

Apríl 2022

Návod na použitie súpravy QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 ELISA Kit



2 x 96

Verzia 1



Na diagnostické použitie in vitro

Na použitie so skúmavkami na odber krvi QuantiFERON[®]
SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes



626420



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



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Nemecko



1124420SK

Obsah

Zamýšľané použitie	5
Zamýšľaný používateľ	6
Popis a princíp.....	7
Súhrn a vysvetlenie.....	7
Dodávané materiály	9
Obsah súpravy	9
Súčasti súpravy.....	10
Platforma a softvér	10
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú.....	11
Doplňkové reagensy	11
Zariadenie	11
Varovania a preventívne opatrenia.....	12
Bezpečnostné informácie	12
Preventívne opatrenia	14
Skladovanie a manipulácia s reagensmi.....	17
Stabilita pri používaní	17
Zriadené a nepoužívané činidlá	17
Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi	18
Postup: Vykonanie testu ELISA.....	19
Protokol: IFN- γ ELISA	19
Výsledky (výpočty)	25
Generovanie krivky štandardu a hodnôt vzoriek	25

Kontrola kvality testu	27
Interpretácia výsledkov	29
Obmedzenia	30
Charakteristiky účinnosti testu	31
Analytické charakteristiky	31
Klinická účinnosť	40
Referenčná literatúra	46
Spríevodca riešením problémov	51
Symboly	54
Kontaktné informácie	55
Príloha A: Technické informácie	56
Neurčité výsledky	56
Zrazené plazmové vzorky	56
Vzorky lipemickej plazmy	56
Príloha B: Skrátený postup testu ELISA	57
Informácie o objednávaní	59
História úprav dokumentu	60

Zamýšľané použitie

Test QuantiFERON SARS-CoV-2 je test na diagnostiku in vitro určený na kvalitatívnu detekciu interferónu γ (IFN- γ), ktorý produkujú T bunky CD4+ a CD8+ ako odpoveď na stimuláciu peptidovým koktailom SARS-CoV-2 v heparinizovanej plnej krvi. Množstvo vyprodukovaného IFN- γ sa meria pomocou enzymatického imunisorbenčného testu (ELISA).

Test QuantiFERON SARS-CoV-2 je určený ako pomôcka pri hodnotení bunkami sprostredkovanej imunitnej (CMI) odpovede u jednotlivcov bez anamnézy infekcie SARS-CoV-2, ktorí boli očkovaní proti ochoreniu COVID-19 pomocou vakcín zameraných na vírusový spike (S) proteín vírusu SARS-CoV-2.

Test QuantiFERON SARS-CoV-2 sa musí používať spolu s iným testovacím a epidemiologickým/klinickým spôsobom vyhodnotenia, aby dokázal zhodnotiť imunitnú odpoveď vakcinácie proti vírusu COVID-19.

Tvorba imunitnej odpovede pomocou T buniek môže po vakcinácii trvať niekoľko dní, hoci doba, počas ktorej je imunitná odpoveď T buniek prítomná, nie je u vakcinovaných jednotlivcov dobre stanovená.

Nereaktívne výsledky nebránia aktívnej infekcii vírusom SARS-CoV-2 ani neurčujú účinnosť vakcín proti ochoreniu COVID-19. Ak existuje podozrenie na aktívnu infekciu, potvrdte ju pomocou iného molekulárneho alebo antigénového testu na SARS-CoV-2. Výsledky testu sa musia vždy použiť v kombinácii s klinickým vyšetrením, anamnézou pacienta a inými nálezmi.

Na diagnostické použitie in-vitro.

Zamýšľaný používateľ

Táto súprava je určená na profesionálne použitie.

Výrobok smú používať iba pracovníci špeciálne poučení a vyškolení v technikách molekulárnej biológie, ktorí sú oboznámení s touto technológiou.

Popis a princíp

Súhrn a vysvetlenie

QuantIFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) je kvalitatívny test, ktorý využíva špeciálne skúmavky na odber krvi, ktoré obsahujú peptidové antigény, ktoré stimulujú imunitné bunky pomocou špecifických proteínov vírusu SARS CoV-2. Inkubácia krvi sa vykonáva v skúmavkách po dobu 16 až 24 hodín. Po ukončení inkubácie sa odoberie plazma a plazma sa testuje na prítomnosť IFN- γ vytvoreného ako reakcia na peptidové antigény. Špecifické odpovede sprostredkované T-bunkami na infekciu SARS-CoV-2 boli nahlásené po vakcinácii u rôznych typov vakcín zameraných proti spike proteínu [1 – 34].

Najskôr sa odoberie celá krv do každej zo skúmaviek na odber krvi QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes, ktoré obsahujú skúmavku Nil, skúmavku Ag1, skúmavku Ag2 a skúmavku Mitogen. Krv je možné prípadne odobrať aj pomocou skúmavky na odber krvi s obsahom lítia alebo heparínu sodného (antikoagulant). Následne krv preneste do skúmaviek na odber krvi QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes.

Skúmavky QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes sa pretrepú, aby sa antigén mohol zmiešať s krvou, a je potrebné ich čo najskôr inkubovať pri teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, najneskôr však do 16 hodín od odberu. Po uplynutí inkubačnej doby 16 až 24 hodín sa skúmavky odstredia, plazma sa spracuje a pomocou testu ELISA sa odmeria množstvo IFN- γ (IU/ml). Test QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA používa rekombinantný ľudský IFN- γ štandard, ktorý bol testovaný voči referenčnému IFN- γ prípravku (Ref. NIH: Gxg01-902-535). Výsledky testovaných vzoriek sa uvádzajú v medzinárodných jednotkách na ml (IU/ml) vo vzťahu ku krivke štandardu vytvorenej testovaním riedení štandardu, ktorý je súčasťou súpravy.

Je známe, že heterofilné protilátky (napríklad ľudské protilátky voči myším protilátkam) v sére alebo plazme niektorých jednotlivcov môžu skresľovať výsledky imunologických testov. Efekt heterofilných protilátok v rámci testu QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA je minimalizovaný pridaním normálneho myšieho séra do zeleného riedidla a použitím fragmentov monoklonálnej protilátky F(ab')₂ ako protilátky na zachytávanie IFN- γ , ktorá je nanosená na povrch mikrotitračných kalíškov.

Plazmová vzorka zo skúmavky Mitogen slúži ako pozitívna kontrola IFN- γ pre každú testovanú vzorku. Skúmavka Nil slúži na úpravu pozadia (napr. vzhľadom na nadmernú cirkuláciu IFN- γ alebo prítomnosť heterofilných protilátok). Úroveň IFN- γ v skúmavke Nil sa odčíta od úrovne IFN- γ v skúmavkách s antigénom Ag1, Ag2 a v skúmavke Mitogen.

Dodávané materiály

Obsah súpravy

Súčasti testu ELISA	Súprava s 2 doštičkami
Katalógové č.	626420
Microplate Strips (Mikrotitračné prúžky) (12 × 8 kalíškov) s myšacou antihumánnou monoklonálnou protilátkou IFN- γ	2 súpravy s mikrotitračnými prúžkami 12 × 8
IFN- γ Standard (Štandard IFN- γ), lyofilizovaný (obsahuje rekombinantný ľudský IFN- γ , hovädzí kazeín, Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 × liekovka (8 IU/ml po zriedení)
Green Diluent (Zelené riedidlo) (obsahuje hovädzí kazeín, štandardné myšacie sérum, Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 × 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Konjugát s koncentráciou 100x), lyofilizovaný (myšacie antihumánne IFN- γ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01 %)	1 × 0,3 ml (po zriedení)
Wash Buffer 20x Concentrate (Premývací roztok s koncentráciou 20x) (pH 7,2, obsahuje ProClin® 300, 0,05 % obj. hm.)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymatický substrátový roztok) (obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametylbendidín)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymatický tmiaci roztok; obsahuje 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 × 15 ml
<i>Návod na použitie súpravy QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit</i>	1

* Obsahuje kyselinu sírovú

Súčasti súpravy

Kontrolné a kalibračné roztoky

Test QFN SARS ELISA používa rekombinantný ľudský IFN- γ štandard, ktorý bol testovaný voči referenčnému IFN- γ prípravku (Ref. NIH: Gxg01-902-535).

Platforma a softvér

Na analýzu nespracovaných údajov a na výpočet výsledkov možno použiť analyzačný softvér QFN SARS Analysis Software. Je dostupný na stiahnutie na stránke **www.qiagen.com**.

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Doplňkové reagenty

- Deionizovaná alebo destilovaná voda, 2 litre

Zariadenie*

- Inkubátor s teplotou 37 ± 1 °C (s alebo bez CO₂)
- Kalibrované pipety s variabilným objemom na aplikáciu 10 µl až 1 000 µl s jednorazovými špičkami
- Kalibrované multikanálové pipety s možnosťou aplikácie objemu 50 µl a 100 µl s jednorazovými špičkami
- Trepáčka na mikrotitračné doštičky schopná dosiahnuť rýchlosť od 500 do 1000 ot./min.
- Umývačka mikrotitračných doštičiek (pre bezpečnosť pri manipulácii so vzorkami plazmy sa odporúča automatizovaná umývačka)
- Čítačka mikrotitračných doštičiek s filtrom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 nm až 650 nm
- Vortex s premenlivou rýchlosťou
- Centrifúga schopná centrifúgovania skúmaviek na odber krvi pri minimálne 3 000 RFC (g)
- Odmerný valec, 1 liter alebo 2 litre
- Veko doštičky
- Absorpčné utierky nezanechávajúce vlákna

* Pred použitím zabezpečte, aby sa prístroje skontrolovali a nakalibrovali podľa odporúčaní výrobcu.

Varovania a preventívne opatrenia

Zákazníci v Európskej únii musia zobrať na vedomie, že môžu byť požiadaní, aby nahlásili výrobcovi a kompetentnému orgánu v členskom štáte, ku ktorému používateľ a/alebo pacient prináleží, vážne incidenty, ktoré vznikli v súvislosti s pomôckou.

Bezpečnostné informácie

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese **www.qiagen.com/safety**. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

- Všetky chemikálie a biologické materiály sú potenciálne nebezpečné. Vzorky sú potenciálne infekčné a musí sa s nimi zaobchádzať ako s biologicky nebezpečnými materiálmi.
- Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných postupov.
- Vzorky sú potenciálne infekčné. Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných postupov.
- Test QFN SARS sa musí používať spolu s iným testovacím a epidemiologickým/klinickým spôsobom vyhodnotenia, aby dokázal zhodnotiť imunitnú odpoveď vakcinácie proti vírusu COVID-19.

- Nereaktívny výsledok testu QFN SARS nebráni o možnosti infekcie vírusom SARS-CoV-2 ani neurčuje účinnosť vakcín proti ochoreniu COVID-19. Falošné nereaktívne výsledky môžu byť spôsobené nesprávnou manipuláciou so skúmavkami na odber krvi po venepunkcii, nesprávnym vykonaním testu alebo inými individuálnymi imunologickými premennými, vrátane tých, ktoré súvisia s komorbiditami. Produkcia heterofilných protilátok a nešpecifického IFN- γ pri iných zápalových zdravotných problémoch môže maskovať špecifickú reakciu na peptidy vírusu SARS-CoV-2.
- Reaktívny výsledok QFN SARS nesmie byť jediným alebo definitívnym základom stanovenia infekcie vírusom COVID-19. Nesprávne vykonanie testu môže viesť k falošne reaktívnym výsledkom QFN SARS.
- Falošne reaktívny výsledok QFN SARS môže byť spôsobený nesprávnym odberom vzorky krvi alebo nesprávnou manipuláciou so vzorkou, čo ovplyvní funkciu lymfocytov. Prečítajte si časť „Postup: Vykonanie testu ELISA“ na strane 19, kde nájdete informácie o správnej manipulácii so vzorkami krvi. Oneskorenie inkubácie môže spôsobiť falošne nereaktívne alebo neurčité výsledky a iné technické parametre môžu ovplyvniť schopnosť detegovať výraznú odpoveď na IFN- γ .
- Slabá reakcia na Mitogen (< 0,5 IU/ml) indikuje neurčitý výsledok v prípade, ak krvná vzorka taktiež vykazuje nereaktívnu odpoveď na proteíny SARS CoV-2. K takémuto správaniu môže dochádzať v prípade nedostatočného počtu lymfocytov, zníženej aktivity lymfocytov v dôsledku manipulácie so vzorkami, nesprávneho plnenia/miešania skúmavky Mitogen alebo neschopnosti lymfocytov pacienta generovať IFN- γ . Zvýšené úrovne IFN- γ vo vzorke Nil sa môžu vyskytnúť za prítomnosti heterofilných protilátok alebo v dôsledku vnútornej sekrécie IFN- γ .

Preventívne opatrenia

UPOZORNENIE



S ľudskou krvou manipulujte ako s potenciálne infekčným materiálom.

Dodržiavajte príslušné pokyny na manipuláciu s krvou. Všetky vzorky a materiály, ktoré prišli do styku s krvou alebo krvnými produktmi, zlikvidujte v súlade s platnými federálnymi, štátnymi a miestnymi predpismi.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Obsahuje: kyselina sírová. Varovanie! Môže byť korozívna pre kovy. Spôsobuje podráždenie pokožky. Spôsobuje závažné podráždenie očí. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Varovanie! Spôsobuje mierne podráždenie pokožky. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

QuantiFERON Green Diluent



Obsahuje: tartrazín. Varovanie! Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia.

Ďalšie informácie

Karty bezpečnostných údajov: www.qiagen.com/safety

- Thimerosal sa používa ako konzervant pri niektorých reagentoch QFN SARS. Po požití, vdychnutí alebo po kontakte s pokožkou môže byť toxický.
- Odchýlky od postupov uvádzaných v *návode na použitie súpravy QuantiFERON ELISA Kit* môžu viesť k chybným výsledkom. Pred začatím si dôkladne prečítajte príslušné pokyny.
- Súpravu nepoužívajte, ak niektorá z fliaš s činidlami pred použitím vykazuje znaky poškodenia alebo únikov.
- **Dôležité:** Pred použitím skontrolujte liekovky. Nepoužívajte liekovky konjugátu alebo štandardu IFN- γ , ktoré vykazujú známky poškodenia alebo poškodenie gumového tesnenia. Nepracujte s poškodenými liekovkami. Liekovky bezpečne zlikvidujte v súlade s príslušnými bezpečnostnými opatreniami. Na otváranie liekoviek konjugátu alebo štandardu IFN- γ sa odporúča použiť nástroj na odpájanie stlačených spojov, čím znížite riziko zranenia spôsobeného kovovým stlačeným vekom.

-
- Nemiešajte ani spolu nepoužívajte mikrotitračné prúžky, štandard IFN- γ , zelené riedidlo alebo konjugát s koncentráciou 100x z rôznych dávok súprav QFN SARS. Ďalšie činidlá (premyvacie roztok s koncentráciou 20x, enzymatický substrátový roztok a enzymatický tlmiači roztok) je možné zamieňať medzi jednotlivými súpravami za predpokladu, že neuplynul dátum expirácie činidiel a sú zaznamenané podrobné informácie o šarži.
 - Nepoužité činidlá a biologické vzorky zlikvidujte v súlade s miestnymi, štátnymi a federálnymi nariadeniami.
 - Nepoužívajte súpravu QFN SARS ELISA Kit po uplynutí dátumu expirácie.
 - Vždy dodržiavajte správne laboratórne postupy.
 - Overte, či sú laboratórne zariadenia (napríklad umývačky doštičiek a čítačky) kalibrované a schválené na používanie.

Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie a podmienkam skladovania vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované alebo nesprávne skladované komponenty.

Stabilita pri používaní

- Súpravu ELISA skladujte pri teplote 2 – 8 °C.
- Enzymatický substrátový roztok vždy chráňte pred priamym slnečným svetlom.

Zriedené a nepoužívané činidlá

- Pokyny na prípravu reagensí ELISA nájdete v časti „Postup: Vykonanie testu ELISA“ na strane 19.
- Zriedený štandard zo súpravy je možné uchovávať po dobu 3 mesiacov pri teplote 2 – 8 °C.
Zaznamenajte si dátum zriedenia štandardu súpravy.
- Konjugát s koncentráciou 100× je po zriedení potrebné uchovávať tiež pri teplote 2 – 8 °C a spotrebovať ho do 3 mesiacov.
Zaznamenajte si dátum zriedenia konjugátu.
- Konjugát s požadovanou koncentráciou je potrebné spotrebovať do 6 hodín od prípravy.
- Premývací roztok s požadovanou koncentráciou môžete uchovávať pri izbovej teplote maximálne 2 týždne.

Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi

Prečítajte si *návod na použitie skúmaviek na odber krvi QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes (1124422)*, ktorom nájdete podrobnosti o pracovnom postupe pri odbere krvi pre test QFN SARS.

Postup: Vykonalie testu ELISA

Protokol: IFN- γ ELISA

Dôležité body

- Viac si prečítajte na „Obsah súpravy“, strana 9 a „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“, strana 11, pre materiály potrebné na vykonanie testu ELISA.

Nastavenie (Čas potrebný na vykonanie testu)

Na získanie platných výsledkov testu QFN SARS musí operátor vykonať konkrétne úlohy v určenom čase. Pred použitím testu sa odporúča, aby operátor dôkladne naplánoval každú fázu testu, aby mal dostatočný čas na vykonanie každej z nich. Čas potrebný na vykonanie testu QFT je uvedený nižšie – súčasťou týchto informácií je aj čas potrebný na testovanie viacerých vzoriek v dávkach.

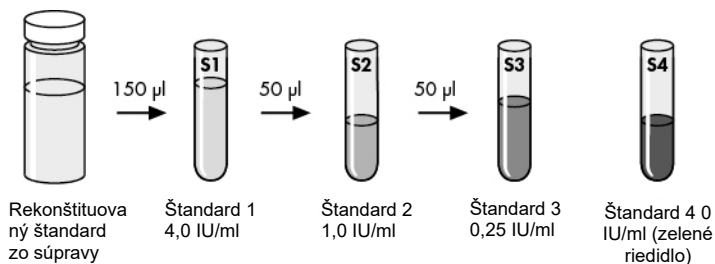
- Približne 3 hodiny na jednu doštičku ELISA
- Práca < 1 hod.
- Pre každú ďalšiu doštičku pridajte 10 až 15 minút

Postup

1. Je potrebné, aby všetky plazmové vzorky a činidlá (okrem konjugátu s koncentráciou 100x) pred použitím nadobudli izbovú teplotu (22 ± 5 °C). Ekvilibrácia má trvať najmenej 60 minút.
2. Odstráňte z rámu nepotrebné prúžky platne ELISA, uzavrite fóliové vrečko a vráťte ho do chladničky.
3. Vykonať test najmenej 1 prúžka so štandardmi QFN SARS a dostatočného počtu prúžkov vzhľadom na počet testovaných pacientov (pozrite si obrázok 2 s odporúčaným formátom doštičky). Po dokončení si ponechajte rám a viečko na použitie s ďalšími prúžkami.

- 3a. Zriedte štandard IFN- γ s deionizovanou alebo destilovanou vodou s objemom vyznačeným na štítku liekovky. Jemne zamiešajte, aby ste minimalizovali tvorbu peny a zabezpečte úplné rozpustenie obsahu liekovky. Zriedenie štandardu IFN- γ na uvedený objem vedie k získaniu roztoku s koncentráciou 8,0 IU/ml.
- 3b. Pomocou rekonštituovaného štandardu pripravte sériu riedení 4 koncentrácií IFN- γ v zelenom riedidle (pozri obrázok 1).
- 3c. Krivka štandardu sa musí vygenerovať s týmito koncentraciami IFN- γ :
- S1 (štandard 1) obsahuje 4,0 IU/ml
 - S2 (štandard 2) obsahuje 1,0 IU/ml
 - S3 (štandard 3) obsahuje 0,25 IU/ml
 - S4 (štandard 4) obsahuje 0 IU/ml (len zelené riedidlo [Green Diluent, GD]).
- 3d. Štandardy sa musia testovať najmenej duplicitne.
- 3e. Pripravte si čerstvé zriedené roztoky štandardu súpravy na každú analytickú reláciu ELISA.

Postup	
A	Označte 4 skúmavky: S1, S2, S3, S4
B	Pridajte 150 μ l GD do S1, S2, S3, S4
C	Pridajte 150 μ l štandardu súpravy do S1 a zmes riadne premiešajte
D	Preňte 50 μ l z S1 do S2 a zmes riadne premiešajte
E	Preňte 50 μ l z S2 do S3 a zmes riadne premiešajte
F	Samotné GD slúži ako nulový štandard (S4)



Obrázok 1. Príprava sérií riedení pre krivku štandardu.

4. Zriedte lyofilizovaný konjugát s koncentráciou 100× s 0,3 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Jemne zamiešajte, aby ste minimalizovali tvorbu peny a zabezpečte úplné rozpustenie obsahu liekovky.
- 4a. Konjugát s požadovanou (pracovnou) koncentráciou sa pripravuje zriedením požadovaného objemu konjugátu s koncentráciou 100× v zelenom riedidle (tabuľka 1).
- 4b. Konjugát s požadovanou koncentráciou je potrebné spotrebovať do 6 hodín od prípravy.
- 4c. Nepoužitý konjugát s koncentráciou 100× ihneď po použití vráťte do skladovacieho priestoru s teplotou 2 až 8°C.

Tabuľka 1. Príprava konjugátu (s požadovanou koncentráciou)

Počet prúžkov	Objem konjugátu (koncentrácia 100×)	Objem zeleného riedidla
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. V prípade plazmových vzoriek odobratých zo skúmaviek na odber krvi a následne skladovaných (v chladničke alebo mrazničke) skladované vzorky dôkladne premiešajte pred tým, než ich pridáte do kalíška ELISA. Vzorky plazmy je možné uskladniť v centrifúgovaných skúmavkách na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes až na 28 dní pri teplote 2 - 8 °C a vzorky odobratej plazmy sa môžu uskladniť na 28 dní pri teplote 2 - 8 °C. Vzorky odobratej plazmy sa môžu uskladniť aj pri teplote nižšej ako -20 °C (pokiaľ možno nižšej ako -70 °C) až na 24 mesiacov.

Plazmové vzorky je možné preniesť/použiť priamo z odstredených skúmaviek na meranie na doštičku QFN SARS ELISA.

Dôležité: Ak chcete preniesť vzorky plazmy priamo z odstredených skúmaviek na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes, plazma sa nesmie miešať. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.

6. Pridajte 50 µl čerstvo pripraveného konjugátu s požadovanou koncentráciou do príslušnej doštičky ELISA.
7. Pomocou multikanálovej pipety pridajte 50 µl testovanej plazmovej vzorky do príslušných jamiek (pozri odporúčané rozloženie doštičky ELISA na obrázku 2).
8. Pomocou multikanálovej pipety nakoniec pridajte 50 µl každého štandardu 1 až 4 do príslušnej jamky doštičky (pozri odporúčané rozloženie doštičky ELISA na obrázku 2). Štandardy je potrebné testovať najmenej duplicitne.

	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

Obrázok 2. Odporúčané rozloženie doštičky ELISA. S1 (Štandard 1), S2 (Štandard 2), S3 (Štandard 3), S4 (Štandard 4). 1N (vzorka 1. kontrolná plazma Nil), 1 Ag1 (vzorka 1. plazma Ag1), 1 Ag2 (vzorka 1. plazma Ag2), 1M (vzorka 1. plazma Mitogen).

9. Zakryte každú doštičku ELISA vekom a pomocou trepačky na mikrotitračné doštičky dôkladne premiešajte konjugát a plazmové vzorky/štandardy 1 minútu pri rýchlosti 500 až 1 000 otáčok/min. Dávajte pozor, aby ste nerozliali obsah.
10. Zakryte doštičku ELISA a inkubujte pri izbovej teplote ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 120 ± 5 minút. Doštička ELISA počas inkubácie nesmie byť vystavená priamemu slnečnému žiareniu. Odchýlka od špecifikovaného teplotného rozsahu môže viesť k chybným výsledkom.
11. Počas inkubácie doštičky ELISA pripravte premývací roztok s požadovanou koncentráciou. Zriedte jeden diel premývacieho roztoku s koncentráciou $20\times$ s 19 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody a zmes riadne premiešajte. K dispozícii je dostatok premývacieho roztoku s koncentráciou $20\times$ na prípravu 2 litrov premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou.
12. Po skončení inkubácie doštičky ELISA umyte jamky doštičky pomocou $400\text{ }\mu\text{l}$ premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou. Vykonať kroky premývania minimálne 6-krát. Z bezpečnostných dôvodov sa pri manipulácii so vzorkami plazmy odporúča automatizovaná umývačka doštičiek.

Dôkladné prepláchnutie je veľmi dôležité z hľadiska účinnosti testu. Dbajte na úplné naplnenie každého kalíška premývacím roztokom (až po vrch kalíška) v každom premývacom cykle. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.

Do odpadovej nádoby je vhodné pridať štandardný laboratórny dezinfekčný prostriedok a v prípade dekontaminácie potenciálne infekčného materiálu je potrebné postupovať podľa stanovených procedúr.

13. Vyklepaním doštičky ELISA na absorpčnú utierku (nezanechávajúcu vlákna) odstráňte zvyškový premývací roztok. Do každej jamky doštičky pridajte $100\text{ }\mu\text{l}$ enzymatického substrátového roztoku, doštičku zakryte a dôkladne premiešajte 1 minútu pri rýchlosti 500 až 1 000 ot./min.

-
14. Zakryte doštičku ELISA a inkubujte pri izbovej teplote ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 30 minút. Doštička ELISA počas inkubácie nesmie byť vystavená priamemu slnečnému žiareniu.
 15. Po 30 minútach inkubácie pridajte 50 μl enzymatického tlmiaceho roztoku do každej jamky doštičky v rovnakom poradí, ako bol pridaný substrát, a dôkladne premiešajte pri 500 až 1 000 ot./min. Použite trepačku na mikrotitračné doštičky.
 16. Odmerajte optickú hustotu (Optical Density – OD) jamiek doštičky ELISA do 5 minút od zastavenia reakcie pomocou čítačky mikrotitračných doštičiek vybavenej filtrom s filtračným rozsahom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 až 650 nm. Hodnoty OD sa používajú na výpočet výsledkov.

Výsledky (výpočty)

Na analýzu nespracovaných údajov a na výpočet výsledkov možno použiť analyzačný softvér QFN SARS Analysis Software. Je dostupný na stránke www.qiagen.com. Vždy overte, či používate najnovšiu verziu analyzačného softvéru QFN SARS Analysis Software.

Tento softvér slúži na hodnotenie kontroly kvality testu, generovanie krivky štandardu a poskytuje výsledok testu každého pacienta v súlade s informáciami uvádzanými v „Interpretácia výsledkov“ na strane 29. Softvér oznámi všetky koncentrácie väčšie ako 10 IU/ml ako „>10“, pretože tieto hodnoty nespádajú do validovaného lineárneho rozsahu doštičky ELISA.

Okrem použitia analyzačného softvéru QFN SARS Analysis Software je možné výsledky stanoviť aj pomocou nasledovnej metódy.

Generovanie krivky štandardu a hodnôt vzoriek

Ak sa nepoužíva analyzačný softvér QFN SARS Analysis Software

Určenie krivky štandardu a stanovenie hodnôt IU/ml vzorky vyžaduje program tabuľkového procesora, ako napríklad Microsoft® Excel®, ak sa nepoužíva analyzačný softvér QFN SARS Analysis Software.

Použitie programu s tabuľkovým procesorom

1. Stanovte stredné hodnoty OD replikátov štandardu súpravy na každej doštičke.
2. Vytvorte logaritmickú krivku štandardu $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ zakreslením hodnoty $\log_{(e)}$ priemeru OD (os y) voči hodnote $\log_{(e)}$ koncentrácie IFN- γ štandardov v IU/ml (os x) a z týchto výpočtov vynechajte nulový štandard. Pomocou regresnej analýzy vypočítajte čiaru najlepšieho umiestnenia (prispôsobenia) krivky štandardu.

- Pomocou krivky štandardu stanovte koncentráciu IFN- γ (IU/ml) každej z testovaných plazmových vzoriek a použite hodnotu OD každej vzorky.
- Tieto výpočty je možné vykonávať pomocou softvérových balíkov dostupných spolu s čítačkami mikrotitračných doštičiek a štandardného tabuľkového alebo štatistického softvéru (napríklad Microsoft Excel). Tieto balíky odporúčame používať na výpočet regresnej analýzy, koeficientu variácie (Coefficient of Variation, %CV) štandardov a koeficientu korelácie (r) krivky štandardu.

Výpočet vzorky

Ak sa pre štandardy získajú tieto hodnoty OD, budú nasledovať výpočty pomocou $-\log_{(e)}$ – po výpočtoch uvedených v tabuľke 2.

Tabuľka 2. Krivka štandardu

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

Rovnica krivky je $y = 0,7885(X) - 0,9837$, kde „m“ = 0,7885 a „c“ = -0,9837. Tieto hodnoty sa používajú v rovnici $X = (Y-c)/m$ na vyriešenie X. Na základe krivky štandardu je vypočítaný koeficient korelácie (r) = 1 000. **Nevzťahuje sa:** nevzťahuje sa.

Pomocou kritérií uvedených v „Kontrola kvality testu“ na strane 27 sa určí platnosť testu.

Krivka štandardu (tabuľka 2) sa používa na premenu odpovedí OD antigénu na medzinárodné jednotky (IU/ml).

Tabuľka 3. Výpočet vzorky

Antigén	Hodnota OD	Log _(e) hodnota OD	X	e ^x (IU/ml)	Antigén –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) pre Ag1, Ag2 a Mitogen sa skorigujú pre pozadie odpočítaním hodnoty IU/ml získanej pre konkrétny kontrolný roztok Nil. Tieto skorigované hodnoty sa použijú na interpretáciu výsledkov testu.

Kontrola kvality testu

Správnosť výsledkov testu závisí od generovania správnej krivky štandardu. Z tohto dôvodu je výsledky odvodené od štandardov potrebné preskúmať pred tým, než budete môcť interpretovať výsledky testovacej vzorky.

Zabezpečenie platnosti analýzy ELISA:

- Stredná hodnota OD štandardu 1 musí byť $\geq 0,600$.
- %CV hodnôt replikátu štandardu 1 a štandardu 2 musí byť $\leq 15\%$.
- Hodnoty OD replikátu štandardov 3 a 4 sa nesmú odlišovať o viac než 0,040 jednotky optickej hustoty od ich strednej hodnoty.
- Koeficient korelácie (r) vypočítaný zo stredných hodnôt absorbancie štandardov musí byť $\geq 0,98$.
- Ak vyššie uvedené kritériá nie sú splnené, cyklus testovania je neplatný a je potrebné ho zopakovať.
- Stredná hodnota OD nulového štandardu (zelené riedidlo) má byť $\leq 0,150$. Ak je stredná hodnota OD $> 0,150$, je potrebné preskúmať postup premývania doštičky.

Analyzačný softvér QFN SARS Analysis Software počíta a vykazuje tieto parametre kontroly kvality.

Každé laboratórium musí určiť vhodné typy kontrolných látok a frekvenciu testovania v súlade s miestnymi, štátnymi, federálnymi alebo inými platnými akreditačnými inštitúciami. Musia sa zohľadniť externé hodnotenie kvality a alternatívne validačné postupy.

Poznámka: Vzorky plazmy, do ktorej sa pridal rekombinantný IFN- γ vykázali zníženie koncentrácie až do 50 % pri skladovaní pri teplote 2 – 8 °C a –20 °C. Rekombinantný IFN- γ sa neodporúča na stanovenie štandardov kontrolných roztokov vo vzorkách plazmy.

Interpretácia výsledkov

Výsledky QFN SARS sa interpretujú pomocou nasledovných kritérií (tabuľka 4).

Dôležité: Test QFN SARS sa musí používať spolu s iným testovacím a epidemiologickým/klinickým spôsobom vyhodnotenia, aby dokázal zhodnotiť imunitnú odpoveď vakcinácie proti vírusu COVID-19.

Tabuľka 4. Interpretácia výsledkov testu QFN SARS

Nil (IU/ml)	Antigén Ag1 mínus Nil (IU/ml)	Antigén Ag2 mínus Nil (IU/ml)	Mitogen mínus Nil (IU/ml)*	Výsledok QFN SARS	Správa/interpretácia
≤ 8,0	≥ 0,15 a ≥ 25 % Nil	Akákolvek hodnota	Akákolvek hodnota	Reaktívne	<i>Zistená odpoveď na SARS-CoV-2</i>
	Akákolvek hodnota	≥ 0,15 a ≥ 25 % Nil			
	< 0,15 alebo ≥ 0,15 a < 25 % Nil	< 0,15 alebo ≥ 0,15 a < 25 % Nil	≥ 0,50	Nereaktívne	<i>NEZISTENÁ odpoveď na SARS-CoV-2</i>
	< 0,15 alebo ≥ 0,15 a < 25 % Nil	< 0,15 alebo ≥ 0,15 a < 25 % Nil	< 0,50	Neurčitý [‡]	<i>Odpoveď na SARS- CoV-2 a Mitogen nie je možné zistiť</i>
> 8,0 [§]	Akákolvek hodnota				

* Reakcie na pozitívnu kontrolu Mitogen (a niekedy aj reakcie na antigén Ag) sa môžu bežne nachádzať mimo rozsahu čítačky mikrotitračných doštičiek. Nemá to však žiadny vplyv na výsledky. Hodnoty > 10 IU/ml označuje softvér QFN SARS ako >10 IU/ml.

[‡] Možné príčiny nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“ na strane 51.

[§] V rámci klinických štúdií malo menej než 0,25 % pacientov hodnoty IFN- γ > 8,0 IU/ml (vzhľadom na hodnotu Nil).

Obmedzenia

Výsledky testovania QFN SARS sa musia používať spolu s epidemiologickou anamnézou, aktuálnym zdravotným stavom a ďalšími diagnostickými hodnoteniami každého pacienta.

Jednotlivci s hodnotami Nil vyššími než 8 IU/ml sú zaradení do kategórie „neurčitý“, pretože miera reakcie na antigény Ag 25 % alebo vyššia môže spadať mimo rozsahu merania testu.

- Nereaktívny výsledok sa musí zohľadniť pri anamnéze pacienta a údajoch z minulosti, ktoré sú relevantné pre pravdepodobnosť imunitnej odpovede na vakcináciu, najmä u jednotlivcov so zníženou funkciou imunitného systému.
- Test QFN SARS sa musí používať spolu s iným testovacím a epidemiologickým/klinickým spôsobom vyhodnotenia, aby dokázal zhodnotiť imunitnú odpoveď vakcinácie proti vírusu COVID-19.

Nespoľahlivé alebo neurčité výsledky môžu byť výsledkom:

- odchýlok od postupov uvádzaných v návode na použitie,
- nesprávnou prepravou/manipuláciou so vzorkou krvi,
- zvýšenými hladinami cirkulácie IFN γ alebo prítomnosti heterofilných protilátok,
- prekročenia validovaných časov pre krv pri odobratí vzorky po jej inkubácii. Pozri *návod na použitie skúmaviek na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes (1124422)*.

Charakteristiky účinnosti testu

Analytické charakteristiky

Hraničná hodnota testu

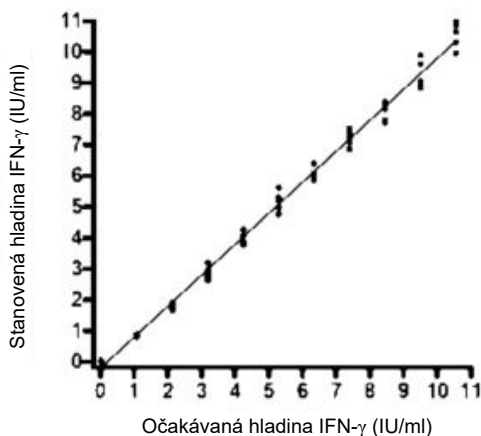
Hraničná hodnota testu QFN SARS bola stanovená pomocou údajov od dvadsiatich (20) pacientov, ktorých výsledok RT-PCR testu alebo sérologického testu na SARS-CoV-2 bol nereaktívny a od dvadsiatich (20) darcov, ktorí boli plne očkovaní (medzi 2 – 16 týždňami po dosiahnutí plnej vakcinácie) vakcínou schválenou podľa oprávnenia EUA úradu FDA. Údaje o senzitivite a špecificite spolu s presnými dvojstrannými intervalmi spoľahlivosti 95 % (CI) sa analyzovali a zistilo sa, že optimálna hraničná hodnota testu ELISA bola 0,15 IU/ml (pozri tabuľku 5).

Tabuľka 5. Hraničné hodnoty QFN SARS (IU/ml) s príslušnou senzitivitou a špecificitou s presným obojstranným koeficientom spoľahlivosti 95 %

Hraničná vzorka	Citlivosť			Špecificita		
	Hodnota	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %	Hodnota	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %
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

Uskutočnila sa štúdia lineárnosti, v rámci ktorej bolo náhodným spôsobom umiestnených 5 replikátov z 11 skupín plazmových vzoriek so známou koncentráciou IFN- γ na doštičku ELISA a bolo dokázané, že test QFN SARS ELISA je lineárny. Čiara lineárnej regresie má strmosť $1,002 \pm 0,011$ a koeficient korelácie s hodnotou 0,99 (obrázok 3).



Obrázok 3. Obrázok regresnej analýzy štúdie lineárnosti.

Reprodukovateľnosť

Uskutočnila sa multilaboratórna štúdia reprodukovateľnosti na vyhodnotenie presnosti testu QFN SARS v laboratóriách s viacerými operátormi. Táto štúdia sa uskutočnila v troch laboratóriách spoločnosti QIAGEN. Do štúdie boli zapojení celkovo traja (3) pacienti reaktívni na SARS-CoV-2 a traja (3) pacienti nereaktívni na SARS-CoV-2 (určení pomocou testu RT-PCR alebo sérologického testu).

Od každého pacienta sa odobrala krv do štyroch (4) skúmaviek na odber krvi s lítiom heparínom. Skúmavky na odber krvi s lítiom heparínom sa potom preniesli do jedného z testovacích laboratórií, kde sa krv alikvotovala do troch (3) súborov skúmaviek na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen a Nil). Jeden súbor každých skúmaviek na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes (BCT) sa preniesol do každého z testovacích laboratórií a potom sa otestoval podľa testovacieho postupu QFN SARS. Každý pacient sa v každom laboratóriu testoval s desiatimi (10) replikátmi (päť (5) replikátov pre Ag1 a päť (5) replikátov pre Ag2). V každom laboratóriu uskutočnil test QFN SARS nezávisle jeden (1) operátor. Pre každého operátora boli výsledky získané od ostatných operátorov zaslepené a zaslepené boli aj výsledky RT-PCR testov a serologických testov.

Získalo sa 30 výsledkov vygenerovaných vo všetkých troch (3) testovacích laboratóriách, čo znamená celkovo 90 dátových bodov. Výsledky štúdie reprodukovateľnosti sú zhrnuté v tabuľke 6.

Tabuľka 6. Súhrn výsledkov opakovateľnosti štúdie – N = Vzorky 30 pacientov

Laboratórium 1 – 1 operátor	Laboratórium 2 – 1 operátor	Laboratórium 3 – 1 operátor
25/30 = 83 %	30/30 = 100%	30/30 = 100%
Zhoda kvalitatívnych výsledkov	Zhoda kvalitatívnych výsledkov	Zhoda kvalitatívnych výsledkov

Celková percentuálna zhoda vo všetkých reaktívnych a nereaktívnych vzorkách s očakávanými kvalitatívnymi výsledkami (reaktívny pacient s reaktívnym výsledkom a nereaktívny pacient s nereaktívnym výsledkom na základe výsledku referenčnej metódy pacienta) bola 94,4 % (85/90) vo všetkých troch (3) laboratóriách.

Opakovateľnosť v rámci šarže

Uskutočnila sa štúdia na určenie variability skúmaviek na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes v rámci šarže. Do štúdie boli zapojení celkovo dvaja (2) pacienti reaktívni na SARS-CoV-2 a traja (3) pacienti nereaktívni na SARS-CoV-2 (určení pomocou testu RT-PCR alebo sérologického testu). Do štúdie sa zahrnuli tri (3) samostatné šarže skúmaviek na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes Ag1 a Ag2. Testovalo sa päť (5) replikátov na darcu na jednu skúmavku na odber krvi. Výsledky presnosti medzi jednotlivými šaržami sú zhrnuté v tabuľke 7.

Tabuľka 7. Súhrn výsledkov štúdie presnosti medzi šaržami – celková percentuálna zhoda skúmaviek na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes Ag1 a Ag2; N = 25

Skúmavka na odber krvi QFN SARS	Číslo šarže skúmavky	Počet kvalitatívnych signálov v zhode/signály celkovo	Podiel	Dolná hranica spoľahlivosti	Horná hranica spoľahlivosti
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 percentuálna zhoda vo všetkých reaktívnych a nereaktívnych vzorkách s očakávanými výsledkami (reaktívny pacient s reaktívnym výsledkom a nereaktívny pacient s nereaktívnym výsledkom na základe výsledku referenčnej metódy pacienta) bola 100 % vo všetkých troch (3) šaržiach skúmaviek QFN SARS Ag1 a Ag2 BCT.

Limit slepého pokusu (Limit of Blank, LoB)

Pre test QFN SARS sa vyhodnotil limit slepého pokusu (LoB). Dve (2) repliky každej zo štrnástich (14) jednotlivých vzoriek normálnej ľudskej plazmy (ako slepé pokusy) testovali pomocou dvoch (2) šarží testu QFN SARS ELISA traja (3) operátori počas troch (3) testovacích dní, jeden (1) operátor na jeden testovací deň s použitím celkovo 84 replík z každej šarže súpravy ELISA Kit.

Hodnoty LoB (IU/ml) pre dve (2) šarže súpravy ELISA Kit sa vypočítali samostatne a sú uvedené v tabuľke 8.

Tabuľka 8. Hodnoty LoB (IU/ml) pre dve (2) šarže súpravy QFN SARS ELISA Kit

Súprava QFN SARS ELISA Kit	Odhadovaný LoB (IU/ml)
Súprava 1	0,030
Súprava 2	0,040

Vyššia hodnota LoB 0,040 IU/ml v oboch šaržach súpravy QFN SARS ELISA Kit bola hlásená ako konečná hodnota LoB.

Limit detekcie (Limit of Detection, LoD)

Pre test QFN SARS sa vyhodnotil limit detekcie (LoD). Pool ľudskej plazmy sa vygeneroval skombinovaním štrnástich (14) samostatných vzoriek plazmy. Každý z troch (3) operátorov pripravil štandardnú referenčnú zásobu IFN- γ s hodnotou 1,0 IU/ml, ktorý sa zriedil v pufrí. Séria riedení ôsmich (8) koncentrácií sa uskutočnila v plazme. Štúdia sa uskutočnila počas troch (3) dní, zúčastnili sa na nej striedavo traja (3) operátori, ktorí použili dve (2) šarže súpravy QFN SARS ELISA Kit. Počas každého testovacieho dňa sa otestovalo päť (5) replík z každej koncentrácie v každom súbore sériového radu riedení pri celkovo 45 replikách pre každé riedenie koncentrácie IFN- γ pre každú šaržu súpravy QFN SARS ELISA Kit.

Hodnota LoD pre každú testovanú šaržu súpravy QFN SARS ELISA Kit sa vypočítala samostatne a je uvedená v tabuľke 9. Hodnota LoD sa odhadla pomocou modelu regresie Probit. Hodnota LoD bola založená na odhadovanej koncentrácii (IU/ml), ktorá poskytla 95 % odhadovanú pravdepodobnosť dosiahnutia miery úspešnosti vyššej ako 0,04 IU/ml (stanovenej pomocou LoB).

Tabuľka 9. Odhadované hodnoty LoD (IU/ml) pre dve (2) šarže súpravy QFN SARS ELISA Kit

Súprava QFN SARS ELISA Kit	Pravdepodobnosť	Odhadovaná koncentrácia (IU/ml)	Dolný 95 % limit spoľahlivosti pre odhad	Horný 95 % limit spoľahlivosti pre odhad
Súprava 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Súprava 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Vyššia hodnota LoD vypočítaná v oboch šaržach súpravy QFN SARS ELISA Kit, čiže 0,065 IU/ml, bola hlásená ako konečná hodnota LoD.

Interferujúce látky

Uskutočnila sa štúdia na stanovenie účinkov potenciálnych interferujúcich látok na presnosť detekcie IFN- γ testom QFN SARS ELISA. Interferujúce látky použité pri testovaní boli: triglyceridy (celkové), hemoglobín, proteín (celkové sérum), bilirubín (konjugovaný), bilirubín (nekonjugovaný), abakavir sulfát, cyklosporín a prednizolón. Pomocou rôznych koncentrácií interferujúcich látok sa pripravilo päť (5) poolov plazmy so známymi koncentraciami IFN- γ . Základná hladina IFN- γ poolu sa predtým pripravila pomocou vopred určeného množstva prítomného IFN- γ (približne 0,21, 0,45 a 1,4 IU/ml). Tento pool sa potom použil na prípravu poolov interferujúcich látok. Päť rôznych úrovní koncentrácie interferujúcich látok bolo testovaných a boli založené na referenčných intervaloch, patologických hodnotách, terapeutických rozsahoch a toxických rozsahoch alebo podľa odporúčania dodávateľa alebo všeobecných klinických úrovní. Pre každú hladinu koncentrácie vzorky interferujúcej látky sa testovalo šesť (6) replík.

Pre každú koncentráciu vzoriek sa vykonal T-test porovnávajúci rozdiel priemernej hodnoty log₁₀ (IU/ml) vysokej hladiny interferujúcej látky (10) v porovnaní s kontrolným roztok (t. j. hladina bez interferujúcej látky). V tabuľke je uvedený aj odhadovaný rozdiel v priemernej odpovedi spolu s príslušnými dvojstrannými 95 % limitmi spoľahlivosti a p-hodnotou.

Tabuľka 10. Log₁₀ IU/mL: Súhrnná tabuľka T-testu s rozdielmi v priemerných hodnotách medzi hladinou kontrolného roztoku a vysokou hladinou interferujúcej látky pre každú interferujúcu látku a hladinu koncentrácie IFN- γ

Interferujúca látka	Hladina interferujúcej látky	Koncentrácia vzorky (IU/ml)	Priemerný rozdiel	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %	P-hodnota
Triglyceridy	silná	1,4	0,053	-0,004	0,110	0,063
		0,45	0,039	-0,021	0,058	<.001
		0,21	0,034	-0,002	0,071	0,061
Hemoglobín	silná	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
Proteín	silná	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 bilirubín	silná	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 bilirubín	silná	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	silná	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

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

Pokračovanie tabuľky z predchádzajúcej strany

Tabuľka 10. Log₁₀ IU/mL: Súhrnná tabuľka T-testu s rozdielmi v priemerných hodnotách medzi hladinou kontrolného roztoku a vysokou hladinou interferujúcej látky pre každú interferujúcu látku a hladinu koncentrácie IFN- γ

Interferujúca látka	Hladina interferujúcej látky	Koncentrácia vzorky (IU/ml)	Priemerný rozdiel	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %	P-hodnota
Cyklosporín	silná	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
Prednizolón	silná	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 nevykázali žiadne štatisticky výrazné rozdiely medzi testovanou najvyššou hladinou interferujúcej látky a kontrolným roztokom (hladina bez interferujúcej látky) okrem hladiny koncentrácie triglyceridu 0,45 IU/ml. Priemerný rozdiel pri tejto hodnote sa zistil na úrovni ± 2 štandardné odchýlky od merania priemernej hladiny kontrolného roztoku, čo znamená, že sledovaný rozdiel je v rozsahu očakávanej variability testu a že sa očakáva, že klinicky relevantné hladiny triglyceridov budú narúšať test QFN SARS ELISA.

Klinická účinnosť

Klinická účinnosť testu QFN SARS sa hodnotila v prospektívnej pozorovacej štúdii, ktorá sa uskutočnila od júna do októbra 2021 na pacientoch bez anamnézy infekcie vírusom SARS-CoV-2, ktorí boli vakcinovaní proti vírusu COVID-19 vakcínami zacieleným na S proteín vírusu SARS-CoV-2 a tiež na pacientoch bez anamnézy infekcie vírusom SARS-CoV-2, ktorí neboli vakcinovaní proti vírusu COVID-19.

Pacienti, ktorí dali svoje súhlas, sa vyhodnotili v rámci inkluzívnych a exkluzívnych kritérií štúdie a do štúdie boli zapojení len pacienti, ktorí splnili všetky inkluzívne kritériá, ale žiadne exkluzívne kritériá, a týmto bola odobratá krv na test QFN SARS.

Súhrn zahrnutej populácie je uvedený nižšie:

- Skupina 1: Zahnutí pacienti s anamnézou prirodzenej infekcie vírusom SARS-CoV-2, neboli vakcinovaní proti vírusu COVID-19 v čas odberu krvi na test QFN SARS, neboli nikdy pozitívne testovaní na infekciu vírusom SARS-CoV-2, neohlásili nereaktívny výsledok sérologického testu a nemali žiadne príznaky ani symptómy ochorenia COVID-19 počas 4-týždňového obdobia pred zapojením do štúdie.
- Skupina 2: Zahnutí pacienti bez anamnézy infekcie vírusom SARS-CoV-2, boli vakcinovaní proti vírusu COVID-19 vakcínou cielenou na S proteín vírusu SARS-CoV-2 v čas odberu krvi na test QFN SARS a nikdy neboli pozitívne testovaní na infekciu vírusom SARS-CoV-2.
- Žiadni z pacientov nebol príjemcov transplantátu (pevného orgánu alebo buniek) a/alebo v čas štúdie nepodstúpi žiadnu liečbu rakoviny.

Do skupiny 1 bolo zaradených celkovo 218 pacientov, zatiaľ čo do skupiny 2 bolo zaradených 171 pacientov. Po odbere krvi do skúmaviek QFN SARS sa zistilo, že štyria pacienti zo skupiny 1 neboli vhodní z dôvodu reaktívneho výsledku serologického testu získané z odobratej vzorky v čase návštevy, kedy sa krv odoberala na test QFN SARS a títo pacienti boli z analýzy vylúčení.

Vzorky sa odobrali, skúmavky na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes sa spracovali a plazma sa uskladnila pri teplote ≤ -20 °C, kým nebola pripravená na testovanie testom QFN SARS ELISA. Všetky cykly doštičky QFN SARS ELISA boli platné a nezískali sa žiadne neurčité výsledky, vďaka čomu sa dosiahlo 214 a 171 zhodnotiteľných vzoriek v skupine 1 a 2 v tomto poradí.

Demografia

Počet vzoriek odobratých v každej krajine a percentuálna hodnota celkového počtu pre každú skupinu štúdie sú uvedené v tabuľke 11.

Tabuľka 11. Súhrn krajín odberu vzorky

Krajina odberu vzorky	Skupina 1		Skupina 2	
	N	%	N	%
Holandsko	214	100,00 %	153	89,47%
Americkí pacienti	0	0,00%	18	10,53%

Súhrn veku pacienta vrátane priemerného, mediánového, minimálneho a maximálneho veku a štandardnej odchýlky veku (SD) je uvedený v tabuľke 12.

Tabuľka 12. Súhrn veku pacientov (v rokoch)

N	Stredná hodnota	Medián	SD	Minimálny vek	Maximálny vek
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Súhrn pohlavia pacientov je uvedený v tabuľke 13.

Tabuľka 13. Súhrn pohlavia pacientov

Pohlavie	N	%
Žena	234	60,78%
Muž	151	39,22%

Špecifická

Klinická zhoda porovnávajúca výsledky testu QFN SARS s výsledkami referenčnej metódy je uvedená v tabuľke 14.

Tabuľka 14. Klinická zhoda: Výsledok testu QFN SARS v. referenčná metóda

		Výsledok referenčnej metódy		
		Skupina 1 (- vakc., -infekcia)	Skupina 2 (+ vakc., -infekcia)	Celkom
Výsledok QFN SARS	Nereaktívne	199	34	233
	Reaktívne	15	137	152
Celkom		214	171	385

Pri nevakcinovaných pacientoch (skupina 1) bolo 199 z 214 pacientov testovaných ako nereaktívni pomocou testu QFN SARS, zatiaľ čo zvyšných 15 bolo reaktívnych. Pri vakcinovaných pacientoch (skupina 2) bolo 137 z 171 pacientov testovaných ako reaktívni pomocou testu QFN SARS, zatiaľ čo zvyšných 34 bolo nereaktívnych. Žiadna z 15 a 34 nezhodujúcich sa vzoriek v skupine 1 a 2 v tomto poradí nebola testovaná opakovane pomocou nezhodujúcej sa metódy.

Negatívna percentuálna zhoda (NPA) (špecifickosť) sa vypočítala pri nevakcinovaných pacientoch (skupina 1) spolu s dvojstranným 95 % presným intervalom spoľahlivosti (CI) a je uvedená v tabuľke 15.

Tabuľka 15. Negatívna percentuálna zhoda (špecifickosť)

Č. skupiny	NPA (špecifickosť)	95 % CI
Skupina 1 (-vax, -infekcia)	92,99 % (199/214)	88,70 – 96,02 %

Citlivosť

Pozitívna percentuálna zhoda (PPA) (senzitivita) sa vypočítala pri nevakcinovaných pacientoch (skupina 2) spolu s dvojstranným 95 % presným intervalom spoľahlivosti (CI) a je uvedená v tabuľke 16.

Tabuľka 16. Pozitívna percentuálna zhoda (senzitivita)

Č. skupiny	PPA (senzitivita)	95 % CI
Skupina 2 (+vax, -infekcia)	80,12% (137/171)	73,34 – 85,82 %

Pozitívna percentuálna zhoda podľa veku

Pri vakcinovaných pacientoch (skupina 2) sa pozitívna percentuálna zhoda stratifikovala podľa veku < 60 a ≥ 60 rokov a je uvedená v tabuľke 17.

Tabuľka 17. Pozitívna percentuálna zhoda podľa veku < 60 a ≥ 60

Veková skupina (v rokoch)	PPA (senzitivita)	95 % CI
< 60	85,33 % (128/150)	78,78 – 90,64 %
≥ 60	42,86 % (9/21)	21,82 – 65,98 %

Pozitívna percentuálna zhoda podľa vakcíny proti COVID-19

Pri vakcinovaných pacientoch (skupina 2) sa pozitívna percentuálna zhoda stratifikovala podľa podanej vakcíny proti ochoreniu COVID-19 a je uvedená v tabuľke 18.

Tabuľka 18. Pozitívna percentuálna zhoda podľa vakcíny proti COVID-19

Vakcína	PPA (senzitivita)	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 súvisiace s nereaktívnymi výsledkami u vakcinovaných pacientov

Na určenie, či vyšší vek, čas od ukončenia vakcinácie proti ochoreniu COVID-19, podaná vakcína a pohlavie súvisia s nereaktívnymi výsledkami u vakcinovaných pacientov (skupina 2), sa uskutočnila jednorozmerná regresná analýza. Súvis medzi každým faktorom a nereaktívnymi výsledkami sa vypočíta s ohľadom na pravdepodobnosť (OR) a výsledky sú uvedené v tabuľke 19.

Tabuľka 19. Súvis medzi faktormi a nereaktívnymi výsledkami u vakcinovaných pacientov

Faktor		OR (95 % CI)	p-hodnota
Vek (v rokoch)		1,08 (1,05 – 1,12)	< 0,001
Čas od vakcinácie po ober krvi na test QFN SARS (v dňoch)		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
Pohlavie	Žena	1	–
	Muž	1,25 (0,59 – 2,65)	0,565

Jediné faktory, ktoré výrazne súviseli s nereaktívnymi výsledkami u vakcinovaných pacientov, boli vek a čas od vakcinácie.

Keď sa štúdia uskutočnila v krajinách, v ktorých bola vakcína proti vírusu COVID-19 dostupná najprv pre staršie osoby, mohol mať vek vplyv na súvis medzi časom od vakcinácie a nereaktívnymi výsledkami. Tabuľka 20 ukazuje regresnú analýzu s vekom ako kovariátom.

Tabuľka 20. Súvis medzi faktormi a nereaktívnymi výsledkami regulovanými vzhľadom na vek

Faktor	OR (95 % CI)	p-hodnota
Vek (v rokoch)	1,07 (1,03 – 1,11)	< 0,001
Čas od vakcinácie po ober krvi na test QFN SARS (v dňoch)	1,01 (1,00 – 1,02)	0,214

Ak sa reguloval vek, súvis medzi časom od vakcinácie a nereaktívnymi výsledkami nie je viac dôležitý, aj keď pri veku stále existuje výrazný súvis.

Referenčná literatúra

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, EunáteArana-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. Rydyznski 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

Spríevodca riešením problémov

Tento spríevodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a/alebo protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na stránke www.qiagen.com).

Komentáre a návrhy

Riešenie problémov s analýzou ELISA

Vytvorenie nešpecifickej farby

- | | |
|--|--|
| a) Neúplné prepláchnutie doštičky | Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia. |
| b) Krížová kontaminácia kalíškov ELISA | Počas pipetovania a miešania vzorky postupujte opatrne, aby ste minimalizovali riziko. |
| c) Uplynul dátum expirácie súpravy/komponento v | Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do troch mesiacov od dátumu riedenia. |
| d) Overte, či enzymatický substrátový roztok nie je kontaminovaný | Ak sa vytvorí modré sfarbenie, substrát zlikvidujte. Používajte výlučne čisté nádoby na činidlá. |
| e) Miešanie plazmy v skúmavkách na odber krvi QFN SARS Blood Collection Tubes pred jej odberom | Po dokončení odstredovania a pred odobratím plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu. |

Komentáre a návrhy

Nízke hodnoty optickej hustoty štandardov

- | | |
|--|--|
| a) Chyba riedenia štandardu | Dbajte na to, aby ste pripravovali roztoky štandardu súpravy v súlade s informáciami v tomto návode na použitie. |
| b) Chyba pipetovania | Pipety musia byť kalibrované a je potrebné ich používať v súlade s pokynmi výrobcu. |
| c) Príliš nízka teplota inkubácie | Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). |
| d) Príliš krátka doba inkubácie | Inkubácia doštičky s konjugátom, štandardmi a vzorkami má trvať 120 ± 5 minút. Enzymatický substrátový roztok sa musí inkubovať na doštičke 30 minút. |
| e) Použitý nesprávny filter na čítačku doštičiek | Doštička sa má načítať pri vlnovej dĺžke 450 nm s referenčným filtrom s filtračným rozsahom od 620 do 650 nm. |
| f) Činidlá sú príliš studené | Než začnete s testom, musia všetky činidlá s výnimkou konjugátu s koncentráciou 100X nadobudnúť izbovú teplotu. Trvá to približne 1 hodinu. |
| g) Uplynul dátum expirácie súpravy/komponento v | Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do 3 mesiacov od zriedenia. |

Vysoké hodnoty na pozadí

- | | |
|--|---|
| a) Neúplné prepláchnutie doštičky | Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. Môže byť potrebných viac ako 6 umývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia. |
| b) Príliš vysoká teplota inkubácie | Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). |
| c) Uplynul dátum expirácie súpravy/komponentov | Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do troch mesiacov od dátumu riedenia. |

Komentáre a návrhy














- d) Overte, či enzymatický substrátový roztok nie je kontaminovaný Ak sa vytvorí modré sfarbenie, substrát zlikvidujte. Používajte výlučne čisté nádoby na činidlá.


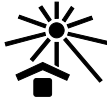

Nelineárna krivka štandardu a variabilita duplikátu

- a) Neúplné prepláchnutie doštičky Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. Môže byť potrebných viac ako 6 umývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
- b) Chyba riedenia štandardu Dbajte na to, aby ste pripravovali roztoky štandardu v súlade s informáciami v tomto návode na použitie.
- c) Nedostatočné miešanie Činidlá treba pred pridaním na doštičku riadne premiešať preklápaním alebo jemným premiešaním.
- d) Nekonzistentný postup pipetovania alebo prerušenie počas nastavenia testu Pridávanie vzoriek a štandardov treba vykonávať kontinuálne. Všetky činidlá je potrebné pripraviť pred začatím testu.

Symbols

Nasledujúce symboly sa môžu objaviť v návode na použitie alebo na balení a štítkoch:

Symbol	Definícia symbolu
 <N>	Obsahuje reagenty postačujúce na <N> reakcií
	Použite do
	Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro
	Katalógové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (t. j. označenie komponentu)
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
	Autorizovaný zástupca
R_n	R označuje revíziu návodu na použitie a n je číslo revízie
	Teplotné obmedzenia
	Výrobca

Symbol	Definícia symbolu
	Prečítajte si návod na použitie
	Chráňte pred slnečným svetlom
	Varovanie/upozornenie

Kontaktné informácie

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate v centre technickej podpory na adrese **www.qiagen.com/Support** alebo na telefónnom čísle 00800-22-44-6000, alebo kontaktujte niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú stranu alebo navštívte lokalitu **www.qiagen.com**).

Príloha A: Technické informácie

Neurčité výsledky

Neurčité výsledky sú neobvyklé a môžu súvisieť s imunitným stavom testovaného jedinca. Súvisieť však môžu aj s mnohými technickými faktormi (napr. nevhodná manipulácia/skladovanie skúmaviek na odber krvi, neúplné umytie doštičky ELISA), ak sa nepostupuje podľa pokynov uvedených vyššie.

Ak predpokladáte, že počas skladovania činidiel, odberu krvi alebo manipulácie s krvnými vzorkami došlo k technickým problémom, zopakujte celý test QFN SARS s novými vzorkami krvi. Opakovanie testovania stimulovanej plazmy pomocou analýzy ELISA je možné vykonať v prípade, ak predpokladáte nedostatočné premývanie alebo akúkoľvek procedurálnu odchýlku od testu ELISA. Lekári sa môžu rozhodnúť opakovať odber vzorky alebo vykonať iný postup.

Zrazené plazmové vzorky

Ak v prípade dlhodobého uchovávaní plazmových vzoriek dôjde k vytvoreniu fibrínových zrazenín, odstredení vzoriek oddelíte zrazený materiál a zjednodušíte prenos plazmy pipetou.

Vzorky lipemickej plazmy

Pri pipetovaní vzoriek lipemickej plazmy postupujte opatrne, pretože masťné usadeniny môžu upchať pipetovacie špičky.

Príloha B: Skrátенý postup testu ELISA

1. Vykonaajte ekvilibračiu komponentov ELISA s výnimkou konjugátu s koncentráciou 100× na izbovú teplotu po dobu najmenej 60 minút.



2. Zriedte štandard súpravy na 8,0 IU/ml s destilovanou alebo deionizovanou vodou. Pripravte si štyri (4) roztoky štandardu.



3. Rozriedte mrazom vysušený konjugát s koncentráciou 100× s destilovanou alebo deionizovanou vodou.

4. Pripravte si konjugát požadovanej koncentrácie v zelenom riedidle a pridajte 50 µl do všetkých kalíškov.



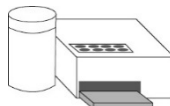
5. Pridajte 50 µl testovaných plazmových vzoriek a 50 µl štandardov do príslušných kalíškov. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



6. Inkubujte 120 minút pri izbovej teplote.



7. Kalíšky prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok.



8. Do kalíškov pridajte 100 μ l enzymatického substrátového roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



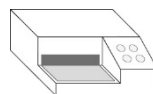
9. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote.



10. Do všetkých kalíškov pridajte 50 μ l enzymatického tlmiaceho roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



11. Načítajte výsledky pri vlnovej dĺžke 450 nm s použitím referenčného filtra s filtračným výkonom 620 až 650 nm.



12. Analyzujte výsledky.



Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
QuantIFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	Súprava s 2 doštičkami ELISA	626420
Súvisiace produkty		
QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 skúmaviek (50 vždy pre Nil, Ag1, Ag2 a Mitogen)	626725

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

História úprav dokumentu

Dátum	Popis
R1, október 2021	Prvé vydanie
R2, november 2021	Aktualizované časti Charakteristiky účinnosti a Klinická účinnosť
R3, apríl 2022	Aktualizovaná časť Charakteristiky účinnosti pre Interferujúce látky

Táto strana je zámerne prázdna.

Táto strana je zámerne prázdna.

Táto strana je zámerne prázdna.

Obmedzená licenčná zmluva súpravu QuantiFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a touto príručkou, a môže sa používať výlučne s komponentmi obsahujúcimi v paneli. Spoločnosť QIAGEN neudeluje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tohto panela s akýmkoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tejto príručke a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com. Niektoré z týchto protokolov boli poskytnuté používateľmi produktov od spoločnosti QIAGEN pre používateľov produktov od spoločnosti QIAGEN. Tieto protokoly neboli podrobne testované ani optimalizované spoločnosťou QIAGEN. Spoločnosť QIAGEN na ne neposkytuje žiadne záruky a neručí za to, že ich použitím nedôjde k porušeniu práv tretích strán.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že tento panel a/alebo jeho použitie neporuší práva tretích strán.
3. Tento panel a jeho komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tohto panela súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolí vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich s panelom a/alebo jeho komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese www.qiagen.com.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®, Registrované názvy, ochranné známky atď. použité v tomto dokumente sa nesmú považovať za známky nechránené podľa zákona, i keď neboli ako také označené príslušným symbolom.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

