

Duben 2022

Návod k použití soupravy QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 ELISA Kit



Verze 1



Pro diagnostické použití in vitro

Pro použití s odběrovými zkumavkami QuantiFERON[®] SARS-CoV-2
Blood Collection Tube



626420



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



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Německo



1124420CS

Obsah

Účel použití.....	5
Určený uživatel.....	6
Popis a principy.....	7
Shrnutí a vysvětlení.....	7
Dodávané materiály.....	9
Obsah soupravy.....	9
Součásti soupravy.....	10
Platforma a software.....	10
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky.....	11
Další reagentie.....	11
Vybavení.....	11
Varování a bezpečnostní opatření.....	12
Informace o bezpečnosti.....	12
Bezpečnostní opatření.....	13
Skladování reagentií a manipulace s nimi.....	16
Stabilita při používání.....	16
Rekonstituovaná a nepoužitá činidla.....	16
Uchovávání vzorku a manipulace s ním.....	17
Postup: Provedení analýzy ELISA.....	18
Protokol: IFN- γ ELISA.....	18
Výsledky (výpočty).....	23
Generování standardní křivky a hodnot vzorků.....	23

Kontrola kvality testu	25
Interpretace výsledků	27
Omezení	28
Charakteristika funkčních vlastností analýzy	29
Analytická účinnost	29
Klinická účinnost	38
Literatura	45
Návod na řešení potíží	50
Symboly	53
Kontaktní údaje	54
Příloha A: Technické údaje	55
Nejednoznačné výsledky	55
Sražení vzorků plazmy	55
Lipemické vzorky plazmy	55
Příloha B: Zkrácený postup testu ELISA	56
Informace pro objednání	58
Historie revízi dokumentu	59

Účel použití

Analýza QuantiFERON SARS-CoV-2 je diagnostický test in vitro, určený ke kvalitativní detekci interferonu- γ (IFN- γ) produkovaného T-buňkami CD4+ a CD8+ v reakci na stimulaci koktejlem peptidů viru SARS-CoV-2 v heparinizované plné krvi. Množství produkovaného IFN- γ se měří pomocí enzymatické imunisorpční analýzy (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

Analýza QuantiFERON SARS-CoV-2 je určena jako pomůcka při posuzování buněčné imunitní (Cell-Mediated Immune, CMI) odpovědi u osob, které neprodělaly infekci virem SARS-CoV-2 a které byly očkovány proti onemocnění COVID-19 s použitím vakcín zaměřených na virový spike (S) protein viru SARS-CoV-2.

Analýza QuantiFERON SARS-CoV-2 by k posouzení imunitní odpovědi jedince, vyvolané očkováním proti onemocnění COVID-19, měla být používána ve spojení s dalšími laboratorními testy a epidemiologickým/klinickým hodnocením.

Rozvoj imunitní odpovědi T-buněk může trvat několik dní po očkování, ačkoli doba trvání imunitní odpovědi T-buněk není u očkovaných osob dobře charakterizována.

Nereaktivní výsledky nevyklučují aktivní infekci SARS-CoV-2 ani neurčují účinnost vakcín proti onemocnění COVID-19. Při podezření na aktivní infekci ji potvrďte pomocí jiného molekulárního nebo antigenního testu na virus SARS-CoV-2. Výsledky analýzy by měly být vždy použity v kombinaci s klinickým vyšetřením, anamnézou pacienta a dalšími nálezy.

Pro diagnostické použití in vitro.

Určený uživatel

Tato sada je určena pro profesionální použití.

Tento výrobek je určen k použití personálem speciálně instruovaným a vyškoleným v technikách molekulární biologie, který je důkladně obeznámen s touto technologií.

Popis a principy

Shrnutí a vysvětlení

QuantIFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) je kvalitativní analýza, která využívá specializované zkumavky pro odběr krve obsahující peptidové antigeny, jež stimulují imunitní buňky pomocí specifických proteinů viru SARS CoV-2. Inkubace krve probíhá ve zkumavkách po dobu 16 až 24 hodin. Po této době se odebere plazma, která je testována na přítomnost IFN- γ produkovaného v reakci na peptidové antigeny. U jedinců po očkování různými typy vakcín zaměřených na spike protein byly zaznamenány specifické, T-buňkami zprostředkované reakce na infekci virem SARS-CoV-2 [1–34].

Nejprve se do jednotlivých odběrových zkumavek QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube, mezi které patří zkumavka Nil, zkumavka Ag1, Ag2 a zkumavka Mitogen, odebere plná krev. Krev může být případně odebrána do jedné odběrové zkumavky obsahující heparin lithný nebo sodný jako antikoagulant a poté přenesena do zkumavek QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube.

Zkumavky QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube se protřepají, aby došlo ke smísení antigenu s krví a je nutné je co nejdříve inkubovat při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (do 16 hodin od odběru). Po uplynutí 16 až 24 hodin inkubace se zkumavky odstředí, plazma se zpracuje a změří se množství IFN- γ (IU/ml) pomocí analýzy ELISA. Analýza QuantIFERON SARS-CoV-2 ELISA využívá standardní rekombinantní lidský IFN- γ , jenž byl srovnán s referenčním přípravkem IFN- γ (ref. NIH: Gxg01-902-535). Výsledky testů vzorků jsou uvedeny v mezinárodních jednotkách IU na ml (IU/ml) podle standardní křivky připravené testováním ředění standardu dodávaného spolu se soupravou.

Je známo, že heterofilní (např. lidské protimyší) protilátky v séru nebo plazmě určitých jedinců způsobují interferenci s imunitními analýzami. Vliv heterofilních protilátek je v analýze QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA minimalizován přidáním normálního myšího séra do zeleného ředicího roztoku a použitím monoklonálních fragmentů protilátek F(ab')₂ jako protilátky k zachycení IFN- γ , kterou jsou potaženy jamky mikrotitračních destiček.

Vzorek plazmy ze zkumavky Mitogen slouží jako pozitivní kontrola IFN- γ pro každý testovaný vzorek. Zkumavka Nil upravuje pozadí (např. zvýšené hladiny IFN- γ v krevním oběhu nebo přítomnost heterofilních protilátek). Hladina IFN- γ ze zkumavky Nil je odečtena od hladiny IFN- γ ze zkumavek Ag1, Ag2 a Mitogen.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

Součásti analýzy ELISA	Souprava se 2 destičkami
Katalogové č.	626420
Microplate Strips (Stripy s mikrotitračními destičkami, 12 × 8 jamek) pokryté myší monoklonální protilátkou proti lidskému IFN- γ	2 sady stripů mikrotitračních destiček s 12 × 8 jamkami
IFN- γ Standard (standardní IFN-gama), lyofylizovaný (obsahuje rekombinantní lidský IFN- γ , bovinní kasein, Thimerosal 0,01 % hm./obj.)	1 × lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)
Green Diluent (Zelený ředící roztok) (obsahuje bovinní kasein, normální myší sérum, Thimerosal 0,01 % hm./obj.)	1 × 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Konjugát 100× koncentrát), lyofilizovaný (myší protilátkou proti lidskému IFN- γ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01 %)	1 × 0,3 ml (po rekonstituci)
Wash Buffer 20x Concentrate (20× koncentrát promývacího činidla) (pH 7,2; obsahuje 0,05 % obj. ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztok enzymového substrátu; obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Zastavovací roztok enzymů; obsahuje 0,5M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
<i>Návod k použití soupravy QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit</i>	1

* Obsahuje kyselinu sírovou

Součásti soupravy

Kontroly a kalibrátory

Analýza QFN SARS ELISA využívá rekombinantní lidský IFN- γ standard, jenž byl srovnán s referenčním přípravkem IFN- γ (ref. NIH: Gxg01-902-535).

Platforma a software

Pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků může být volitelně použit software pro analýzu QFN SARS. Ten je k dispozici ke stažení na webových stránkách **www.qiagen.com**.

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Další reagentie

- Deionizovaná nebo destilovaná voda, 2 litry

Vybavení*

- Inkubátor 37 ± 1 °C (s nebo bez CO₂)
- Kalibrované pipety s proměnným objemem pro dávkování 10 µl až 1 000 µl s jednorázovými špičkami
- Kalibrovaná vícekanálová pipeta pro dávkování 50 µl a 100 µl s jednorázovými špičkami
- Třepačka mikrotitračních destiček s rychlostí od 500 do 1 000 otáček za minutu
- Promývačka mikrotitračních destiček (z důvodu bezpečnosti při manipulaci se vzorky plazmy se doporučuje automatická promývačka destiček)
- Čtečka mikrotitračních destiček s filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm
- Vortex s proměnlivou rychlostí
- Odstředivka schopná odstředit zkumavky na odběr krve alespoň na 3 000 RCF (g)
- Odměrný válec, 1 litr nebo 2 litry
- Víčko destičky
- Savé utěrky neuvolňující vlákna

* Před použitím zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

Varování a bezpečnostní opatření

Zákazníci v Evropské unii by měli vzít na vědomí, že od nich může být vyžadováno nahlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobci a kompetentnímu orgánu členského státu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.


Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v praktickém a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou soupravu QIAGEN i pro každou součást těchto souprav.

- Veškeré chemikálie a biologické materiály jsou potenciálně nebezpečné. Vzorky a alikvoty jsou potenciálně infekční, a musí se s nimi proto zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály.
- Alikvoty a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Vzorky a alikvoty jsou potenciálně infekční. Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Analýza QFN SARS by k posouzení imunitní odpovědi jedince, vyvolané očkováním proti onemocnění COVID-19, měla být používána ve spojení s dalšími laboratorními testy a epidemiologickým/klinickým hodnocením.
- Nereaktivní výsledek QFN SARS nevylučuje možnost infekce virem SARS-CoV-2 ani nestanovuje účinnost vakcín proti onemocnění COVID-19. Falešně nereaktivní výsledky mohou být způsobeny nesprávnou manipulací s odběrovými zkumavkami po venepunkci, nesprávným provedením analýzy nebo jinými individuálními imunologickými proměnnými včetně těch, které souvisejí s případnými komorbiditami. Heterofilní protilátky nebo nespecifická produkce IFN- γ při jiných zánětlivých stavech mohou specifické reakce na peptidy viru SARS-CoV-2 maskovat.

- **Reaktivní výsledek QFN SARS by neměl být jediným nebo definitivním základem pro stanovení účinnosti vakcíny proti onemocnění COVID-19. Nesprávné provedení analýzy může způsobit falešně reaktivní výsledky QFN SARS.**
- **Falešně reaktivní výsledek QFN SARS může být způsoben nesprávným odběrem alikvotu krve nebo nesprávnou manipulací se vzorkem ovlivňující funkci lymfocytů. Správné zacházení se vzorky krve naleznete v části „Postup: Provedení analýzy ELISA“ na straně 18. Prodleva v inkubaci může způsobit falešně nereaktivní nebo nejednoznačné výsledky a další technické parametry mohou ovlivnit schopnost detekovat významnou odpověď IFN- γ .**
- **Nízká odezva na Mitogen (< 0,5 IU/ml) označuje nejednoznačný výsledek, pokud má vzorek krve také nereaktivní odezvu na proteiny viru SARS-CoV-2. K této situaci může docházet při nedostatku lymfocytů, snížené aktivitě lymfocytů v důsledku nesprávného zacházení se vzorkem, nesprávného plnění/mísení zkumavky Mitogen nebo neschopnosti lymfocytů pacienta vytvářet IFN- γ . Při přítomnosti heterofilních protilátek nebo vlastního sekretu IFN- γ se mohou ve vzorku Nil objevit zvýšené hladiny IFN- γ .**

Bezpečnostní opatření

<p>UPOZORNĚNÍ</p> 	<p>S lidskou krví zacházejte jako s potenciálně infekční.</p> <p>Dodržujte příslušné postupy pro zacházení s krví. Vzorky a materiály, které byly v kontaktu s krví nebo krevními produkty, likvidujte v souladu s federálními, státními a místními předpisy.</p>
--	---

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Obsahuje: kyselinu sírovou. Varování! Může způsobovat korozi kovů. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Varování! Způsobuje mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

QuantiFERON Green Diluent



Obsahuje: tartrazin. Varování! Může vyvolat alergickou kožní reakci. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Škodlivý pro vodní organismy s dlouhodobými účinky. Zabraňte uvolnění do prostředí.

Další informace

Bezpečnostní listy: www.qiagen.com/safety

- Thimerosal se používá jako konzervační látka v některých reagentech QFN SARS. Může být toxický po požití, vdechnutí nebo styku s kůží.
- Odchytky od pokynů, které jsou uvedeny v *návodu k použití soupravy QuantiFERON ELISA Kit*, mohou způsobit chybné výsledky. Před použitím si prosím pečlivě přečtete pokyny.
- Nepoužívejte soupravu, pokud jakákoliv láhev s čínidlem vykazuje před použitím známky poškození nebo netěsnosti.
- **Důležité:** Před použitím zkontrolujte lahvičky. Nepoužívejte konjugované lahvičky ani lahvičky standardního IFN- γ , pokud vykazují známky poškození nebo pokud došlo k porušení pryžového těsnění. Nemanipulujte s poškozenými lahvičkami. S použitím náležitých bezpečnostních opatření lahvičky bezpečně zlikvidujte. K otevření konjugovaných lahviček nebo lahviček standardního IFN- γ doporučujeme použít dekrimpovací kleštičky, čímž se minimalizuje riziko zranění kovovým zvlněným víčkem.

-
- Nepoužívejte společně stripy mikrotitračních destiček, standardní IFN- γ , zelený ředící roztok nebo konjugát 100 \times koncentrát z různých šarží souprav QFN SARS. Ostatní reagentie (20 \times koncentrát promývacího pufru, roztok enzymového substrátu a zastavovací roztok enzymů) mohou být používány z různých šarží souprav za předpokladu, že u nich nevypršela doba použitelnosti a že jsou zaznamenány informace o dané šarži.
 - Nepoužité reagentie a biologické vzorky zlikvidujte v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
 - Nepoužívejte soupravu QFN SARS ELISA po vypršení doby použitelnosti.
 - Vždy je nutno dodržovat správné laboratorní postupy.
 - Ujistěte se, že laboratorní vybavení, například promývačky a čtečky destiček, byly kalibrovány/validovány pro použití.

Skladování reagensů a manipulace s nimi

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.

Stabilita při používání

- Soupravu ELISA skladujte při teplotě 2–8 °C.
- Roztok enzymového substrátu vždy chraňte před přímým slunečním světlem.

Rekonstituovaná a nepoužitá činidla

- Pokyny ke způsobu rekonstituce reagensů obsahuje část „Postup: Provedení analýzy ELISA“ na straně 18.
- Rekonstituovaný standard soupravy může být uchováván až po dobu 3 měsíců, pokud je skladován při teplotě 2–8 °C.
Poznačte si datum, kdy byl standard soupravy rekonstituován.
- Po rekonstituci musí být konjugát 100× koncentrát převeden zpět na skladovací teplotu 2–8 °C a musí být spotřebován do 3 měsíců.
Poznačte si datum, kdy byl konjugát rekonstituován.
- Pracovní roztok konjugátu musí být použit do 6 hodin od přípravy.
- Pracovní roztok promývacího pufru může být uchován při pokojové teplotě po dobu až 2 týdnů.

Uchovávání vzorku a manipulace s ním

Podrobnosti o postupu odběru krve pro test QFN SARS naleznete v *návodu k použití zkumavek QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tube (1124422)*.

Postup: Provedení analýzy ELISA

Protokol: IFN- γ ELISA

Důležité aspekty

- Materiál potřebný k provedení analýzy ELISA je uveden v části „Obsah soupravy“, strana 9 a „Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky“, strana 11.

Nastavení (čas potřebný k provedení analýzy)

Aby bylo možné získat platné výsledky analýzy QFN SARS, musí obsluha provádět specifické úkony ve stanovených časech. Před použitím analýzy se doporučuje, aby operátor pečlivě naplánoval každou fázi analýzy, aby měl na provedení každé fáze dostatek času. Odhadovaný potřebný čas je uveden níže; je také uveden čas potřebný k testování více vzorků v dávkovém zpracování.

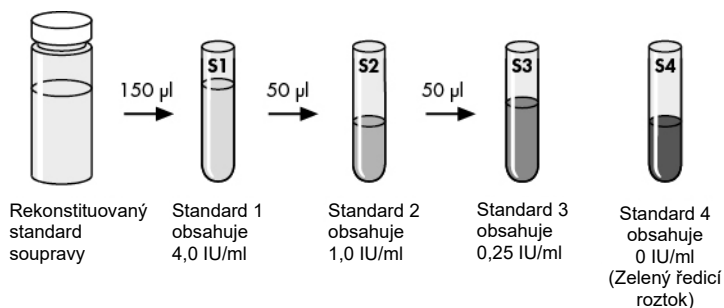
- Přibližně 3 hodiny pro jednu destičku ELISA
- < 1 hodina práce
- Pro každou další destičku přidejte 10 až 15 minut

Postup

1. Všechny vzorky plazmy a reagentie, kromě konjugátu 100× koncentráту, musejí být před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). Nechte temperovat alespoň 60 minut.
2. Z rámečku destičky ELISA vyjměte stripy, které nejsou vyžadovány, opět zalepte fólií, a vraťte do chladničky do doby, kdy je budete potřebovat.
3. Ponechte alespoň 1 strip pro QFN SARS standardy a dostatečný počet stripů pro počet testovaných subjektů (viz obrázek 2, kde naleznete doporučený formát destiček). Po použití rámeček uchovejte a uzavřete pro použití se zbývajícími stripy.

- 3a. Rekonstituujte standardní IFN- γ pomocí objemu deionizované nebo destilované vody uvedeného na štítku lahvičky. Jemně promíchejte, abyste minimalizovali pění, a zajistěte, aby se celý obsah lahvičky zcela rozpustil. Rekonstitucí standardu IFN- γ na správný objem se získá roztok o koncentraci 8,0 IU/ml.
- 3b. Pomocí rekonstituovaného standardu připravte řadu ředění 4 koncentrací IFN- γ (viz obrázek 1).
- 3c. Měla by být vytvořena standardní křivka s následujícími koncentracemi IFN- γ :
- S1 (Standard 1) obsahuje 4,0 IU/ml
 - S2 (Standard 2) obsahuje 1,0 IU/ml
 - S3 (Standard 3) obsahuje 0,25 IU/ml
 - S4 (Standard 4) obsahuje 0 IU/ml (samotný zelený ředící roztok [Green Diluent, GD]).
- 3d. Standardy musejí být analyzovány alespoň v duplikátu.
- 3e. Připravte čerstvá ředění standardu soupravy pro každou relaci testu ELISA.

Postup	
A	Označte 4 zkumavky: S1, S2, S3, S4.
B	Přidejte 150 μ l GD do zkumavek S1, S2, S3, S4.
C	Přidejte 150 μ l standardu soupravy do zkumavky S1 a důkladně promíchejte.
D	Přeneste 50 μ l ze zkumavky S1 do S2 a důkladně promíchejte.
E	Přeneste 50 μ l ze zkumavky S2 do S3 a důkladně promíchejte.
F	Zelený ředící roztok (GD) samotný slouží jako nulový standard (S4).



Obrázek 1. Příprava standardní křivky s řadou ředění.

4. Rekonstituujte lyofylizovaný konjugát 100× koncentrát pomocí 0,3 ml deionizované nebo destilované vody. Jemně promíchejte, abyste minimalizovali pění, a zajistěte, aby se celý obsah lahvičky zcela rozpustil.
 - 4a. Pracovní roztok konjugátu se připravuje zředěním požadovaného množství rekonstituovaného konjugátu 100× koncentrátu v zeleném ředícím roztoku (tabulka 1).
 - 4b. Pracovní roztok konjugátu by měl být použit do 6 hodin od přípravy.
 - 4c. Ihned po použití převedte případný nespotřebovaný konjugát 100× koncentrát na skladovací teplotu 2–8 °C.

Tabulka 1. Příprava konjugátu (pracovní roztok)

Počet stripů	Objem konjugátu (100× koncentrát)	Objem zeleného ředícího roztoku
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. Vzorky plazmy odebrané ze zkumavek na odběr krve, které byly následně uloženy (ochlazeny nebo zmrazeny), před přidáním do jamky analýzy ELISA důkladně promíchejte. Vzorky plazmy lze uchovávat v odstředěných zkumavkách QFN SARS Blood Collection Tube pro odběr krve po dobu až 28 dní při teplotě 2–8 °C. Případně

Ize odebrané vzorky plazmy uchovávat po dobu až 28 dní při teplotě 2–8 °C.

Odebrané vzorky plazmy lze také skladovat po dobu až 24 měsíců při teplotě nižší než –20 °C (nejlépe při teplotě do –70 °C).

Vzorky plazmy je možné za účelem měření naplnit/používat přímo z odstředěných zkumavek na odběr krve do destičky QFN SARS ELISA.

Důležité: Jestliže mají být vzorky plazmy přeneseny přímo z odstředěných zkumavek QFN SARS Blood Collection Tube pro odběr krve, plazmu nepromíchávejte. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

6. Přidejte 50 µl čerstvě připraveného pracovního roztoku konjugátu do jednotlivých jamek destičky ELISA.
7. Přidejte 50 µl vzorku plazmy pro test do příslušných jamek (viz doporučené rozvržení destičky ELISA na obrázku 2).
8. Nakonec přidejte po 50 µl Standardů 1 až 4 do příslušných jamek destičky (viz doporučené uspořádání destičky ELISA na obrázku 2). Standardy by měly být analyzovány alespoň v duplikátu.

	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

Obrázek 2. Doporučené uspořádání destiček ELISA. S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4), 1N (vzorek 1. kontrolní plazma Nil), 1 Ag1 (vzorek 1. plazma Ag1), 1 Ag2 (vzorek 1. plazma Ag2), 1M (vzorek 1. plazma Mitogen).

9. Zakryjte destičku ELISA a promíchejte důkladně konjugát a vzorky plazmy / standardy pomocí třepačky mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty při otáčkách 500 až 1 000 ot/min. Zabraňte stříkání.

10. Zakryjte destičku ELISA a inkubujte při pokojové teplotě ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) po dobu 120 ± 5 minut. Destička ELISA by během inkubace neměla být vystavena přímému slunečnímu světlu. Odchylení od předepsaného rozmezí teplot může vést k chybným výsledkům.
11. Během inkubace destičky ELISA připravte pracovní roztok promývacího pufru. Zředte jeden díl promývacího pufru $20\times$ koncentrátu 19 díly deionizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte. K dispozici je dostatek promývacího pufru $20\times$ koncentrátu k přípravě 2 litrů pracovního promývacího pufru.
12. Po dokončení inkubace destičky ELISA promyjte jamky destičky ELISA $400\ \mu\text{l}$ pracovního roztoku promývacího pufru. Promývací krok proveďte nejméně 6krát. Při manipulaci se vzorky plazmy se z bezpečnostních důvodů doporučuje automatická promývačka destiček.

Důkladné promytí je pro výkon analýzy velmi důležité. Ujistěte se, že je každá jamka při každém promývacím cyklu úplně naplněna promývacím pufrem až po okraj. Doporučuje se ponechat jamky mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund.

Do odpadního zásobníku by měl být přidán standardní laboratorní dezinfekční prostředek a je nutné dodržovat zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.
13. Pokleptejte destičkou ELISA čelem dolů na savou utěrku (neuvolňující vlákna), abyste odstranili zbytky promývacího pufru. Do každé jamky destičky přidejte $100\ \mu\text{l}$ roztoku enzymového substrátu, zakryjte destičku víčkem a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty při otáčkách 500 až 1000 ot/min.
14. Zakryjte destičku ELISA a inkubujte při pokojové teplotě ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) po dobu 30 minut. Destička ELISA by během inkubace neměla být vystavena přímému slunečnímu světlu.
15. Po 30minutové inkubaci přidejte do každé jamky destičky $50\ \mu\text{l}$ zastavovacího roztoku enzymů, a to ve stejném pořadí jako při přidávání substrátu. Důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrotitračních destiček při otáčkách 500 až 1 000 ot/min.
16. Změřte optickou hustotu (Optical Density, OD) každé jamky destičky ELISA během 5 minut od zastavení reakce pomocí čtečky mikrotitračních destiček s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem 620 nm až 650 nm. Hodnoty OD budou použity k výpočtu výsledků.

Výsledky (výpočty)

Pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků může být použit software pro analýzu QFN SARS. Ten je k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com. Ujistěte se, že používáte nejnovější verzi softwaru pro analýzu QFN SARS.

Software provádí vyhodnocení kontroly kvality analýzy, vytváří standardní křivku a poskytuje výsledky testu pro každý subjekt, jak je uvedeno v části „Interpretace výsledků“ na straně 27. Software hlásí všechny koncentrace vyšší než 10 IU/ml jako „> 10“, protože tyto hodnoty jsou mimo validovaný lineární rozsah analýzy ELISA.

Alternativně k použití softwaru pro analýzu QFN SARS je možné výsledky stanovit dle následující metody.

Generování standardní křivky a hodnot vzorků

Pokud není použit software pro analýzu QFN SARS

Pokud není použit software pro analýzu QFN SARS, stanovení standardní křivky a určení hodnot IU/ml u vzorku vyžaduje tabulkový procesor, například Microsoft® Excel®.

Použití tabulkového procesoru

1. Určete střední hodnoty OD replikátů standardů soupravy na každé destičce.
2. Sestrojte standardní křivku $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ vynesením hodnoty $\log_{(e)}$ střední hodnoty OD (osa y) oproti hodnotě $\log_{(e)}$ koncentrace standardů IFN- γ v IU/ml (osa x). U těchto výpočtů se vynechává nulový standard. Pomocí regresní analýzy vypočítejte nejlepší proložení standardní křivky.
3. Použijte standardní křivku ke stanovení koncentrace IFN- γ (IU/ml) pro každý testovaný vzorek plazmy s použitím hodnoty OD pro každý vzorek.

4. Tyto výpočty je možné provádět pomocí softwarových balíčků, které jsou k dispozici se čtečkami mikrotitračních destiček a standardního tabulkového procesoru nebo statistického softwaru (například Microsoft Excel). Doporučuje se, aby byly tyto balíčky použity k výpočtu regresní analýzy, koeficientu variace (Coefficient of Variation, %CV) pro standardy korelačního koeficientu (r) standardní křivky.

Výpočet vzorku

Pokud by byly pro standardy získány následující hodnoty OD, výpočty pomocí $-\log(e)$ – by se řídily výpočty uvedenými v tabulce 2.

Tabulka 2. Standardní křivka

Standard	IU/ml	Hodnoty OD a a b	Střední hodnota OD	%CV	Log _(e) IU/ml	Log _(e) střední hodnoty (OD)
Standard 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Standard 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Standard 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	–	-1,386	-2,079
Standard 4	0	0,034, 0,037	0,036	–	–	–

Rovnice křivky je $y = 0,7885(X) - 0,9837$, kde „m“ = 0,7885 a „c“ = -0,9837. Tyto hodnoty se použijí v rovnici $X = (Y-c)/m$ pro řešení X. Na základě standardní křivky je vypočtený korelační koeficient (r) = 1,000. –: Neuveďeno.

Pomocí kritérií, uvedených v části „Kontrola kvality testu“ na straně 25, se určí platnost analýzy.

Standardní křivka (tabulka 2) se používá k přepočtu reakcí OD na antigen na mezinárodní jednotky (IU/ml).

Tabulka 3. Výpočet vzorku

Antigen	Hodnota OD	Log _(e) hodnoty OD	X	e ^x (IU/ml)	Antigen–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

Hodnoty IFN- γ (v IU/ml) pro Ag1, Ag2 a Mitogen jsou korigovány na pozadí odečtením hodnoty IU/ml získané pro příslušnou kontrolu Nil. Tyto korigované hodnoty se používají pro interpretaci výsledků testu.

Kontrola kvality testu

Přesnost výsledků testu závisí na vytvoření přesné standardní křivky. Proto musí být výsledky odvozené od standardů před interpretací výsledky testů vzorků prošetřeny.

Aby byla analýza ELISA platná:

- Střední hodnota OD pro standard 1 musí být $\geq 0,600$.
- %CV pro hodnoty replikátu standardu 1 a standardu 2 musí být $\leq 15 \%$.
- Hodnoty OD replikátu pro standardy 3 a 4 se nesmí lišit o více než 0,040 jednotek optické hustoty od jejich střední hodnoty.
- Korelační koeficient (r) vypočtený ze středních hodnot absorbance těchto standardů musí být $\geq 0,98$.
- Pokud výše uvedená kritéria nejsou splněna, bude cyklus testu neplatný a musí být zopakován.
- Střední hodnota OD pro nulový standard (zelený ředící roztok) musí být $\leq 0,150$. Jestliže je střední hodnota OD $> 0,150$, je nutné prověřit postup promývání destiček.

Software pro analýzu QFN SARS vypočítá tyto parametry kontroly kvality a vytvoří zprávu.

Každá laboratoř by měla stanovit vhodné typy kontrolních materiálů a četnost testování v souladu s místními, státními, federálními nebo jinými příslušnými akreditačními organizacemi. Mělo by se zvažovat externí posouzení kvality a alternativní validační postupy.

Poznámka: Plazma s přidaným rekombinantním IFN- γ vykazuje snížení koncentrace až o 50 % při skladování při teplotě 2–8 °C i –20 °C. Rekombinantní IFN- γ se pro stanovení kontrolních standardů ve vzorcích plazmy nedoporučuje.

Interpretace výsledků

Výsledky testu QFN SARS jsou interpretovány pomocí následujících kritérií (tabulka 4).

Důležité: Analýza QFN SARS by k posouzení imunitní odpovědi jedince, vyvolané očkováním proti onemocnění COVID-19, měla být používána ve spojení s dalšími laboratorními testy a epidemiologickým/klinickým hodnocením.

Tabulka 4. Interpretace výsledků testu QFN SARS

Nil (IU/ml)	Ag1 antigen minus Nil (IU/ml)	Ag2 antigen minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Výsledek QFN SARS	Zpráva/Interpretace
≤ 8,0	≥ 0,15 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Jakákoliv	Jakákoliv	Reaktivní	<i>Zjištěna reakce na SARS-CoV-2</i>
	Jakákoliv	≥ 0,15 a ≥ 25 % hodnoty Nil			
	< 0,15 nebo ≥ 0,15 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,15 nebo ≥ 0,15 a < 25 % hodnoty Nil	≥ 0,50	Nereaktivní	<i>Reakce na SARS-CoV-2 NEZJIŠTĚNA</i>
	< 0,15 nebo ≥ 0,15 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,15 nebo ≥ 0,15 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,50	Nejednoznačný [‡]	<i>Reakci na SARS-CoV-2 a Mitogen nelze zjistit</i>
> 8,0 [§]	Jakákoliv				

* Odezvy na pozitivní kontrolu Mitogen (a občas odezvy na Ag antigeny) mohou být mimo rozsah čtečky mikrotitračních destiček. To nemá žádný dopad na výsledky testu. Hodnoty > 10 IU/ml označuje software QFN SARS jako > 10 IU/ml.

[‡] Možné příčiny uvádí část „Návod na řešení potíží“ na straně 50.

[§] V klinických studiích mělo méně než 0,25 % subjektů hladiny IFN-γ > 8,0 IU/ml u hodnoty Nil.

Omezení

Výsledky testů QFN SARS musejí být použity společně s epidemiologickou anamnézou každého jedince, současným zdravotním stavem a dalšími diagnostickými hodnoceními.

Výsledky osob s hodnotami Nil většími než 8 IU/ml jsou klasifikovány jako „nejednoznačné“, protože o 25 % vyšší odezva na antigeny Ag může být mimo rozsah měření analýzy.

- Nereaktivní výsledek je třeba zvážit spolu s lékařskými záznamy a údaji z anamnézy jednotlivce, které se týkají pravděpodobnosti imunitní odpovědi na očkování, zejména u jedinců s oslabenou imunitní funkcí.
- Analýza QFN SARS by k posouzení imunitní odpovědi jedince, vyvolané očkováním proti onemocnění COVID-19, měla být používána ve spojení s dalšími laboratorními testy a epidemiologickým/klinickým hodnocením.

Nespolehlivé nebo nejednoznačné výsledky se mohou objevit v důsledku následujících situací:

- Odchylky od postupu popsaneho v návodu k použití
- Nesprávná přeprava vzorku krve / manipulace s ním
- Zvýšené hladiny IFN- γ v krevním oběhu nebo přítomnost heterofilních protilátek
- Překročení validované doby od odběru vzorku krve do inkubace Viz *návod k použití zkumavek pro odběr krve QFN SARS Blood Collection Tube (1124422)*.

Charakteristika funkčních vlastností analýzy

Analytická účinnost

Mezní hodnota analýzy

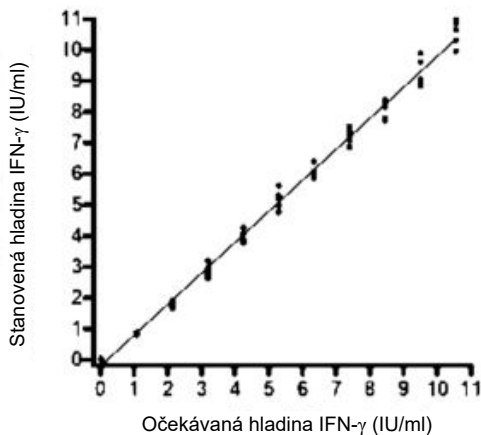
Mezní hodnota analýzy QFN SARS byla stanovena na základě údajů od dvaceti (20) subjektů, u nichž byl test na SARS-CoV-2 nereaktivní pomocí testu RT-PCR nebo sérologického testu, a dvaceti (20) dárců, kteří byli plně očkovaní (v rozmezí 2–16 týdnů po ukončeném očkování) vakcínou schválenou FDA EUA. Byly analyzovány údaje o citlivosti a specifitě spolu s přesnými oboustrannými 95% intervaly spolehlivosti (Confidence Interval, CI) a prokázaly, že optimální mezní hodnota testu ELISA je 0,15 IU/ml (viz tabulka 5).

Tabulka 5. Mezní hodnoty QFN SARS (IU/ml) s odpovídající citlivostí a specifivitou s přesným oboustranným intervalem spolehlivosti 95% CI

Mezní hodnota	Citlivost			Specifivita		
	Hodnota	Dolní 95% CI	Horní 95% CI	Hodnota	Dolní 95% CI	Horní 95% 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

Linearita

Linearita analýzy QFN SARS ELISA se prokázala náhodným umístěním 5 replikátů 11 směsí plazmy se známými koncentracemi IFN- γ na destičku ELISA. Křivka lineární regrese měla směrnici $1,002 \pm 0,011$ a korelační koeficient 0,99 (obrázek 3).



Obrázek 3. Ilustrace studie linearity s regresní analýzou.

Reprodukovatelnost

Byla provedena multilaboratorní studie reprodukovatelnosti s cílem vyhodnotit výkonnost analýzy QFN SARS v různých laboratořích provádějících studii s více operátory. Tato studie byla provedena ve třech laboratořích v rámci společnosti QIAGEN. Do studie byly zařazeny celkem tři (3) subjekty reagující na virus SARS-CoV-2 a tři (3) subjekty nereagující na virus SARS-CoV-2 (stanoveno pomocí testu RT-PCR nebo sérologického testu).

Od každého subjektu studie byla odebrána krev do čtyř (4) zkumavek na odběr krve s heparinem lithným. Odběrové zkumavky s heparinem lithným byly poté přeneseny do jedné z laboratořích provádějících testování, kde byla krev alikvotně rozdělena do tří (3) sad odběrových zkumavek QFN SARS Blood Collection Tube (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen

a Nil). Do každé laboratoře provádějící test byla přenesena vždy jedna sada odběrových zkumavek QFN SARS Blood Collection Tube (BCTs) a poté byla testována v souladu s postupem analýzy QFN SARS. Každý subjekt byl v každé laboratoři testován v deseti (10) replikátech (pět (5) replikátů pro Ag1 a pět (5) replikátů pro Ag2). V každé laboratoři provedl test QFN SARS nezávisle jeden (1) operátor. Jednotliví operátoři nebyli obeznámeni s výsledky získanými ostatními operátory ani výsledky RT-PCR nebo sérologických testů u subjektu studie.

Z každé ze tří (3) laboratoří provádějících testování bylo získáno 30 výsledků, což představuje celkem 90 datových bodů. Přehled výsledků studie reprodukovatelnosti je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6. Souhrn výsledků studie reprodukovatelnosti – N = 30 vzorků pacientů

Laboratoř 1 – 1 operátor	Laboratoř 2 – 1 operátor	Laboratoř 3 – 1 operátor
25/30 = 83 %	30/30 = 100 %	30/30 = 100 %
Shoda kvalitativních výsledků	Shoda kvalitativních výsledků	Shoda kvalitativních výsledků

Celková míra shody všech reaktivních a nereaktivních vzorků s očekávanými kvalitativními výsledky (reaktivní subjekt vrátí reaktivní výsledek a nereaktivní subjekt vrátí nereaktivní výsledek na základě výsledku referenční metody provedené u subjektu) byla v rámci všech tří (3) laboratoří 94,4 % (85/90).

Opakovatelnost mezi šaržemi

Byla provedena studie s cílem stanovit variabilitu mezi jednotlivými šaržemi zkumavek pro odběr krve QFN SARS Blood Collection Tube. Ve studii byly testovány celkem dva (2) subjekty reagující na virus SARS-CoV-2 a tři (3) subjekty nereagující na virus SARS-CoV-2 (stanoveno pomocí testu RT-PCR nebo sérologického testu). Do této studie byly zahrnuty tři (3) samostatné šarže zkumavek pro odběr krve QFN SARS Ag1 a Ag2. Bylo testováno pět (5) replikátů na dárce a šarži zkumavky pro odběr krve. Přehled výsledků preciznosti mezi šaržemi je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7. Přehled výsledků studie preciznosti mezi šaržemi – celková míra shody pro zkumavky pro odběr krve QFN SARS Blood Collection Tube Ag1 a Ag2; N = 25

Odběrové zkumavky QFN SARS BCT	Číslo šarže odběrových zkumavek	Počet kvalitativních výsledků v rámci shody / celkový počet výsledků	Poměr	Dolní mez spolehlivosti	Horní mez spolehlivosti
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 %

Celková míra shody všech reaktivních a nereaktivních vzorků s očekávanými výsledky (reaktivní subjekt vrátí reaktivní výsledek a nereaktivní subjekt vrátí nereaktivní výsledek na základě výsledku referenční metody provedené u subjektu) byla 100 % u všech tří (3) šarží odběrových zkumavek QFN SARS Ag1 a Ag2 BCTs.

Mez slepého alikvotu (Limit of Blank, LoB)

Pro analýzu QFN SARS byla vyhodnocena mez slepého alikvotu (Limit of Blank, LoB). Dva (2) replikáty od každého ze čtrnácti (14) vzorků normální lidské plazmy (jako slepé alikvoty) byly testovány se dvěma (2) šaržemi analýzy QFN SARS ELISA, a to třemi (3) operátory po tři (3) dny testování; jeden (1) operátor na jeden den testování; celkem 84 replikátů z každé šarže soupravy ELISA.

Hodnoty LoB (IU/ml) pro dvě (2) šarže soupravy ELISA byly vypočteny samostatně, jak je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8. Hodnoty LoB (IU/ml) pro dvě (2) šarže soupravy QFN SARS ELISA Kit

Souprava QFN SARS ELISA Kit	Odhadovaná hodnota LoB (IU/ml)
Souprava 1	0,030
Souprava 2	0,040

Vyšší hodnota LoB, 0,040 IU/ml, z obou šarží soupravy QFN SARS ELISA, byla uvedena jako konečná hodnota LoB.

Limit detekce (Limit of Detection, LoD)

Pro analýzu QFN SARS byl vyhodnocen limit detekce (Limit of Detection, LoD). Spojením čtrnácti (14) jednotlivých vzorků plazmy byla vytvořena směs lidské plazmy. Každý ze tří (3) operátorů připravil referenční standardní zásobní roztok IFN- γ o koncentraci 1,0 IU/ml, naředěný v pufru. Byla provedena série ředění v plazmě o osmi (8) koncentracích. Studie byla provedena během tří (3) dnů, kdy se střídali tři (3) operátoři a použily se dvě (2) šarže soupravy QFN SARS ELISA. Každý den testování bylo testováno pět (5) replikátů každé koncentrace v rámci každé sady sériových ředění, celkem 45 replikátů pro každé ředění koncentrace IFN- γ pro každou šarži soupravy QFN SARS ELISA.

Hodnota LoD pro každou z testovaných šarží soupravy QFN SARS ELISA byla vypočtena samostatně, jak je uvedeno v tabulce 9. Hodnota LoD byla odhadnuta pomocí probitového regresního modelu. Hodnota LoD byla založena na odhadované koncentraci (IU/ml), která dává 95% odhadovanou pravděpodobnost dosažení úspěšnosti větší než 0,04 IU/ml (stanovené LoB).

Tabulka 9. Odhadované hodnoty LoD (IU/ml) pro dvě (2) šarže soupravy QFN SARS ELISA Kit

Souprava QFN SARS ELISA Kit	Pravděpodobnost	Odhadovaná koncentrace (IU/ml)	Dolní 95% mez spolehlivosti odhadu	Horní 95% mez spolehlivosti odhadu
Souprava 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Souprava 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Jako konečná hodnota LoD byla uvedena vyšší hodnota LoD vypočtená pro obě šarže soupravy QFN SARS ELISA – 0,065 IU/ml.

Interferující látky

Byla provedena studie s cílem stanovit vliv potenciálních interferujících látek na účinnost detekce IFN- γ . při analýze QFN SARS ELISA. Interferující látky zahrnuté do tohoto testování byly: triglyceridy (celkové), hemoglobin, protein (celková koncentrace v séru), bilirubin (konjugovaný), bilirubin (nekonjugovaný), abakavir sulfát, cyklosporin a prednisolon. Bylo připraveno pět (5) plazmatických směsí se známými koncentracemi IFN- γ s použitím různých koncentrací interferujících látek. Základní hladina IFN- γ ve směsi byla předem připravena s předem stanoveným množstvím IFN- γ (přibližně 0,21, 0,45 a 1,4 IU/ml). Tato směs byla poté použita k přípravě směsí interferujících látek. Bylo testováno pět různých hladin koncentrace interferujících látek, které byly založeny na referenčních intervalech, patologických hodnotách, terapeutických rozmezích a toxických rozmezích nebo podle doporučení prodejce či obecných klinických hladin. Pro každou hladinu koncentrace vzorku interferujících látek bylo testováno šest (6) replikátů.

Pro každou koncentraci vzorku byl proveden T-test, který porovnával rozdíl střední hodnoty log₁₀ (IU/ml) vysoké hladiny interferující látky (10) s kontrolou (tj. hladinou bez interferující látky). Odhadovaný rozdíl v průměrné odpovědi spolu s odpovídajícími oboustrannými 95% mezemi spolehlivosti a p-hodnotou je uveden v tabulce.

Tabulka 10. Log₁₀ IU/ml: Souhrnná tabulka t-testu pro rozdíly středních hodnot mezi kontrolní hladinou a vysokou hladinou interferující látky pro každou interferující látku a každou úroveň koncentrace IFN- γ

Interferující látka	Hladina interferující látky	Koncentrace alikvotu (IU/ml)	Rozdíl střední hodnoty	Dolní 95% CI	Horní 95% CI	P-hodnota
Triglyceridy	Vysoká	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
Hemoglobin	Vysoká	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
Protein	Vysoká	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
Konjugovaný bilirubin	Vysoká	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
Nekonjugovaný bilirubin	Vysoká	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
Abakavir	Vysoká	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

Tabulka pokračuje na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

Tabulka 10. Log₁₀ IU/ml: Souhrnná tabulka t-testu pro rozdíly středních hodnot mezi kontrolní hladinou a vysokou hladinou interferující látky pro každou interferující látku a každou úroveň koncentrace IFN- γ

Interferující látka	Hladina interferující látky	Koncentrace alikvotu (IU/ml)	Rozdíl střední hodnoty	Dolní 95% CI	Horní 95% CI	P-hodnota
Cyklosporin	Vysoká	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
Prednisolon	Vysoká	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

Výsledky neprokázaly žádné statisticky významné rozdíly mezi nejvyšší testovanou hladinou interferující látky a kontrolou (hladina bez interferující látky) s výjimkou hladiny koncentrace triglyceridů 0,45 IU/ml. Rozdíl střední hodnoty pro tuto veličinu byl stanoven v rozmezí ± 2 směrodatné odchylky od střední naměřené kontrolní hladiny, což dokazuje, že pozorovaný rozdíl je v rámci očekávané variability analýzy a že se neočekává, že by klinicky relevantní hladiny triglyceridů s analýzou QFN SARS ELISA interferovaly.

Klinická účinnost

Klinická účinnost analýzy QFN SARS byla hodnocena v prospektivní observační studii prováděné od června do října 2021 s využitím subjektů bez anamnézy infekce virem SARS-CoV-2, které byly očkovány vakcínou proti onemocnění COVID-19 s vakcínami zaměřenými na S protein viru SARS-CoV-2, a také subjektů bez anamnézy infekce virem SARS-CoV-2, které vakcínou proti onemocnění COVID-19 očkovány nebyly.

Subjekty, které k tomu poskytly souhlas, byly posouzeny podle kritérií pro zařazení a vyloučení ze studie. Pouze subjekty splňující všechna kritéria pro zařazení, ale žádné z kritérií pro vyloučení, byly zařazeny do studie a podstoupily odběr krve pro analýzu QFN SARS.

Níže je uveden přehled populace zařazené do studie:

- Skupina 1: Subjekty zařazené do této skupiny neprodělaly přirozenou infekci virem SARS-CoV-2, v době odběru krve pro analýzu QFN SARS nebyly očkovány proti onemocnění COVID-19, nikdy nebyly pozitivní na infekci virem SARS-CoV-2, měly nahlášený nereaktivní výsledek sérologického testu a během 4týdenní lhůty před zařazením nevykazovaly žádné příznaky či symptomy onemocnění COVID-19.
- Skupina 2: Subjekty zařazené do této skupiny neprodělaly infekci virem SARS-CoV-2, v době odběru krve pro analýzu QFN SARS byly naočkovány vakcínou proti onemocnění COVID-19 zaměřenou na S protein viru SARS-CoV-2 a nikdy nebyly pozitivně testovány na infekci virem SARS-CoV-2.
- Žádný ze subjektů nebyl v době účasti ve studii příjemcem transplantátu (solidního orgánu nebo buněk) a/nebo nebyl léčen pro nádorové onemocnění.

Do skupiny 1 bylo zařazeno celkem 218 subjektů, do skupiny 2 bylo zařazeno 171 subjektů. Po odběru krve pro analýzu QFN SARS bylo zjištěno, že čtyři subjekty ve skupině 1 nejsou způsobilé ke studii z důvodu reaktivního výsledku sérologického testu získaného ze vzorku odebraného při stejné návštěvě, při níž došlo k odběru krve pro analýzu QFN SARS, a následně byly z analýzy vyloučeny.

Vzorky byly odebrány, zkumavky pro odběr krve QFN SARS byly zpracovány a plazma byla skladována při teplotě ≤ -20 °C, dokud nebyla připravena k testování pomocí analýzy QFN SARS ELISA. Všechny testy na destičkách QFN SARS ELISA byly platné a nebyly získány žádné nejednoznačné výsledky, což vedlo k získání 214 hodnotitelných vzorků ve skupině 1 a 171 hodnotitelných vzorků ve skupině 2.

Demografické údaje

Počet vzorků odebraných v každé zemi a procento z celkového počtu pro každou studijní skupinu jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11. Přehled zemí, kde proběhl odběr vzorků

Země, kde proběhl odběr vzorků	Skupina 1		Skupina 2	
	N	%	N	%
Nizozemsko	214	100,00 %	153	89,47 %
USA	0	0,00 %	18	10,53 %

Přehled věku subjektů, včetně střední hodnoty, mediánu, minimálního a maximálního věku a směrodatné odchylky věku (Standard Deviation, SD), je uveden v tabulce 12.

Tabulka 12. Přehled věku subjektů (roky)

N	Průměr	Medián	SD	Minimální	Maximální
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Přehled pohlaví subjektů je uveden v tabulce 13.

Tabulka 13. Přehled pohlaví subjektů

Pohlaví	N	%
Ženské	234	60,78 %
Mužské	151	39,22 %

Specifická

Klinická shoda porovnávací výsledky analýzy QFN SARS s výsledky referenční metody je uvedena v tabulce 14.

Tabulka 14. Klinická shoda: Výsledek analýzy QFN SARS ve srovnání s referenční metodou

		Výsledek referenční metody		
		Skupina 1 (- očko., - infekce)	Skupina 2 (+ očko., - infekce)	Celkem
Výsledek QFN SARS	Nereaktivní	199	34	233
	Reaktivní	15	137	152
Celkem		214	171	385

U neočkovaných subjektů (skupina 1) bylo 199 z celkem 214 testováno jako nereagující pomocí analýzy QFN SARS, zatímco zbývajících 15 osob bylo testováno jako reagující. U očkovaných subjektů (skupina 2) bylo 137 z celkem 171 testováno jako reagující pomocí analýzy QFN SARS, zatímco zbývajících 34 osob bylo testováno jako nereagující. Žádný z 15, resp. 34 neshodných vzorků ve skupinách 1 a 2 nebyl dodatečně testován odlišnou metodou.

Míra negativní shody (Negative Percent Agreement, NPA) (specifická) byla vypočtena pro neočkované subjekty (skupina 1) spolu s oboustranným 95% přesným intervalem spolehlivosti (Confidence Interval, CI) a je uvedena v tabulce 15.

Tabulka 15. Míra negativní shody (specifická)

Skupina č.	NPA (specifická)	95 % CI
Skupina 1 (– očko., – infekce)	92,99 % (199/214)	88,70–96,02 %

Citlivost

Míra pozitivní shody (Positive Percent Agreement, PPA) (citlivost) byla vypočtena pro očkované subjekty (skupina 2) spolu s oboustranným 95% přesným CI a je uvedena v tabulce 16.

Tabulka 16. Míra pozitivní shody (citlivost)

Skupina č.	PPA (citlivost)	95 % CI
Skupina 2 (+ očko., – infekce)	80,12 % (137/171)	73,34–85,82 %

Míra pozitivní shody podle věku

U očkovaných subjektů (skupina 2) byla míra pozitivní shody stratifikována podle věku < 60 let a ≥ 60 let a je uvedena v tabulce 17.

Tabulka 17. Míra pozitivní shody podle věku < 60 let a ≥ 60 let

Věkové rozmezí (roky)	PPA (citlivost)	95 % CI
< 60	85,33 % (128/150)	78,78–90,64 %
≥ 60	42,86 % (9/21)	21,82–65,98 %

Míra pozitivní shody podle očkování proti onemocnění COVID-19

U očkováných subjektů (skupina 2) byla míra pozitivní shody stratifikována podle obdržené vakcíny proti onemocnění COVID-19 a je uvedena v tabulce 18.

Tabulka 18. Míra pozitivní shody podle očkování proti onemocnění COVID-19

Vakcína	PPA (citlivost)	95 % 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 %

Faktory spojené s nereaktivními výsledky u očkováných osob

Za účelem zjištění, zda zvyšující se věk, doba od ukončení očkování vakcínou proti onemocnění COVID-19, obdržená vakcína a pohlaví souvisejí s nereaktivními výsledky u očkováných subjektů (skupina 2), byla provedena jednorozměrná logistická regresní analýza. Souvislost mezi jednotlivými faktory a nereaktivními výsledky byla vypočtena ve formě míry pravděpodobnosti (Odds Ratio, OR) a výsledky jsou uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19. Souvislost mezi faktory a nereaktivními výsledky u očkovanych osob

Faktor		OR (95% CI)	p-hodnota
Věk (roky)		1,08 (1,05–1,12)	< 0,001
Doba od očkování do odběru krve pro analýzu QFN SARS (dny)		1,02 (1,01–1,03)	< 0,001
Vakcína	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
Pohlaví	Ženské	1	–
	Mužské	1,25 (0,59–2,65)	0,565

Jedinými faktory, které významně souvisely s nereaktivními výsledky u očkovanych subjektů, byly věk a doba od očkování.

Vzhledem k tomu, že studie byla provedena v zemích, kde byly vakcíny proti onemocnění COVID-19 nejprve zpřístupněny starším osobám, mohl věk ovlivnit souvislost mezi dobou od očkování a nereaktivními výsledky. Tabulka 20 ukazuje regresní analýzu s věkem jako kovariátem.

Tabulka 20. Souvislost mezi faktory a nereaktivními výsledky řízenými podle věku

Faktor	OR (95% CI)	p-hodnota
Věk (roky)	1,07 (1,03–1,11)	< 0,001
Doba od očkování do odběru krve pro analýzu QFN SARS (dny)	1,01 (1,00–1,02)	0,214

Při řízení věku již není souvislost mezi dobou od očkování a nereaktivními výsledky významná, avšak souvislosti u věku zůstaly významné.

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'Abamo, 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 QIAreacH 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

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a/nebo protokolů v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu alikvotů a jejich analýz (kontaktní údaje naleznete na webových stránkách www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Řešení potíží s analýzou ELISA

Nespecifické zbarvení

- | | |
|--|--|
| a) Nedokonalé promytí destičky | Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočené alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Křížová kontaminace jamek ELISA | Při pipetování a mísení vzorku buďte opatrní, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. |
| c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100× koncentrát použit do tří měsíců od data rekonstituce. |
| d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu | Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla. |
| e) Mísení plazmy ve zkumavkách QFN SARS Blood Collection Tube před odběrem | Po odstředění se před odběrem vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu. |

Komentáře a návrhy

Nízké hodnoty optické hustoty pro standardy

- | | |
|---|---|
| a) Chyba ředění standardu | Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle návodu k použití. |
| b) Chyba pipetování | Ujistěte se, že je zařízení kalibrováno a používáno dle pokynů výrobce. |
| c) Příliš nízká teplota inkubace | Inkubace při analýze ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). |
| d) Příliš krátká doba inkubace | Inkubace destičky s konjugátem, standardy a vzorky musí trvat 120 ± 5 minut. Roztok enzymového substrátu by se měl inkubovat na destičce po dobu 30 minut. |
| e) Použit nesprávný filtr čtečky destiček | Hodnoty destičky musejí být načteny s filtrem o vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem od 620 do 650 nm. |
| f) Příliš chladné reagentie | Všechny reagentie, s výjimkou konjugátu $100\times$ koncentrátu, musejí být před zahájením analýzy vytemperovány na pokojovou teplotu. To může trvat přibližně 1 hodinu. |
| g) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát $100\times$ koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce. |

Vysoké pozadí

- | | |
|---|---|
| a) Nedokonalé promytí destičky | Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 μ l promývacího pufru na jamku. Může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund. |
| b) Příliš vysoká teplota inkubace | Inkubace při analýze ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). |
| c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent | Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát $100\times$ koncentrát použit do tří měsíců od data rekonstituce. |
| d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu | Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla. |





Komentáře a návrhy


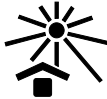

Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátu

- a) Nedokonalé promytí destičky
Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. Může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund.
- b) Chyba ředění standardu
Ujistěte se, že ředění standardu jsou připravena správně dle pokynů v tomto návodu k použití.
- c) Nedostatečné promíchání
Činidla důkladně promíchejte tak, že před jejich přidáním na destičku zkumavku převrátíte nebo lehce protřepete na třepačce.
- d) Nejednotná technika pipetování nebo přerušování během přípravy testu
Přidávání vzorků a standardů by mělo probíhat nepřerušovaně. Všechna činidla musí být připravena před zahájením testu.

Symbols

V návodu k použití anebo na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
 Σ <N>	Obsahuje dostatek reagensů pro <N> reakcí
	Použijte do
IVD	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
REF	Katalogové číslo
LOT	Číslo šarže
MAT	Číslo materiálu (tj. označení dílu)
COMP	Komponenty
CONT	Obsahuje
NUM	Číslo
GTIN	Globální číslo obchodní položky
ECREP	Autorizovaný zástupce
Rn	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Teplotní rozmezí
	Výrobce

Symbol	Definice symbolu
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem
	Varování/upozornění

Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na internetové adrese **www.qiagen.com/Support**, volejte na telefonní číslo 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN anebo naše místní distributory (viz zadní strana obalu nebo navštivte webové stránky **www.qiagen.com**).

Příloha A: Technické údaje

Nejednoznačné výsledky

Nejednoznačné výsledky jsou vzácné a mohou souviset se stavem imunity testovaných osob, avšak mohou se také vztahovat k množství technických faktorů (např. nevhodná manipulace se zkumavkami pro odběr krve, neúplné promytí destiček ELISA), pokud není dodržován výše uvedený návod k použití.

Pokud existuje podezření, že došlo k technickým problémům při skladování reagentů, odběru vzorků krve nebo manipulaci s nimi, zopakujte celý test QFN SARS s novými vzorky krve. Zopakování testování ELISA stimulované plazmy je možné provést, pokud je podezření na nedostatečné promytí nebo jakoukoliv jinou odchylku od postupu pro test ELISA. Lékaři se mohou rozhodnout znovu odebrat vzorek nebo provést jiné výkony, jak to budou považovat za vhodné.

Sražení vzorků plazmy

Pokud se při dlouhodobém skladování objeví ve vzorcích plazmy sraženiny fibrinu, odstředte vzorky, aby se sražený materiál usadil a napipetování plazmy bylo snadnější.

Lipemické vzorky plazmy

Při pipetování lipemických vzorků je třeba dbát zvýšené opatrnosti, protože tukové usazeniny mohou ucpat pipetovací špičky.

Příloha B: Zkrácený postup testu ELISA

1. Ponechte temperovat součásti testu ELISA, s výjimkou konjugátu 100x koncentrátu, na pokojovou teplotu alespoň po dobu 60 minut.

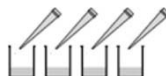


2. Rekonstituujte standard soupravy na 8,0 IU/ml pomocí deionizované nebo destilované vody. Připravte čtyři (4) standardní ředění.

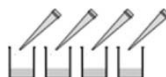


3. Rekonstituujte mrazem sušený konjugát 100x koncentrát pomocí destilované nebo deionizované vody.

4. Připravte pracovní roztok konjugátu v zeleném ředícím roztoku a do všech jamek přidejte 50 μ l.



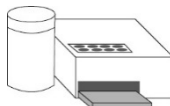
5. Do příslušných jamek přidejte 50 μ l testovaných vzorků plazmy a 50 μ l standardů. Promíchejte pomocí třepačky.



6. Inkubujte po dobu 120 minut při pokojové teplotě.



7. Promyjte jamky alespoň 6krát pomocí 400 μ l promývacího pufru na jamku.



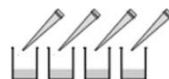
8. Přidejte do jamek 100 μ l roztoku enzymového substrátu.
Promíchejte pomocí třepačky.



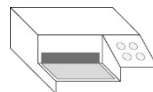
9. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě.



10. Přidejte do jamek 50 μ l zastavovacího roztoku enzymů.
Promíchejte pomocí třepačky.



11. Zjistěte výsledné hodnoty při 450 nm pomocí referenčního filtru
620 až 650 nm.



12. Proveďte analýzu výsledků.



Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
QuantIFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	Souprava ELISA se 2 destičkami	626420
Související výrobky		
QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 zkumavek (po 50 zkumavkách Nil, Ag1, Ag2 a Mitogen)	626725

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro soupravu QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technické podpory společnosti QIAGEN či místního distributora.

Historie revizí dokumentu

Datum	Popis
R1, říjen 2021	První vydání
R2, listopad 2021	Aktualizace částí Charakteristika funkčních vlastností a Klinická účinnost
R3, duben 2022	Aktualizace části Analytická charakteristika funkčních vlastností pro interferující látky

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

Omezené licenční ujednání pro soupravu QuantiFERONTM SARS-CoV-2 (QFN-SARS) ELISA Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje každý kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v panelu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v tomto panelu, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v tomto panelu obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tento panel a/nebo jeho použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tento panel a jeho komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoli další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat zájazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem a/nebo jeho součástmi.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®, Registrované názvy, ochranné známky atd., použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmějí být považovány za nechráněné zákonem.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

