

2022. április

QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 ELISA Kit használati útmutató



1. verzió



In vitro diagnosztikai használatra

A QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes vérvételi csövekkel való használatra



626420



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



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Németország



1124420HU

Tartalom

Alkalmazási terület	5
Felhasználói célcsoport.....	6
Leírás és működési elv.....	7
Összefoglalás és magyarázat	7
Szállított anyagok	9
A kit tartalma	9
A kit összetevői	10
Platform és szoftver	10
Szükséges, de nem biztosított anyagok	11
Kiegészítő reagensek.....	11
Eszközök.....	11
Figyelmeztetések és óvintézkedések	12
Biztonsági információk	12
Óvintézkedések.....	13
A reagensek tárolása és kezelése.....	16
Felbontás után stabilitás	16
Rehidratált és maradék reagensek	16
A minták kezelése és tárolása	17
Eljárás: Az ELISA assay végrehajtása	18
Protokoll: IFN- γ ELISA.....	18
Eredmények (számítások).....	23
A standard görbe létrehozása és a minták értékének meghatározása.....	23

A teszt minőség-ellenőrzése	25
Az eredmények értelmezése	27
Korlátozások	28
Az assay teljesítményjellemzői	29
Analitikai teljesítmény	29
Klinikai teljesítmény	38
Irodalomjegyzék	45
Hibaelhárítási útmutató	50
Szimbólumok	53
Kapcsolatfelvételi adatok	54
„A” függelék: Technikai tudnivalók	55
Nem eldönthető eredmények	55
Alvadt plazmaminták	55
Lipémiás plazmaminták	55
„B” függelék: Rövidített ELISA teszteljárás	56
Rendelési információk	58
A dokumentum átdolgozási előzményei	59

Alkalmazási terület

A QuantiFERON SARS-CoV-2 assay a SARS-CoV-2 peptidkeverékkel végzett stimulálás hatására a CD4+ és CD8+ T-sejtek által termelt interferon- γ (IFN- γ) heparinos teljes vérben történő kvalitatív kimutatására szolgáló in vitro diagnosztikai teszt. A termelt IFN- γ mérése enzimhez kapcsolt immunsorbens assay (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) segítségével történik.

A QuantiFERON SARS-CoV-2 assay rendeltetése a sejtmediált (Cell-Mediated Immune, CMI) immunválasz felmérése olyan egyéneknél, akik nem estek át a SARS-CoV-2 fertőzésen, és a SARS-CoV-2 vírus tüskefehérjéjét (S fehérjéjét) célzó COVID19-védőoltást kaptak.

A QuantiFERON SARS-CoV-2 assay-t más laboratóriumi tesztekkel és az epidemiológiai/klinikai értékeléssel együtt kell alkalmazni a COVID19-védőoltás eredményeként kialakuló immunválasz felmérésére.

Több napra is szükség lehet a védőoltás felvétele után a T-sejtes immunválasz kialakulásához, ugyanakkor nincsen pontosan meghatározva, hogy mennyi ideig van jelen a T-sejtes immunválasz az oltott egyéneknél.

A nem reaktív eredmények nem zárják ki az aktív SARS-CoV-2 fertőzés lehetőségét, és nem engednek következtetni a COVID19-védőoltások hatékonyságára. Aktív fertőzés gyanúja esetén végezzen SARS-CoV-2 vizsgálatot másik molekuláris vagy antigénteszttel. Az assay eredményeit mindig a klinikai állapotfelméréssel, a beteg kórtörténetével és az egyéb leletekkel együtt kell értelmezni.

In vitro diagnosztikai használatra.

Felhasználói célcsoport

A kit szakemberek általi használatra készült.

A terméket kizárólag olyan személyek használhatják, akik célzott eligazításban és képzésben részesültek a molekuláris biológiában alkalmazott technikákra vonatkozóan, illetve ismerik ezt a technológiát.

Leírás és működési elv

Összefoglalás és magyarázat

A QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) egy kvalitatív assay, amely speciális, az immunsejteket SARS-CoV-2-specifikus fehérjék révén stimuláló peptid antigéneket tartalmazó vérvételi csövekkel használható. A vért a csövekben 16–24 órán keresztül inkubálják, a plazmát elválasztják, majd a peptid antigénekre válaszul létrejövő IFN- γ jelenlétére tesztelik. A tüskefehérjét célzó különböző védőoltások esetén beszámoltak róla, hogy a vakinációt követően specifikus, T-sejtek által mediált immunválasz volt megfigyelhető a SARS-CoV-2 fertőzésre [1–34].

Először teljes vért kell venni mindegyik QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes vérvételi csöbe: a Nil csöbe, az Ag1 és Ag2 csöbe, valamint a Mitogen csöbe. Alternatív megoldásként a vér egyetlen, antikoagulánsként lítium- vagy nátrium-heparint tartalmazó vérvételi csöbe is levehető, hogy azután innen mérjék be a QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes vérvételi csövekbe.

A QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes vérvételi csöveket össze kell rázni, hogy az antigén elkeveredjen a vérrel, és a lehető leghamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül inkubálni kell őket $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ -on. 16–24 órás inkubálást követően a csöveket centrifugálják, a plazmát feldolgozzák, majd megméri az IFN- γ (IU/ml) mennyiségét ELISA assay-vel. A QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA assay rekombináns humán IFN- γ standardot használ, amelyet referencia IFN- γ készítményhez képest vizsgáltak (NIH ref.: Gxg01-902-535). A tesztminták eredményeinek leletezése nemzetközi egység per milliliterben (IU/ml) történik, a kithoz biztosított standard hígításainak tesztelésével készített standard görbéhez képest.

Bizonyos egyének szérumban vagy plazmájában található heterofil (pl. humán egérellenes) antitestekről ismert, hogy befolyásolják az immunológiai vizsgálatokat. A heterofil antitestek QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA assay-re gyakorolt hatását a zöld hígítóhoz adott normál egérszérum és a mikrolemezek tesztlyukait bevonó, IFN- γ -befogó antitestként alkalmazott F(ab')₂ monoklonális antitest-fragmentumok minimalizálják.

A Mitogen cső plazmamintája az IFN- γ pozitív kontrolljaként szolgál minden egyes tesztelt mintához. A Nil csővel kompenzálhatók a háttértékek (pl. megemelkedett keringő IFN- γ szintek vagy heterofil antitestek jelenléte miatt). A Nil cső IFN-g szintjét ki kell vonni az Ag1, Ag2 és Mitogen cső IFN- γ szintjéből.

Szállított anyagok

A kit tartalma

ELISA összetevők	2 lemezes kit
Katalógusszám	626420
Microplate strips (Mikrolemezcsíkok) (12 × 8 tesztlyuk) egér antihumán IFN- γ monoklonális antitesttel bevonva	2 készlet 12 × 8 tesztlyukas mikrolemezcsík
IFN- γ Standard (IFN- γ standard), liofilizált; (tartalma: rekombináns humán IFN- γ , szarvasmarha-kazein, 0,01% [m/V] tiomerzál)	1 üveg (8 IU/ml rehidratálva)
Green Diluent (Zöld hígító) (tartalma: szarvasmarha-kazein, normál egérszérum, 0,01% [m/V] tiomerzál)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Konjugátum 100× koncentrátum), liofilizált (egér antihumán IFN- γ HRP, 0,01% tiomerzált tartalmaz)	1 x 0,3 ml (rehidratálva)
Wash Buffer 20x Concentrate (Mosópuffer 20× koncentrátum) (pH 7,2; 0,05% [V/V] ProClin® 300-at tartalmaz)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzimszubsztrátoldat) (tartalma: H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametil-benzidin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimeállító oldat) (tartalma: 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
<i>QuantifERON SARS-CoV-2 ELISA Kit használati útmutató</i>	1

* Kénsavat tartalmaz

A kit összetevői

Kontrollok és kalibrátorok

A QFN SARS ELISA assay rekombináns humán IFN- γ standardot használ, amelyet referencia IFN- γ készítményhez képest vizsgáltak (NIH ref.: Gxg01-902-535).

Platform és szoftver

A nyers adatok elemzéséhez és az eredmények kiszámításához rendelkezésre áll a QFN SARS Analysis Software szoftver, amelynek használata opcionális. A **www.qiagen.com** webhelyről tölthető le.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Kiegészítő reagensek

- Ioncserélt vagy desztillált víz, 2 liter

Eszközök*

- 37 ± 1 °C-os inkubátor (CO₂-dal vagy anélkül)
- Kalibrált, állítható térfogatú pipetták 10 µl – 1000 µl közti mennyiségekhez, egyszer használatos hegyekkel
- Kalibrált, többcsatornás pipetta 50 µl és 100 µl mennyiséghez, egyszer használatos hegyekkel
- 500 és 1000 rpm közötti fordulatszámon működtethető mikrolemezzázó gép
- Mikrolemezmosó (a plazmaminták biztonságos kezelése érdekében automata lemezmosó használata ajánlott)
- 450 nm-es szűrőjű mikrolemezolvasó 620–650 nm-es referenciaszűrővel
- Állítható fordulatszámú vortex keverő
- A vérvételi csöveket legalább 3000 RCF (g) fordulatszámon centrifugálni képes centrifuga
- Mérőhenger, 1 literes vagy 2 literes
- Lemezfedél
- Nedvszívó, kevésbé szálal kendők

* Használat előtt ellenőrizze, hogy a műszereket a gyártó ajánlásai szerint ellenőrizték és kalibrálták-e.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Az Európai Unión belüli ügyfelek tartsák szem előtt, hogy az eszközzel összefüggésben fellépő súlyos incidenseket jelenteni kell a gyártó, valamint a felhasználó és/vagy a beteg tartózkodási helye szerinti tagállam illetékes hatósága felé.


Biztonsági információk

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS-ek) tartalmazzák. Ezek elérhetők online, a www.qiagen.com/safety weboldalon, jól kezelhető, kompakt PDF formátumban; a weboldalon megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az egyes QIAGEN kitek és kitekben található összetevők biztonsági adatlapja.

- Minden vegyi és biológiai anyag potenciálisan veszélyes. A minták potenciálisan fertőzőek lehetnek, ezért biológiailag veszélyes anyagként kezelendők.
- A mintákat és az assay során képződő hulladékokat a helyi biztonsági eljárásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.
- A vizsgálati minták potenciálisan fertőzők. A mintákat és az assay során képződő hulladékokat a helyi biztonsági eljárásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.
- A QFN SARS assay-t más laboratóriumi tesztekkel és az epidemiológiai/klinikai értékeléssel együtt kell alkalmazni a COVID19-védőoltás eredményeként kialakuló immunválasz felmérésére.
- A nem reaktív QFN SARS eredmény nem zárja ki a SARS-CoV-2 fertőzés lehetőségét, és nem enged következtetni a COVID19-védőoltások hatékonyságára. Tévesen nem reaktív eredményeket okozhat a vérvételi csövek helytelen kezelése a vénapunkciót követően, az assay szabálytalan végrehajtása, illetve az egyéb egyéni immunológiai jellemzők, beleértve az esetleges alapbetegségekkel összefüggő sajátosságokat. A heterofil antitestek vagy a más gyulladásos állapotok által kiváltott nem specifikus IFN- γ termelés elfedheti a SARS-CoV-2 peptidekre adott specifikus immunválaszt.

- Nem szabad kizárólag vagy döntően a reaktív QFN SARS eredmény alapján megítélni a COVID19-védőoltások hatékonyságát. Az assay szabálytalan végrehajtása is okozhat tévesen reaktív QFN SARS eredményeket.
- Tévesen reaktív QFN SARS eredményt okozhat a helytelenül végzett vérvétel vagy a limfociták aktivitását befolyásoló helytelen mintakezelés. A vérminták megfelelő kezelésére vonatkozóan lásd az „Eljárás: Az ELISA assay végrehajtása” című fejezetet a 18. oldalon. Tévesen nem reaktív vagy nem eldönthető eredményeket okozhat, ha túl sok idő telik el az inkubációig, illetve más technikai paraméterek is hatással lehetnek arra, hogy kimutatható-e szignifikáns IFN- γ válasz.
- A gyenge (< 0,5 IU/ml) Mitogen reakció akkor jelent nem eldönthető eredményt, ha a vérminta SARS-CoV-2 fehérjékre adott válasza is nem reaktív. Ilyen eredményt akkor kaphatunk, ha elégtelen a limfociták száma, ha helytelen mintakezelés vagy a Mitogen cső helytelen megtöltése/keverése miatt gyenge a limfocitatevékenység, vagy ha a beteg limfocitái képtelenek IFN- γ előállítására. A Nil csőben lévő mintában előfordulhat az IFN- γ szintek megemelkedése a heterofil antitestek jelenlétével, vagy belső IFN- γ szekrécióval.

Óvintézkedések

<p>FIGYELEM</p> 	<p>Az emberi vér kezelése fertőzésveszéllyel jár.</p> <p>Be kell tartani a vonatkozó vérmintakezelési előírásokat. A vérminták, valamint a vérrel és vérkészítményekkel érintkező anyagok hulladékkezelését mindig a helyi, tagállami és uniós előírások szerint végezze.</p>
--	---

QuantIFERON Enzyme Stopping Solution



Kénsavat tartalmaz. Vigyázat! Fémeke korrozív hatású lehet. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

QuantIFERON Enzyme Substrate Solution

Vigyázat! Enyhén bőrirritáló hatású.
Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

QuantIFERON Green Diluent



Tartrazint tartalmaz. Vigyázat! Allergiás bőrreakciót válthat ki.
Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

QuantIFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz. Ne hagyja, hogy kijusson a környezetbe.

További tudnivalók

Biztonsági adatlapok: www.qiagen.com/safety

- Egyes QFN SARS reagensek tartósítószerként tiomerzált tartalmaznak. Ezek lenyelve, belélegezve vagy bőrrel érintkezve mérgezőek lehetnek.
- A *QuantIFERON ELISA Kit használati útmutatótól* való eltérés hibás eredményekhez vezethet. Használat előtt figyelmesen olvassa el az utasításokat.
- Sérültnek tűnő vagy szivárgó reagenspalackot tartalmazó kitet nem szabad használni.
- **Fontos:** Használat előtt vizsgálja meg az üvegeket. Ne használja a konjugátumot vagy IFN- γ standardot tartalmazó üvegeket, ha azokon sérülés jeleit látja, vagy ha a gumi záróelemük sérült. Ne fogja meg a törött üvegeket. Tegye meg a megfelelő biztonsági óvintézkedéseket az üvegek biztonságos hulladékkezeléséhez. A konjugátumot és IFN- γ standardot tartalmazó üvegek felbontásához ajánlott kupaknyitót használni a perforált fémkupak okozta sérülések kockázatának minimalizálása érdekében.

-
- Nem engedélyezett a különböző tételszámú QFN SARS kitekbe tartozó mikrolemezcsíkok, IFN- γ standardok, zöld hígítók, illetve konjugátum 100 \times koncentrátumok vegyes felhasználása, illetve összekeverése. A többi reagens (a mosópuffer 20 \times koncentrátum, az enzimszubsztrátoldat és az enzimeállító oldat) különböző kitekből vegyesen is használható a reagensek lejáratí idején belül, ha a tételszámokat feljegyzik.
 - A fel nem használt reagensok és biológiai minták hulladékkezelését a helyi, tagállami és uniós előírások szerint kell végezni.
 - Ne használja fel a QFN SARS ELISA Kitet a lejáratí idején túl.
 - Mindig tartsa be a helyes laboratóriumi eljárásokat.
 - Gondoskodjon a laboratóriumi berendezések, például a lemezmosók és -olvasók kalibrálásáról és validálásáról.

A reagensek tárolása és kezelése

Vegye figyelembe a dobozon és az egyes összetevők címkéjén feltüntetett lejárati időt és tárolási körülményeket. Ne használjon lejárt szavatosságú vagy helytelenül tárolt összetevőket.

Felbontás után stabilitás

- Az ELISA kitet 2–8 °C-on kell tárolni.
- Az enzimszubsztrátoldatot mindig napfénytől védett helyen kell tartani.

Rehidratált és maradék reagensek

- A reagensek rehidratálására vonatkozó utasításokat lásd a következő fejezetben: „Eljárás: Az ELISA assay végrehajtása”, 18. oldal.
- A kitben lévő standard rehidratálva 2–8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 3 hónapig tárolható.
Jegyezze fel a kitben lévő standard rehidratálásának dátumát.
- A rehidratált konjugátum 100× koncentrátumot vissza kell hűteni 2–8 °C-os tárolási hőmérsékletre, és szintén fel kell használni 3 hónapon belül.
Jegyezze fel a konjugátum rehidratálásának dátumát.
- A készre hígított konjugátumot elkészítése után 6 órán belül fel kell használni.
- A készre hígított mosópuffer szobahőmérsékleten legfeljebb 2 hétig tárolható.

A minták kezelése és tárolása

A QFN SARS teszthez végzett vérvétel munkafolyamatára vonatkozó részletek a *QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes* használati útmutatóban (1124422) található.

Eljárás: Az ELISA assay végrehajtása

Protokoll: IFN- γ ELISA

Fontos tudnivalók

- Az ELISA assay végrehajtásához szükséges anyagok felsorolását lásd: A kit tartalma, 9. oldal és Szükséges, de nem biztosított anyagok, 11. oldal.

Előkészítés (az assay végrehajtásához szükséges idő)

A QFN SARS assay csak akkor ad érvényes eredményeket, ha a kezelő meghatározott feladatokat a megadott időn belül elvéggez. Az assay végrehajtása előtt célszerű a kezelőnek gondosan megterveznie az assay minden egyes fázisát, hogy elegendő ideje legyen a különböző lépések elvégzésére. A szükséges idő becsült értéke alább látható, és a több minta egyidejű teszteléséhez szükséges időt is feltüntettük.

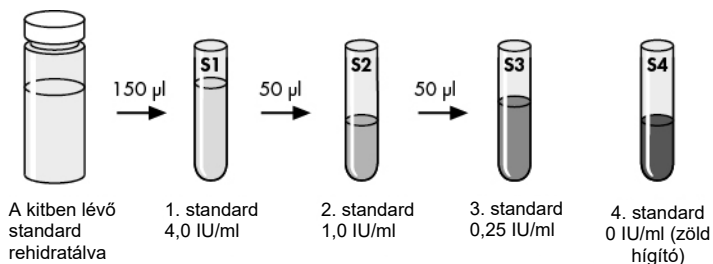
- Egy ELISA lemez esetében körülbelül 3 óra
- < 1 óra munka
- Minden további lemezre újabb 10–15 percet kell számolni

Eljárás

1. Felhasználás előtt minden plazmamintát és a konjugátum 100× koncentrátum kivételével minden reagenst hagyni kell, hogy szoba-hőmérsékletűre ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ -ra) melegedjen. Legalább 60 percet kell hagyni a hőkiegyenlítődesre.
2. Vegye ki a keretből a nem szükséges ELISA lemezcsíkokat, ezeket zárja vissza a fóliatásakba, majd felhasználásig helyezze vissza őket a hűtőszekrénybe.
3. Legalább 1 csíkot számoljon a QFN SARS standardoknak, és ehhez adja hozzá a tesztelt alanyok számához elegendő mennyiségű csíkot (az ajánlott lemezformátumot lásd a 2. ábrán). Használat után a többi csík számára őrizze meg a keretet és a fedelet.

- 3a. Rehidratálja az IFN- γ standardot az üveg címkéjén feltüntetett mennyiségű ioncserélt vagy desztillált vízzel. Keverje fel óvatosan, minimális habképződéssel, amíg az üveg teljes tartalma maradéktalanul fel nem oldódik. Az IFN- γ standard megadott térfogatra történő rehidratálása 8,0 IU/ml koncentrációjú oldatot képez.
- 3b. A rehidratált standard felhasználásával készítsen 4 IFN- γ koncentrációból álló hígítási sorozatot (lásd az 1. ábrát).
- 3c. A standard görbét az alábbi IFN- γ koncentrációk alapján kell létrehozni:
- S1 (1. standard): 4,0 IU/ml
 - S2 (2. standard): 1,0 IU/ml
 - S3 (3. standard): 0,25 IU/ml
 - S4 (4. standard): 0 IU/ml (csak zöld hígító [Green Diluent, GD]).
- 3d. A standardokat legalább duplán kell tesztelni.
- 3e. Minden ELISA munkamenethez friss hígítást kell készíteni a készletben lévő standardból.

Eljárás	
A	Címkézzen fel 4 csövet: S1, S2, S3, S4
B	Töltsön 150 μ l GD-t az S1, S2, S3 és S4 csőbe
C	Töltsön 150 μ l-t a kitben lévő standardból az S1 csőbe, és alaposan keverje össze
D	Töltsön át 50 μ l-t az S1-ből az S2 csőbe, és alaposan keverje össze
E	Töltsön át 50 μ l-t az S2-ből az S3 csőbe, és alaposan keverje össze
F	A GD szolgál magában nullstandardként (S4)



1. ábra: A standard görbéhez szükséges hígítási sorozat elkészítése.

4. Rehidratálja a liofilizált konjugátum 100× koncentrátumot 0,3 ml ioncserélt vagy desztillált vízzel. Keverje fel óvatosan, minimális habképződéssel, amíg az üveg teljes tartalma maradéktalanul fel nem oldódik.
- 4a. A konjugátum készre hígításához hígítsa fel a szükséges mennyiségű rehidratált konjugátum 100× koncentrátumot zöld hígítóval (1. táblázat).
- 4b. A készre hígított konjugátumot az elkészítés után 6 órán belül fel kell használni.
- 4c. Az esetleg megmaradó konjugátum 100× koncentrátumot azonnal vissza kell hűteni 2–8 °C-ra.

1. táblázat: A konjugátum elkészítése (készre hígítás)

Csík száma	Konjugátum mennyisége (100× koncentrátum)	Zöld hígító mennyisége
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. A vérévételi csövekből elválasztott, majd tárolt (hűtött vagy fagyasztott) plazmamintákat alaposan keverje fel az ELISA tesztlyukakba töltés előtt. A plazmaminták a centrifugált QFN SARS Blood Collection Tubes vérévételi csövekben 2–8 °C-on legfeljebb 28 napig, illetve az elválasztott plazmaminták 2–8 °C-on szintén legfeljebb 28 napig

tárolhatók. Az elválasztott plazmaminták $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt (lehetőleg $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt) legfeljebb 24 hónapig tárolhatók.

A plazmaminták közvetlenül a centrifugált vérvételi csövekből is betölthetők/felhasználhatók a QFN SARS ELISA lemezzel végzett méréshez.

Fontos: A közvetlenül a centrifugált QFN SARS Blood Collection Tubes vérvételi csövekből bémért plazmaminták esetén kerülni kell a plazma felkeveredését. A teljes eljárás során meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét.

6. Mérjen be 50 μl frissen készre hígított konjugátumot az ELISA lemez összes tesztlyukába.
7. Mérjen be 50 μl -t a tesztelni kívánt plazmamintából a megfelelő tesztlyukakba (az ELISA lemez ajánlott elrendezését lásd a 2. ábrán).
8. Végül mérjen be 50 μl -t az 1–4. standard mindegyikéből a lemez megfelelő tesztlyukaiba (az ELISA lemez ajánlott elrendezését lásd a 2. ábrán). A standardokat legalább két párhuzamossal kell tesztelni.

	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

2. ábra: Az ELISA lemez ajánlott elrendezése. S1 (1. standard), S2 (2. standard), S3 (3. standard), S4 (4. standard). 1N (1. minta, Nil kontrollplazma), 1 Ag1 (1. minta, Ag1 plazma), 1 Ag2 (1. minta, Ag2 plazma), 1M (1. minta, Mitogen plazma).

9. Fedje le az ELISA lemezt, és keverje össze alaposan a konjugátumot és a plazmamintákat/standardokat mikrolemezrázóval 1 percen át, 500 és 1000 rpm közötti fordulatszámon. Kerülje a minták kifröccsenését.

10. Fedje le az ELISA lemezt, és inkubálja szobahőmérsékleten ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) 120 ± 5 percen át. Az ELISA lemezt az inkubálás alatt óvni kell a közvetlen napfénytől. A megadott hőmérséklet-tartománytól való eltérés hibás eredményekhez vezethet.
11. Az ELISA lemez inkubálása közben hígítsa készre a mosópuffert. Ehhez hígítson egy rész mosópuffer $20\times$ koncentrátumot 19 rész ioncserélt vagy desztillált vízzel, és keverje fel alaposan. A kit 2 liter készre hígított mosópuffer elkészítéséhez elegendő mosópuffer $20\times$ koncentrátumot tartalmaz.
12. Az ELISA lemez inkubálását követően mossa az ELISA-lemez tesztlyukait $400\ \mu\text{l}$ készre hígított mosópufferrel. Legalább 6-szor végezze el a mosási lépést. Biztonsági okokból a plazmaminták kezeléséhez automata lemezmosó használata ajánlott. Az assay megfelelő működéséhez nagyon fontos az alapos mosás. Ügyeljen rá, hogy minden lyuk minden mosási ciklusban színültig telítődjön a mosópufferrel. Ajánlott egy legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között. A szennyvíztartályba normál laboratóriumi fertőtlenítőszerrel kell tölteni, és a potenciálisan fertőző anyagot a szabályos eljárások szerint fertőtleníteni kell.
13. Ütögesse az ELISA lemezt lefordítva nedvszívó (kevésbé szálás) kendőre, hogy a maradék mosópuffer eltávozzon. Mérjen be $100\ \mu\text{l}$ enzimszubsztrátoldatot a lemez minden tesztlyukába, fedje le a lemezt, és végezzen alapos keverést mikrolemezrázóval 1 percen keresztül, 500 és 1000 rpm közötti fordulatszámon.
14. Fedje le az ELISA lemezt, és inkubálja szobahőmérsékleten ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) 30 percen át. Az ELISA lemezt az inkubálás alatt óvni kell a közvetlen napfénytől.
15. A 30 perces inkubálást követően mérjen be $50\ \mu\text{l}$ enzimleállító oldatot a lemez mindegyik tesztlyukába ugyanabban a sorrendben, amiben a szubsztrátot is hozzáadta, és végezzen alapos keverést mikrolemezrázóval 500 és 1000 rpm közötti fordulatszámon.
16. A reakció leállítását követően 5 percen belül mérje meg az ELISA lemez tesztlyukaiban az optikai denzitás (OD) értékét egy 450 nm -es szűrővel és $620\text{--}650\text{ nm}$ -es referenciaszűrővel felszerelt mikrolemez-olvasóval. A teszteredményeket az OD-értékekből lehet kiszámolni.

Eredmények (számítások)

A nyers adatok elemzése és az eredmények kiszámítása elvégezhető a QFN SARS Analysis Software szoftverrel. A szoftver a **www.qiagen.com** webhelyen érhető el. Ügyeljen rá, hogy a QFN SARS Analysis Software szoftver legfrissebb verzióját használja.

A szoftver „Az eredmények értelmezése” című fejezetben (27. oldal) leírtak szerint elvégzi az assay minőség-ellenőrzését, létrehozza a standard görbét, és kiszámítja az egyes alanyok teszteredményét. A szoftver a 10 IU/ml-nél nagyobb koncentrációkat „> 10” értékkel leletezi, mivel az ilyen koncentrációk meghaladják az ELISA assay validált lineáris tartományát.

A QFN SARS Analysis Software szoftver használata helyett az eredmények az alábbi módon is meghatározhatók.

A standard görbe létrehozása és a minták értékének meghatározása

A QFN SARS Analysis Software szoftver használata nélkül

A standard görbe felvételéhez és a minták IU/ml értékének meghatározásához táblázatkezelő program, például Microsoft® Excel® szükséges, ha nem használják a QFN SARS Analysis software elemzőszoftvert.

Táblázatkezelő program használata

1. Határozza meg minden lemezen a standardok párhuzamosainak átlagos OD-értékeit.
2. Szerkesszen egy $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ standard görbét, amely az átlag OD $\log_{(e)}$ értékét ábrázolja (y tengely) a standardok IU/ml-ben kifejezett IFN- γ koncentrációja $\log_{(e)}$ értékének függvényében (x tengely), kihagyva a számításból a nullstandardot. Számítsa ki regresszióanalízissel a standard görbe legjobban illeszkedő egyenesét.

- Állapítsa meg a standard görbe segítségével az egyes vizsgált plazmaminták IFN- γ koncentrációját (IU/ml) a hozzájuk tartozó OD értékből.
- Ezeket a számításokat a mikrolemez-olvasóhoz tartozó szoftvercsomagokkal, valamint hagyományos táblázatkezelő vagy statisztikai szoftverekkel (például Microsoft Excel) is el lehet végezni. Ajánlatos ezeket a csomagokat használni a regresszióanalízis, valamint a standardokra vonatkozó variációs koefficiens (%CV) és a standard görbe korrelációs együtthatójának (r) kiszámításához.

A mintaeredmények kiszámítása

A standardok alábbi OD-értékei esetén a $\log(e)$ alapú számítások a 2. táblázatban látható módon alakulnának.

2. táblázat: Standard görbe

Standard	IU/ml	a és b OD-érték	Átlag OD	%CV	Log _(e) IU/ml	Log _(e) átlag (OD)
1. standard	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
2. standard	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
3. standard	0,25	0,114, 0,136	0,125	NA	-1,386	-2,079
4. standard	0	0,034, 0,037	0,036	NA	NA	NA

A görbe egyenlete $y = 0,7885(X) - 0,9837$, ahol „m” = 0,7885 és „c” = -0,9837. Ezeket az értékeket helyettesítjük be az $X = (Y-c)/m$ egyenletbe az X kiszámításához. A standard görbe alapján a kiszámított korrelációs együttható (r) = 1,000. **NA**: nem alkalmazható.

„A teszt minőség-ellenőrzése” (25. oldal) című alfejezetben megadott követelmények alapján meg kell határozni, hogy érvényes-e az assay.

A standard görbe (2. táblázat) segítségével az antigén által kiváltott OD-reakciók átszámíthatók nemzetközi egységbe (IU/ml).

3. táblázat: A mintaeredmények kiszámítása

Antigén	OD-érték	Log _(e) OD-érték	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

Az Ag1, Ag2 és Mitogen cső IFN- γ értékéből (IU/ml) a háttér korigálása érdekében ki kell vonni a megfelelő Nil kontrollal kapott IU/ml értéket. Ezeket a korigált értékeket kell felhasználni a teszteredmények értelmezéséhez.

A teszt minőség-ellenőrzése

A teszteredmények pontossága a standard görbe pontosságától függ. Ezért a mintaeredmények értelmezését megelőzően ellenőrizni kell a standardokból származó eredményeket.

Az ELISA teszt érvényességének feltételei:

- Az 1. standardra vonatkozó OD átlagnak $\geq 0,600$ értékűnek kell lennie.
- Az 1. és 2. standard párhuzamosainak értékéhez tartozó %CV $\leq 15\%$.
- A 3. és 4. standard párhuzamosainak OD értéke nem mutathat 0,040 optikai denzitási egységnél nagyobb szórást az átlagértéktől.
- A standardok átlagos abszorpciós értékéből számított korrelációs együtthatónak (r) $\geq 0,98$ értékűnek kell lennie.
- Ha a fenti követelmények nem teljesülnek, akkor a teszt érvénytelen, és meg kell ismételni.
- A nullstandardhoz (zöld hígító) tartozó átlag OD érték $\leq 0,150$ lehet. Ha az átlag OD-érték $> 0,150$, akkor felül kell vizsgálni a lemezmosási eljárást.

A QFN SARS Analysis Software szoftver kiszámítja ezeket a minőség-ellenőrzési paramétereket, és jelentést készít róluk.

Minden laboratóriumnak a helyi, tagállami és uniós előírásokkal, illetve az egyéb illetékes akkreditáló szervezetek követelményeivel összhangban kell meghatározni a megfelelő típusú kontrollanyagokat és a tesztelés gyakoriságát. Meg kell fontolni külső minőség-ellenőrzés és alternatív validálási eljárások alkalmazását is.

Megjegyzés: A hozzáadott rekombináns IFN- γ -t tartalmazó plazmamintáknál akár 50%-os koncentrációcsökkenést is megfigyeltek 2–8 °C-on és –20 °C-on való tárolás esetén. Nem javasolt a rekombináns IFN- γ használata a plazmaminták kontrollstandardjainak létrehozásához.

Az eredmények értelmezése

A QFN SARS eredményeit az alábbi szempontok szerint kell értelmezni (4. táblázat).

Fontos: A QFN SARS assay-t más laboratóriumi tesztekkel és az epidemiológiai/klinikai értékeléssel együtt kell alkalmazni a COVID19-védőoltás eredményeként kialakuló immunválasz felmérésére.

4. táblázat: A QFN SARS teszteredmények értelmezése

Nil (IU/ml)	Ag1 antigén mínusz Nil (IU/ml)	Ag2 antigén mínusz Nil (IU/ml)	Mitogen mínusz Nil (IU/ml)*	QFN SARS eredmény	Lelet/értelmezés
≤ 8,0	≥ 0,15 és legalább a Nil 25%-a	Bármilyen	Bármilyen	Reaktív	<i>kimutatható SARS-CoV-2 immunválasz</i>
	Bármilyen	≥ 0,15 és legalább a Nil 25%-a			
	< 0,15 vagy ≥ 0,15 és kisebb a Nil 25%-ánál	< 0,15 vagy ≥ 0,15 és kisebb a Nil 25%-ánál	≥ 0,50	Nem reaktív	<i>NEM mutatható ki SARS-CoV-2 immunválasz</i>
	< 0,15 vagy ≥ 0,15 és kisebb a Nil 25%-ánál	< 0,15 vagy ≥ 0,15 és kisebb a Nil 25%-ánál	< 0,50	Nem eldönthető [‡]	<i>nem mutatható ki immunválasz a SARS-CoV-2-re és a Mitogentre</i>
> 8,0 [§]	Bármilyen				

* A Mitogen pozitív kontrollra (és esetenként az Ag antigénekre) kapott válaszértékek meghaladhatják a mikrolemez-olvasó mérési tartományát. Ez a teszteredményeket nem befolyásolja. A QFN SARS szoftver a 10 IU/ml-nél magasabb értékek esetében a „> 10 IU/ml” eredményt jeleníti meg.

[‡] A lehetséges okokat lásd „Hibaelhárítási útmutató”, 50. oldal.

[§] A klinikai vizsgálatokban az alanyoknak kevesebb mint 0,25%-ánál volt a Nil értéke > 8,0 IU/ml IFN-γ.

Korlátozások

A QFN SARS teszt eredményeit az egyének epidemiológiai kórelőzményével, aktuális egészségi állapotával és egyéb diagnosztikai eredményeivel együtt kell értékelni.

A 8 IU/ml értéket meghaladó Nil eredménnyel rendelkező egyének „nem eldönthető” besorolást kapnak, mert az Ag antigénekre adott 25%-kal magasabb válasz meghaladhatja az assay mérési tartományát.

- A nem reaktív eredmény értékelésekor – különösen csökkent immunműködésű egyéneknél – figyelembe kell venni, hogy az egyén egészségi állapota és kórtörténete mennyire teszi valószínűvé a vakcináció által kiváltott immunválaszt.
- A QFN SARS assay-t más laboratóriumi tesztekkel és az epidemiológiai/klinikai értékeléssel együtt kell alkalmazni a COVID19-védőoltás eredményeként kialakuló immunválasz felmérésére.

A megbízhatatlan vagy nem eldönthető eredmény okai a következők lehetnek:

- Eltérések a használati útmutatóban ismertetett eljárástól
- A vérminták nem megfelelő szállítása/kezelése
- Emelkedett keringő IFN- γ szint vagy heterofil antitestek jelenléte
- A validált időtartamnál hosszabb idő a vérvétel és az inkubáció között. Lásd a *QFN SARS Blood Collection Tubes használati útmutatót* (1124422).

Az assay teljesítményjellemzői

Analitikai teljesítmény

Az assay küszöbértéke

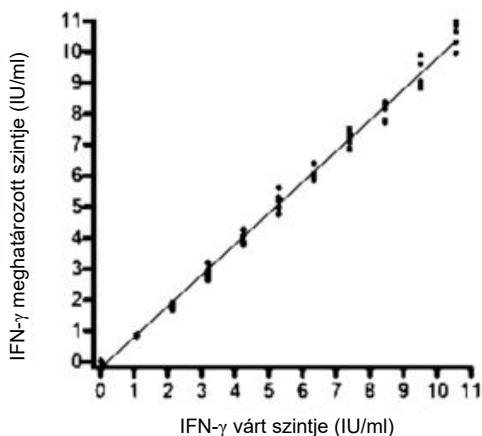
A QFN SARS assay küszöbértékének meghatározásához felhasznált adatok húsz (20) olyan alanytól származtak, akik RT-PCR teszttel vagy szerológiai teszttel nem reaktívnak bizonyultak SARS-CoV-2-re, valamint húsz (20) olyan donortól, akik az FDA által vészhelyzeti alkalmazásra engedélyezett (Emergency Use Authorization, EUA) védőoltások valamelyikének az összes dózisát megkapták (2–16 hét telt el az utolsó dózis után). A szenzitivitási és specificitási adatok, valamint az egzakt kétoldali 95%-os konfidenciaintervallumok (CI-k) elemzése azt mutatta, hogy az ELISA assay optimális küszöbértéke 0,15 IU/ml (lásd az 5. táblázatot).

5. táblázat: A QFN SARS assay küszöbértékei (IU/ml) a kapcsolódó szenzitivitással, specificitással és egzaktt kétoldali 95%-os CI-kkel

Küszöbérték	Szenzitivitás			Specificitás		
	Érték	Alsó 95%-os CI	Felső 95%-os CI	Érték	Alsó 95%-os CI	Felső 95%-os 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

Linearitás

A QFN SARS ELISA assay linearitását úgy bizonyították, hogy 11 ismert IFN- γ koncentrációjú plazmapool 5 párhuzamos mintáját helyezték véletlenszerűen az ELISA lemezre. A lineáris regressziós egyenes meredeksége $1,002 \pm 0,011$, korrelációs együtthatója 0,99 volt (3. ábra).



3. ábra: A linearitás vizsgálatához használt regresszióanalízis.

Reprodukálhatóság

Reprodukálhatósági vizsgálatot végeztek több laboratórium bevonásával, hogy kiértékeljék a QFN SARS assay teljesítményét különböző laboratóriumok és különböző kezelők esetében. A vizsgálatot a QIAGEN három laboratóriumában végezték. Három (3) SARS-CoV-2-re reaktív és három (3) SARS-CoV-2-re nem reaktív alanyt vontak be a vizsgálatba (az alanyok státuszát RT-PCR teszttel vagy szerológiai teszttel határozták meg).

Minden vizsgálati alanytól négy (4) lítium-heparinos vérvételi csőbe vettek mintát. A lítium-heparinos vérvételi csöveket ezután az egyik vizsgálólaboratóriumba szállították, ahol a vért szétesztették három (3) sorozat QFN SARS Blood Collection Tubes vérvételi csőbe (QFN SARS

Ag1, Ag2, Mitogen és Nil). Minden vizsgálólaboratórium kapott egy-egy sorozat QFN SARS Blood Collection Tubes (BCT) vérvételi csövet minden alany mintájából, és azokon elvégezte a tesztelést a QFN SARS assay eljárásának megfelelően. Minden alany mintáját az összes laboratóriumban tíz (10) párhuzamossal vizsgálták (öt (5) párhuzamos az Ag1 csőből és öt (5) párhuzamos az Ag2 csőből). Mindegyik laboratóriumban egy (1) kezelő végezte a QFN SARS tesztet önállóan. A kezelőknek nem volt tudomásuk a többi kezelő által kapott eredményekről és a vizsgálati alanyok RT-PCR vagy szerológiai teszteredményéről sem.

Mind a három (3) vizsgálólaboratóriumban 30-30 eredmény keletkezett, így összességében 90 adatpont állt rendelkezésre. A reprodukálhatósági vizsgálat eredményeinek összefoglalását a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A reprodukálhatósági vizsgálat eredményeinek összefoglalása – N = 30 betegminta

1. laboratórium – 1 kezelő	2. laboratórium – 1 kezelő	3. laboratórium – 1 kezelő
25/30 = 83%	30/30 = 100%	30/30 = 100%
A kvalitatív eredmények egyezése	A kvalitatív eredmények egyezése	A kvalitatív eredmények egyezése

A várt kvalitatív eredményekhez képest számított összesített százalékos egyezés (vagyis hogy a referencia-módszer eredménye alapján reaktív alanyok mintája reaktív eredményt, a nem reaktív alanyok mintája pedig nem reaktív eredményt adott) az összes reaktív és nem reaktív mintára vonatkozóan, a három (3) laboratóriumban összesen 94,4% (85/90) volt.

Tételek közötti megismételhetőség

Vizsgálatot végeztek a QFN SARS Blood Collection Tubes vérvételi csövek tételek közötti variabilitásának meghatározására. Kettő (2) SARS-CoV-2-re reaktív és három (3) SARS-CoV-2-re nem reaktív vizsgálati alanyt teszteltek (az alanyok státuszát RT-PCR teszttel vagy szerológiai teszttel határozták meg). A vizsgálatban három (3) különböző tételből származó QFN SARS Ag1 és Ag2 Blood Collection Tubes vérvételi csöveket használtak. Donoronként és vérvételi csövenként öt (5) párhuzamost vizsgáltak. A tételek közötti precizitási vizsgálat eredményeinek összefoglalását a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: A tételek közötti precízitási vizsgálat eredményeinek összefoglalása – a QFN SARS Ag1 és Ag2 Blood Collection Tubes vérvételi csövek összesített százalékos egyezése; N = 25

QFN SARS BCT vérvételi cső	Vérvételi cső tételszáma	Egyező kvalitatív besorolások / összes besorolás	Arány	Konfidenciaintervallum alsó határa	Konfidenciaintervallum felső határa
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%

A várt eredményekhez képest számított összesített százalékos egyezés (vagyis hogy a referencia-módszer eredménye alapján reaktív alanyok mintája reaktív eredményt, a nem reaktív alanyok mintája pedig nem reaktív eredményt adott) az összes reaktív és nem reaktív mintára vonatkozóan a QFN SARS Ag1 és Ag2 BCT vérvételi csövek mind a három (3) tétele esetében 100% volt.

Vakminta-határérték (Limit of Blank, LoB)

Meghatározták a QFN SARS assay esetén a vakminta-határértéket (Limit of Blank, LoB). Tizennégy (14) különböző, normál humán plazmamintából (mint vakmintából) mintánként két (2) párhuzamost vizsgáltak a QFN SARS ELISA assay két (2) tételével, három (3) kezelő bevonásával, három (3) vizsgálati napon; minden vizsgálati napon egy-egy (1) kezelő végezte a tesztelést, és az ELISA kit egyes tétéleivel összesen 84 párhuzamost vizsgáltak.

Az ELISA kit két (2) tételének LoB-értékét (IU/ml) külön számították ki; az eredmények a 8. táblázatban láthatók.

8. táblázat: A QFN SARS ELISA Kit két (2) tételének LoB-értékei (IU/ml)

QFN SARS ELISA Kit	Becsült LoB (IU/ml)
1. kit	0,030
2. kit	0,040

A QFN SARS ELISA Kit két tételénél kapott LoB-értékek közül a nagyobbat (0,040 IU/ml) adtuk meg a végső LoB-értékként.

Kimutatási határ (Limit of Detection, LoD)

Meghatározták a QFN SARS assay esetén a kimutatási határértéket (Limit of Detection, LoD). Tizennégy (14) különböző plazmaminta kombinálásával létrehoztak egy humán plazmapoolt. Pufferrel végzett hígítással mind a három (3) kezelő létrehozott egy 1,0 IU/ml koncentrációjú IFN- γ referenciastandardot. Ezután nyolc (8) koncentrációból álló hígítási sorozatot készítettek a plazmából. A vizsgálatot három (3) napon keresztül, felváltva három (3) kezelővel, a QFN SARS ELISA Kit két (2) tételének felhasználásával végezték. Minden vizsgálati napon öt (5) párhuzamost teszteltek az összes hígítási sorozat valamennyi koncentrációjából, így a különböző koncentrációjú IFN- γ hígítások mindegyikéből a QFN SARS ELISA Kit egyes tételeivel összesen 45 párhuzamost vizsgáltak.

A QFN SARS ELISA Kit vizsgált tételeinek LoD-értékét külön számították ki; az eredmények a 9. táblázatban láthatók. Az LoD értékét probit regressziós modellel becsülték meg. Az LoD értéke azon a becsült koncentráción (IU/ml) alapul, amelynél 95%-os a becsült valószínűsége a 0,04 IU/ml (vagyis az LoB) értékénél nagyobb találati arány elérésének.

9. táblázat: A QFN SARS ELISA Kit két (2) tételének becslött LoD-értékei (IU/ml)

QFN SARS ELISA Kit	Valószínűség	Becslött koncentráció (IU/ml)	Becslés 95%-os konfidenciaintervallumának alsó határa	Becslés 95%-os konfidenciaintervallumának felső határa
1. kit	0,95	0,063	0,060	0,067
2. kit	0,95	0,065	0,060	0,073

A QFN SARS ELISA Kit mindkét tételénél kiszámított LoD-értékek közül a nagyobbat (0,065 IU/ml) adtuk meg a végső LoD-értékként.

Zavaró anyagok

Vizsgálatot végeztek annak meghatározására, hogy milyen hatással vannak az esetleges zavaró anyagok a QFN SARS ELISA assay-vel végzett IFN- γ kimutatásra. A következő zavaró anyagokat vizsgálták: trigliceridek (összes), hemoglobin, fehérje (szérum összfehérje), bilirubin (konjugált), bilirubin (nem konjugált), abakavir-szulfát, ciklosporin és prednizolon. Öt (5), ismert IFN- γ koncentrációjú plazmapoolt készítettek, amelyekben különböző koncentrációkban voltak jelen a zavaró anyagok. Az alappool IFN- γ szintjét már korábban beállították előre meghatározott mennyiségű IFN- γ felhasználásával (körülbelül 0,21, 0,45 és 1,4 IU/ml). Ezt követően ebből a poolból készítették el a zavaró anyagot tartalmazó poolokat. A zavaró anyagok öt különböző koncentrációját tesztelték, és a referenciatartományok, a patológias értékek, a terápiás tartományok, a mérgező tartományok, illetve a gyártó ajánlái vagy az általános klinikai szintek alapján határozták meg. A különböző koncentrációjú, zavaró anyagot tartalmazó mintákat hat-hat (6) párhuzamossal tesztelték.

Mindegyik mintakonzentrációnál T-vizsgálatot végeztek, amelynek során összehasonlítták a zavaró anyag magas szintjénél (10) kapott átlag log₁₀-értékét (IU/ml) a kontrollal (vagyis a zavaró anyagot nem tartalmazó koncentrációval) kapott értékkel. A reakcióértékek átlagának becslött eltérése mellett a kapcsolódó kétoldali 95%-os konfidenciaintervallum és a p-érték is fel van tüntetve a táblázatban.

10. táblázat: Log10 IU/ml: A t-próba összefoglaló táblázata a kontrollal kapott átlagok és a zavaró anyag magas szintjénél kapott átlagok különbségére vonatkozóan az egyes zavaró anyagok és az IFN- γ egyes koncentrációi esetén

Zavaró anyag	Zavaró anyag szintje	Mintakonzentráció (IU/ml)	Átlagok közötti eltérés	Alsó 95%-os CI	Felső 95%-os CI	p-érték
Trigliceridek	Magas	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	Magas	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
Fehérje	Magas	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
Konjugált bilirubin	Magas	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
Nem konjugált bilirubin	Magas	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	Magas	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

A táblázat a következő oldalon folytatódik

Az előző oldalon lévő táblázat folytatása

10. táblázat: Log₁₀ IU/ml: A t-próba összefoglaló táblázata a kontrollal kapott átlagok és a zavaró anyag magas szintjénél kapott átlagok különbségére vonatkozóan az egyes zavaró anyagok és az IFN- γ egyes koncentrációi esetén

Zavaró anyag	Zavaró anyag szintje	Mintakonzentráció (IU/ml)	Átlagok közötti eltérés	Alsó 95%-os CI	Felső 95%-os CI	p-érték
Ciklosporin	Magas	1,4	0,002	-0,019	0,024	0,816
		0,45	0,007	-0,030	0,043	0,682
		0,21	0,015	-0,007	0,038	0,155
Prednizolon	Magas	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

Az eredmények nem mutattak statisztikailag szignifikáns eltérést a zavaró anyag legmagasabb tesztelt szintje és a kontroll (zavaró anyagot nem tartalmazó koncentráció) között, kivéve a trigliceridet a 0,45 IU/ml koncentrációnál. Ennél az értéknél az átlagok közötti eltérés a kontrollmérés átlaga ± 2 szórás tartományon belül volt, ami azt jelenti, hogy a megfigyelt eltérés az assay várható variabilitásán belül van, és a trigliceridek klinikumban előforduló szintjei várhatóan nem fogják befolyásolni a QFN SARS ELISA assay-vel kapott eredményeket.

Klinikai teljesítmény

A QFN SARS assay klinikai teljesítményét prospektív megfigyeléses vizsgálatban értékelték 2021. június és október között olyan alanyokkal, akik nem estek át a SARS-CoV-2 fertőzésen, és be vannak oltva a COVID19 ellen a SARS-CoV-2 vírus S fehérjét célzó védőoltással, illetve olyan alanyokkal, akik nem estek át a SARS-CoV-2 fertőzésen, és nincsenek beoltva a COVID19 ellen.

A beleegyező nyilatkozatot aláíró alanyokat értékelték a vizsgálat bevonási és kizárási kritériumai alapján, és csak az összes bevonási kritériumnak eleget tevő, de egyetlen kizárási kritériumot sem teljesítő alanyokat vonták be a vizsgálatba és vetették alá vérvételnek a QFN SARS assay-hez.

Alább olvasható a bevont populáció összefoglalása:

- 1. csoport: Az alanyok nem estek át természetes úton a SARS-CoV-2 fertőzésen, nem voltak beoltva a COVID19 ellen a QFN SARS assay-hez végzett vérvétel idején, sosem bizonyultak a múltban pozitívnak a SARS-CoV-2 fertőzésre végzett teszteléskor, nem reaktív szerológiai teszteredménnyel rendelkeztek, és a bevonás előtti 4 hetes időszakban nem mutattak COVID19-re utaló tüneteket.
- 2. csoport: Az alanyok nem estek át a SARS-CoV-2 fertőzésen, be voltak oltva a COVID19 ellen a SARS-CoV-2 S fehérjét célzó védőoltással a QFN SARS assay-hez végzett vérvétel idején, és sosem bizonyultak a múltban pozitívnak a SARS-CoV-2 fertőzésre végzett teszteléskor.
- Egyetlen alany sem volt szervtranszplantált (szolid szerv vagy sejt), és egyetlen alany sem részesült rák elleni terápiában a vizsgálatban való részvétel idején.

Az 1. csoportba összesen 218 alanyt vontak be, míg a 2. csoportba összesen 171 alanyt vontak be. A QFN SARS assay-hez végzett vérvétel után az 1. csoport négy alanyáról kiderült, hogy nem választhatók be, mivel a QFN SARS assay-hez végzett vérvétel vizitje során vett mintájuk reaktív szerológiai teszteredményt adott; így ezután az alanyokat kizárták az elemzésből.

A mintavételt követően elvégezték a szükséges lépéseket a QFN SARS Blood Collection Tubes vérvételi csövekkel, majd a plazmát ≤ -20 °C-on tárolták a QFN SARS ELISA assay-vel végzett tesztelésig. Az összes tesztelt QFN SARS ELISA lemez érvényes volt, és nem kaptak nem eldönthető eredményeket, így az 1. csoportban 214, a 2. csoportban 171 értékelhető minta volt.

Demográfiai adatok

Az egyes országokban gyűjtött minták számát és azok százalékos arányát az egyes vizsgálati csoportokon belül a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: A mintavételi országok összefoglalása

A mintavétel országa	1. csoport		2. csoport	
	N	%	N	%
Hollandia	214	100,00%	153	89,47%
USA	0	0,00%	18	10,53%

Az alanyok életkorának összefoglalása az átlaggal, középértékkel, minimum és maximum életkorral, valamint az életkor szórásával (Standard Deviation, SD) a 12. táblázatban látható.

12. táblázat: Az alanyok életkorának összefoglalása (év)

N	Átlag	Középérték	Szórás	Minimum	Maximum
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Az alanyok nemének összefoglalása a 13. táblázatban látható.

13. táblázat: Az alanyok nemének összefoglalása

Nem	N	%
Nő	234	60,78%
Férfi	151	39,22%

Specifititás

A QFN SARS eredmények és a referencia-módszerrel kapott eredmények összehasonlításával kapott klinikai egyezést a 14. táblázat tartalmazza.

14. táblázat: Klinikai egyezés: QFN SARS eredmény vs. referencia-módszer

		Referencia-módszerrel kapott eredmény		
		1. csoport (- oltás, -fertőzés)	2. csoport (+ oltás, -fertőzés)	Összes
QFN SARS eredmény	Nem reaktív	199	34	233
	Reaktív	15	137	152
Összes		214	171	385

A 214 oltatlan alanyból (1. csoport) 199-nek nem reaktív lett az eredménye a QFN SARS assay-vel, míg a fennmaradó 15-nek reaktív lett a teszteredménye. A 171 oltott alanyból (2. csoport) 137-nek reaktív lett az eredménye a QFN SARS assay-vel, míg a fennmaradó 34-nek nem reaktív lett a teszteredménye. Az 1. és 2. csoportban kapott 15, illetve 34 nem egyező eredményt nem vizsgálták további, nem egyező módszerrel.

Az oltatlan alanyok (1. csoport) esetében kiszámították a negatív százalékos egyezést (Negative Percent Agreement, NPA) (specifititás), valamint az egzakt kétoldali 95%-os konfidenciaintervallumot (Confidence Interval, CI); ezek a 15. táblázatban láthatók.

15. táblázat: Negatív százalékos egyezés (specifititás)

Csoport száma	NPA (specifititás)	95%-os CI
1. csoport (-oltás, -fertőzés)	92,99% (199 / 214)	88,70–96,02%

Szenzitivitás

Az oltott alanyok (2. csoport) esetében kiszámították a pozitív százalékos egyezést (Positive Percent Agreement, PPA) (szenzitivitás), valamint az egzaktt kétoldali 95%-os CI-t; ezek a 16. táblázatban láthatók.

16. táblázat: Pozitív százalékos egyezés (szenzitivitás)

Csoport száma	PPA (szenzitivitás)	95%-os CI
2. csoport (+oltás, -fertőzés)	80,12% (137 / 171)	73,34–85,82%

Pozitív százalékos egyezés életkor szerint

Az oltott alanyoknál (2. csoport) a pozitív százalékos egyezést rétegezték aszerint, hogy az alanyok életkora < 60 vagy ≥ 60 volt; az eredmények a 17. táblázatban láthatók.

17. táblázat: Pozitív százalékos egyezés a < 60 éves és a ≥ 60 éves alanyoknál

Életkortartomány (év)	PPA (szenzitivitás)	95%-os CI
< 60	85,33% (128/150)	78,78–90,64%
≥ 60	42,86% (9/21)	21,82–65,98%

Pozitív százalékos egyezés a COVID19-védőoltás típusa szerint

Az oltott alanyoknál (2. csoport) a pozitív százalékos egyezést rétegezték a kapott COVID19-védőoltás szerint; az eredmények a 18. táblázatban láthatók.

18. táblázat: Pozitív százalékos egyezés a COVID19-védőoltás típusa szerint

Védőoltás	PPA (szenzitivitás)	95%-os 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%

Az oltott alanyoknál kapott nem reaktív eredményeket befolyásoló tényezők

Annak megállapításához, hogy a magasabb életkor, a COVID19-védőoltás felvétele óta eltelt idő, a kapott védőoltás típusa és a nem összefügg-e az oltott alanyoknál (2. csoport) kapott nem reaktív eredményekkel, egyváltozós logisztikus regresszióanalízist végeztek. Az egyes tényezők és a nem reaktív eredmények közötti összefüggést az esélyhányados (Odds Ratio, OR) segítségével számították ki; az eredmények a 19. táblázatban láthatók.

19. táblázat: A különböző tényezők összefüggése a nem reaktív eredményekkel az oltott alanyoknál

Tényező	OR (95%-os CI)	p-érték
Életkor (év)	1,08 (1,05–1,12)	< 0,001
A vakcináció és a QFN SARS vérvétel közt eltelt idő (nap)	1,02 (1,01–1,03)	< 0,001
Védőoltás	Pfizer–BioNTech	1
	Astra Zeneca	2,55 (0,57–11,42)
	Janssen (Johnson & Johnson)	0,65 (0,14–3,09)
	Moderna	1,25 (0,42–3,72)
Nem	Nő	1
	Férfi	1,25 (0,59–2,65)

Csak az életkor és a vakcináció óta eltelt idő mutatott szignifikáns összefüggést az oltott alanyoknál kapott nem reaktív eredményekkel.

Mivel a vizsgálatot olyan országokban végezték, ahol az idősebbek hamarabb kaphatták meg a COVID19-védőoltásokat, az életkor hatással lehetett a vakcináció óta eltelt idő és a nem reaktív eredmények közötti összefüggésre. A 20. táblázatban látható a regresszióanalízis, amelynek során az életkor volt a magyarázó változó.

20. táblázat: A különböző tényezők összefüggése a nem reaktív eredményekkel az életkorra kontrollálva

Tényező	OR (95%-os CI)	p-érték
Életkor (év)	1,07 (1,03–1,11)	< 0,001
A vakcináció és a QFN SARS vérvétel közt eltelt idő (nap)	1,01 (1,00–1,02)	0,214

Az életkorra kontrollálva már nem szignifikáns az összefüggés a vakcináció óta eltelt idő és a nem reaktív eredmények között, azonban továbbra is szignifikáns az életkorral való összefüggés.

Irodalomjegyzék

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

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

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN műszaki ügyfélszolgálat kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és/vagy a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a mintafeldolgozási és assay módszerekkel kapcsolatban (az elérhetőség a következő címen található: www.qiagen.com).

Megjegyzések és javaslatok

ELISA – hibaelhárítás

Nem specifikus szín kialakulása

- | | |
|---|---|
| a) A lemez nem megfelelő mosása | A lemezt legalább 6 alkalommal kell mosni, tesztlyukanként 400 µl mosópufferrel. Az alkalmazott mosóberendezéstől függően 6-nál több mosási ciklusra is szükség lehet. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között. |
| b) Az ELISA lemez tesztlyukai közötti keresztzennyeződés | A kockázat minimalizálása érdekében legyen óvatos a minták pipettázásakor és keverésekor. |
| c) A kit vagy összetevői lejártak | Ügyeljen rá, hogy a kitet a lejáratási időn belül használja fel. A rehidratált standardot és konjugátum 100× koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő három hónapon belül fel kell használni. |
| d) Az enzimszubsztrátoldat szennyezett | Kékes elszíneződés esetén a szubsztrátot ártalmatlanítani kell. Ügyeljen a reagenstartályok tisztaságára. |
| e) Elválasztás előtt felkeveredett a plazma a QFN SARS Blood Collection Tubes vérvételi csövekben | A centrifugálás és az elválasztás között kerülni kell a plazma felkeverését a pipetta fel-le mozgatásával vagy bármilyen más módon. A teljes eljárás során meg kell őrizni a gélfelület sértetlenségét. |

Megjegyzések és javaslatok

Alacsony optikai denzitási értékek a standardoknál

- a) Standardhígítási hiba Ügyeljen rá, hogy a jelen használati útmutató szerint történjen a kit standardjának hígítása.
- b) Pipettázási hiba A pipettákat mindig a gyártói utasítások betartásával kell kalibrálni és alkalmazni.
- c) Túl alacsony inkubációs hőmérséklet Az ELISA inkubálását szobahőmérsékleten ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) kell végezni.
- d) Túl rövid inkubációs idő A konjugátumot, a standardokat és a mintákat tartalmazó lemezt 120 ± 5 percen át kell inkubálni. Az enzimszubsztrátoldatot 30 percen át kell a lemezen inkubálni.
- e) Nem megfelelő szűrő a lemez leolvasásánál A lemez leolvasását 450 nm-en kell végezni, 620–650 nm-es referenciaszűrővel.
- f) Túl hideg reagensek A konjugátum $100\times$ koncentrátum kivételével minden reagenst szobahőmérsékletre kell hozni az assay megkezdését megelőzően. Ehhez körülbelül 1 óra szükséges.
- g) A kit vagy összetevői lejártak Ügyeljen rá, hogy a kitet a lejáratási időn belül használja fel. A rehidratált standardot és konjugátum $100\times$ koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő 3 hónapon belül fel kell használni.

Magas háttérérték

- a) A lemez nem megfelelő mosása A lemezt legalább 6 alkalommal kell mosni, tesztlyukanként $400 \mu\text{l}$ mosópufferrel. Előfordulhat, hogy 6-nál több mosási ciklusra van szükség. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között.
- b) Túl magas inkubációs hőmérséklet Az ELISA inkubálását szobahőmérsékleten ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) kell végezni.
- c) A kit vagy összetevői lejártak Ügyeljen rá, hogy a kitet a lejáratási időn belül használja fel. A rehidratált standardot és konjugátum $100\times$ koncentrátumot a rehidratálás dátumát követő három hónapon belül fel kell használni.

Megjegyzések és javaslatok














- d) Az enzimszubsztrátoldat szennyezett Kékes elszíneződés esetén a szubsztrátot ártalmatlanítani kell. Ügyeljen a reagenstartályok tisztaságára.


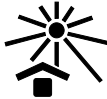

Nem lineáris standard görbe és a párhuzamosok közti variabilitás

- a) A lemez nem megfelelő mosása A lemezt legalább 6 alkalommal kell mosni, tesztlyukanként 400 µl mosópufferrel. Előfordulhat, hogy 6-nál több mosási ciklusra van szükség. Ajánlott legalább 5 másodperces áztatási időt hagyni az egyes ciklusok között.
- b) Standardhígítási hiba Ügyeljen rá, hogy a jelen használati útmutató szerint történjen a standard hígítása.
- c) Elégtelen keverés A reagenseket a lemezre mérésük előtt alaposan fel kell keverni átfordítással vagy óvatos vortexeléssel.
- d) Nem egyenletes pipettázás vagy az assay előkészítésének megszakítása A minták és a standardok bemérését folyamatosan kell végezni. Minden reagenst elő kell készíteni az assay megkezdése előtt.

Szimbólumok

A használati útmutatóban, a csomagoláson és a címkéken a következő szimbólumok szerepelhetnek:

Szimbólum	A szimbólum meghatározása
 <N>	<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz
	Lejárat dátum
	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Katalógusszám
	Tételszám
	Anyagszám (azaz az összetevők címkéje)
	Összetevők
	Tartalom
	Szám
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám
	Hivatalos képviselő
R_n	Az R a használati útmutató átdolgozását, az n pedig az átdolgozás számát jelöli
	Hőmérsékleti korlátozás
	Gyártó

Szimbólum	A szimbólum meghatározása
	Lásd a használati útmutatót
	Napfénytől védve tartandó
	Vigyázat / figyelem

Kapcsolatfelvételi adatok

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért tekintse meg műszaki támogatásunk weblapját a **www.qiagen.com/Support** címen, hívja a 00800-22-44-6000 telefonszámot, vagy forduljon a QIAGEN valamelyik műszaki szervizosztályához vagy a területileg illetékes forgalmazóhoz (lásd a hátsó borítón vagy a **www.qiagen.com** webhelyen).

„A” függelék: Technikai tudnivalók

Nem eldönthető eredmények

A nem eldönthető eredmény ritka jelenség, és a tesztalany immunállapota mellett számos technikai tényező is okozhatja (pl. a vérvételi csövek nem megfelelő kezelése/tárolása, az ELISA lemez nem megfelelő mosása), ha nem tartják be a fenti használati útmutatót.

A reagensek tárolásakor, illetve a vérminták levételekor vagy kezelésekor elkövetett technikai hibák gyanúja esetén meg kell ismételni a teljes QFN SARS tesztet új vérmintával. Nem megfelelő mosás vagy az előírt ELISA műveletsortól való bármely eltérés gyanúja esetén a stimulált plazmák ELISA tesztelését meg kell ismételni. Az orvos belátása szerint dönthet új minta levételéről vagy más eljárás végrehajtásáról.

Alvadt plazmaminták

A plazmaminták hosszú időn át való tárolásakor fibrinalvadékok kialakulása esetén centrifugálja a mintát a vérrögök ülepítéséhez és a plazma pipettázásának megkönnyítéséhez.

Lipémiás plazmaminták

A lipémiás mintákat óvatosan kell pipettázni, mivel a zsírlerakódások eltömíthetik a pipettahegyeket.

„B” függelék: Rövidített ELISA teszteljárás

1. Legalább 60 percen keresztül engedje, hogy az ELISA összetevői a konjugátum 100× koncentrátum kivételével felvegyék a szobahőmérsékletet.

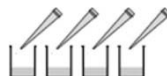


2. Rehidratálja a kitben található standardot 8,0 IU/ml koncentrációra desztillált vagy ioncserélt vízzel. Készítsen négy (4) hígítást a standardból.

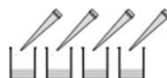


3. Rehidratálja a liofilizált konjugátum 100× koncentrátumot desztillált vagy ioncserélt vízzel.

4. Hígítsa készre a konjugátumot a zöld hígítóval, majd mérjen belőle 50 µl mennyiséget minden tesztlyukba.



5. Töltsön 50 µl tesztplazmamintát és 50 µl standardot a megfelelő lyukakba. Keverje fel a rázógéppel.



6. Inkubálja 120 percig szobahőmérsékleten.



7. Mossa a tesztlyukakat legalább 6 alkalommal, tesztlyukanként 400 µl mosópufferrel.



8. Mérjen 100 µl enzimszubsztrátoldatot a tesztlyukakba. Keverje fel a rázógéppel.



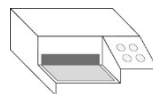
9. Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.



10. Mérjen 50 μ l enzimeállító oldatot minden tesztlyukba. Keverje fel a rázógéppel.



11. Olvassa be az eredményeket 450 nm-en a 620–650 nm-es referenciaszűrővel.



12. Elemezze az eredményeket.



Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	2 lemezes ELISA kit	626420
Kapcsolódó termékek		
QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 cső (50-50 Nil, Ag1, Ag2 és Mitogen cső)	626725

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében vagy felhasználói kézikönyvében található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói kézikönyvei a www.qiagen.com webhelyen érhetők el, illetve a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

A dokumentum átdolgozási előzményei

Dátum	Leírás
R1, 2021. október	Első kiadás
R2, 2021. november	A „Teljesítményjellemzők” és a „Klinikai teljesítmény” című fejezetek frissítése
R3, 2022. április	Zavaró anyagokkal kapcsolatos frissítés az „Analitikai teljesítmény jellemzői” című fejezetben

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva.

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva.

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva.

Korlátozott licencszerződés a QuantiFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kíthez

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a panelhez tartozó összetevőkkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a panelhez tartozó összetevőket a termékhez mellékelt protokollokban, a jelen kézikönyvben és a www.qiagen.com webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a panelhez tartozó összetevőbe beépítsék vagy azokkal együtt használják. Az említett protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsájtják más QIAGEN felhasználók rendelkezésére. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sérítik harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licenccen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a panel és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A panel és az összetevőinek licence csak egyszeri használatra jogosít; újrafelhasználása, felújítása vagy újraértékesítése tilos.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A panel vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztüli érvényesítésére és a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a panellel és/vagy összetevőivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárással kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perkoltségg követelésére, beleértve az ügyvédi költségeket is.

A legújabb licencfeltételekről a www.qiagen.com webhelyen tájékozódhat.

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN csoport), Proclin®. A dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. akkor sem tekinthetők a törvény védelmén kívül esőnek, ha nincsenek külön jelöléssel ellátva.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, minden jog fenntartva.

Rendelés: www.qiagen.com/shop | Műszaki támogatás: support.qiagen.com |
Webhely: www.qiagen.com
