

Návod na použitie súpravy QuantiFERON[®]-TB Gold Plus ELISA Kit



2 × 96 (622120)



20 × 96 (622822)

Verzia 1

IVD

Na diagnostické použitie in vitro

Na použitie so skúmavkami na odber krvi QuantiFERON[®]- TB Gold Plus Blood Collection Tubes



REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Nemecko

R4

MAT

1123669SK

Obsah

Zamýšľané použitie	5
Zamýšľaný používateľ	5
Popis a princíp.....	6
Informácie o patogéne	6
Súhrn a vysvetlenie.....	7
Princípy testu	9
Dodávané materiály	11
Obsah súpravy	11
Súčasti súpravy.....	12
Platforma a softvér	12
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú.....	13
Doplňkové reagensy	13
Spotrebný materiál	13
Zariadenie	13
Varovania a preventívne opatrenia.....	14
Bezpečnostné informácie	14
Informácie v prípade výnimočného stavu.....	15
Preventívne opatrenia	16
Skladovanie a manipulácia s reagensmi.....	18
Stabilita pri používaní	18
Zriedené a nepoužívané činidlá	18
Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi	19

Protokol: Vykonanie testu ELISA.....	20
Výsledky (výpočty)	26
Generovanie krivky štandardu a hodnôt vzoriek	26
Kontrola kvality testu	28
Interpretácia výsledkov.....	30
Obmedzenia	32
Charakteristiky účinnosti.....	33
Klinické štúdie	33
Citlivosť	35
Predpokladané hodnoty	43
Súhrn bezpečnosti a charakteristík	49
Charakteristiky účinnosti testu.....	50
Analytické charakteristiky	50
Likvidácia.....	63
Referenčná literatúra	64
Sprievodca riešením problémov	66
Symboly.....	69
Príloha A: Technické informácie	72
Neurčité výsledky	72
Zrazené plazmové vzorky	72
Vzorky lipemickej plazmy	72
Príloha B: Skrátенý postup testu ELISA.....	73
Informácie o objednávaní	75
História úprav dokumentu.....	77

Zamýšľané použitie

Test QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) je *in vitro* diagnostický test, v rámci ktorého sa používa zmes peptidov simulujúcich proteíny ESAT-6 a CFP-10 na stimuláciu buniek v heparinizovanej celej krvi. Detekcia interferónu- γ (IFN- γ) pomocou enzymatickej imunosorbenčnej analýzy (ELISA) sa používa na identifikáciu *in vitro* reakcií na tie peptidové antigény, ktoré súvisia s infekciou *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus je nepriamy test infekcie *M. tuberculosis* (vrátane súvisiaceho ochorenia) a tento test sa používa spolu s hodnotením rizika, rádiografiou a ďalšími zdravotníckymi a diagnostickými hodnoteniami.

Zamýšľaný používateľ

Táto súprava je určená na profesionálne použitie.

Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) môže používať školený personál v laboratórnom prostredí.

Popis a princíp

Informácie o patogéne

Tuberkulóza je nákazlivá choroba, ktorú spôsobujú komplexné organizmy *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* a *M. caprae*), ktorá sa typicky šíri na nových hostiteľov prostredníctvom vzduchom prenášaných kvapôčkových jadier od pacientov s pľúcnou tuberkulózou. Ochorenie u nových pacientov sa môže prejaviť v rozsahu týždňov až mesiacov, stav väčšiny infikovaných jednotlivcov však ostáva dobrý. Latentná infekcia tuberkulózy (LTBI), t. j. nenákazlivý asymptomatický stav, u niektorých pretrváva, a u takýchto jednotlivcov sa samotné ochorenie môže rozvinúť až o niekoľko mesiacov alebo rokov. Hlavným účelom diagnostiky LTBI je zváženie možnosti zdravotníckej liečby na zabránenie ochoreniu tuberkulózou. Viac ako 100 rokov bol jedinou dostupnou metódou na diagnostiku LTBI (4) tuberkulínový kožný test (Tuberculin Skin Test, TST). Kožná reakcia na tuberkulín sa vyvinie do 2 až 10 týždňov po infikovaní. Niektorí infikovaní jednotlivci vrátane osôb s rôznymi stavmi potláčajúcimi imunitné funkcie a osôb bez takýchto stavov však nereagovali na tuberkulín. Naopak niektorí jednotlivci bez predpokladu infekcie *M. tuberculosis* vykazovali citlivosť na tuberkulín a súčasne vykazovali pozitívne výsledky TST po vakcinácii bacilom Calmette-Guérin (BCG), mykobakterickú infekciu (inú než komplex *M. tuberculosis*) alebo neurčité iné faktory.

LTBI je nevyhnutné odlišiť od samotného tuberkulózneho ochorenia, t. j. stavu, ktorý obvykle zasahuje pľúca a dolný dýchací trakt, môže však zasiahnuť aj ďalšie orgány. Na diagnostiku tuberkulózneho ochorenia sa využívajú poznatky anamnézy, ako aj fyzické, rádiologické a mykobakteriologické nálezy.

Súhrn a vysvetlenie

Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) je štvrtou generáciou testovacej technológie QuantiFERON-TB, ktorá hodnotí reakciu sprostredkovanú bunkami pomocou kvantitatívneho merania IFN- γ v celej krvi. QFT-Plus je kvalitatívny test, ktorý meria bunkami sprostredkované imunitné reakcie (Cell-Mediated Immune, CMI) na peptidové antigény, ktoré simulujú mykobakteriálne proteíny. Tieto proteíny (ESAT-6 a CFP-10) sa nenachádzajú v žiadnych reťazcoch BCG a nenachádzajú sa vo väčšine netuberkulózných mykobaktérií okrem *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* (1). Jednotlivci infikovaní komplexnými organizmami *M. tuberculosis* spravidla majú v krvi lymfocyty, ktoré rozpoznávajú tieto a iné mykobakteriálne antigény. Proces rozpoznávania zahŕňa generovanie a vylučovanie cytokínu IFN- γ . Základ tohto testu tvorí detekcia a následná kvantifikácia IFN- γ .

Tuberkulínové kožné testy a testy IGRA sú užitočné, ale nedostatočné na diagnostiku komplexnej infekcie *M. tuberculosis* u chorých pacientov – pozitívny výsledok môže podporovať diagnózu tuberkulózy, ale pozitívne výsledky môžu spôsobiť aj infekcie inými mykobaktériami (napr. *M. kansasii*). Na potvrdenie alebo vylúčenie tuberkulózneho ochorenia sa vyžadujú ďalšie zdravotnícke a diagnostické hodnotenia.

Antigény používané v rámci QFT-Plus sú zmesou peptidov simulujúcich proteíny ESAT-6 a CFP-10. Na základe mnohých štúdií sa zistilo, že tieto peptidové antigény simulujú reakcie IFN- γ v bunkách T u jednotlivcov infikovaných baktériou *M. tuberculosis*, to však vo všeobecnosti neplatí u neinfikovaných osôb alebo u osôb s vakcináciou BCG bez samotného ochorenia alebo rizika LTBI (1,2, 6,9). Zdravotnícka liečba alebo stavy, ktoré zhoršujú funkcie imunitného systému, však môžu potenciálne obmedzovať reakcie na IFN- γ . Pacienti s niektorými inými mykobakteriálnymi infekciami taktiež môžu reagovať na ESAT-6 a CFP-10, pretože gény kódujúce tieto proteíny sa nachádzajú v kmeňoch *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* (1, 3,7).

Testovacou populáciou na testovanie QFT-Plus sú pacienti s klinicky potvrdenou aktívnou tuberkulózou a pacienti s rizikom infekcie tuberkulózou alebo latentnou infekciou tuberkulózy (LTBI). Neplatia žiadne obmedzenia podľa veku, pohlavia alebo iné obmedzenia.

V priebehu infekcie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) zohrávajú CD4⁺ T-bunky kľúčovú úlohu v rámci imunologickej kontroly prostredníctvom ich vylúčovania cytokínu IFN- γ . Získané dôkazy teraz prisudzujú dôležitú úlohu aj CD8⁺ T-bunkám, ktoré sa zúčastňujú obrany jedinca voči infekcii MTB tvorbou IFN- γ a iných rozpustných faktorov, ktoré aktivujú makrofágy, aby sa zabránilo rastu MTB, zabili sa infikované bunky alebo sa priamo rozkladala intracelulárna MTB. IFN- γ produkujúce MTB špecifické CD8⁺ bunky boli zistené u pacientov s LTBI a aktívnou formou TB. Okrem toho sa uvádza, že CD8⁺ T-lymfocyty špecifické pre ESAT-6 a CFP-10 sa častejšie detegujú u pacientov s aktívnou formou ochorenia TB v porovnaní s pacientmi s LTBI, čo môže súvisieť s nedávnou expozíciou voči MTB (8,10 – 12). CD8⁺ T-bunky špecifické pre MTB a produkujúce IFN- γ boli tiež detegované u pacientov s aktívnou formou ochorenia TB so súbežnou infekciou HIV (13, 14) a u malých detí s ochorením TB (15).

Test QFT- Plus využíva dve rôzne skúmavky s antigénom TB: TB Antigen Tube 1 (TB1) a TB Antigen Tube 2 (TB2). Obe skúmavky obsahujú peptidové antigény z príslušných antigénov ESAT-6 a CFP-10 špecifických pre organizmy komplexu MTB. Skúmavky TB1 a TB2 obsahujú peptidy z proteínov ESAT-6 a CFP-10, ktorých účelom je vyvolať reakcie CMI od pomocných CD4⁺ T-lymfocytov TB2 obsahuje ďalšiu skupinu peptidov, ktorých účelom je vyvolať reakcie CMI od CD8⁺ cytotoxických T-lymfocytov.

Rizikové faktory pre infekciu *M. tuberculosis* zahŕňajú historické, zdravotné alebo epidemiologické prediktory pre ochorenie tuberkulózy alebo vystavenie sa tuberkulóze. Prečítajte si najnovšie odporúčanie WHO <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment>, v ktorom nájdete odporúčania týkajúce sa diagnostiky infekcie *M. tuberculosis* (vrátane ochorenia) a výbere osôb na testovanie (16). Test QFT- Plus bol odskúšaný na niektorých skupinách pacientov indikovaných na skrining infekcie TB podľa aktuálneho odporúčania WHO (16) vrátane týchto osôb: osoby, ktoré mali pozitívny výsledok testu na vírus ľudskej imunodeficiencie (Human Immunodeficiency Virus, HIV), kontakty nedávnych pacientov chorých na TB a obyvatelia miest s vysokou mierou kolektivity, ktorí boli vystavení dospelým osobám s vysokým rizikom TB (5).

Princípy testu

QFT-Plus je kvalitatívny test, ktorý používa špecializované skúmavky na odber krvi, ktoré obsahujú peptidové antigény, ktoré stimulujú proteíny *M. tuberculosis*, ktoré sa používajú na odber celej krvi. 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.

Najskôr sa odoberie celá krv do každej zo skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi (ide o skúmavku Nil, skúmavku TB1, skúmavku TB2 a skúmavku Mitogen). Krv je možné prípadne odobrať aj pomocou skúmavky na odber krvi s obsahom lítium-heparínu alebo heparínu sodného (antikoagulant). Následne krv preneste do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi.

Skúmavky QFT- Plus 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 QFT-Plus 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 QFT-Plus 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 do jamiek mikrotitračnej doštičky.

Analýza QFT-Plus sa považuje za pozitívnu vzhľadom na reakciu IFN- γ vtedy, keď sú výsledky z ktorejkoľvek skúmavky s antigénom TB výrazne vyššie, než je hodnota Nil IFN- γ v IU/ml. Plazmová vzorka zo skúmavky Mitogen slúži ako pozitívna kontrola IFN- γ pre každú testovanú vzorku. Slabá reakcia na Mitogen (< 0,5 IU/ml) indikuje neurčitý výsledok v prípade, ak krvná vzorka taktiež vykazuje negatívnu reakciu na antigény TB. 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 . 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 TB a v skúmavke Mitogen. Merací rozsah testov QFT-Plus ELISA je 10 IU/ml.

Dodávané materiály

Obsah súpravy

Súčasti testu ELISA Katalógové č.	Súprava s 2 doštičkami 622120	Referenčná laboratórna súprava 622822
Microplate Strips (Mikrotitračné prúžky) (12 × 8 kalíškov) s myšacou antihumánou monoklonálnou protilátkou IFN- γ	2 súpravy s mikrotitračnými prúžkami 12 × 8	20 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)	10 × liekovka (8 IU/ml po zriedení)
Green Diluent (Zelené riedidlo) (obsahuje hovädzí kazeín, štandardné myšacie sérum, Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 × 30 ml	10 × 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)	10 × 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	10 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymatický substrátový roztok) (obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametylbenzidín)	1 × 30 ml	10 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymatický tlmiaci roztok; obsahuje 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 × 15 ml	10 × 15 ml
<i>Návod na použitie súpravy QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

Súčasti súpravy

Kontrolné a kalibračné roztoky

Test QFT-Plus 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 QFT-Plus Analysis Software. Je dostupný na stiahnutie na stránke www.qiagen.com.

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Doplnkové reagensie

- Skúmavky na odber krvi QuantiFERON- TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Deionizovaná alebo destilovaná voda, 2 litre

Spotrebný materiál

- Veko doštičky na 96-jamkovú doštičku
- **Voliteľné:** 1 ml mikroskúmavky s uzávermi v držiaku s 96-jamkovým formátom alebo holé mikrodoštičky s plastovými uzávermi na uloženie plazmy (22 pacientov/držiak alebo doštičku)
- Nádoby na reagensie

Zariadenie*

- Inkubátor s teplotou $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (s alebo bez CO_2)
- 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
- Trepačka na mikrotitračné doštičky schopná dosiahnuť rýchlosť 500 a 1 000 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

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

Varovania a preventívne opatrenia

Vezmite na vedomie, že môžete byť požiadaní, aby ste si naštudovali miestne nariadenia pre nahlasovanie vážnych incidentov, ktoré vznikli v súvislosti s pomôckou. Výrobci a/alebo jeho oprávnenému zástupcovi a regulačnému orgánu, ku ktorému používateľ a/alebo pacient prináleží.

Na diagnostické použitie in-vitro.

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, zobraziť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

- Vzorky sú potenciálne infekčné. Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných postupov.
- Negatívny výsledok QFT-Plus nevylučuje možnosť infekcie *M. tuberculosis* alebo tuberkulózneho ochorenia: falošne negatívne výsledky môžu byť spôsobené fázou infekcie (napríklad získanie vzorky pred rozvojom bunkovej imunitnej reakcie), nesprávnou manipuláciou so skúmavkami na odber krvi po venepunkcii, nesprávnym vykonaním analýzy alebo inými individuálnymi imunologickými faktormi vrátane tých, ktoré súvisia s komorbiditami. Produkcia heterofilných protilátok a nešpecifického IFN- γ pri iných zápalových zdravotných problémoch môže maskovať špecifickú reakciu na peptidy ESAT-6 alebo CFP-10.
- Pozitívny výsledok QFT-Plus nesmie byť jediným a definitívnym základom stanovenia infekcie *M. tuberculosis*. Nesprávne vykonanie testu môže viesť k falošne reaktívnym výsledkom QFT-Plus.


- Pozitívny výsledok QFT-Plus je potrebné overiť pomocou ďalšieho zdravotníckeho hodnotenia aktívneho tuberkulózneho ochorenia (napríklad výter a kultúra Acid Fast Bacilli, hrudný RTG).
- Aj keď nie sú organizmy ESAT-6 a CFP-10 prítomné vo všetkých reťazcoch BCG a vo väčšine známych netuberkulózných mykobaktérií, je možné, že pozitívny výsledok QFT-Plus môže byť spôsobený infekciou *M. kansasii*, *M. szulgai* alebo *M. marinum*. V prípade podozrení na tieto infekcie je potrebné vykonať alternatívne testy.
- Falošne reaktívny výsledok QFT-Plus môže byť spôsobený nesprávnym odberom vzorky krvi alebo nesprávnou manipuláciou so vzorkou, čo ovplyvní funkciu lymfocytov. Prečítajte si časť „Protokol: Vykonanie testu ELISA“ na strane 20, kde nájdete informácie o správnej manipulácii so vzorkami krvi. Oneskorenie inkubácie môže spôsobiť falošne negatívne alebo neurčité výsledky a iné technické parametre môžu ovplyvniť schopnosť detegovať výraznú odpoveď na IFN- γ .

Informácie v prípade výnimočného stavu

CHEMTREC

Mimo USA a Kanada +1 703 527 3887

Preventívne opatrenia

<p>UPOZORNENIE</p> 	<p>S ľudskou krvou manipulujte ako s potenciálne infekčným materiálom.</p> <p>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.</p>
---	--

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 20× 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 reagensoch QFT-Plus. Po požití, vdýchnutí alebo po kontakte s pokožkou môže byť toxický.
- Odchýlky od postupov uvádzaných v príbalovom letáku k analýze *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Návod na použitie* 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 QFT-Plus. Ďalšie činidlá (premývací 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.
- Nepoužitá činidlá a biologické vzorky zlikvidujte v súlade s miestnymi, štátnymi a federálnymi nariadeniami.
- Nepoužívajte súpravu QFT-Plus 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 reagencií ELISA nájdete v časti „Protokol: Vykonanie testu ELISA“ na strane 20.
- 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 100x 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.
- Prúžky mikrotitračnej doštičky sú len na jedno použitie. Nepoužité prúžky je možné vybrať z doštičky a uskladniť na ďalšie použitie.

Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi

Prečítajte si *návod na použitie skúmaviek na odber krvi QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes (1123668)*, ktorom nájdete podrobnosti o pracovnom postupe pri odbere krvi pre test QFT-Plus.

Protokol: Vykonanie testu ELISA

Dôležité body pred začatím činnosti

Nastavenie (Čas potrebný na vykonanie testu)

- Na získanie platných výsledkov testu QFT-Plus 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. Potrebný čas 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

IFN- γ ELISA

- Viac si prečítajte na „Obsah súpravy“, strana 11 a „Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú“, strana 13, pre materiály potrebné na vykonanie testu ELISA.

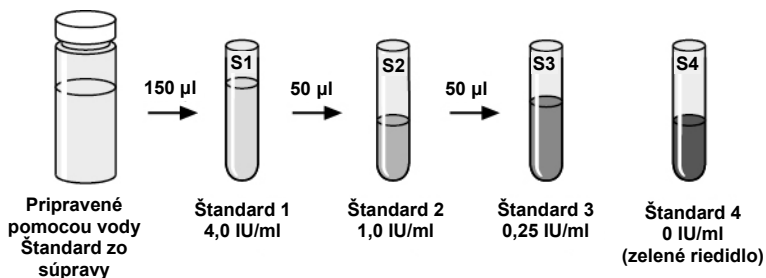
Postup

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. Nechajte minimálne 1 prúžok pre štandardy QFT-Plus a dostatočný počet prúžkov pre niekoľko testovaných pacientov (pozri 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	Preneste 50 μ l z S1 do S2 a zmes riadne premiešajte
E	Preneste 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. Zriedíte 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 100x 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. Plazmové vzorky je možné uskladniť v centrifúgovaných skúmavkách na odber krvi QFT-Plus 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) počas dlhšieho obdobia.

Plazmové vzorky je možné preniesť/použiť priamo z odstredených skúmaviek na meranie na doštičku QFT-Plus ELISA.

Dôležité: Ak chcete preniesť plazmové vzorky priamo z odstredených skúmaviek na odber krvi QFT-Plus 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 vzorky plazmy do príslušných jamiek (pozri odporúčané rozloženie doštičky 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 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
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 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
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 TB1 (vzorka 1. plazma TB1), 1 TB2 (vzorka 1. plazma TB2), 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 20x s 19 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody a zmes riadne premiešajte. K dispozícii je dostatok premývacieho roztoku s koncentráciou 20x na prípravu 2 litrov premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou.

12. Po skončení inkubácie doštičky ELISA umyte jamky doštičky pomocou 400 µl premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou. Vykonajte 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 premývacie roztok. Do každej jamky doštičky pridajte 100 µl enzymatického substrátového roztoku, doštičku zakryte a dôkladne premiešajte na 1 minútu pri rýchlosti 500 – 1 000 otáčok/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 QFT-Plus Analysis Software. Je dostupný na stránke www.qiagen.com. Vždy overte, či používate najnovšiu verziu analyzačného softvéru QFT-Plus 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 30. Softvér oznámi všetky koncentrácie väčšie ako 10 IU/ml ako „>10“, pretože tieto hodnoty nespádajú do validovaného lineárneho rozsahu doštičky ELISA.

Okrem použitia analytického softvéru QFT-Plus Analysis Software je možné výsledky stanoviť aj pomocou nasledovnej metódy.

Generovanie krivky štandardu a hodnôt vzoriek

Ak sa nepoužíva analytický softvér QFT- Plus Analysis Software

Určenie krivky štandardu a stanovenie hodnôt IU/ml vzorky vyžaduje program tabuľkového procesora, ako napríklad Microsoft® Excel®, ak sa nepoužíva analyzačný softvér QFT-Plus 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 tieto údaje OD získali pre štandardy, výpočty pomocou $-\log(e)$ – by zodpovedali údajom 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 28 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	–
TB1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,16
TB2	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 TB1, TB2 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.

Analytický softvér QFT- Plus 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.

Interpretácia výsledkov

Výsledky testu QFT-Plus sa interpretujú podľa týchto kritérií (tabuľka 4).

Dôležité: Diagnostika alebo vylúčenie tuberkulózneho ochorenia a hodnotenie pravdepodobnosti LTBI vyžadujú použiť kombináciu epidemiologických, historických, zdravotníckych a diagnostických nálezov, na ktoré je potrebné prihliadať počas interpretácie výsledkov QFT-Plus. Pozri všeobecné odporúčanie k diagnostike a liečbe ochorenia TB a LTBI:

(<https://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/default.htm>).

Tabuľka 4. Interpretácia výsledkov QFT- Plus

Nil (IU/ml)	TB1 mínus Nil (IU/ml)	TB2 mínus Nil (IU/ml)	Mitogen mínus Nil (IU/ml)*	Výsledok QFT- Plus	Správa/interpretácia
≤ 8,0	≥0,35 a ≥25 % Nil	Akákkoľvek hodnota	Akákkoľvek hodnota	Poitívny†	Infekcia <i>M. tuberculosis</i> je pravdepodobná.
	Akákkoľvek hodnota	≥ 0,35 a ≥ 25 % Nil			
	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % Nil	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % Nil	≥ 0,50	Negatívny	Infekcia <i>M. tuberculosis</i> je NEPRAVDEPODOBNÁ.
	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % Nil	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % Nil	< 0,50	Neurčitý‡	Pravdepodobnosť infekcie <i>M. tuberculosis</i> nemožno stanoviť
> 8,0§	Akákkoľvek hodnota				

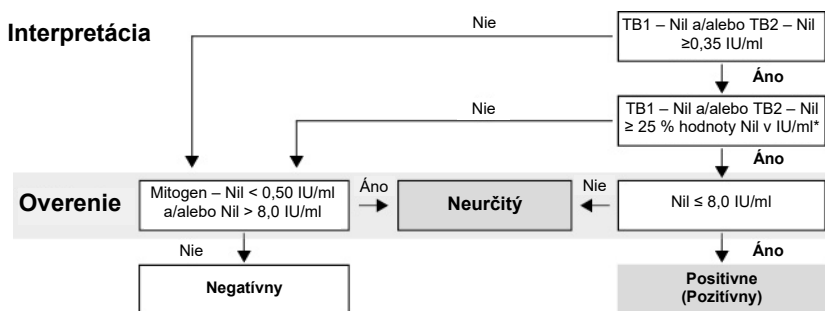
* Reakcie na pozitívnu kontrolu Mitogen (a niekedy aj na antigény TB) sa môžu bežne nachádzať mimo rozsahu čítačky mikrotitračných doštičiek. Nemá to však žiadny vplyv na výsledky. Hodnoty > 10 IU/ml označuje softvér QFT-Plus ako >10 IU/ml.

† V prípadoch, kedy nie je podozrenie na infekciu *M. tuberculosis*, je možné úvodné pozitívne výsledky overiť opätovným testovaním pôvodných plazmových vzoriek (duplicitne) v QFT-Plus ELISA. Ak je opakované testovanie jedného alebo oboch replikátov pozitívne, považuje sa výsledok testu za pozitívny.

‡ Možné príčiny nájdete v „Sprievodca riešením problémov“, strana 66.

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

Magnitúdu nameranej úrovne IFN- γ nie je možné korelovať s fázou alebo stupňom infekcie, úrovne imunitnej reakcie ani pravdepodobnosťou prechodu do aktívneho štádia ochorenia. Pozitívna reakcia na TB u osôb s negatívnou reakciou na Mitogen je zriedkavá, bola však pozorovaná u pacientov s ochorením TB. To indikuje, že reakcia IFN- γ na antigény TB je výraznejšia než reakcia na Mitogen. Je to možné, keďže úroveň Mitogen nestimuluje v maximálnej miere tvorbu IFN- γ lymfocytmi.



Obrázok 3. Interpretácia testu QFT-Plus. * Aby bolo možné považovať hodnoty TB1 mínus Nil alebo TB2 mínus Nil za platné, hodnota $\geq 25\%$ Nil v IU/ml musí byť z rovnakej skúmavky ako pôvodný výsledok $\geq 0,35$ IU/ml.

Obmedzenia

Výsledky testovania QFT-Plus 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 TB 25 % alebo vyššia môže spadať mimo rozsahu merania testu.

- Prediktívna hodnota pozitívneho výsledku testu QFT-Plus pri diagnostike infekcie *M. tuberculosis* závisí od pravdepodobnosti infekcie, ktorá sa hodnotí podľa historických, epidemiologických, diagnostických a iných zistení.
- Diagnostika LTBI vyžaduje, aby sa tuberkulóza vylúčila na základe zdravotníckeho hodnotenia vrátane hodnotenia aktuálnych zdravotných a diagnostických testov na ochorenie podľa indikácie.
- Negatívny výsledok sa musí zohľadniť pri anamnéze pacienta a údajoch z minulosti, ktoré sú relevantné pre pravdepodobnosť infekcie *M. tuberculosis* a potenciálneho rizika progresie tuberkulózy, najmä u jednotlivcov so zníženou funkciou imunitného systému.

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 QFT-Plus Blood Collection Tubes (1123668)*.

Charakteristiky účinnosti

Klinické štúdie

Keďže na potvrdenie alebo vylúčenie diagnózy LTBI neexistuje žiadny definitívny štandardný test, predpoklad citlivosti a špecificity týkajúcej sa QFT-Plus nie je možné prakticky zhodnotiť. Špecificita QFT-Plus bola odhadnutá formou hodnotenia miery falošne pozitívnych výsledkov u osôb s nízkym rizikom (žiadne známe rizikové faktory) tuberkulózne infekcie. Citlivosť bola odhadnutá formou hodnotenia skupín pacientov v štúdiu s kultivačne potvrdeným ochorením TB. Charakteristiky testu boli okrem toho hodnotené v rámci pozitivity a negativity v populácii zdravých osôb so zistenými rizikovými faktormi pre infekciu tuberkulózy (populácia so zmiešaným rizikom).

Špecificita

Multicentrická štúdia hodnotiaca klinickú špecificitu testu QFT-Plus sa uskutočnila na 733 účastníkoch štúdie, u ktorých existoval predpoklad, že majú buď nízke riziko infekcie *M. tuberculosis* alebo žiadne rizikové faktory expozície infekcii alebo chorobe. Demografické informácie a rizikové faktory expozície voči TB boli stanovené pomocou standardizovaného prieskumu počas testovania. Štúdia sa uskutočnila v štyroch rôznych centrách vrátane jedného v Spojených štátoch, dvoch v Japonsku a jedného v Austrálii. Test QFT-Plus sa porovnal s testom QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Zhrnutie údajov charakteristík klinickej špecificity, ktoré sú stratifikované podľa centra štúdie a regiónu, nájdete v tabuľke 5. Výsledky charakteristík sú založené na celkovom počte platných testov. Nevznikli žiadne neurčité výsledky.

Tabuľka 5. Špecifická testu QFT- Plus v nízkorizikovej populácii

Centrum	N	Požítivny		Negative (Negatívny)		Neurčitý		Špecifická (95 % CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT- Plus
Spojené štáty									
(č. 1) USA-4	212	2	4	210	208	0	0	99,06 % (210/212) (96,63 – 99,74)	98,11 % (208/212) (95,25 – 99,26)
Japonsko									
(č. 2) JPN-3	106	1	2	105	104	0	0	99,06 % (105/106) (94,85 – 99,83)	98,11 % (104/106) (93,38 – 99,48)
(č. 3) JPN-1	216	3	5	213	211	0	0	98,61 % (213/216) (96,00 – 99,53)	97,69 % (211/216) (94,70 – 99,01)
Japonsko celkovo	322	4	7	318	315	0	0	98,76 % (318/322) (96,85 – 99,52)	97,83 % (315/322) (95,6 – 98,9)
Austrália									
(č. 4) AU-3	199	8	9	191	190	0	0	95,98 % (191/199) (92,27 – 97,95)	95,48 % (190/199) (91,63 – 97,60)

Špecifická testu QFT-Plus bola 98,11 % v USA, 97,83 % v Japonsku a 95,48 % v Austrálii. Celková špecifická testu QFT-Plus bola 97,27 % (713/733). Špecifická testu QFT bola 99,06 % v USA, 98,76 % v Japonsku a 95,98 % v Austrálii. Celková špecifická testu QFT bola 98,09 % (719/733).

Analýza výsledkov podľa typu skúmvavky s antigénom TB a ich kombinácii je uvedená ako príklad očakávaných výsledkov v nízkorizikovej populácii (tabuľka 6).

Tabuľka 6. Výsledky štúdie týkajúce sa špecificity testu QFT- Plus podľa skúmvavky s antigénom TB

Interpretácia na základe TB antigénu Nil				
IU/ml v	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitívna podľa TB1 a/alebo TB2)*	Zhodne pozitívna TB1 a TB2 (analýza alternatív)†
Positívne (Pozitívny)	10	18	20	8
Negatívny	723	715	713	725
Neurčitý	0	0	0	0
Špecificita (95 % CI)	–	–	97,3 % (713/733) (95,8 – 98,2)	–
Negativita (95 % CI)	98,6 % (723/733) (97,5 – 99,3)	97,5 % (715/733) (96,2 – 98,4)	–	98,9 % (725/733) (97,9 – 99,5)

* Interpretácia na základe antigénu TB – hodnota Nil $\geq 0,35$ IU/ml v obidvoch (TB1 a TB2) v jednej skúmvavke TB tak, aby splnili kritériá interpretácie pre test QFT- Plus (TB1 alebo TB2), ktorý bude určený ako pozitívny.

† Analýza alternatív sa uvádza len pre informáciu.

U pacientov s nízkym rizikom infekcie TB bolo pozitívnych celkovo 20/733 pacientov. Z nich len 8 pacientov malo hodnotu >0.35 IU/ml v obidvoch skúmvavkách TB1 a TB2. Porovnanie testov QFT a QFT-Plus sa uskutočnilo na nízkorizikovej kohorte v rámci štúdie a výsledkom bola celková zhoda 97,5 % (715/733) a zhoda negatívneho percenta bola 98,3 % (707/719).

Citlivosť

Aj keď neexistuje žiadny definitívny štandardný test latentnej infekcie LTBI, vhodnou náhradou je mikrobiologická kultúra *M. tuberculosis*, pretože infekcia TB je nevyhnutným prekursorom ochorenia.

Multicentrická štúdia hodnotiaca klinickú citlivosť testu QFT-Plus sa uskutočnila na 434 účastníkoch štúdie, ktorí mali príznaky a symptómy aktívneho ochorenia *M. tuberculosis*, ktoré sa potvrdilo kultúrou a/alebo PCR testom a aktuálne ani ≤ 14 dní pred odberom krvi nedostávali žiadnu liečbu TB. Štúdia sa uskutočnila v 7 nezávislých centrách vrátane troch centier v Spojených štátoch, troch centrách v Japonsku a jednom centre v Austrálii. Test QFT-Plus sa porovnal s testom QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Súhrn stratifikovaných údajov o charakteristikách klinickej citlivosti podľa štúdie a krajiny nájdete v tabuľke 7. Výsledky charakteristík sú založené na celkovom počte platných testov. Frekvencia neurčitých výsledkov pre test QFT a QFT-Plus bola 2,3 % (10/434) a 2,5 % (11/434) v tomto poradí.

Tabuľka 7. Súhrn charakteristík štúdie klinickej citlivosti stratifikovaný podľa centra, krajiny a celkovo

Centrum	N	Positive (Pozitívny)		Negative (Negatívny)		Neurčitý		Citlivosť (95 % CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Spojené štáty									
(č. 1) USA-5	15	13	13	2	2	0	0	86,67 % (13/15) (62,12 – 96,26)	86,67 % (13/15) (62,12 – 96,26)
(č. 2) USA-1	33	29	29	4	4	0	0	87,88 % (29/33) (72,67 – 95,18)	87,88 % (29/33) (72,67 – 95,18)
(č. 3) USA-4	5	5	5	0	0	0	0	100,0 % (5/5) (56,55 – 100,0)	100,0 % (5/5) (56,55 – 100,0)
Spojené štáty celkovo	53	47	47	6	6	0	0	88,7 % (47/53) (77,4 – 94,7)	88,7 % (47/53) (77,4 – 94,7)
Japonsko									
(č. 4) JPN-2	76	72	67	1	3	3	6	98,63 % (72/73) (92,64 – 99,76)	95,71 % (67/70) (88,14 – 98,53)
(č. 5) JPN-3	99	97	98	2	1	0	0	97,98 % (97/99) (92,93 – 99,44)	98,99 % (98/99) (94,50 – 99,82)

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

Pokračovanie tabuľky z predchádzajúcej strany

Tabuľka 7. Súhrn charakteristík štúdie klinickej citlivosti stratifikovaný podľa centra, krajiny a celkovo (pokračovanie)

Centrum	N	Positívne (Pozitívny)		Negative (Negatívny)		Neurčité		Citlivosť (95 % CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(č. 6) JPN-1	177	159	157	12	15	6	5	92,98 % (159/171) (88,14 – 95,94)	91,28 % (157/172) (86,11 – 94,64)
Japonsko celkovo	352	328	322	15	19	9	11	95,63 % (328/343) (92,91 – 97,33)	94,43% (322/341) (91,5 – 96,4)
Austrália									
(č. 7) AU-2	29	27	29	1	0	1	0	96,43% (27/28) (82,29 – 99,37)	100,0 % (29/29) (88,30 – 100,0)

Analýza v tabuľke vyššie neobsahuje neurčité výsledky.

Citlivosť testu QFT-Plus bola 88,7 % v USA, 94,43 % v Japonsku a 100,0 % v Austrálii. Celková citlivosť testu QFT-Plus bola 94,09 % (398/423). Citlivosť testu QFT bola 88,7 % v USA, 95,63% v Japonsku a 96,43% v Austrálii. Celková citlivosť testu QFT bola 94,81% (402/424).

Analýza výsledkov podľa typu skúmanky s antigénom TB a kombinácii skúmaniek je zobrazená ako príklad očakávaných výsledkov v infikovanej populácii s potvrdenou TB (tabuľka 8).

Tabuľka 8. Výsledky štúdie týkajúce sa citlivosti testu QFT- Plus podľa skúmavky s antigénom TB

Interpretácia na základe TB antigén–Nil v IU/ml	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitívna podľa TB1 a/alebo TB2)
Pozitívny	388	397	398
Negatívny	32	26	25
Neurčitý	14	11	11
Citlivosť* (95 % CI)	–	–	94 % (398/423) (91,4 – 96,0)
Pozitivita* (95 % CI)	92,4% (388/420) (89,4 – 94,6)	93,9% (397/423) (91,1 – 95,8)	–

* Okrem neurčitých hodnôt.

Porovnanie testov QFT a QFT-Plus sa hodnotilo v kohorte s kultivačne potvrdenou aktívnou TB (kohorty štúdie citlivosti) a výsledkom bola celková zhoda 95,9 % a zhoda pozitívneho percenta bola 97,3 % (391/402).

Tabuľka 9. Pomery pravdepodobnosti testu QFT- Plus

Centrum*	Citlivosť	Špecificita	LR+	LR-
Austrália	100,00%	95,48%	22,11	0,00
Japonsko	94,43%	97,83%	43,44	0,06
Spojené štáty	88,68%	98,11%	47,00	0,12

* Celkom

Účinnosť u pacientov so zistenými rizikovými faktormi infekcie MTB (jednotlivci so zmiešaným rizikom)

Kohorta 601 jednotlivcov so zmiešanými rizikovými faktormi pre infekciu TB (napr. pozitívita na HIV, anamnéza liečby na aktívnu alebo latentnú TB, vystavenie aktívnej forme ochorenia TB, stav HCW atď.) sa vyhodnotila pomocou testov QFT a QFT-Plus. Pomocou štandardizovaného prieskumu sa stanovili rizikové faktory a jednotlivci nevykazovali žiadny príznaky súvisiace s aktívnou formou ochorenia TB v čase náboru. Demografia a rizikové faktory sú uvedené v tabuľke 10. V tejto populácii vyšlo 68/601 (11,3 %) pacientov pozitívnych pomocou testu QFT-Plus so zhodou pozitívneho percenta (Positive Percent Agreement, PPA) a zhodou negatívneho percenta (Negative Percent Agreement, NPA) 98,44 % a 99,07 % v tomto poradí (tabuľka 11). V tejto kohorte 68 pozitívnych pacientov diagnostikovaných pomocou testu QFT- Plus bolo celkovo 62 pacientov pozitívnych zo skúmaviek TB1 a TB2, 2 pacienti boli pozitívni len na základe výsledku zo skúmavky TB1 a 4 pacienti boli pozitívni len na základe výsledku zo skúmavky TB2. Neboli zistené žiadne neurčité výsledky (0/601).

Tabuľka 10. Demografia a faktory súvisiace s rizikom infekcie TB v zmiešanej kohorte

Pacienti celkovo (601)		Číslo	Percentuálna hodnota
Pohlavie	Muž	539	89,7%
	Žena	62	10,3%
Vek (v rokoch)	Rozsah	18 – 70	–
	Stredná hodnota	46,7	–
Očkovanie BCG	Áno	15	2,5%
	Nie	586	97,5%
HIV pozitívni alebo testovaný pozitívne na vírusy HTLV	Áno	12	2,0%
	Nie	589	98%
S predchádzajúcou diagnózou TB	Áno	11	1,8%
	Nie	590	98,2%
Mali pozitívny kožný test tuberkulózu (TST)/Mantoux test na TB	Áno	47	7,8%
	Nie	554	92,2%
Už boli liečení na aktívne alebo latentné ochorenie TB	Áno	35	5,8%
	Nie	566	94,2%
Žili, pracovali alebo vykonávali dobrovoľnícku činnosť (>1 mesiac) vo väzení	Áno	373	62,1%
	Nie	228	37,9%
Žili, pracovali alebo vykonávali dobrovoľnícku činnosť (>1 mesiac) v útulku pre bezdomovcov	Áno	525	87,4%
	Nie	76	12,6%
Pracovník v oblasti zdravotníctva	Áno	8	1,3%
	Nie	593	98,7%
Blízky kontakt osoby s potvrdeným alebo podozrením na aktívne ochorenie TB	Áno	9	1,5%
	Nie	592	98,5%

Tabuľka 11. Súhrnné charakteristiky testu QFT- Plus v porovnaní s testom QFT u pacientov so známymi rizikovými faktormi pre latentnú infekciu TB

		QFT		
		Pozitívny (+)	Negatívny (-)	Celkom
QFT- Plus	Pozitívny (+)	63	5*	68
	Negatívny (-)	1*	532	533
	Celkom	64	537	601

*Všetkých 6 nezhodujúcich sa vzoriek malo hladiny IFN- γ skúmaviek s antigénom na TB, ktoré sa blížili k hraničnej hodnote testu.

Zhoda pozitívneho percenta (Positive Percent Agreement, PPA) a zhoda negatívneho percenta (Negative Percent Agreement, NPA) medzi výsledkami QFT a QFT- Plus bola nasledovná:

- PPA: 98,44 % (63/64), 95 % CI (91,67, 99,72)
- NPA: 99,07 % (532/537), 95 % CI (97,84, 99,60)

Tabuľka 12 nižšie ilustruje charakteristiky testu QFT-Plus v porovnaní s testom QFT u pacientov v štúdiu očkovaných proti BCG.

Tabuľka 12. Charakteristiky testu QFT- Plus v porovnaní s testom QFT u pacientov v štúdiu očkovaných proti BCG (kombinované údaje od pacientov zo štúdie o citlivosti, špecifite a LTBI)

		QFT		
		Pozitívny (+)	Negatívny (-)	Celkom
QFT- Plus	Pozitívny (+)	66	5	71
	Negatívny (-)	3	268	271
	Celkom	69	273	342*

* Dvaja pacienti zo štúdie o citlivosti boli vyradení z analýzy z dôvodu neurčitých výsledkov

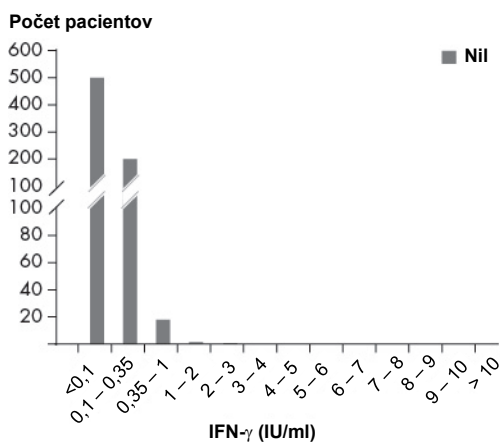
- PPA = 95,6 % (66/69), 95 % CI (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2 % (268/273), 95 % CI (95,79, 99,22)

Predpokladané hodnoty

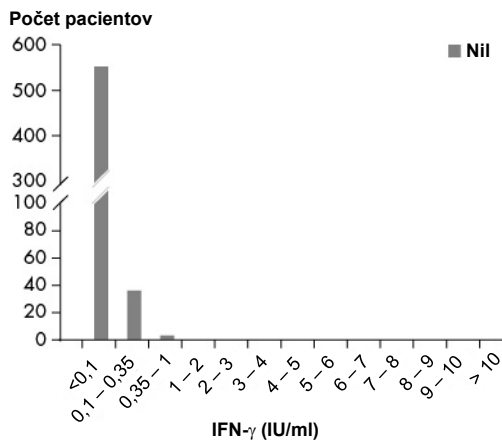
Zaznamenaná distribúcia reakcií – s rozptylom rizika

Rôzne reakcie IFN- γ na TB1, TB2 a kontrolné skúmavky boli sledované počas klinických štúdií a stratifikované podľa rizika infekcie *M. tuberculosis* (obrázok 4 až obrázok 7). Skupinu so zmiešaným rizikom tvorili pacienti, ktorých bolo možné v rámci testovania považovať za všeobecnú populáciu. Zahrnutí boli pacienti s rizikovými faktormi expozície voči TB a bez nich a tiež pacienti, u ktorých bola aktívna forma TB nepravdepodobná (t. j. pacienti s LTBI).

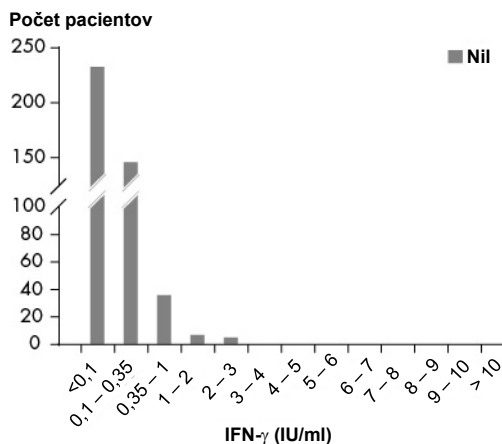
A



B

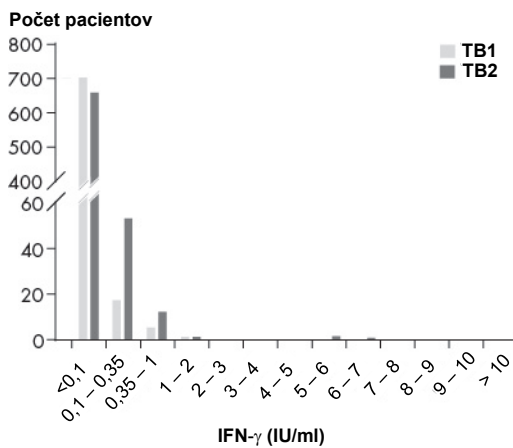


C

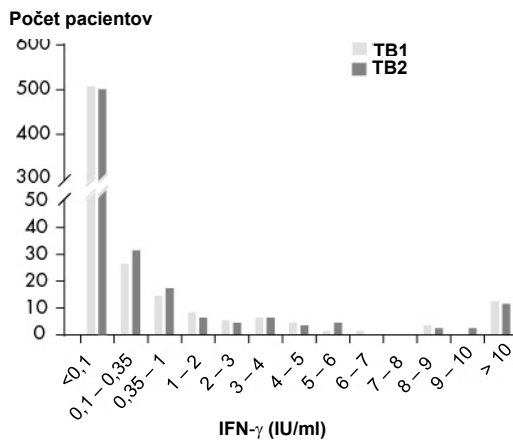


Obrázok 4. Distribúcia hodnôt Nil. **A** Distribúcia hodnôt Nil u populácie s nízkym rizikom (n = 744). **B** Distribúcia hodnôt Nil u populácie so zmiešaným rizikom (n = 601). **C** Distribúcia hodnôt Nil u populácie s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* (n = 416).

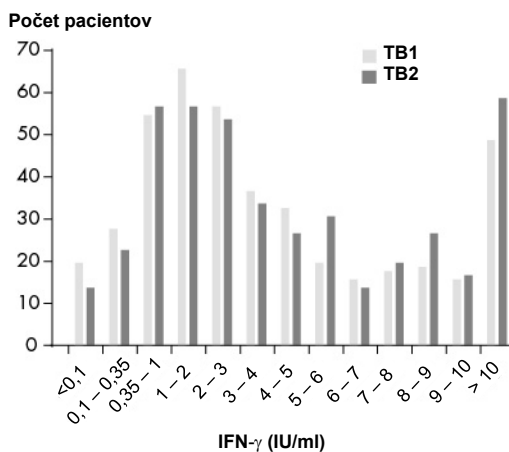
A



B

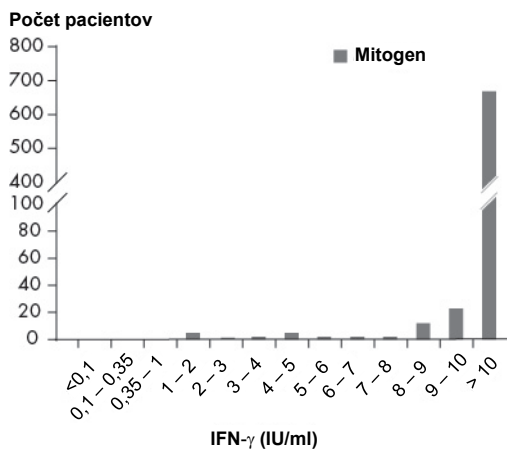


C

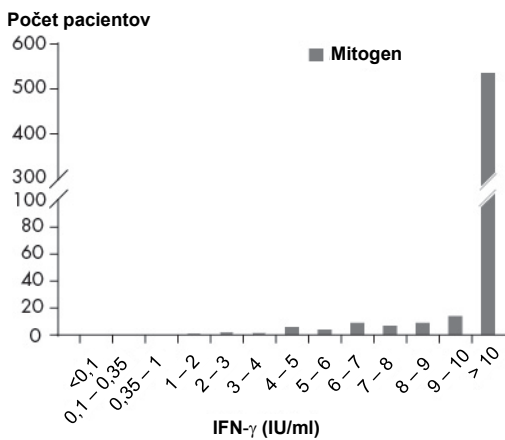


Obrázok 5. Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil). **A** Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s nízkym rizikom (n = 744). **B** Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie so zmiešaným rizikom (n = 601). **C** Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* (n = 416).

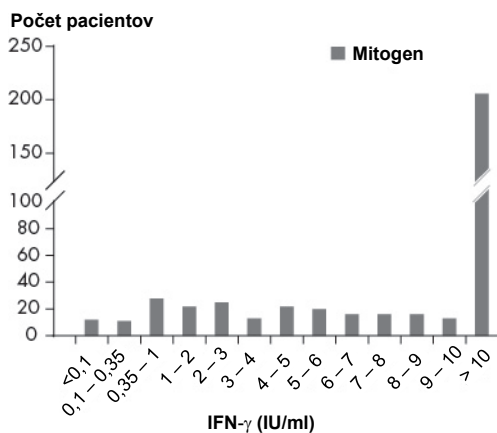
A



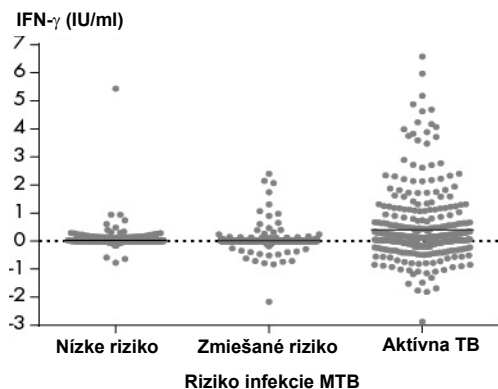
B



C



Obrázok 6. Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil). **A** Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s nízkym rizikom (n = 744). **B** Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie so zmiešaným rizikom (n = 601). **C** Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* (n=415).



Obrázok 7. Zaznamenaný rozdiel medzi hodnotami TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil), rozptyl podľa rizika. Zahŕňa údaje zo štúdie s kohortou so zmiešaným rizikom, aby sa ukázali rozdiely medzi kohortami s nízkym rizikom, aktívnym rizikom a zmiešaným rizikom. Táto analýza údajov zahŕňala kohortu so zmiešaným rizikom so známymi rizikovými faktormi. Preto z kohorty s nízkym rizikom $n = 733$, z kohorty so zmiešaným rizikom $n = 588$ a z kohorty s aktívnou formou ochorenia TB $n = 357$. Kvantitatívny rozdiel v IU/ml pre každého pacienta sa získal odpočítaním hodnoty TB1 od hodnoty TB2.

Súhrn bezpečnosti a charakteristík

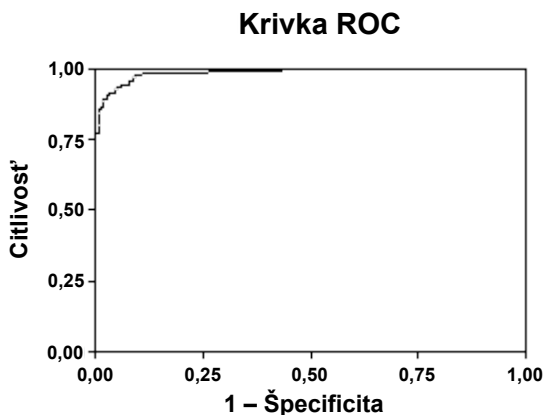
Súhrn bezpečnosti a charakteristík nájdete na webovej stránke databázy EUDAMED.

Charakteristiky účinnosti testu

Analytické charakteristiky

Hraničná hodnota testu

Hraničná hodnota testu QFT-Plus sa stanovila pomocou údajov od 216 pacientov bez identifikovaných rizikových faktorov expozície TB, ktorí boli očkovaní proti BCG a predpokladá sa, že neboli infikovaní, a od 118 pacientov s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis*. Údaje a citlivosti a špecificite sa spojili a zanalyzovali pomocou analýzy krivky operačnej charakteristiky prijímača (ROC). Údaje a citlivosti a špecificite analyzované pomocou analýzy ROC ukázali, že optimálna hraničná hodnota testu ELISA bola 0,35 IU/ml (pozri obrázok 8).



Obrázok 8. Krivka ROC pre reakcie ESAT-6 a CFP-10.

Tabuľka 13. Hodnoty citlivosti a špecificity pre test ELISA s rôznymi hraničnými hodnotami

Hraničná hodnota IU/ml IFN- γ	Citlivosť %	95 % CI	Špecificita %	95 % CI	Citlivosť + špecificita
0,20	91,53	84,97 % až 95,86 %	96,31	92,87% až 98,40%	187,84
0,23	91,53	84,97 % až 95,86 %	96,77	93,47% až 98,69%	188,30
0,26	90,68	83,93% až 95,25%	96,77	93,47% až 98,69%	187,45
0,28	90,68	83,93% až 95,25%	97,24	94,08% až 98,98%	187,92
0,30	89,83	82,91% až 94,63%	97,24	94,08% až 98,98%	187,07
0,31	88,98	81,90% až 94,00%	97,24	94,08% až 98,98%	186,22
0,33	88,98	81,90% až 94,00%	97,70	94,71% až 99,25%	186,68
0,35	88,98	81,90% až 94,00%	98,16	95,35% až 99,50%	187,14
0,39	88,14	80,90% až 93,36%	98,16	95,35% až 99,50%	186,3
0,42	87,29	79,90% až 92,71%	98,16	95,35% až 99,50%	185,45
0,43	86,44	78,92% až 92,05%	98,16	95,35% až 99,50%	184,6
0,45	86,44	78,92% až 92,05%	98,62	96,01% až 99,71%	185,06

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

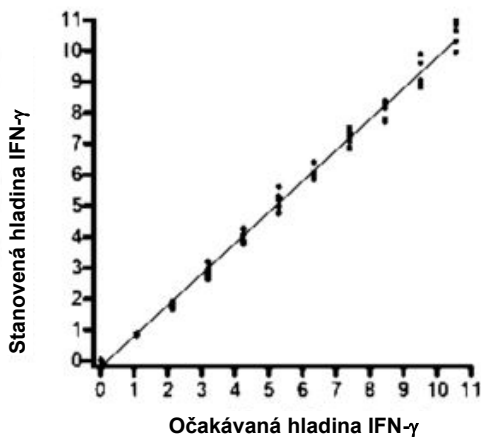
Pokračovanie tabuľky z predchádzajúcej strany

Tabuľka 13. Hodnoty citlivosti a špecificity pre test ELISA s rôznymi hraničnými hodnotami

Hraničná hodnota IU/ml IFN- γ	Citlivosť %	95 % CI	Špecificita %	95 % CI	Citlivosť + špecificita
0,47	85,59	77,94 % až 91,38 %	99,08	96,71 % až 99,89 %	184,67
0,48	84,75	76,97 % až 90,70 %	99,08	96,71 % až 99,89 %	183,83
0,50	83,90	76,00 % až 90,02 %	99,08	96,71 % až 99,89 %	182,98

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 analýza QFT-Plus ELISA je lineárna. Čiara lineárnej regresie má strmosť $1,002 \pm 0,011$ a koeficient korelácie s hodnotou 0,99 (obrázok 9).



Obrázok 9. Obrázok regresnej analýzy štúdie lineárnosti – stredná hodnota vysokého poolu = $-0,24 + 0,9964 \cdot \text{Očakávaná}$.

Reprodukovateľnosť

Uskutočnila sa multilcentrická štúdia reprodukovateľnosti na vyhodnotenie presnosti testu QFT-Plus v centrách s viacerými operátormi. Bola to prospektívna štúdia vykonaná v troch externých testovacích centrách a jednom kolektívnom centre. Celkovo sa do nej zapojilo 32 pozitívnych a 34 negatívnych (stanovených pomocou testu QFT) pacientov. Pacienti v rámci štúdie pozostávali zo zdravých zdravotníkov v Spojených štátoch. Pacienti v rámci štúdie predstavovali skupiny so zmiešaným rizikom expozície TB z dôvodu ich povolania alebo ako zdravotníci narodení v zahraničí pochádzajúci z miest s mierou výskytu TB vyššou ako 50/100 000.

Od každého pacienta sa odobrali tri skúmvavky s obsahom lítnej soli heparínu. Skúmvavky na odber krvi s lítnou soľou heparínu sa potom preniesú do každého z troch testovacích centier, kde sa alikvotujú do dvoch sád skúmvaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen a Nil) a potom sa otestujú v súlade s testovacím postupom pre test QFT-Plus. V každom centre vykonávajú minimálne dvaja operátori dva testy pre každého pacienta štúdie samostatne. Pre každého operátora boli výsledky získané od ostatných operátorov zaslepené a zaslepený bol aj výsledok QFT testu pacienta štúdie.

Získalo sa šesť výsledkov vygenerovaných vo všetkých troch testovacích miestach na každého zo 66 pacientov štúdie, čo znamená celkovo 396 dátových bodov. Súhrn výsledkov so zhrnutím reprodukovateľnosti je uvedený v tabuľke 14.

Tabuľka 14. Súhrn výsledkov štúdie reprodukovateľnosti – v rámci zhody % na mieste kvalitatívnych výsledkov operátorov N = 66 vzoriek od pacientov

Centrum 1 – 2 operátori	Centrum 2 – 2 operátori	Centrum 3 – 3 operátori
64/66 = 96,97%	64/66 = 96,97%	59/66 = 89,39%
Zhoda kvalitatívnych výsledkov sady skúmvaviek 1 a sady skúmvaviek 2	Zhoda kvalitatívnych výsledkov sady skúmvaviek 1 a sady skúmvaviek 2	Zhoda kvalitatívnych výsledkov sady skúmvaviek 1 a sady skúmvaviek 2

Kvalitatívna percentuálna zhoda naprieč všetkými centrami štúdie je 94,7 % (375/396). V tomto výpočte zahŕňa celkový počet výsledkov testu v zhode (375) tie prípady, v ktorých je zhoda všetkých 6 výsledkov, zhoda 5 zo 6 výsledkov, zhoda 4 zo 6 výsledkov a zhoda 3 zo 6 výsledkov v kombinácii.

Opakovateľnosť v rámci šarže

Uskutočnila sa štúdia na určenie variability skúmaviek na odber krvi QFT-Plus Blood Collection Tubes pri porovnaní so skúmavkami QFT. Celkovo sa testovalo 30 pacientov (15 pozitívnych s potvrdenou TB a 15 potvrdených TB negatívnych stanovených pomocou testu QFT). Do štúdie sa zahrnuli tri samostatné šarže skúmaviek na odber krvi QFT-Plus TB1, TB2 a QFT TB Blood Collection Tubes. Testovali sa tri replikáty na darcu na jednu skúmavku na odber krvi. Skúmavky Nil a Mitogen sa testovali každá s jedným replikátom.

Krv od každého pacienta bola odobratá do skúmavky na odber krvi s lítnou soľou heparínu a potom sa 1 ml krvi preniesol do každej zo skúmaviek na odber krvi QFT- Plus a QFT Blood Collection Tubes a otestoval sa v súlade s postupom testu. Pre každú skupinu s pozitívnou a negatívnou vzorkou nesmie byť celkový rozptyl výsledkov skúmavky QFT-Plus tube výrazne väčší ako celkový rozptyl výsledkov skúmavky QFT. Toto sa určilo z hodnoty p danej Levenovým testom homogénnosti rozptylu (HOV). Ak hodnota p nebola výrazne vyššia ($p > 0,05$) a/alebo rozptyl skúmaviek QFT-Plus TB tubes bol menší ako rozptyl skúmavky QFT TB, potom existoval rozptyl medzi skúmavkami QFT-Plus a QFT TB.

Tabuľka 15. Porovnanie rozptylov medzi skúmavkami na odber krvi QFT- Plus a QFT TB Blood Collection Tubes pomocou Levenovho testu HOV

Typ vzorky	Rozdiel	Efekt	Závislosť	P-hodnota	Výrazný
Pozitívny	TB2 vs. QFT	Podtyp	Zvyškový	0,0378	Áno
Pozitívny	TB2 vs. QFT	Podtyp	Zvyškový	0,0540	Nie
Negatívny	TB2 vs. QFT	Podtyp	Zvyškový	0,1025	Nie
Negatívny	TB2 vs. QFT	Podtyp	Zvyškový	0,6344	Nie

Kolísanie medzi skúmvkami na odber krvi QFT-Plus a QFT TB Blood Collection Tubes nebolo výrazné s výnimkou skúmvky QFT-Plus TB2 pri testovaní pozitívnych pacientov. Po analyzovaní odhadu štandardnej odchýlky bola odchýlka zistená v skúmvke QFT-Plus TB2 menšia (0,06089) ako v skúmvke QFT TB (0,07641), ako je to uvedené v tabuľke 16. Preto nebol rozptyl skúmviek QFT-Plus TB1 a TB2 Blood Collection Tubes väčší ako rozptyl skúmvky QFT TB Blood Collection Tube.

Tabuľka 16. Štandardná odchýlka pre zvyšok a 95 % interval spoľahlivosti pre pozitívnych pacientov

Typ vzorky	Podtyp	Odhad štandardnej odchýlky	95 % LCL	95 % UCL
Pozitívny	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Pozitívny	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Pozitívny	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

Opakovateľnosť v rámci šarže

Uskutočnila sa štúdia na vyhodnotenie reprodukovateľnosti skúmviek QFT-Plus Blood Collection Tubes v rámci šarží porovnaním koncentrácie IFN- γ z replikátu skúmviek QFT-Plus TB Blood Collection Tubes krvi.

Šesť alikvôt jednej vzorky krvi od rovnakých pacientov s potvrdenou infekciou TB sa spustilo v 6 opakovacích skúmvkách na odber krvi z jednej šarže obidvoch skúmviek QFT-Plus tubes (TB1 a TB2). Testovanie sa uskutočnilo u 13 pacientov. Hodnota %CV sa vypočítala pre každého darcu a u všetkých darcov a vygenerovala sa stredná hodnota %CV, ako je uvedené v tabuľke 17.

Tabuľka 17. %CV pre strednú hodnotu, štandardnú odchýlku, minimálnu, mediánovú a maximálnu hodnotu v každej skúmavke QFT- Plus TB Blood Collection Tube u pacientov pozitívnych na TB

Skúmavka QFT- Plus Tube	Veľkosť vzorky	Stredný (% CV)	Štandardná odchýlka	Minimálny vek	Medián	Maximálny vek
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Výsledky ukázali, že stredná hodnota %CV pre TB1 a TB2 bola ~13 %, čo spĺňa kritériá prijatia ≤ 30 % a dokazuje opakovateľnosť v rámci šarží.

Limit slepého pokusu (Limit of blank, LoB)

Pre test QFT-Plus sa vyhodnotil limit slepého pokusu (LoB). Dva replikáty každej zo 14 jednotlivých ľudských plazmových vzoriek (ako slepé pokusy) testovali pomocou 2 šarží testu QFT-Plus ELISA 3 operátori alebo 3 testovacie dni, jeden operátor na jeden testovací deň s použitím celkovo 84 replikátov z každej šarže súpravy ELISA.

Hodnoty LoB (IU/ml) pre 2 šarže súpravy ELISA sa vypočítali samostatne, ako to ukazuje tabuľka 18.

Tabuľka 18. Hodnoty LoB (IU/ml) pre 2 šarže súpravy QFT-Plus ELISA Kit

Súprava QFT-Plus ELISA Kit	Odhadovaný LoB (IU/ml)
Súprava 1	0,030
Súprava 2	0,040

Vyššia hodnota LoB 0,040 IU/ml v oboch šaržiach súpravy QFT-Plus ELISA Kit bola hlásená ako konečná hodnota LoB.

Limit detekcie (Limit of detection, LoD)

Pre test QFT-Plus sa vyhodnotil limit detekcie (LoD). Pool TB negatívnych vzoriek ľudskej plazmy sa vygeneroval skombinovaním 14 samostatných vzoriek plazmy. Každý z 3 operátorov pripravil štandardnú referenčnú zásobu IFN- γ s hodnotou 1,0 IU/ml, ktorý sa zriedil v pufrí. Uskutočnila sa séria riedení 8 koncentrácií. Štúdia sa uskutočnila počas 3 dní, zúčastnili sa na nej striedavo 3 operátori, ktorí použili 2 šarže súpravy QFT- Plus ELISA Kit. Počas každého testovacieho dňa sa otestovalo 5 replikátov z každej koncentrácie v každej sade sériového radu riedení pri celkovo 45 replikátoch pre každé riedenie koncentrácie IFN γ každú šaržu súpravy QFT-Plus ELISA Kit.

Hodnota LoD pre každú testovanú šaržu súpravy QFT-Plus ELISA Kit sa vypočítala samostatne, ako to ukazuje tabuľka 19.

Tabuľka 19. Odhadované hodnoty LoD (IU/ml) pre 2 šarže súpravy QFT- Plus ELISA Kit

Súprava QFT-Plus 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 obidvoch šaržach súpravy QFT-Plus ELISA Kit, čiže 0,065 IU/ml bola hlásená ako konečná hodnota LoD.

Interferujúce látky

Uskutočnila sa štúdia na stanovenie účinkov potencionálnych interferujúcich látok na presnosť detekcie IFN- γ . QFT-Plus 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 intererujúcich látok sa pripravilo päť 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. Koncentrácie testovaných interferujúcich látok boli 0 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl a 20 mg/dl. Cieľové koncentrácie interferujúcich látok 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 replikátov.

Pre každú koncentráciu sa uskutočnil dvojvzorkový t-test, ktorý porovnal rozdiel priemernej hodnoty log₁₀ (IU/ml) primárnej hladiny interferujúcej látky s kontrolou (t. j. hladina bez interferujúcej látky), ako je to uvedené v tabuľke 20 a 21. Oznamil sa aj odhadovaný rozdiel v priemernej odpovedi spolu s príslušnými dvojstrannými 95 % limitmi spoľahlivosti a p-hodnotou.

Tabuľka 20. Log10 IU/ml: Súhrnná tabuľka T-testu s rozdielmi v priemerných hodnotách medzi hladinou kontrolného roztoku a primárnej interferujúcej látky pre každú interferujúcu látku a hladinu koncentrácie IFN- γ

Interferujúca látka	Hladina interferujúcej látky	Koncentrácia vzorky (IU/ml)	Rozptyly	Priemerný rozdiel	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %	P-hodnota	Pass (úspešné)
Triglyceridy	silná	1,4	Rovnaké	0,019	-0,040	0,077	0,491	Áno
		0,45	Rovnaké	0,004	-0,022	0,030	0,732	Áno
		0,21	Rovnaké	0,006	-0,035	0,047	0,759	Áno
Hemoglobín	silná	1,4	Rovnaké	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Áno
		0,45	Rovnaké	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Áno
		0,21	Rovnaké	0,000	-0,034	0,035	0,980	Áno
Proteín	silná	1,4	Rovnaké	0,004	-0,034	0,042	0,836	Áno
		0,45	Rovnaké	0,001	-0,38	0,040	0,962	Áno
		0,21	Rovnaké	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Áno
Konjugovaný bilirubín	silná	1,4	Rovnaké	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Áno
		0,45	Rovnaké	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Áno
		0,21	Rovnaké	-0,014	0,074	0,046	0,625	Áno
Nekonjugovaný bilirubín	silná	1,4	Rovnaké	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Áno
		0,45	Rovnaké	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Áno
		0,21	Rovnaké	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Áno
Abakavir	silná	1,4	Rovnaké	0,008	-0,025	0,041	0,601	Áno
		0,45	Rovnaké	0,012	-0,019	0,044	0,412	Áno
		0,21	Rovnaké	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Áno

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

Pokračovanie tabuľky z predchádzajúcej strany

Tabuľka 20. Log₁₀ IU/ml: Súhrnná tabuľka T-testu s rozdielmi v priemerných hodnotách medzi hladinou kontrolného roztoku a primárnej interferujúcej látky pre každú interferujúcu látku a hladinu koncentrácie IFN- γ

Interferujúca látka	Hladina interferujúcej látky	Koncentrácia vzorky (IU/ml)	Rozptyly	Priemerný rozdiel	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %	P-hodnota	Pass (úspešné)
Cyklosporín	silná	1,4	Rovnaké	0,014	-0,020	0,047	0,383	Áno
		0,45	Rovnaké	0,005	-0,035	0,045	0,773	Áno
		0,21	Rovnaké	0,024	-0,008	0,056	0,131	Áno
Prednizolón	silná	1,4	Rovnaké	0,017	-0,017	0,050	0,293	Áno
		0,45	Rovnaké	0,000	-0,036	0,036	0,979	Áno
		0,21	Rovnaké	0,015	-0,035	0,065	0,524	Áno

Tabuľka 21. 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)	Rozptyly	Priemerný rozdiel	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %	P-hodnota	Pass (úspešné)
Triglyceridy	silná	1,4	Rovnaké	0,053	-0,004	0,110	0,063	Áno
		0,45	Rovnaké	0,039	-0,021	0,058	<.001	Áno
		0,21	Rovnaké	0,034	-0,002	0,071	0,061	Áno
Hemoglobín	silná	1,4	Rovnaké	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Áno
		0,45	Rovnaké	0,016	-0,007	0,040	0,152	Áno
		0,21	Rovnaké	0,014	-0,030	0,059	0,489	Áno
Proteín	silná	1,4	Rovnaké	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Áno
		0,45	Rovnaké	0,000	-0,046	0,046	0,992	Áno
		0,21	Rovnaké	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Áno
Konjugovaný bilirubín	silná	1,4	Rovnaké	0,001	-0,046	0,048	0,961	Áno
		0,45	Rovnaké	0,012	-0,043	0,067	0,639	Áno
		0,21	Rovnaké	0,015	-0,044	0,074	0,586	Áno
Nekonjugovaný bilirubín	silná	1,4	Rovnaké	0,015	-0,011	0,042	0,231	Áno
		0,45	Rovnaké	0,015	-0,023	0,052	0,411	Áno
		0,21	Rovnaké	0,012	-0,033	0,057	0,566	Áno
Abakavir	silná	1,4	Rovnaké	0,013	-0,015	0,040	0,322	Áno
		0,45	Rovnaké	0,015	-0,014	0,044	0,283	Áno
		0,21	Rovnaké	0,008	-0,034	0,050	0,677	Áno

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

Pokračovanie tabuľky z predchádzajúcej strany

Tabuľka 21. 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)	Rozptyly	Priemerný rozdiel	Dolný CI 95 %	Horný CI 95 %	P-hodnota	Pass (úspešné)
Cyklosporín	silná	1,4	Rovnaké	0,002	-0,019	0,024	0,816	Áno
		0,45	Rovnaké	0,007	-0,030	0,043	0,682	Áno
		0,21	Rovnaké	0,015	-0,007	0,038	0,155	Áno
Prednizolón	silná	1,4	Rovnaké	0,007	-0,016	0,030	0,518	Áno
		0,45	Rovnaké	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Áno
		0,21	Rovnaké	0,021	-0,025	0,068	0,334	Áno

Výsledky nevykázal žiadne výrazné rozdiely medzi hladinou primárnej interferujúcej látky a kontrolného roztoku (hladina bez interferujúcej látky) a pre vysokú hladinu interferujúcej látky okrem hladiny koncentrácie triglyceridu 0,45 IU/ml. Priemerný rozdiel sa určil v rámci rozsahu štandardnej odchýlky +/- 2. Toto ukazuje, že rozdiel je v rámci očakávanej variability testu a že triglyceridy nemajú interferujúci účinok na test QFT-Plus ELISA.

Likvidácia

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.

Referenčná literatúra

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 645.
3. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 84.
4. Rothel, J.S., Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: Is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **3**, 981.
5. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 681.
6. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from Mycobacterium tuberculosis-infected cells: definition of antigenic specificity. *J. Immunol.* **166**, 439.
7. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS Pathol.* **3**, 1240.
8. Barcellini, L. et al. (2016) First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur. Respir. J.* **47**, 1587.
9. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* **187**, 2222.

10. Rozot, V. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. **43**, 1568.
11. Nikolava, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **75**, 277.
12. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. **69**, 533.
13. Ongaya, A. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis **93**, S60.
14. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **185**, 206.
15. Mazurek, G.H., et al.; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection – United States, 2010. MMWR Recomm. Rep. **59**, 1.
16. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: tuberculosis preventive treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Spríevodca riešením problémov

Tento spríevodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Technickú pomoc a viac informácií získate od nášho technického centra podpory na adrese www.qiagen.com/Support (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/ 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. |
| 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 QFT- Plus Blood Collection Tubes pred jej odberom | Po dokončení odstred'ovania 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 620 až 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/ komponentov | Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu expirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100x do 3 mesiacov od zriedenia. |

Vysoké hodnoty na pozadí

- | | |
|------------------------------------|--|
| a) Neúplné prepláchnutie doštičky | Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 μ l 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 ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). |

Komentáre a návrhy














- 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.
- 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 sú uvedené v návode na použitie alebo na balení a štítkoch:

Symbol	Definícia symbolu
 <N>	Obsahuje reagentie postačujúce na <N> reakcií
	Použite do
	Tento výrobok spĺňa požiadavky európskeho nariadenia 2017/746 pre zdravotnícka diagnostická pomôcka na použitie v podmienkach in vitro.
	Autorizované zastúpenie v Európskom spoločenstve/ Európskej únii
	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)
Rn	R označuje revíziu návodu na použitie a n je číslo revízie
	Teplotné obmedzenia

Symbol

Definícia symbolu



Výrobca



Prečítajte si návod na použitie



Chráňte pred svetlom



Varovanie/upozornenie alebo upozornenia, prečítajte si sprievodné dokumenty

An in vitro diagnostic test using a peptide cocktail simulating ESAT-6 and CFP-10 proteins to stimulate cells in heparinized whole blood.

In vitro diagnostický test, v rámci ktorého sa používa zmes peptidov simulujúcich proteíny ESAT-6 a CFP-10 na stimuláciu buniek v heparinizovanej celej krvi



Obsahuje biologický materiál zvieracieho pôvodu



Obsahuje biologický materiál ľudského pôvodu



Unikátny identifikátor pomôcky

Symbol**Definícia symbolu**

tartrazine

Obsahuje tartrazín

sulfuric acid

Obsahuje kyselinu sírovú

Príloha A: Technické informácie

Neurčité výsledky

Neurčité výsledky sú neobvyklé a môžu súvisieť s imunitným stavom testovaného jedinca (5). 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 QFT-Plus 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: Skrátený postup testu ELISA

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



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



3. Rozried'te 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.



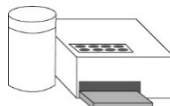
5. Pridajte 50 µl testovaných plazmových vzoriek a 50 µl štandardov do príslušných kalíškov. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



6. Inkubujte 120 minút pri izbovej teplote.



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



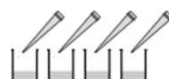
8. Do kalíškov pridajte 100 μ l enzymatického substrátového roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



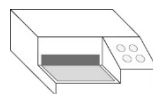
9. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote.



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-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	Súprava s 2 doštičkami ELISA	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Súprava s 20 doštičkami ELISA	622822
Related products		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 skúmaviek (50 vždy pre Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 skúmaviek (25 vždy pre Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 skúmaviek (1 vždy pre Nil, TB1, TB2 a Mitogen/balenie), balenie po 10	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 skúmaviek (50 vždy pre Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 skúmaviek (50 vždy pre Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 skúmaviek (1 vždy pre Nil, TB1, TB2 a Mitogen/balenie), balenie po 10	623222

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo návode na použitie k súprave QIAGEN. Návod na použitie 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	Zmeny
R2, jún 2021	Vrátane informácií o balení pre jedného pacienta Revidované tabuľky 10 a 11 na odlíšenie údajov QFT-GIT vs. QFT-Plus Aktualizovaná časť Popis a princíp s pridanými informáciami o testovacej populácii a meracom rozsahu Pridaná tabuľka 9 s údajmi o pomere pravdepodobnosti testu QFT-Plus
R3, október 2021	Otočené katalógové číslo späť na pôvodné katalógové čísla Pridané vyhlásenie o jednorazovom použití pre prúžky s mikrotitračnými doštičkami v obsahu súpravy
R4, marec 2023	Opravy formátovania

Táto strana je zámerne prázdna

Obmedzená licenčná zmluva pre súpravu QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) 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 týmto návodom na použitie a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými 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 tohto panela s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom, tomto návode na použitie 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.

03/2023 L1123669 1123669SK © 2023 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com |
Webová stránka www.qiagen.com