos sumaišykite.

Svarbu: jei plazmos mėginiai dedami tiesiai iš centrifuguotų QFM mėgintuvėlių, plazmos maišyti nereikėtų. Visuomet dirbkite kruopščiai, kad nesujudintumėte medžiagos prie gelio paviršiaus.

6. Rekomenduojama: praskiesti plazmos mėginius santykiu 1:10.

- Įpilkite 90 µl žalio skiediklio (ŽS) į mėgintuvėlį, ant kurio nurodyta paciento informacija ir santykis „1:10“.
- Tada įpilkite 10 µl sumaišytų plazmos mėginių (informacijos apie sumaišytus plazmos mėginius ir mėginius, kurie buvo įpilti tiesiai iš centrifuguotų QFM mėgintuvėlių žr. 5 veiksmė).
- Gerai sumaišykite naudodami pipetę stengdamiesi, kad nesusidarytų putos.

7. Rekomenduojama: praskiesti plazmos mėginius santykiu 1:100.

- Paruošti santykiu 1:10 praskiestą mėginį (žr. anksčiau aprašytą 6 veiksmą).
- Įpilkite 90 µl žalio skiediklio į mėgintuvėlį, ant kurio nurodyta paciento informacija ir santykis „1:100“.
- Įpilkite 10 µl mėginio, praskiesto santykiu 1:10.
- Gerai sumaišykite naudodami pipetę stengdamiesi, kad nesusidarytų putos.

Rekomenduojama: palyginkite šiuos mėginius lygiagrečiai tokia tvarka:

- neskiestas, 1:10, 1:100

QFM analizės programinė įranga taip pat palaiko ir šias tiriamojo mėginių parinktis:

- neskiestas
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- neskiestas, 1:10

- 8. Į atitinkamas ELISA duobutes daugiakanale pipete įpilkite po 50 µl šviežiai naudoti paruošto konjugato.**
- 9. Į atitinkamas ELISA duobutes daugiakanale pipete įpilkite po 50 µl plazmos mėginio. Tada įpilkite po 50 µl kiekvieno standartinio mišinio nuo 1 iki 4. Standartinius mišinius tirkite du kartus.**
- 10. Kiekvieną plokštelę uždenkite dangteliu ir kruopščiai maišykite konjugatą ir plazmos mėginius / standartus 1 minutę naudodami mikroplokštelių kratytuvą. Stenkitės, kad netikštų.**
- 11. Inkubuokite kambario temperatūroje (22 ± 5 °C) 120 ± 5 minučių.** Inkubavimo metu plokšteles saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.
- 12. Inkubacijos metu praskieskite 1 dalį plovimo buferio 20× koncentrato su 19 dalių dejonizuoto ar distiliuoto vandens ir kruopščiai išmaišykite. Iš pateikto plovimo buferio 20× koncentrato galima pagaminti 2 litrus naudoti tinkamo plovimo buferio.**

Duobutes plaukite mikroplokštelių plovimo aparate mažiausiai 6 kartus naudodami 400 µl tinkamo plovimo buferio. Rekomenduojame naudotis mikroplokštelių plovimo automatu.

Siekiant tikslių tyrimo rezultatų labai svarbu kruopščiai išplauti. Kiekvieno plovimo ciklo metu patikrinkite, ar visos duobutės yra **visiškai užpildytos** plovimo buferiu. Rekomenduojama: norint gauti geriausią rezultatą, tarp plovimo ciklų duobutes pamirkyti bent 5 sekundes.

Į atliekamų skysčių talpyklą įpilkite laboratorijose įprastai naudojamos dezinfekcinės priemonės ir laikykitės nustatytų taisyklių, kaip potencialiai infekuojančią medžiagą padaryti nekenksminga.

- 13. Pastuksenkite plokštelę duobutėmis į apačią ant nepūkuoto rankšluosčio, kad būtų pašalintas likęs plovimo buferis. Tada į kiekvieną duobutę įpilkite 100 µl fermento substrato tirpalo, kiekvieną plokštelę uždenkite dangteliu ir maišykite mikroplokštelių kratytuve.**
- 14. Inkubuokite kambario temperatūroje (22 ± 5 °C) 30 minučių.**
Inkubavimo metu plokšteles saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.
- 15. Po inkubavimo į kiekvieną duobutę įpilkite 50 µl fermento stabdymo tirpalo ir kruopščiai sumaišykite mikroplokštelių kratytuve.**
Fermento stabdymo tirpalą į duobutes reikėtų įpilti ta pačia eilės tvarka ir maždaug tuo pačiu tempu, kaip ir įpilant fermento substrato tirpalą 13 veiksmė.
- 16. Pamatuokite optinį tankį (OT) per 5 minutes nuo reakcijos sustabdymo. Naudokite mikroplokštelėms skirtą skaitymo įrenginį, kuriame yra 450 nm filtras ir nuo 620 iki 650 nm referencijos filtras. OT reikšmės yra reikalingos skaičiuojant rezultatus.**

Skaičiavimas ir rezultatų aiškinimas

QuantiFERON Monitor analizės programinė įranga naudojama neapdorotiems duomenims analizuoti ir rezultatams skaičiuoti. Programinę įrangą galite gauti www.QuantiFERON.com. Būtinai naudokite naujausią QuantiFERON Monitor analizės programinės įrangos versiją.

Naudojant programinę įrangą atliekamas tyrimo kokybės kontrolės vertinimas, sudaroma standarto kreivė ir pateikiamas kiekvieno tyrimo rezultatas pagal skyriuje „Rezultatų aiškinimas“ pateiktą metodą.

Jei neskiesta plazma viršija viršutinę QFM ELISA diapazono ribą (t. y. >10 IU/ml), QuantiFERON Monitor analizės programinė įranga pateikia mažiausią atskiedimo koeficientą, pagal kurį, atsižvelgiant į atskiedimo koeficientą, sugeneruojamas į QFM ELISA diapazoną patenkantis rezultatas.

Užuot naudojus QuantiFERON Monitor analizės programinę įrangą, rezultatai gali būti nustatomi ir pagal toliau paaiškintą metodą.

Standarto kreivės sudarymas

(Kai nenaudojama QuantiFERON Monitor analizės programinė įranga)

Nustatykite komplekto standarto pakartojimų vidutines OT reikšmes ant kiekvienos plokštelės.

Sudarykite $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ standarto kreivę: pažymėkite vidutinės OT reikšmes $\log_{(e)}$ (y ašis) ir standarto IFN- γ koncentracijos $\log_{(e)}$ (x ašis), bet į šiuos skaičiavimus neįtraukite nulinio standarto. Pasitelkę regresijos analizę, apskaičiuokite liniją su labiausiai standarto kreivei tinkančia forma.

Standarto kreivę panaudokite IFN- γ koncentracijai (IU/ml) nustatyti kiekvienam tiriamam plazmos mėginiui, naudodami kiekvieno mėginio OT reikšmę.

Šiems skaičiavimams gali būti panaudoti programinės įrangos paketai, gaunami su mikroplokštelių skaitytuvais, taip pat standartinės skaičiuoklės arba statistikos programos (pvz., Microsoft® Excel®). Tokiais programinės įrangos paketais rekomenduojame naudotis atliekant regresijos analizę, skaičiuojant standartų variacijos koeficientą (%VK) bei koreliacijos koeficientą (r) standarto kreivei.

Jei neskiesta plazma viršija viršutinę QFM ELISA diapazono ribą, pateiktas rezultatas turi būti vertinamas nuo mažiausio atskiedimo koeficiento, pagal kurį, atsižvelgiant į atskiedimo koeficientą, sugeneruojamas į QFM ELISA diapazoną patenkantis rezultatas.

Testo kokybės patikrinimas

Testo rezultatų teisingumas priklauso nuo teisingos standarto kreivės sudarymo. Todėl, prieš pradėdant aiškinti testo rezultatus, turi būti patikrinti iš standartų išvesti rezultatai.

ELISA galioja, kai:

- 1 standarto vidutinė OT reikšmė privalo būti $\geq 0,600$.
- 1 ir 2 standarto replikuotų OT reikšmių %VK turi būti $\leq 15\%$.
- 3 ir 4 standarto replikuotos OT reikšmės nuo atitinkamų vidutinių reikšmių turi nukrypti ne daugiau kaip 0,040 OT vienetų.
- Iš standartų vidutinių absorbcijos reikšmių apskaičiuotas koreliacijos koeficientas (r) turi būti $\geq 0,98$.

QuantiFERON Monitor analizės programinė įranga skaičiuoja ir pateikia šiuos kokybės kontrolės parametrus.

Jeigu šie kriterijai neišpildomi, testas negalioja ir turi būti pakartotas.

Nulinio standarto (žalio skiediklio) vidutinė OT reikšmė turi būti $\leq 0,150$. Jeigu vidutinė OT reikšmė yra $> 0,150$, rekomenduojama patikrinti plokštelių plovimo procesą.

Rezultatų aiškinimas

QFM rezultatai aiškinami, atsižvelgiant į IFN- γ reakciją į įgimto ir įgyto imuniteto stimulatorius. QFM – tai tyrimas, pateikiantis tiek kokybinį, tiek kiekybinį imuniteto funkcijos įvertinimą. QFM rezultatai gali tiesiogiai neįvertinti imuninės sistemos slopinimo lygio.

Svarbu: nustatant tiriamojo imuninės sistemos būseną, išmatuotas IFN- γ lygis turėtų būti naudojamas, kartu atsižvelgiant į klinikinius simptomus, medicininę istoriją ir kitus diagnostinius vertinimus (2 lentelė). QFM testo slenkstis gali priklausyti nuo tiriamojo imuniteto slopinimo lygio ir atskirų organo persodinimo parametrų.

2 lentelė. Rezultatų aiškinimas

QFM rezultatas IFN- γ (IU/ml)	Kategorija	Aiškinimas
< 15	Silpna	Tiriamąo IFN- γ reakcija į įgimto ir įgyto imuniteto stimulatorius yra silpna
15–1 000	Vidutiniška	Tiriamąo IFN- γ reakcija į įgimto ir įgyto imuniteto stimulatorius yra vidutiniška
> 1 000	Stipri	Tiriamąo IFN- γ reakcija į įgimto ir įgyto imuniteto stimulatorius yra stipri

Jei išmatuoto neskiestos plazmos mėginio IFN- γ lygis yra mažiau nei 0,1 IU/ml:

- patikrinkite, ar QFM LyoSphere granulė buvo įdėta į kraujo mėginį, o mėgintuvėlis buvo inkubuotas, kaip aprašyta pakuotės informaciniame lapelyje;
- patikrinkite, ar IFN- γ rezultatas atitinka dabartinę tiriamąo klinikinę būseną.

Esant įtarimui, kad paimant kraują arba dirbant su kraujo mėginiais buvo techninių problemų, visas QFM testas turėtų būti pakartotas su nauju kraujo mėginiu. Jei įtariama, kad pradinio testo metu buvo nukrypta nuo pakuotės informaciniame lapelyje aprašytos procedūros, pakartokite stimuliuotų plazmos mėginių ELISA testą (išsamios informacijos žr. skyriuje „Testo kokybės patikrinimas“).

Gydytojas gali norėti pakartoti testą, jei rezultatai nesuderinami su dabartinę tiriamąo klinicine būseną.

Apribojimai

QFM testo rezultatai turi būti naudojami, atsižvelgiant į kiekvieno asmens klinikinę istoriją, esamą medicininę būklę ir kitus diagnostinius vertinimus. Laboratorijos gali nustatyti savo tyrimo diapazono ribas.

Laboratorijos taip pat gali lygiagrečiai ištirti išorinį kontrolinį mėginį, surinktą iš sveiko tiriamąo.

Nepatikimų ar netikslių rezultatų priežastys

- Netinkamas kraujo antikoaguliantas (naudokite tik ličio hepariną, nes kiti antikoaguliantai trukdo tyrimui).

- Nesilaikoma informaciniame lapelyje aprašytos procedūros.
- Yra ypač aukštos cirkuliuojančio IFN- γ koncentracijos arba yra heterofilinių antikūnų.
- Ilgesnis nei 8 val. kraujo mėginio laikymas iki inkubavimo 37 °C temperatūroje.
- QFM kraujo mėgintuvėliai papildomi per mažai arba per daug (nepatenka į 0,9–1,1 ml diapazoną).

Efektyvumo charakteristikos

Klinikinės studijos

Buvo atlikti du klinikiniai tyrimai, skirti įvertinti ir palyginti sveikų asmenų (n = 114) ir pacientų, kuriems buvo persodinti organai (n = 30), reakcijas. 18 pacientų, kuriems buvo persodinti organai, buvo tiriama ankstyvuoju laikotarpiu po persodinimo (3 mėn. po persodinimo), o 12 – vėlyvuoju laikotarpiu po persodinimo (> 12 mėn. po persodinimo arba stabilioji grupė).

- Ankstyvojo laikotarpio po persodinimo grupėje mėginiai iš kiekvieno asmens buvo surinkti daugiausia 5 kartus (3 mėn. po persodinimo, n = 64 mėginiai).
- Vėlyvojo laikotarpio po persodinimo grupėje mėginiai iš kiekvieno asmens buvo surinkti 1 kartą (n = 12 mėginių).
- Sveikų pacientų grupėje mėginiai iš kiekvieno asmens buvo surinkti 1 kartą (n = 114 mėginių).

Reakcijos į QFM svyravo nuo mažų iki vidutinių tiek ankstyvojo, tiek vėlyvojo laikotarpio po persodinimo mėginių grupėje. Ankstyvojo laikotarpio po persodinimo grupėje buvo didesnis silpnų reakcijų procentas (93,8 %) ir mažesnis vidutinių reakcijų procentas (6,3 %), palyginti su vėlyvojo laikotarpio po persodinimo grupės reakcijomis, kurių 25 % buvo silpnos ir 66,7 % vidutinio stiprumo (3 lentelė). Ankstyvojo laikotarpio po persodinimo grupėje nebuvo stiprių reakcijų ir tik 1 (8,3 %) tokia reakcija buvo vėlyvojo laikotarpio po persodinimo grupėje. QFM reakcijos sveikų asmenų grupėje daugiausia buvo vidutinio stiprumo (83,3 %) ir stiprios (15,8 %) (3 lentelė).

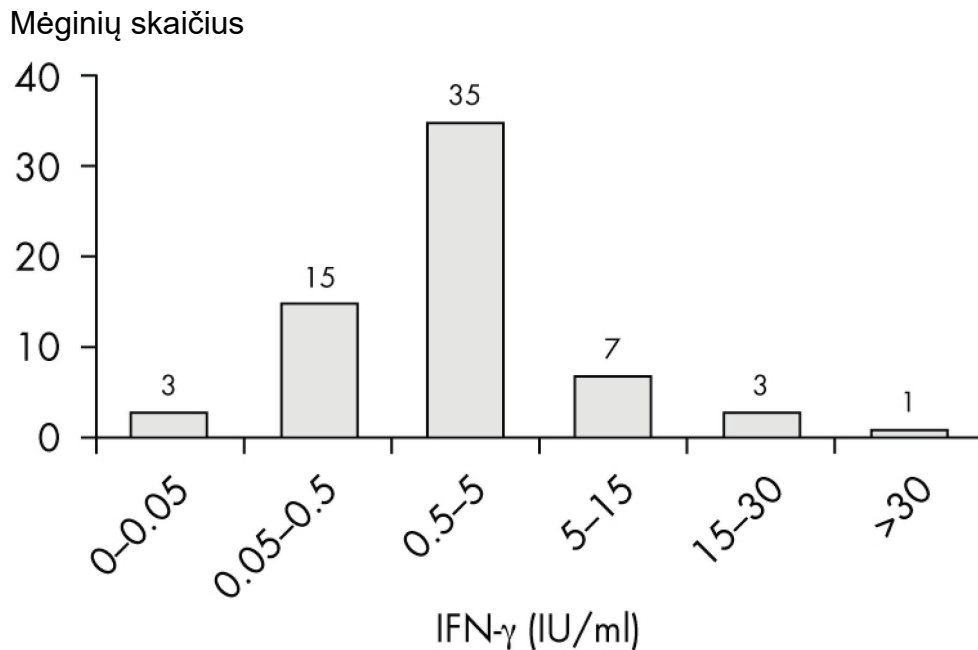
3 lentelė. QFM reakcijų diapazonas sveikų tiriamųjų ir asmenų, kuriems buvo persodinti organai, grupėse

IFN- γ (IU/ml)	Rezultatų kategorija	Ankstyv. po perso- dinimo %* 95 % CI n	Vėlyv. po perso- dinimo %* 95 % CI n	Sveiki %* 95 % CI n	Iš viso
< 15	Silpna	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	Vidutiniška	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	Stipri	0,0 % 0–5,7 n = 0	8,3 % 1,5–35,4 n = 1	15,8 % 10,2–23,6 n = 18	19
Iš viso mėginių		64	12	114	190

* Procentai rodo kiekvienos donorų grupės mėginių proporciją, patenkančią į konkretų reakcijų diapazoną.

Tikėtinos reikšmės

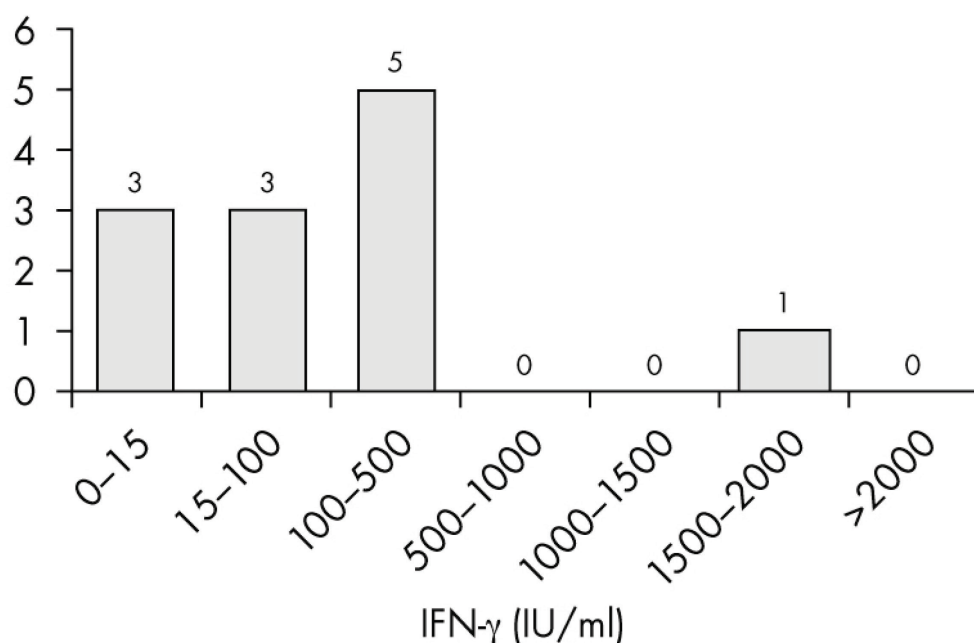
IFN- γ reakcijų į QFM pasiskirstymas ankstyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų grupėje (iki 3 mėn. po persodinimo) buvo nustatytas, naudojant QFM ELISA metodą, iš 64 mėginių, surinktų iš 18 pacientų, kuriems buvo persodinti organai (3 pav.).



3 pav. QFM IFN- γ reakcijų pasiskirstymas ankstyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų grupėje (n = 64; mediana = 1,5 IU/ml).

IFN- γ reakcijų į QFM pasiskirstymas vėlyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų grupėje (> 12 mėn. po persodinimo) buvo nustatytas, naudojant QFM ELISA metodą, iš 12 mėginių (4 pav.).

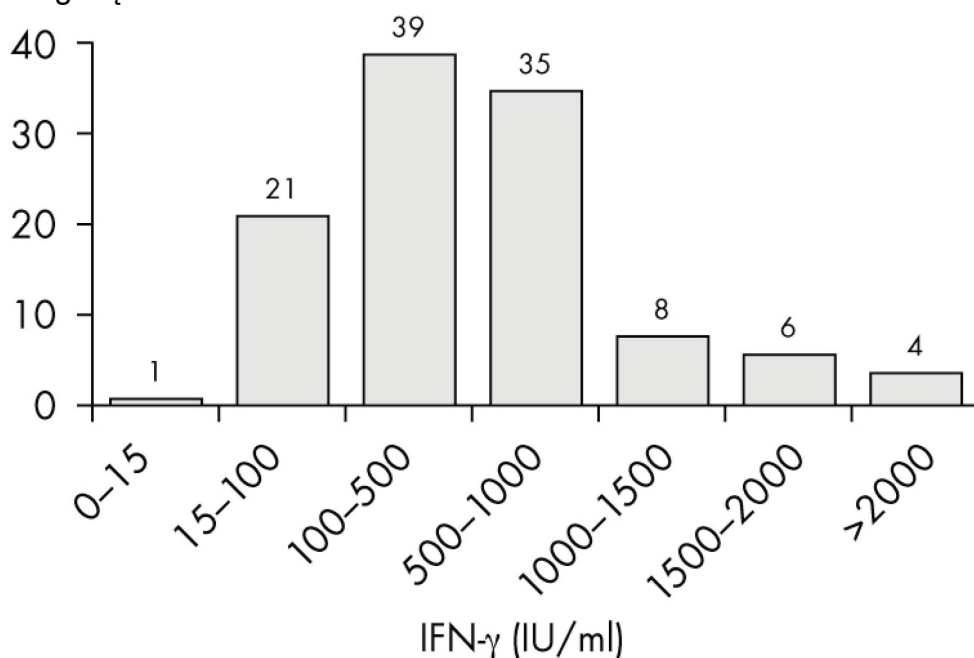
Mėginių skaičius



4 pav. QFM IFN- γ reakcijų pasiskirstymas vėlyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų grupėje (n = 12; mediana = 98,8 IU/ml).

IFN- γ reakcijų į QuantiFERON Monitor pasiskirstymas sveikų tiriamųjų grupėje buvo nustatytas, naudojant QFM ELISA metoda, iš 114 mėginių (5 pav.).

Mėginių skaičius



5 pav. QFM IFN- γ reakcijų pasiskirstymas sveikų tiriamųjų grupėje (n = 114; mediana = 400,5 IU/ml).

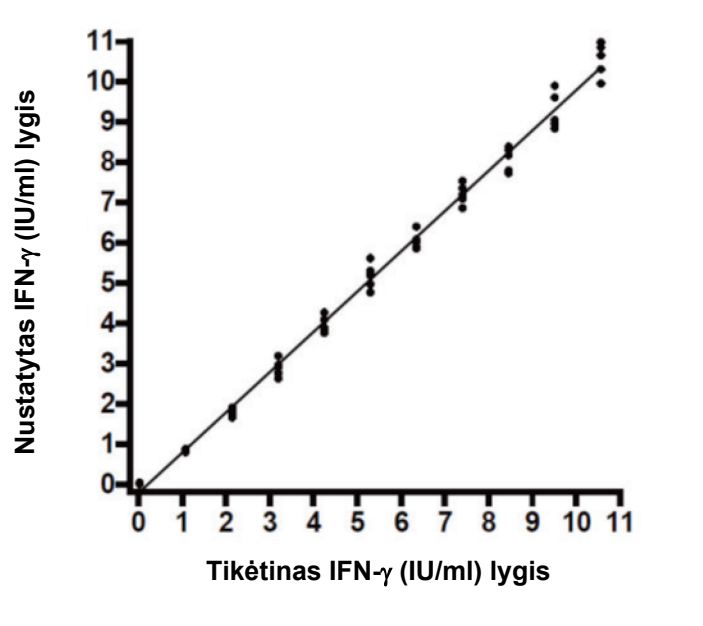
Pacientų su persodintais vientisais organais QFM reakcijos

QFM buvo vertinamas atliekant stebint pacientus su persodintais vientisais organais ir atliekant skerspjūvio analizės tyrimą (4). Tyrimo imtis: 212 sveikų tiriamųjų, tarp kurių buvo 30 pagal amžių ir lytį atrinktų asmenų kontrolinė grupė, 30 persodinimo laukiančių pacientų, 18 ankstyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų (66 mėginių; vidutinis laikas po persodinimo = 21 d.) ir 11 vėlyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų (vidutinis laikas po persodinimo = 2290 d.). Vidutinis IFN- γ buvo 555,2 IU/ml tarp sveikų kontrolinės grupės pacientų ir 614,6 IU/ml tarp kontrolinės grupės pagal amžių ir lytį asmenų. Vidutinis IFN- γ buvo gerokai mažesnis persodinimo laukiančių (IFN- γ = 89,3 IU/ml) ir ankstyvojo laikotarpio po persodinimo (IFN- γ = 3,76 IU/ml) pacientų grupėse, palyginti su kontrolinės grupės pagal amžių ir lytį asmenimis ($p < 0,001$). Buvo stebimas imuniteto funkcijos atkūrimas vėlyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų grupėje (vidutinis IFN- γ = 256,1 IU/ml), ir jis buvo gerokai didesnis nei ankstyvojo laikotarpio po persodinimo pacientų grupėje ($p < 0,05$). Šis tyrimas rodo, kad QFM galima naudoti ląstelinei imuninei reakcijai vertinti žmonių, kuriems buvo persodinti vientisi organai ir kurių imunitetas slopinamas, organizmuose.

Tyrimo atlikimo charakteristikos

QFM ELISA testo linijškumas įrodytas, žinomos IFN- γ koncentracijos 11 plazmos telkinių 5 pakartojimus padėjus atsitiktine tvarka ELISA plokštelėje. Tiesinė regresinė linija turi $1,002 \pm 0,011$ nuožulnų kilimą ir 0,99 koreliacijos koeficientą (6 pav.).

QFM ELISA testo aptikimo riba yra 0,065 IU/ml ir nepateikiama jokių prozono efekto įrodymų, kai IFN- γ koncentracijai yra iki 10 000 IU/ml.



6 pav. QFM ELISA tiesinis profilis nustatytas ištyrus 11 žinomos IFN- γ koncentracijos plazmos mėginių (5 dublikatus).

QFM tyrimo atgaminamumas (1 etapas) buvo nustatytas, naudojant 20 sveikų tiriamųjų kraujo mėginius. Buvo vertinami trys skirtingi operatoriai, QFM LyoSphere partijos ir įrangos rinkiniai. Vidutinis IFN- γ reakcijos lygio pokyčių koeficientas, nustatytas naudojant QFM ELISA metodą visose trijose QFM LyoSpheres partijose ir visomis trimis tirtomis sąlygomis, buvo 22,22 % (95 % CI: 17,20–27,25).

QFM tyrimo atkartojamumas (1 etapas) buvo vertinamas matuojant 5–6 pakartotinių QFM LyoSphere kraujo stimuliacijų kintamumą to paties donoro 14 tiriamųjų organizmuose. Vidutinis kintamumo koeficientas tarp tirtų 14 tiriamųjų buvo 14,7 % (95 % CI: 10,2–19,2). Atskirų tiriamųjų %VK buvo mažiau nei 30 %.

QFM ELISA testo atgaminamumas (2 etapas) buvo apskaičiuotas tiriant 20 plazmos mėginių, esant įvairioms IFN- γ 3 pakartojimų koncentracijoms, 3 operatoriams tyrimą atliekant 3 laboratorijose per 3 ne paeiliui einančias dienas. Taigi kiekvienas mėginys buvo tirtas 27 kartus vykdant 9 nepriklausomus tyrimo seansus. Vienas mėginys buvo nulinė kontrolė, o apskaičiuota IFN- γ koncentracija buvo 0,08 IU/ml (95 % CI: 0,07–0,09). Likusių 19 plazmos

mėginių koncentracija buvo nuo 0,33 (95 % CI: 0,31–0,34) iki 7,7 IU/ml (95 % CI: 7,48–7,92).

Tyrimo arba vidinis tyrimo netikslumas apskaičiuotas išvedus %VK vidurkį kiekvienam plazmos mėginiui su IFN- γ (mėginį imant iš kiekvienos plokštelės (n = 9), o netikslumo %VK svyravo nuo 4,1 iki 9,1. Vykdyto %VK vidurkis (\pm 95 % CI) buvo $6,6 \pm 0,6$ %. Nulinio mėgintuvėlio IFN- γ plazmos vidurkis buvo 14,1 %VK.

Bendras netikslumas tarp tyrimų buvo nustatytas palyginus 27 apskaičiuotas kiekvieno plazmos mėginio IFN- γ koncentracijas. Netikslumas tarp tyrimų buvo nuo 6,6 iki 12,3 %VK. Bendras %VK vidurkis (\pm 95 % CI) buvo $8,7 \pm 0,7$ %. Nulinio mėgintuvėlio IFN- γ plazmos rezultatas buvo 26,1 %VK. Šis svyravimo lygmuo yra tikėtinas, nes apskaičiuota IFN- γ koncentracija yra maža ir dėl to svyravimai bus didesni, nei esant didesnei koncentracijai.

Techninė informacija

Sukrešę plazmos mėginiai

Jeigu plazmos mėginius laikant ilgesnį laiką susidaro fibrino krešulių, mėginius reikia centrifuguoti iki nuosėdų susidarymo; tai palengvina plazmos lašinimą pipete.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Norėdami gauti daugiau informacijos žr. techninę informaciją, pateiktą www.QuantiFERON.com. Norėdami susisiekti žr. galinį viršelį.

ELISA trikčių šalinimas

Nespecifinės spalvos atsiradimas

Galima priežastis	Sprendimas
a) Nepakankamai švariai išplautos plokštelės	Plokštelę plaukite mažiausiai 6 kartus po 400 µl plovimo buferio į duobutę. Atsižvelgiant į naudojamą plovimo aparatą, gali prireikti daugiau nei 6 plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų bent 5 sekundes pamirkyti.
b) Kryžminis ELISA duobučių užteršimas	Norėdami sumažinti riziką iki minimumo, pipete lašinkite ir maišykite mėginį atsargiai.
c) Pasibaigęs komplekto / komplekto sudėtinių dalių galiojimo laikas	Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100× koncentratas buvo naudoti 3 mėnesių laikotarpiu nuo atkūrimo.
d) Fermento substrato tirpalas yra užterštas	Išmeskite substratą, jeigu nusidažo mėlynai. Įsitikinkite, kad naudojamos švarios reagentų talpyklos.
e) Plazmos maišymas QFM mėgintuvėliuose prieš paimant plazmos mėginį	Po centrifugavimo ir prieš plazmos paėmimą kiekvienu atveju venkite mėginius traukyti pipete aukštyn ir žemyn arba plazmą sumaišyti. Visuomet dirbkite kruopščiai, kad nesujudintumėte medžiagos prie gelio paviršiaus.

Žema standartų optinio tankio reikšmė

Galima priežastis	Sprendimas
a) Standarto skiedinio ruošimo klaida	Komplekto standarto skiedinius paruoškite tiksliai laikydamiesi pakuotės informaciniame lapelyje pateiktų nurodymų.
b) Klaida naudojantis pipete	Patikrinkite, ar pipetės yra kalibruotos ir naudojamos tiksliai pagal gamintojo nurodymus.
c) Per žema inkubacijos temperatūra	ELISA inkubacija turėtų vykti kambario temperatūroje (17–27 °C).

ELISA trikčių šalinimas

- | | |
|---|--|
| d) Per trumpos inkubacijos laikas | Inkubuokite plokštelę su konjugatu, standartais ir mėginiais 120 ± 5 min. Inkubuokite fermento substrato tirpalą ant plokštelės 30 minučių. |
| e) Naudojamas netinkamas plokštelių skaitytuvo filtras | Plokštelės rezultatai turėtų būti skaitomi prie 450 nm naudojant 620–650 nm referencijos filtrą. |
| f) Per šalti reagentai | Visi reagentai (išskyrus konjugato $100\times$ koncentratą) prieš pradėdant tyrimą turi būti kambario temperatūros. Ją pasiekti trunka apie vieną valandą. |
| g) Pasibaigęs komplekto / komplekto sudėtinų dalių galiojimo laikas | Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato $100\times$ koncentratas buvo naudoti 3 mėnesių laikotarpiu nuo atkūrimo. |

Didelis fonas

- | Galima priežastis | Sprendimas |
|---|--|
| a) Nepakankamai švariai išplautos plokštelės | Plokštelę plaukite mažiausiai 6 kartus po 400 μ l plovimo buferio į duobutę. Atsižvelgiant į naudojamą plovimo aparatą, gali prireikti daugiau nei 6 plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų bent 5 sekundes pamirkyti. |
| b) Per aukšta inkubacijos temperatūra | ELISA inkubacija turėtų vykti kambario temperatūroje ($17\text{--}27$ °C). |
| c) Pasibaigęs komplekto / komplekto sudėtinų dalių galiojimo laikas | Patikrinkite, ar nepasibaigęs komplekto galiojimo laikas. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato $100\times$ koncentratas buvo naudoti trijų mėnesių laikotarpyje nuo atkūrimo. |
| d) Fermento substrato tirpalas yra užterštas | Išmeskite substratą, jeigu nusidažo mėlynai. Įsitikinkite, kad naudojamos švarios reagentų talpyklos. |

Nelinijinė standarto kreivė ir dvigubas kintamumas

- | Galima priežastis | Sprendimas |
|--|--|
| a) Nepakankamai švariai išplautos plokštelės | Plokštelę plaukite mažiausiai 6 kartus po 400 μ l plovimo buferio į duobutę. Atsižvelgiant į naudojamą plovimo aparatą, gali prireikti daugiau nei 6 plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų bent 5 sekundes pamirkyti. |

ELISA trikčių šalinimas

- | | |
|---|---|
| b) Standarto skiedinio ruošimo klaida | Standarto skiedinius paruoškite tiksliai laikydamiesi pakuotės informaciniame lapelyje pateiktų nurodymų. |
| c) Nepakankamas išmaišymas | Prieš pildami duobutes kruopščiai sumaišykite reagentus apversdami arba lengvai pasukiodami. |
| d) Netolygus lašinimas pipete arba pertraukimas pasirengimo tyrimo metu | Mėginių ir standartų pylimas turėtų vykti nenutrūkstamai. Visi reagentai turi būti paruošti prieš pradėdant tyrimą. |













Produkto informaciją ir technines nuorodas gausite nemokamai iš QIAGEN, per platintoją arba apsilankę www.QuantiFERON.com.

Literatūra

Bendrą literatūros sąrašą apie QFM rasite Gnowee – QuantiFERON nuorodų bibliotekoje 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.

Simboliai

 2 × 96	Pakanka 2 × 96 mėginių paruošimui
	Teisėtas gamintojas
	CE-IVD žymėjimo simbolis
	Skirtas „in vitro“ diagnostikai
	Partijos kodas
	Katalogo numeris
	Tinka iki datos
	Temperatūros apribojimai
	Skaitykite naudojimo instrukcijas
	Nenaudoti pakartotinai
	Saugoti nuo saulės šviesos
	Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje

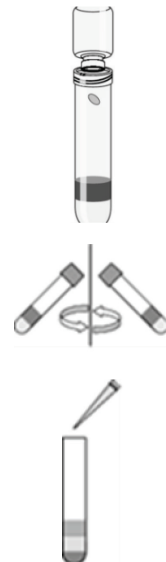
Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, skambinkite nemokamu tel. 00800-22-44-6000, apsilankykite mūsų Techninės pagalbos centre adresu www.qiagen.com/Support arba kreipkitės į vieną iš mūsų QIAGEN Techninio aptarnavimo skyrių (žr. viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Trumpas testo procedūros aprašas

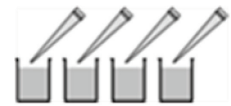
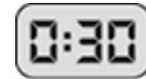
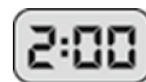
1 etapas. Kraujo mėginio inkubavimas

1. Surinkite paciento kraują į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį arba ličio heparino kraujo surinkimo mėgintuvėlį. Ant mėgintuvėlių etikečių nurodykite informaciją apie pacientą ir kraujo surinkimo laiką, tada per 8 val. nuo surinkimo nugabenkite į laboratoriją, esant kambario temperatūrai.
 - a. Jei kraujas buvo surinktas į ličio heparino kraujo surinkimo mėgintuvėlį, perpilkite 1 ml kraujo alikvoto į QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį ir pažymėkite mėgintuvėlių etiketėje informaciją apie pacientą bei kraujo surinkimo laiką.
2. Į kiekvieną QFM kraujo surinkimo mėgintuvėlį, kuriame yra 1 ml kraujo, įdėkite 1 QFM LyoSphere granulę, ištirpdykite ją ir kaip įmanoma greičiau mėgintuvėlius inkubuokite (per 8 val. nuo kraujo surinkimo) **vertikaliaje** padėtyje 16–24 val., esant 37 °C.
3. Po inkubavimo esant 2 000–3 000 × *g* (RCF) mėgintuvėlius 15 minučių centrifuguokite, kad plazma atsiskirtų nuo raudonųjų kraujo ląstelių.
4. Po centrifugavimo ir prieš plazmos paėmimą kiekvienu atveju venkite mėginius traukyti pipete aukštyn ir žemyn arba plazmą sumaišyti. Visuomet dirbkite kruopščiai, kad nesujudintumėte medžiagos prie gelio paviršiaus.



2 etapas. IFN- γ ELISA

1. ELISA komponentus, neįskaitant konjugato 100 \times koncentrato, palikite mažiausiai 60 minučių pastovėti, kad susilygintų su kambario temperatūra.
2. Komplekto standartą atkurkite naudodami 8,0 IU/ml distiliuoto arba dejonizuoto vandens. Pagaminkite 4 standarto skiedinius.
3. Naudodami distiliuotą arba dejonizuotą vandenį atkurkite liofilizuotą konjugato 100 \times koncentratą.
4. Pagaminkite darbui reikiamo stiprumo konjugatą su žaliu skiedikliu ir į visas duobutes įpilkite po 50 μ l.
5. Į atitinkamas duobutes įpilkite po 50 μ l tiriamo plazmos mėginio (neskiesto, 1:10 ir 1:100 skiedinius, atsižvelgiant į tai, koks naudojamas) ir 50 μ l standartinio mišinio. Išmaišykite naudodami kratytuvą.
6. 120 \pm 5 minučių inkubuokite kambario temperatūroje.
7. Duobutes plaukite mažiausiai 6 kartus įpildami po 400 μ l plovimo buferio į duobutę.
8. Į kiekvieną duobutę įpilkite po 100 μ l fermento substrato tirpalo. Išmaišykite naudodami kratytuvą.
9. 30 minučių inkubuokite kambario temperatūroje.
10. Į kiekvieną duobutę įpilkite po 50 μ l fermento stabdymo tirpalo. Išmaišykite naudodami kratytuvą.
11. Matuokite rezultatus prie 450 nm naudodami 620–650 nm referencijos filtrą.
12. Analizuokite rezultatus.



Pastabos

Svarbūs Pakeitimai

Svarbūs šios QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA pakuotės informacinio lapelio leidimo pakeitimai apibendrinti šioje lentelėje:

Skyrius	Puslapis	Pakeitimas (-ai)
Atsargumo priemonės	11	Nauja GHS informacija
Atsargumo priemonės	12	Pridėti saugos nurodymai, susiję su buteliukais, uždengtais metaliniais dangteliais.

Prekių ženklai: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (QIAGEN grupė); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLymph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

QuantiFERON Monitor komplekto ribotoji licencinė sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektualinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, esančiuose www.qiagen.com. QIAGEN vartotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis komplektas ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Komplektui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Komplekto pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo komplektu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektualinę nuosavybę.

Naujausios licencijos sąlygos pateiktos adresu www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN. Visos teisės saugomos.

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

