



Marzec 2023 r.

# QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus ELISA Kit — Instrukcja użycia



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Wersja 1



Do diagnostyki in vitro

Do stosowania z probówkami QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus Blood  
Collection Tubes



622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Niemcy



1123669PL



# Spis treści

Przeznaczenie.....	5
Docelowi użytkownicy.....	5
Opis i zasada procedury.....	6
Informacje o patogenie.....	6
Podsumowanie i objaśnienie.....	7
Zasady oznaczenia .....	10
Dostarczone materiały.....	12
Zawartość zestawu .....	12
Składniki zestawu.....	13
Platforma i oprogramowanie .....	13
Materiały wymagane, ale niedostarczane.....	14
Odczynniki dodatkowe .....	14
Materiały eksploatacyjne.....	14
Wyposażenie.....	14
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	15
Informacje dotyczące bezpieczeństwa .....	15
Informacje dotyczące nagłych przypadków .....	16
Środki ostrożności.....	17
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami.....	19
Stabilność w trakcie użytkowania.....	19
Zrekonstruowane i nieużyte odczynniki .....	19
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami.....	20

Protokół: Wykonywanie testu ELISA .....	21
Wyniki (obliczenia) .....	27
Generowanie krzywej wzorcowej i wartości próbek .....	27
Kontrola jakości testu .....	29
Interpretacja wyników .....	31
Ograniczenia .....	33
Parametry skuteczności .....	34
Badania kliniczne .....	34
Czułość .....	37
Wartości oczekiwane .....	44
Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności .....	50
Parametry skuteczności oznaczenia .....	51
Skuteczność analityczna .....	51
Usuwanie .....	65
Literatura .....	66
Rozwiązywanie problemów .....	68
Symbole .....	71
Załącznik A: Informacje techniczne .....	74
Wyniki nieokreślone .....	74
Skrzepnięte próbki osocza .....	74
Lipemiczne próbki osocza .....	74
Załącznik B: Skrócony opis procedury testu ELISA .....	75
Dane do zamówień .....	77
Historia zmian dokumentu .....	79

## Przeznaczenie

Oznaczenie QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus (QFT<sup>®</sup>-Plus) to test diagnostyczny *in vitro* wykorzystujący koktajl peptydowy naśladujący działanie białek ESAT-6 i CFP-10 w celu stymulacji komórek w heparynizowanej krwi pełnej. Wykrywanie interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) przez oznaczenie immunoenzymatyczne (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) jest wykorzystywane do określenia odpowiedzi na antygeny peptydowe powiązane z zakażeniem prątkiem gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis* w warunkach *in vitro*.

QFT-Plus jest testem pośrednim w kierunku zakażenia *M. tuberculosis* (w tym choroby), przeznaczonym do stosowania w połączeniu z oceną ryzyka, radiografią oraz innymi badaniami medycznymi i diagnostycznymi.

## Docelowi użytkownicy

Ten zestaw jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

Oznaczenie QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) jest przeznaczone do użytku przez przeszkolony personel w warunkach laboratoryjnych.

# Opis i zasada procedury

## Informacje o patogenie

Gruźlica jest chorobą zakaźną powodowaną przez zakażenie prątkami z grupy *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* i *M. caprae*), które typowo rozprzestrzeniają się na nowych gospodarzy przez unoszące się w powietrzu kropelki wydzielane przez pacjentów cierpiących na gruźlicę płuc. Nowo zakażone osoby mogą zachorować na gruźlicę w ciągu kilku tygodni lub miesięcy, ale większość nie wykazuje objawów choroby. Utajone zakażenie prątkami gruźlicy (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) jest stanem niezakaźnym i bezobjawowym, utrzymującym się u niektórych osób, które mogą zapaść na chorobę gruźliczą w ciągu kolejnych miesięcy lub lat. Głównym celem diagnozowania LTBI jest rozważenie terapii mającej na celu zapobieganie rozwojowi choroby gruźliczej. Przez ponad 100 lat jedyną dostępną metodą diagnozowania LTBI była skórna próba tuberkulinowa (Tuberculin Skin Test, TST) (4). Reakcja skórna na tuberkulinę rozwija się w okresie od 2 do 10 tygodni po zakażeniu. Część zakażonych pacjentów nie wykazuje jednak reakcji na tuberkulinę — dotyczy to osób, u których różne schorzenia upośledzają funkcjonowanie układu odpornościowego, ale również osób bez takich schorzeń. Z drugiej strony niektórzy pacjenci, u których zakażenie *M. tuberculosis* jest mało prawdopodobne, wykazują wrażliwość czułość na tuberkulinę, co przekłada się na pozytywny wynik TST po szczepieniu BCG (Bacille Calmette-Guérin), infekcji mykobakteryjnej spowodowanej czynnikiem innym niż bakterie z grupy *M. tuberculosis* lub z powodu innych nieokreślonych czynników.

LTBI należy odróżnić od właściwej choroby gruźliczej, która podlega zgłoszeniu i zwykle atakuje płuca oraz dolne drogi oddechowe, chociaż może również obejmować inne układy narządów. Gruźlica jest rozpoznawana na podstawie wywiadu oraz wyników badań fizykalnych, radiologicznych i mykobakteriologicznych.

## Podsumowanie i objaśnienie

Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) wykorzystuje czwartą generację technologii QuantiFERON-TB służącej do oceny odpowiedzi komórkowej na podstawie pomiarów ilościowych IFN- $\gamma$  w próbkach krwi pełnej. QFT-Plus to test jakościowy przeznaczony do pomiaru odpornościowej odpowiedzi komórkowej (Cell-Mediated Immune, CMI) na antygeny peptydowe imitujące białka prątków. Białka te, tj. ESAT-6 i CFP-10, są nieobecne w przypadku wszystkich szczepów bakteryjnych BCG i większości prątków niegruźliczych, oprócz *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1). We krwi osób zakażonych mikroorganizmami z grupy *M. tuberculosis* zazwyczaj obecne są limfocyty rozpoznające te i inne antygeny mykobakteryjne. Ten proces rozpoznawania wiąże się z produkcją i wydzielaniem cytokiny — IFN- $\gamma$ . Wykrycie, a następnie ilościowe oznaczenie IFN- $\gamma$  jest istotą niniejszego testu.

Skórna próba tuberkulinowa i testy IGRA są pomocne, ale niewystarczające do rozpoznania zakażenia prątkami z grupy *M. tuberculosis* u chorych pacjentów — wynik pozytywny może pełnić pomocniczą rolę w rozpoznawaniu choroby gruźliczej, ale zakażenia innymi prątkami (np. *M. kansasii*) także mogą spowodować uzyskanie wyników pozytywnych. W celu potwierdzenia lub wykluczenia choroby gruźliczej niezbędne są inne badania medyczne i diagnostyczne.

Antygeny używane w teście QFT-Plus to koktajl peptydów imitujących białka ESAT-6 i CFP-10. W licznych badaniach wykazano, że te antygeny peptydowe stymulują odpowiedzi indukowane IFN- $\gamma$  w limfocytach T pacjentów zakażonych *M. tuberculosis*, lecz zwykle nie wywołują takiej reakcji u osób niezakażonych lub zaszczepionych szczepionką BCG, które nie są chore ani nie należą do grup ryzyka w odniesieniu do LTBI (1, 2, 6, 9). Terapie lub schorzenia upośledzające funkcjonowanie układu odpornościowego mogą jednak osłabiać odpowiedź indukowaną IFN- $\gamma$ . Pacjenci z niektórymi innymi zakażeniami mykobakteryjnymi mogą również reagować na ESAT-6 i CFP-10, ponieważ geny kodujące te białka są obecne w genomie bakterii *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1, 3, 7).

Populacja podlegająca badaniom przy użyciu testu QFT-Plus obejmuje pacjentów, u których klinicznie potwierdzono czynną postać gruźlicy, oraz pacjentów będących w grupie ryzyka zakażenia lub utajonego zakażenia prątkami gruźlicy (Latent Tuberculosis Infection, LTBI). Nie obowiązują żadne ograniczenia pod względem wieku, płci ani innych czynników.

W przebiegu zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) limfocyty T CD4<sup>+</sup> odgrywają kluczową rolę w kontroli immunologicznej poprzez wydzielanie cytokiny IFN- $\gamma$ . Udowodniono, że limfocyty T CD8<sup>+</sup> pełnią ważną rolę w odpowiedzi obronnej gospodarza na MTB, wytwarzając IFN- $\gamma$  oraz inne rozpuszczalne czynniki, które aktywują makrofagi, tłumiąc tym samym rozwój MTB, zabijając zainfekowane komórki lub bezpośrednio lizując wewnątrzkomórkowe bakterie MTB. U pacjentów z LTBI i czynną gruźlicą wykryto swoiste dla MTB limfocyty CD8<sup>+</sup> produkujące IFN- $\gamma$ . Co więcej, limfocyty T CD8<sup>+</sup> swoiste dla ESAT-6 i CFP-10 opisuje się jako wykrywane częściej w przypadku czynnej gruźlicy w porównaniu z LTBI i mogą one być kojarzone z niedawnym narażeniem na MTB (8, 10–12). Ponadto u pacjentów z koinfekcją wirusem HIV i czynną gruźlicą (13, 14) oraz u małych dzieci z gruźlicą (15) wykryto swoiste dla MTB limfocyty T CD8<sup>+</sup> produkujące IFN- $\gamma$ .

W teście QFT-Plus wykorzystywane są dwie różne próbki z antygenami gruźliczymi (TB): próbka TB Antigen Tube 1 (TB1) i próbka TB Antigen Tube 2 (TB2). Obie próbki zawierają antygeny peptydowe z antygenów skojarzonych z grupą MTB complex, ESAT-6 i CFP-10. Zarówno próbka TB1, jak i próbka TB2 zawierają peptydy z ESAT-6 i CFP-10, które mają wywoływać odpowiedź CMI pomocniczych limfocytów T CD4<sup>+</sup>; próbka TB2 zawiera dodatkowy zestaw peptydów, które są ukierunkowane na wywoływanie odpowiedzi CMI cytotoksycznych limfocytów T CD8<sup>+</sup>.



Przy ocenie czynników ryzyka zakażeniem *M. tuberculosis* należy wziąć pod uwagę historię medyczną oraz kwestie medyczne i epidemiologiczne dotyczące gruźlicy lub narażenia na tę chorobę. Szczegółowe zalecenia w kwestii rozpoznawania zakażenia prątkami *M. tuberculosis* (w tym rozpoznawania choroby) i wyboru pacjentów do badań znajdują się w najnowszych wytycznych organizacji WHO: <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> (16). Test QFT-Plus został przetestowany w niektórych grupach pacjentów, w których zgodnie z bieżącymi wytycznymi WHO wskazane były badania przesiewowe pod kątem zakażenia prątkiem gruźlicy (16). Grupy te obejmowały: osoby, które uzyskały pozytywny wynik testu na obecność ludzkiego wirusa niedoboru odporności (Human Immunodeficiency Virus, HIV); osoby, które miały kontakt z pacjentami chorującymi niedawno na gruźlicę; oraz osoby zamieszkujące duże skupiska, narażone na kontakt z dorosłymi należącymi do grupy wysokiego ryzyka zachorowania na gruźlicę (5).

## Zasady oznaczenia

QFT-Plus to oznaczenie jakościowe, które wykorzystuje specjalne probówki do pobierania krwi zawierające antygeny peptydowe imitujące białka *M. tuberculosis*. Służą one do pobierania próbek krwi pełnej. Inkubacja krwi w probówkach trwa od 16 do 24 godzin, po upływie których osocze jest zbierane, a następnie testowane na obecność IFN- $\gamma$  wytwarzanego w odpowiedzi na antygeny peptydowe.

W pierwszym etapie krew pełna jest pobierana do każdej z probówek QFT-Plus Blood Collection Tubes — do probówki Nil, probówki TB1, probówki TB2 oraz probówki Mitogen. Krew można także pobrać do jednej probówki do pobierania krwi zawierającej heparynę litową lub sodową jako antykoagulant, a następnie przenieść ją do probówek QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Zawartość probówek QFT-Plus Blood Collection Tubes jest wytrząsana w celu wymieszania antygeny z krwią, a następnie jak najszybciej powinna zostać poddana inkubacji w temperaturze 37°C  $\pm$ 1°C (maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania). Po upływie okresu inkubacji trwającego od 16 do 24 godzin należy odwirować probówki, przetworzyć osocze i zmierzyć stężenie IFN- $\gamma$  (IU/ml) za pomocą testu ELISA. W teście QFT-Plus ELISA wykorzystywany jest wzorzec rekombinowanego ludzkiego IFN- $\gamma$ , który oznaczono w odniesieniu do referencyjnego preparatu IFN- $\gamma$  (nr ref. NIH: Gxg01-902-535). Wyniki próbek testowych są podawane w jednostkach międzynarodowych (International Unit, IU) na ml (IU/ml) w odniesieniu do krzywej wzorcowej przygotowanej poprzez przetestowanie rozcieńczeń wzorca dostarczonego razem z zestawem.

Znany jest zakłócający wpływ na testy immunologiczne przeciwciał heterofilnych (np. ludzkich przeciwciał anty-mysich), które występują w surowicy lub osoczu niektórych osób. Wpływ przeciwciał heterofilnych na test QFT-Plus ELISA jest minimalizowany poprzez dodanie prawidłowej surowicy mysiej do zielonego rozcieńczalnika i wykorzystanie fragmentów F(ab')<sub>2</sub> przeciwciała monoklonalnego, którym opłaszczono są dołki mikroplatytki, jako przeciwciała wychwytyjącego IFN- $\gamma$ .

Uznaje się, że wynik oznaczenia QFT-Plus jest pozytywny pod kątem odpowiedzi indukowanej IFN- $\gamma$  na antygeny gruźlicze z dowolnej próbki, jeśli odczyt znacznie przekracza wyrażoną w IU/ml wartość IFN- $\gamma$  uzyskaną dla próbki Nil. Próbka osocza z próbki Mitogen służy jako kontrola pozytywna IFN- $\gamma$  dla wszystkich testowanych próbek. Słaba reakcja na mitogen (<0,5 IU/ml) wskazuje na nieokreślony wynik, gdy próbka krwi także wykazuje negatywną reakcję na antygeny gruźlicze. Taka sytuacja może wystąpić w przypadku niewystarczającej liczby limfocytów, zmniejszonej aktywności limfocytów spowodowanej nieprawidłowym postępowaniem z próbką, nieprawidłowego napełnienia/mieszania zawartości próbki Mitogen lub niezdolności do produkcji IFN- $\gamma$  przez limfocyty pacjenta. Przy obecności przeciwciał heterofilnych lub wewnętrznego wydzielania IFN- $\gamma$  w próbce Nil mogą wystąpić podwyższone poziomy IFN- $\gamma$ . Próbka Nil służy do skorygowania wyników o wartość tła (np. uwzględnienie podwyższonych poziomów krążącego we krwi IFN- $\gamma$  lub obecności przeciwciał heterofilnych). Poziom IFN- $\gamma$  w próbce Nil odejmuje się od stężenia IFN- $\gamma$  w próbkach TB Antigen i próbce Mitogen. Zakres pomiarowy testu QFT-Plus ELISA wynosi do 10 IU/ml.

# Dostarczone materiały

## Zawartość zestawu

<b>Składniki zestawu ELISA</b>	<b>Zestaw zawierający 2 płytki</b>	<b>Laboratoryjny pakiet referencyjny</b>
<b>Nr katalogowy</b>	<b>622120</b>	<b>622822</b>
Microplate strips (Paski mikroplótkowe) (12 x 8 dołków) opłaszczony mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko ludzkiemu IFN- $\gamma$	2 zestawy pasków mikroplótkowych (12 x 8 dołków)	20 zestawów pasków mikroplótkowych (12 x 8 dołków)
IFN- $\gamma$ Standard (Wzorzec IFN- $\gamma$ ), liofilizowany (zawiera rekombinowany ludzki IFN- $\gamma$ , kazeinę bydlęcą, tiomersal w stężeniu masowo-objętościowym 0,01%)	1 fiolka (8 IU/ml po rekonstytucji)	10 fiolek (8 IU/ml po rekonstytucji)
Green Diluent (Zielony rozcieńczalnik) (zawiera kazeinę bydlęcą, prawidłową surowicę mysią, tiomersal w stężeniu masowo-objętościowym 0,01%)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (100x stężony koncentrat koniugatu), liofilizowany (mysie przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu IFN- $\gamma$ sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP), zawiera tiomersal w stężeniu 0,01%)	1 x 0,3 ml (po rekonstytucji)	10 x 0,3 ml (po rekonstytucji)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x stężony koncentrat buforu płuczącego) (pH 7,2, zawiera ProClin <sup>®</sup> 300 o stężeniu objętościowym 0,05%)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztwór substratu enzymu) (zawiera H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3',5,5' tetrametylobenzodynę)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Roztwór powstrzymujący działanie enzymu) (zawiera 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 x 15 ml	10 x 15 ml
<i>QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit — Instrukcja użycia</i>	1	1

## Składniki zestawu

### Kontrole i kalibratory

W teście QFT-Plus ELISA wykorzystywany jest wzorzec rekombinowanego ludzkiego IFN- $\gamma$ , który oznaczono w odniesieniu do referencyjnego preparatu IFN- $\gamma$  (nr ref. NIH: Gxg01-902-535).

### Platforma i oprogramowanie

Opcjonalne oprogramowanie QFT-Plus Analysis Software może zostać użyte do analizy danych surowych oraz obliczania wyników. Można je pobrać ze strony [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Materiały wymagane, ale niedostarczane

## Odczynniki dodatkowe

- Probówki QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Woda dejonizowana lub destylowana, 2 litry

## Materiały eksploatacyjne

- Wieczko 96-dołkowej płytki
- **Opcjonalnie:** Mikroprobówki o pojemności 1 ml z zatyczkami w statywach w formacie 96-dołkowym lub nieopłaszczone mikroplátky z folią uszczelniającą z tworzywa sztucznego przeznaczone do przechowywania osocza (22 pacjentów/statyw lub płytkę)
- Zbiorniki na odczynniki

## Wyposażenie\*

- Inkubator ustawiony na temperaturę  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (z opcją kontroli stężenia  $\text{CO}_2$  lub bez takiej opcji)
- Skalibrowane pipety o zmiennej objętości do dozowania objętości wynoszącej od  $10 \mu\text{l}$  do  $1000 \mu\text{l}$ , z jednorazowymi końcówkami
- Skalibrowane pipety wielokanałowe umożliwiające dozowanie objętości  $50 \mu\text{l}$  i  $100 \mu\text{l}$ , z jednorazowymi końcówkami
- Wytrząsarka do mikroplátek umożliwiająca wirowanie z prędkością od 500 do 1000 obr./min
- Płuczka mikroplátek (z przyczyn bezpieczeństwa zalecane jest używanie płuczki automatycznej podczas postępowania z próbkami osocza)
- Czytnik mikroplátek wyposażony w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm
- Wytrząsarka typu vortex o zmiennej prędkości
- Wirówka umożliwiająca wirowanie probówek do pobierania krwi przy co najmniej 3000 RCF (g)
- Cylinder miarowy o pojemności 1 lub 2 litrów

\* Przed użyciem upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

## Ostrzeżenia i środki ostrożności

Należy pamiętać, że może być wymagane zapoznanie się z lokalnymi przepisami dotyczącymi zgłaszania poważnych incydentów, które wystąpiły w związku z wyrobem, producentowi i/lub jego upoważnionemu przedstawicielowi oraz właściwemu organowi państwa, którego rezydentem jest użytkownik i/lub pacjent.

Do diagnostyki in vitro.

### Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

- Próbki są potencjalnie zakaźne. Pozostałości próbek i odczynników używanych do oznaczenia należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
- Negatywny wynik testu QFT-Plus nie wyklucza możliwości zakażenia *M. tuberculosis* ani choroby gruźliczej: fałszywie negatywne wyniki mogą wystąpić ze względu na stadium zakażenia (np. próbka została pobrana przed rozwinięciem się komórkowej odpowiedzi odpornościowej), nieprawidłowe postępowanie z próbkami do pobierania krwi po nakłuciu żyły, nieprawidłowe wykonanie oznaczenia lub inne indywidualne zmienne immunologiczne, także te związane z wszelkimi chorobami współistniejącymi. Obecność przeciwciał heterofilnych lub nieswoista produkcja IFN- $\gamma$  w wyniku innych stanów zapalnych mogą maskować swoiste odpowiedzi na peptydy ESAT-6 lub CFP-10.

- Pozytywny wynik testu QFT-Plus nie powinien stanowić jedynej podstawy ani być rozstrzygający podczas diagnozowania zakażenia *M. tuberculosis*. Nieprawidłowe działanie oznaczenia może spowodować uzyskanie fałszywie pozytywnych wyników testu QFT-Plus.
- Pozytywny wynik testu QFT-Plus powinien pociągnąć za sobą dalsze badania medyczne pod kątem czynnej postaci gruźlicy (np. rozmaz i posiew w kierunku laseczek kwasoopornych (Acid Fast Bacilli, AFB), badanie RTG klatki piersiowej).
- Chociaż białka ESAT-6 i CFP-10 są nieobecne w przypadku wszystkich szczepów bakteryjnych BCG i większości znanych prątków niegruźliczych, pozytywny wynik testu QFT-Plus może być wynikiem zakażenia *M. kansasii*, *M. szulgai* lub *M. marinum*. W przypadku podejrzenia takiego zakażenia należy przeprowadzić testy alternatywne.
- Fałszywie negatywny wynik testu QFT-Plus może być spowodowany nieprawidłowym pobraniem próbki krwi lub nieprawidłowym postępowaniem z próbką. Nieprawidłowości te mają wpływ na funkcjonowanie limfocytów. Informacje na temat prawidłowego postępowania z próbkami krwi można znaleźć w sekcji „Protokół: Wykonywanie testu ELISA” na stronie 21. Opóźnienie w inkubacji może spowodować fałszywie negatywne lub nieokreślone wyniki, a inne parametry techniczne mogą wpływać na zdolność do wykrycia istotnej odpowiedzi indukowanej IFN- $\gamma$ .


## Informacje dotyczące nagłych przypadków

CHEMTREC

Poza obszarem USA i Kanady: +1 703-527-3887



## Środki ostrożności

<p><b>PRZESTROG</b></p> 	<p>Ludzką krew należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny.</p> <p>Należy przestrzegać odpowiednich wytycznych dotyczących postępowania z krwią. Próbki i materiały, które wejdą w kontakt z krwią lub produktami krwiopochodnymi, należy utylizować zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.</p>
---	---

### QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Zawiera: kwas siarkowy. Ostrzeżenie! Może powodować korozję metali. Działa drażniąco na skórę. Powoduje poważne podrażnienie oczu. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

### QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Ostrzeżenie! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

### QuantiFERON Green Diluent



Zawiera: tartrazynę. Ostrzeżenie! Może powodować reakcję alergiczną skóry. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

### QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. Unikać uwalniania do środowiska.

## Dodatkowe informacje

Karty charakterystyki: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- Tiomersal jest wykorzystywany jako środek konserwujący w niektórych odczynnikach QFT-Plus. Może wykazywać właściwości toksyczne w przypadku spożycia, wdychania lub kontaktu ze skórą.
- Odstępstwa od procedur opisanych w instrukcji użycia testu *QuantIFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* mogą prowadzić do uzyskania błędnych wyników. Przed użyciem należy dokładnie przeczytać instrukcję.
- Nie korzystać z zestawu, jeśli przed użyciem którakolwiek z butelek z odczynnikami nosi ślady uszkodzeń lub wycieka z niej płyn.
- **Ważne:** Przed użyciem sprawdzić fiolki. Nie używać fiolek zawierających koniugat lub wzorzec IFN- $\gamma$ , jeśli widoczne są oznaki uszkodzenia lub jeśli doszło do naruszenia gumowej plombki. Nie używać pękniętych fiolek. Aby w bezpieczny sposób zutylizować fiolki, należy postępować zgodnie z odpowiednimi środkami ostrożności. Przy otwieraniu fiolek z koniugatem lub wzorcem IFN- $\gamma$  zalecane jest używanie narzędzia do zdejmowania kapsli, aby ograniczyć do minimum ryzyko urazu spowodowanego przez metalowy kapsel.
- Nie łączyć i nie używać pasków mikro płytkowych, wzorca IFN- $\gamma$ , zielonego rozcieńczalnika lub 100x stężonego koncentratu koniugatu z różnych partii zestawów QFT-Plus. Inne odczynniki (20x stężony koncentrat buforu płuczającego, roztwór substratu enzymu i roztwór powstrzymujący działanie enzymu) można wymieniać między zestawami pod warunkiem, że nie upłynęła data ważności odczynników i zarejestrowane są szczegóły serii.
- Niezużyte odczynniki i próbki biologiczne należy zutylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi i krajowymi przepisami.
- Nie używać zestawu QFT-Plus ELISA kit po upływie wskazanej daty ważności.
- Zawsze należy przestrzegać odpowiednich procedur laboratoryjnych.
- Upewnić się, że wyposażenie laboratoryjne, takie jak płuczki do płytek i czytniki, zostało skalibrowane/zwalidowane do użycia.

# Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Należy zwrócić uwagę na daty ważności oraz informacje o warunkach przechowywania wydrukowane na opakowaniu i etykietach wszystkich składników. Nie należy używać składników z przekroczonym terminem ważności ani niewłaściwie przechowywanych.

## Stabilność w trakcie użytkowania

- Należy przechowywać zestaw ELISA w temperaturze 2–8°C.
- Należy zawsze chronić roztwór substratu enzymu przed bezpośrednim światłem słonecznym.

## Zrekonstruowane i nieużyte odczynniki

- Instrukcje na temat rekonstruowania odczynników znajdują się w sekcji „Protokół: Wykonywanie testu ELISA” na stronie 21.
- Zrekonstruowany wzorzec dołączony do zestawu można przechowywać przez okres maksymalnie 3 miesięcy w przypadku przechowywania w temperaturze 2–8°C.

Należy zapisać datę rekonstrukcji wzorca dołączonego do zestawu.

- Zrekonstruowany 100x stężony koncentrat koniugatu należy przechowywać w temperaturze 2–8°C i używać nie dłużej niż 3 miesiące.

Należy zapisać datę rekonstrukcji koniugatu.

- Koniugat w stężeniu roboczym należy zużyć w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
- Bufor płuczący w stężeniu roboczym można przechowywać w temperaturze pokojowej przez okres maks. 2 tygodni.
- Paski mikropłytkowe są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku. Nieużyte paski można zdjąć z ramki płytek i pozostawić do użytku w przyszłości.

## Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Szczegółowe informacje na temat procedury pobierania krwi do testu QFT-Plus zawiera dokument *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes — Instrukcja użycia* (1123668).

# Protokół: Wykonywanie testu ELISA

## Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury

### Przygotowanie (czas wymagany do przeprowadzenia oznaczenia)

- Operatorzy muszą wykonać określone zadania w ustalonym czasie, aby uzyskać ważne wyniki oznaczenia QFT-Plus. Zalecane jest staranne zaplanowanie każdego etapu oznaczenia przed jego użyciem w celu zapewnienia wystarczającej ilości czasu na przeprowadzenie każdego etapu. Szacunkowy wymagany czas został przedstawiony poniżej. Przedstawiono także czas testowania wielu próbek podzielonych na partie.
  - Około 3 godziny na jedną płytkę do testu ELISA
  - <1 godzina pracy
  - Dodatkowy czas od 10 do 15 minut na każdą dodatkową płytkę

### Test IFN- $\gamma$ ELISA

- Informacje na temat materiałów wymaganych do przeprowadzenia testu ELISA zostały zamieszczone w sekcji „Zawartość zestawu” na stronie 12 oraz w sekcji „Materiały wymagane, ale niedostarczane” na stronie 14.

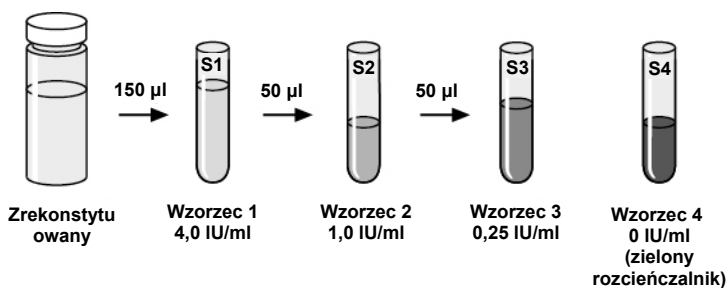
### Procedura

1. Przed użyciem wszystkie próbki osocza i odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Odczekać przynajmniej 60 minut w celu doprowadzenia próbek do temperatury pokojowej.

2. Wyjąć z ramki zbędne paski płytki do testu ELISA, zamknąć w torebce foliowej i włożyć do lodówki w celu przechowywania ich do momentu, gdy ponownie będą potrzebne.
3. Pozostawić co najmniej 1 pasek na potrzeby wzorców QFT-Plus oraz odpowiednią liczbę pasków, w zależności od liczby badanych pacjentów (patrz zalecany układ płytki na Ryc. 2). Po użyciu należy zachować ramkę i pokrywę do ponownego użycia z pozostałymi paskami.
  - 3a. Zrekonstruować wzorec IFN- $\gamma$ , dodając objętość wody dejonizowanej lub destylowanej określoną na etykiecie fiołki. Delikatnie wymieszać zawartość fiołki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie zawartości. Zrekonstruowanie wzorca IFN- $\gamma$  odpowiednią objętością spowoduje otrzymanie roztworu w stężeniu 8,0 IU/ml.
  - 3b. Korzystając ze zrekonstruowanego wzorca, przygotować szereg rozcieńczeń o czterech stężeniach IFN- $\gamma$  (patrz Ryc. 1).
  - 3c. Krzywą wzorcową należy wyznaczyć z poniższymi stężeniami IFN- $\gamma$ :
    - S1 (wzorec 1) w stężeniu 4,0 IU/ml
    - S2 (wzorec 2) w stężeniu 1,0 IU/ml
    - S3 (wzorec 3) w stężeniu 0,25 IU/ml
    - S4 (wzorec 4) w stężeniu 0 IU/ml (sam zielony rozcieńczalnik (Green Diluent, GD)).
  - 3d. Wzorce trzeba poddawać oznaczeniu przynajmniej w jednym powtórzeniu.
  - 3e. Dla każdej sesji testu ELISA należy przygotowywać świeże rozcieńczenia wzorca dołączonego do zestawu.

### Procedura

A	Oznakować 4 probówki: S1, S2, S3, S4
B	Dodać po 150 $\mu$ l GD do probówek S1, S2, S3, S4
C	Dodać 150 $\mu$ l wzorca zestawu do probówki S1 i dokładnie wymieszać
D	Przenieść 50 $\mu$ l roztworu z probówki S1 do probówki S2 i dokładnie wymieszać
E	Przenieść 50 $\mu$ l roztworu z probówki S2 do probówki S3 i dokładnie wymieszać
F	Sam GD służy jako wzorec zerowy (S4)



Ryc. 1. Przygotowanie szeregu rozcieńczeń do krzywej wzorcowej.

4. Zrekonstruować liofilizowany 100x stężony koncentrat koniugatu za pomocą 0,3 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Delikatnie wymieszać zawartość fiolki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie zawartości.
  - 4a. Koniugat w stężeniu roboczym jest uzyskiwany poprzez rozcieńczenie wymaganej ilości zrekonstruowanego 100x stężonego koncentratu koniugatu w zielonym rozcieńczalniku (Tabela 1).
  - 4b. Koniugat w stężeniu roboczym powinien zostać zużyty w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
  - 4c. Natychmiast po użyciu niewykorzystaną część 100x stężonego koncentratu koniugatu należy z powrotem umieścić w temperaturze od 2°C do 8°C.

**Tabela 1. Przygotowywanie koniugatu (w stężeniu roboczym)**

Liczba pasków	Objętość koniugatu (koncentrat 100x)	Objętość zielonego rozdzielacza
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. Próbkę osocza, które zostały zebrane z próbek do pobierania krwi, a następnie były przechowywane (w chłodziarce lub zamrażarce), należy dokładnie wymieszać przed dodaniem do dołków płytki do testu ELISA. Próbkę osocza można przechowywać w poddanych wirowaniu próbkach QFT-Plus Blood Collection Tubes przez maksymalnie 28 dni w temperaturze 2–8°C. Zebrane próbki osocza można przechowywać przez maksymalnie 28 dni w temperaturze 2–8°C; zebrane próbki osocza można również przechowywać w temperaturze poniżej -20°C (najlepiej niższej niż -70°C) przez dłuższy czas.

Próbki osocza można załadować/wykorzystać do pomiaru na płytce do testu QFT-Plus ELISA bezpośrednio z odwirowanych próbek do pobierania krwi.

**Ważne:** W przypadku przenoszenia próbek osocza bezpośrednio z odwirowanych próbek QFT-Plus Blood Collection Tubes należy unikać mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.



6. Dodać po 50 µl świeżo przygotowanego koniugatu w stężeniu roboczym do każdego dołka płytki do testu ELISA.
7. Za pomocą pipety wielokanałowej dodać 50 µl testowych próbek osocza do odpowiednich dołków (patrz zalecany układ płytki do testu ELISA na Ryc. 2).
8. Na końcu dodać 50 µl mieszanin wzorców od 1 do 4 do odpowiednich dołków płytki (patrz zalecany układ płytki do testu ELISA na Ryc. 2). Wzorce należy oznaczyć w przynajmniej dwóch powtórzeniach.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
<b>B</b>	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
<b>C</b>	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
<b>D</b>	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
<b>E</b>	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
<b>F</b>	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
<b>G</b>	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
<b>H</b>	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

**Ryc. 2. Zalecany układ płytki do testu ELISA.** S1 (wzorzec 1), S2 (wzorzec 2), S3 (wzorzec 3), S4 (wzorzec 4). 1N (próbka 1. osocza kontrolnego Nil), 1 TB1 (próbka 1. osocza dla TB1), 1 TB2 (próbka 1. osocza dla TB2), 1 M (próbka 1. osocza Mitogen).

9. Przykryć płytkę do testu ELISA i dokładnie mieszać roztwór koniugatu z próbkami osocza/wzorcami na wytrząsarce do mikropląteczek przez 1 minutę przy od 500 do 1000 obr./min. Unikać rozbryzgiwania.
10. Przykryć płytkę do testu ELISA i inkubować w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) przez  $120 \pm 5$  minut. Podczas inkubacji nie należy narażać płytki do testu ELISA na bezpośrednie działanie światła słonecznego. Odchylenie od określonego zakresu temperatury może spowodować otrzymanie nieprawidłowych wyników.
11. Podczas inkubacji płytki do testu ELISA należy przygotować bufor płuczący w stężeniu roboczym. Rozcieńczyć jedną objętość 20x stężonego buforu płuczającego, dodając 19 objętości dejonizowanej lub destylowanej wody, a następnie dokładnie wymieszać. Dostarczona objętość 20x stężonego koncentratu buforu płuczającego wystarcza do przygotowania 2 litrów buforu płuczającego w stężeniu roboczym.

12. Po zakończeniu inkubacji płytki do testu ELISA umyć dołki płytki do testu ELISA, wykorzystując 400 µl buforu płuczącego w stężeniu roboczym. Etap płukania przeprowadzać przynajmniej sześciokrotnie. Z przyczyn bezpieczeństwa zalecane jest używanie płuczki automatycznej podczas postępowania z próbkami osocza.

Dokładne przepłukanie ma bardzo duży wpływ na skuteczność oznaczenia. Podczas każdego cyklu przemywania wszystkie dołki powinny być całkowicie wypełnione buforem płuczającym. Między cyklami zalecane jest pozostawienie roztworu w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund.

Do zbiornika na ścieki należy dodać standardowy laboratoryjny środek dezynfekujący. Należy przestrzegać obowiązujących procedur w zakresie odkażania potencjalnie zakaźnego materiału.

13. Położyć płytkę do testu ELISA skierowaną górną częścią w dół na papierowym ręczniku (bezpylowym), aby usunąć resztki buforu płuczającego. Dodać po 100 µl roztworu substratu enzymu do każdego dołka płytki, przykryć płytkę pokrywką i dokładnie mieszać na wytrząsarce do mikropłytek przez 1 minutę przy 500–1000 obr./min.
14. Przykryć płytkę do testu ELISA i inkubować w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) przez 30 minut. Podczas inkubacji nie należy narażać płytki do testu ELISA na bezpośrednie działanie światła słonecznego.
15. Po 30-minutowej inkubacji dodać po 50 µl roztworu powstrzymującego działanie enzymu do każdego dołka płytki, w takiej samej kolejności, w jakiej dodawano substrat, a następnie dokładnie wymieszać na wytrząsarce do mikropłytek przy 500 do 1000 obr./min.
16. W ciągu 5 minut od zatrzymania reakcji zmierzyć gęstość optyczną (Optical Density, OD) roztworu w dołkach płytki do testu ELISA, używając czytnika mikropłytek wyposażonego w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm. Wartości OD są używane do obliczenia wyników.

## Wyniki (obliczenia)

Do analizy danych surowych i obliczania wyników można użyć oprogramowania QFT-Plus Analysis Software. Jest ono dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Należy upewnić się, że używana jest najnowsza wersja oprogramowania QFT-Plus Analysis Software.

Oprogramowanie wykonuje kontrolę jakości oznaczenia, tworzy krzywą wzorcową oraz podaje wynik testu dla każdego pacjenta, co opisano w sekcji „Interpretacja wyników” na stronie 31. Oprogramowanie oznacza wszystkie stężenia większe niż 10 IU/ml jako „>10”, gdyż takie wartości przekraczają zwalidowany zakres liniowy testu ELISA.

Alternatywnie, zamiast oprogramowania QFT-Plus Analysis Software, do uzyskania wyników można użyć poniższej metody.

## Generowanie krzywej wzorcowej i wartości próbek

### Jeśli nie jest używane oprogramowanie QFT-Plus Analysis Software

Określenie krzywej wzorcowej i wartości IU/ml próbek wymaga użycia programu obsługującego arkusze kalkulacyjne, np. Microsoft® Excel®, jeśli nie jest używane oprogramowanie QFT-Plus Analysis Software.

### Wykorzystanie programu obsługującego arkusze kalkulacyjne

1. Określić średnie wartości OD dla powtórzeń wzorca dołączonego do zestawu znajdujących się na każdej płytce.
2. Wyznaczyć krzywą wzorcową  $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ , wykreślając  $\log_{(e)}$  ze średniej wartości gęstości optycznej (Optical Density, OD) (oś y) względem  $\log_{(e)}$  ze stężenia wzorców IFN- $\gamma$  wyrażonego w IU/ml (oś x), pomijając w tych obliczeniach wzorzec zerowy. Obliczyć linię najlepszego dopasowania dla krzywej wzorcowej, wykonując analizę regresji.

3. Na podstawie krzywej wzorcowej określić stężenie IFN- $\gamma$  (IU/ml) dla każdej badanej próbki osocza, korzystając z wartości OD każdej z próbek.
4. Obliczenia te można wykonać za pomocą pakietów oprogramowania dostępnych z czytnikami do mikroplitek oraz standardowych arkuszy kalkulacyjnych lub oprogramowania statystycznego (np. Microsoft Excel). Zaleca się korzystanie z tych pakietów do wyznaczenia parametrów analizy regresji, współczynnika zmienności (Coefficient of Variation, %CV) dla wzorców oraz współczynnika korelacji ( $r$ ) krzywej wzorcowej.

## Wyliczenia dla próbki

Jeśli dla wzorców zostały uzyskane poniższe pomiary wartości OD, wyliczenia z wykorzystaniem  $-\log(e)$  – powinny być zgodne z tymi przedstawionymi w Tabeli 2.

**Tabela 2. Krzywa wzorcowa**

Worzec	IU/ml	Wartości OD — a i b	Średnia wartość OD	Współczynnik zmienności wyrażony w %	Log <sub>(e)</sub> IU/ml	Średnia wartość log <sub>(e)</sub> (OD)
Worzec 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Worzec 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Worzec 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	Nd.	-1,386	-2,079
Worzec 4	0	0,034, 0,037	0,036	Nd.	Nd.	Nd.

Równanie krzywej to  $y = 0,7885(X) - 0,9837$ , gdzie „m” = 0,7885, a „c” = -0,9837. Wartości te są stosowane w równaniu  $X = (Y-c)/m$ , aby obliczyć wartość X. Na podstawie krzywej wzorcowej obliczony współczynnik korelacji ( $r$ ) = 1,000. Nd.: Nie dotyczy.

Ważność oznaczenia jest określana na podstawie kryteriów opisanych w sekcji „Kontrola jakości testu” na stronie 29.

Krzywa wzorcowa (Tabela 2) jest wykorzystywana do przeliczania wartości OD odpowiedzi na antygeny na jednostki międzynarodowe (International Unit, IU/ml).

**Tabela 3. Wyliczenia dla próbki**

Antygen	Wartość OD	Wartość OD $\log_{(e)}$	X	$e^x$ (IU/ml)	Antygen — wynik dla próbki 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

Wartości IFN- $\gamma$  (w IU/ml) dla próbek TB1, TB2 i Mitogen są skorygowane pod kątem interferencji tła poprzez odjęcie wartości w IU/ml uzyskanej dla odpowiedniej próbki kontrolnej Nil. Do interpretacji wyników testu stosowane są te skorygowane wartości.

## Kontrola jakości testu

Dokładność wyników testu zależy od utworzenia dokładnej krzywej wzorcowej. W związku z tym przed interpretacją wyników próbek badanych należy sprawdzić wyniki otrzymane dla próbek wzorcowych.

Aby test ELISA był ważny:

- Średnia wartość OD wzorca 1 musi być  $\geq 0,600$ .
- %CV wartości uzyskanych dla powtórzeń wzorca 1 i 2 musi być  $\leq 15\%$ .
- Wartości OD uzyskane dla powtórzeń wzorca 3 i 4 nie mogą różnić się od ich średniej o więcej niż 0,040 jednostki gęstości optycznej.
- Współczynnik korelacji ( $r$ ) obliczony na podstawie średnich wartości absorbancji wzorców musi być  $\geq 0,98$ .
- Jeśli nie są spełnione powyższe kryteria, test nie jest ważny i należy go powtórzyć.
- Średnia wartość OD dla wzorca zerowego (zielony rozcieńczalnik) powinna być  $\leq 0,150$ . Jeśli średnia wartość OD jest  $> 0,150$ , należy sprawdzić, czy procedura płukania płytki została wykonana poprawnie.

Oprogramowanie QFT-Plus Analysis Software oblicza i zgłasza te parametry kontroli jakości.

Rodzaje materiałów kontrolnych i częstotliwość ich badania powinny być ustalone dla każdego laboratorium zgodnie z wymaganiami lokalnych, regionalnych, krajowych lub innych odpowiednich jednostek akredytujących. Należy rozważyć wprowadzenie zewnętrznych ocen jakościowych i alternatywnych procedur walidacji.

**Uwaga:** Osocza z dodatkiem rekombinowanego IFN- $\gamma$  wykazały obniżenie stężenia nawet o 50% w przypadku przechowywania zarówno w temperaturze 2–8°C, jak i -20°C. Rekombinowany IFN- $\gamma$  nie jest zalecany do określania wzorców kontrolnych.

# Interpretacja wyników

Wyniki testu QFT-Plus są interpretowane z wykorzystaniem następujących kryteriów (Tabela 4).

**Ważne:** Rozpoznanie lub wykluczenie choroby gruźliczej oraz ocena prawdopodobieństwa wystąpienia LTBI wymagają przeanalizowania wyników badań epidemiologicznych, medycznych i diagnostycznych oraz historii medycznej pacjenta, które należy uwzględnić, interpretując wyniki testu QFT-Plus. Ogólne wytyczne w zakresie rozpoznawania i leczenia choroby gruźliczej oraz LTBI znajdują się pod poniższym adresem:

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

**Tabela 4. Interpretacja wyników testu QFT-Plus**

Wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki TB1 minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki TB2 minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki Mitogen minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)*	Wynik testu QFT-Plus	Zgłoszenie/interpretacja
≤8,0	≥0,35 i ≥25% próbki Nil	Dowolny	Dowolny	Pozytywny <sup>†</sup>	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> jest prawdopodobne
	Dowolny	≥0,35 i ≥25% próbki Nil			
	<0,35 lub ≥0,35 i <25% próbki Nil	<0,35 lub ≥0,35 i <25% próbki Nil	≥0,50	Negatywny	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> NIE jest prawdopodobne
	<0,35 lub ≥0,35 i <25% próbki Nil	<0,35 lub ≥0,35 i <25% próbki Nil	<0,50	Nieokreślony <sup>‡</sup>	Nie można określić prawdopodobieństwa zakażenia <i>M. tuberculosis</i>
>8,0 <sup>§</sup>	Dowolny				

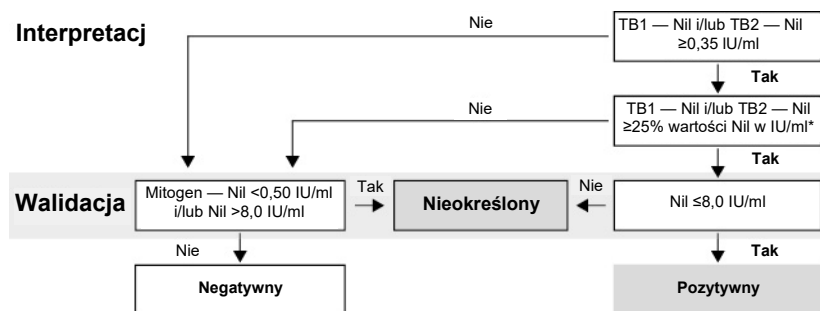
\* Wyniki odpowiedzi na kontrolę pozytywną zawierającą mitogen (i czasem na próbkę z antygenami TB) mogą wykraczać poza zakres odczytu czytnika mikroplitek. Nie ma to wpływu na wyniki testu. Wartości >10 IU/ml są zgłaszane przez oprogramowanie QFT-Plus jako >10 IU/ml.

<sup>†</sup> Jeśli zakażenie *M. tuberculosis* nie jest podejrzewane, a uzyskano wstępne wyniki pozytywne, można je potwierdzić, ponownie badając oryginalne próbki osocza w dwóch powtórzeniach za pomocą testu QFT-Plus ELISA. Jeśli wynik jednego lub obu powtórzonych testów jest pozytywny, wynik testu należy uznawać za pozytywny.

<sup>‡</sup> Informacje na temat możliwych przyczyn zostały zamieszczone w sekcji „Rozwiązywanie problemów”, strona 68.

<sup>§</sup> W badaniach klinicznych u mniej niż 0,25% pacjentów zareportowano stężenie IFN-γ >8,0 IU/ml dla wartości próbki Nil.

Wielkości zmierzonego poziomu IFN- $\gamma$  nie można skorelować z etapem (stadium) lub stopniem nasilenia infekcji, poziomem odpowiedzi odpornościowej ani prawdopodobieństwem rozwoju aktywnej postaci choroby. Pozytywna odpowiedź gruźlicza u osób z negatywnym wynikiem na mitogen jest rzadka, lecz była odnotowywana u pacjentów z gruźlicą. Wskazuje to na fakt większego nasilenia odpowiedzi indukowanej IFN- $\gamma$  na antygeny gruźlicze niż odpowiedzi na mitogen, co może mieć miejsce, ponieważ poziom mitogenu nie powoduje maksymalnego stymulowania produkcji IFN- $\gamma$  przez limfocyty.



**Ryc. 3. Interpretacja wyniku testu QFT-Plus.** \*Aby wartość TB1 minus Nil lub TB2 minus Nil była ważna, wartość  $\geq 25\%$  wartości Nil (IU/ml) musi pochodzić z tej samej próbki, co oryginalny wynik  $\geq 0,35$  IU/ml.



# Ograniczenia

Wyniki testów QFT-Plus należy wykorzystywać w kontekście historii epidemiologicznej pacjenta, obecnego stanu medycznego i innych badań diagnostycznych.

Pacjentom, u których wartości dla próbki Nil przekraczają 8 IU/ml, przypisuje się wynik testu „nieokreślony”, ponieważ wyższa o 25% odpowiedź na antygeny TB może wykraczać poza zakres pomiarowy oznaczenia.

- Wartość predykcyjna pozytywnego wyniku testu QFT-Plus w rozpoznawaniu zakażenia *M. tuberculosis* zależy od prawdopodobieństwa zakażenia, które jest oceniane na podstawie wyników badań epidemiologicznych i diagnostycznych, historii medycznej pacjenta i innych czynników.
- Przy stawianiu rozpoznania LTBI należy wykluczyć chorobę gruźliczą na podstawie oceny medycznej, obejmującej analizę aktualnych badań medycznych i diagnostycznych pod kątem choroby, zgodnie ze wskazaniami.
- Wynik negatywny należy wykorzystywać w kontekście danych medycznych i historycznych pacjenta istotnych pod kątem zakażenia *M. tuberculosis* oraz potencjalnego ryzyka rozwinięcia choroby gruźliczej, zwłaszcza w przypadku osób o upośledzonej odporności.

Niepewne lub nieokreślone wyniki mogą być spowodowane:

- nieprzestrzeganiem procedury opisanej w instrukcji użycia;
- nieprawidłowym transportowaniem próbki krwi/postępowaniem z próbką;
- podwyższonymi poziomami krążącego we krwi IFN- $\gamma$  lub obecnością przeciwciał heterofilnych;
- przekroczeniem zwalidowanego okresu między pobraniem próbki krwi a inkubacją. Więcej informacji znajduje się w dokumencie *QFT-Plus Blood Collection Tubes — Instrukcja użycia* (1123668).

# Parametry skuteczności

## Badania kliniczne

W związku z brakiem standardowej metody potwierdzającej lub wykluczającej rozpoznanie LTBI nie można ocenić czułości i swoistości testu QFT-Plus w praktyce. Swoistość testu QFT-Plus oszacowano w przybliżeniu, oceniając częstotliwość generowania wyników fałszywie pozytywnych u osób z niskim ryzykiem zakażenia gruźlicą (brak znanych czynników ryzyka). Czułość oszacowano w przybliżeniu, oceniając grupy pacjentów z potwierdzoną przez posiew aktywną postacią gruźlicy. Dodatkowo dokonano oceny skuteczności oznaczenia pod kątem częstotliwości generowania wyników pozytywnych i negatywnych w populacji zdrowych pacjentów ze zidentyfikowanymi czynnikami ryzyka zakażenia gruźlicą (populacja mieszanego ryzyka).

## Swoistość

W celu oceny swoistości klinicznej testu QFT-Plus przeprowadzono wieloośrodkowe badanie obejmujące 733 pacjentów, u których stwierdzono niskie ryzyko zakażenia *M. tuberculosis* lub nie zidentyfikowano czynników ryzyka narażenia na zakażenie bądź chorobę. Informacje demograficzne i czynniki ryzyka dotyczące narażenia na gruźlicę określono przy użyciu standaryzowanej ankiety przeprowadzanej podczas badania. Badanie zostało przeprowadzone w czterech niezależnych ośrodkach, z których jeden znajdował się w Stanach Zjednoczonych, dwa w Japonii i jeden w Australii. Test QFT-Plus porównano do testu QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Podsumowanie danych dotyczących swoistości klinicznej z podziałem na ośrodki badawcze i regiony znajduje się w Tabeli 5. Wyniki uwzględniają łączną liczbę ważnych testów. Nie uzyskano wyników nieokreślonych.

**Tabela 5. Swoistość testu QFT-Plus w populacji niskiego ryzyka**

Ośrodek	N	Pozytywny		Negatywny		Nieokreślony		Swoistość (95-procentowy przedział ufności)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
<b>Stany Zjednoczone</b>									
(nr 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)
<b>Japonia</b>									
(nr 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)
(nr 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)
Japonia (łącznie)	322	4	7	318	315	0	0	98,76% (318/322) (96,85– 99,52)	97,83% (315/322) (95,6– 98,9)
<b>Australia</b>									
(nr 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)

Swoistość testu QFT-Plus wyniosła 98,11% w Stanach Zjednoczonych; 97,83% w Japonii i 95,48% w Australii. Ogólna swoistość testu QFT-Plus wyniosła 97,27% (713/733). Swoistość testu QFT była na poziomie 99,06% w Stanach Zjednoczonych, 98,76% w Japonii i 95,98% w Australii. Ogólna swoistość testu QFT wyniosła 98,09% (719/733).

Podział wyników według typu próbek TB Antigen i ich kombinacji został zaprezentowany w celu przedstawienia przykładowych oczekiwanych wyników w populacji niskiego ryzyka (Tabela 6).

**Tabela 6. Wyniki badania swoistości testu QFT-Plus według próbek z antygenem TB**

<b>Interpretacja na podstawie wartości próbki TB Antigen minus Nil</b>				
<b>IU/ml w</b>	<b>TB1</b>	<b>TB2</b>	<b>QFT-Plus (pozytywny w TB1 i/lub TB2)*</b>	<b>Zgodność wyników pozytywnych TB1 i TB2 (analiza alternatywna)†</b>
Pozytywny	10	18	20	8
Negatywny	723	715	713	725
Nieokreślony	0	0	0	0
Swoistość (95-procentowy przedział ufności)	–	–	97,3% (713/733) (95,8–98,2)	–
Odsetek wyników negatywnych (95-procentowy przedział ufności)	98,6% (723/733) (97,5–99,3)	97,5% (715/733) (96,2–98,4)	–	98,9% (725/733) (97,9–99,5)

\* Interpretacja na podstawie wartości próbki TB Antigen minus Nil  $\geq 0,35$  IU/ml w obu próbkach (TB1 i TB2) lub w jednej z próbek TB, zgodnie z kryteriami interpretacji wyniku testu QFT-Plus (TB1 lub TB2) jako pozytywny.

† Dane pochodzące z analizy alternatywnej zostały podane wyłącznie w celach informacyjnych.

Wśród pacjentów z niskim ryzykiem zakażenia prątkiem gruźlicy wynik pozytywny uzyskano łącznie u 20/733 pacjentów. Spośród nich tylko 8 uzyskało wartość  $>0,35$  IU/ml zarówno w próbce TB1, jak i TB2. Porównanie oznaczeń QFT i QFT- Plus przeprowadzono w kohorcie pacjentów o niskim ryzyku. Wykazało ono ogólną zgodność na poziomie 97,5% (715/733) i zgodność procentową wyników ujemnych na poziomie 98,3% (707/719).

## Czułość

W związku z brakiem rozstrzygającego testu na zakażenie LTBI odpowiednim narzędziem zastępczym jest posiew mikrobiologiczny *M. tuberculosis*, ponieważ zakażenie prątkami gruźlicy zawsze poprzedza chorobę.

W celu oceny czułości klinicznej testu QFT-Plus przeprowadzono wielośrodkowe badanie obejmujące 434 pacjentów, u których stwierdzono przedmiotowe i podmiotowe objawy czynnej postaci zakażenia *M. tuberculosis* potwierdzonego posiewem i/lub testem PCR i którzy przed pobraniem krwi nie byli poddawani leczeniu gruźlicy lub czas trwania leczenia wynosił  $\leq 14$  dni. Badanie zostało przeprowadzone w 7 niezależnych ośrodkach — trzech w Stanach Zjednoczonych, trzech w Japonii i jednym w Australii. Test QFT-Plus porównano do testu QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT). Podsumowanie danych dotyczących czułości klinicznej z podziałem na ośrodki badawcze i kraje znajduje się w Tabeli 7. Wyniki uwzględniają łączną liczbę ważnych testów. Częstotliwość nieokreślonych wyników testów QFT i QFT-Plus wyniosła odpowiednio 2,3% (10/434) oraz 2,5% (11/434).

**Tabela 7. Podsumowanie badania pod kątem czułości klinicznej z podziałem na ośrodki i kraje oraz łącznie**

Ośrodek	N	Pozytywna		Negatywna		Nieokreślona		Czułość (95-procentowy przedział ufności)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
<b>Stany Zjednoczone</b>									
(nr 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)
(nr 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)
(nr 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)
Stany Zjednoczone (łącznie)	53	47	47	6	6	0	0	88,7% (47/53) (77,4– 94,7)	88,7% (47/53) (77,4– 94,7)
<b>Japonia</b>									
(nr 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)
(nr 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)

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony

**Tabela 7. Podsumowanie badania pod kątem czułości klinicznej z podziałem na ośrodki i kraje oraz łącznie (cd.)**

Ośrodek	N	Pozytywna		Negatywna		Nieokreślona		Czułość (95-procentowy przedział ufności)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(nr 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)
Japonia (łącznie)	352	328	322	15	19	9	11	95,63% (328/343) (92,91– 97,33)	94,43% (322/341) (91,5–96,4)
<b>Australia</b>									
(nr 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)

Analiza zawarta w powyższej tabeli nie obejmuje wyników nieokreślonych.

Czułość testu QFT-Plus wyniosła 88,7% w Stanach Zjednoczonych, 94,43% w Japonii i 100,0% w Australii. Ogólna czułość testu QFT-Plus wyniosła 94,09% (398/423). Czułość testu QFT była na poziomie 88,7% w Stanach Zjednoczonych, 95,63% w Japonii i 96,43% w Australii. Ogólna czułość testu QFT wyniosła 94,81% (402/424).

Podział wyników według typu próbek TB Antigen i ich kombinacji został zaprezentowany w celu przedstawienia przykładowych oczekiwanych wyników w populacji z potwierdzonym zakażeniem prątkiem gruźlicy (Tabela 8).

**Tabela 8. Wyniki badania czułości testu QFT-Plus według próbek TB Antigen**

Interpretacja na podstawie wartości próbki TB Antigen minus Nil w IU/ml	TB1	TB2	QFT-Plus (pozytywny w TB1 i/lub TB2)
Pozytywny	388	397	398
Negatywny	32	26	25
Nieokreślony	14	11	11
Czułość* (95-procentowy przedział ufności)	–	–	94% (398/423) (91,4–96,0)
Odsetek wyników pozytywnych* (95-procentowy przedział ufności)	92,4% (388/420) (89,4–94,6)	93,9% (397/423) (91,1–95,8)	–

\* Nie uwzględniono wartości nieokreślonych.

Porównanie oznaczeń QFT i QFT-Plus przeprowadzono w kohorcie pacjentów, u których potwierdzono przez posiew czynną postać gruźlicy (kohorty badania czułości). Wykazało ono ogólną zgodność na poziomie 95,9% i zgodność procentową wyników dodatnich na poziomie 97,3% (391/402).

**Tabela 9. Wskaźniki wiarygodności — test QFT-Plus**

Ośrodek*	Czułość	Swoistość	LR+	LR-
Australia	100,00%	95,48%	22,11	0,00
Japonia	94,43%	97,83%	43,44	0,06
Stany Zjednoczone	88,68%	98,11%	47,00	0,12

\* Łącznie



## Skuteczność u pacjentów ze zidentyfikowanymi czynnikami ryzyka zakażenia MTB (populacja mieszanego ryzyka)

Za pomocą obu testów QFT i QFT-Plus zbadano kohortę obejmującą 601 pacjentów o mieszanych czynnikach ryzyka zakażenia prątkiem gruźlicy (np. wynik pozytywny w kierunku wirusa HIV, leczenie gruźlicy w postaci czynnej lub utajonej w przeszłości, narażenie na kontakt z przypadkiem czynnej gruźlicy, status pracownika ochrony zdrowia itp.). Czynniki ryzyka zidentyfikowano na podstawie standaryzowanej ankiety. U pacjentów w momencie kwalifikowania do badania nie obserwowano objawów aktywnej postaci gruźlicy. Dane demograficzne oraz czynniki ryzyka przedstawiono w Tabeli 10. W tej populacji 68/601 (11,3%) pacjentów uzyskało pozytywny wynik testu QFT-Plus przy zgodności procentowej wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodności procentowej wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA) odpowiednio na poziomie 98,44% i 99,07% (Tabela 11). Spośród 68 pacjentów z pozytywnym wynikiem testu QFT-Plus w tej kohorcie 62 pacjentów uzyskało wynik pozytywny zarówno dla próbówki TB1, jak i TB2; 2 pacjentów uzyskało wynik pozytywny wyłącznie dla próbówki TB1, a 4 pacjentów — wyłącznie dla próbówki TB2. Nie uzyskano wyników nieokreślonych (0/601).

**Tabela 10. Dane demograficzne i czynniki ryzyka zakażenia prątkiem gruźlicy w kohorcie mieszanej**

<b>Pacjenci łącznie ( 601)</b>		<b>Liczba</b>	<b>Procentowo</b>
Płeć	Mężczyźni	539	89,7%
	Kobiety	62	10,3%
Wiek (w latach)	Zakres	18–70	–
	Średnia	46,7	
Szczepienie BCG	Tak	15	2,5%
	Nie	586	97,5%
Wynik pozytywny w kierunku wirusów HIV lub HTLV	Tak	12	2,0%
	Nie	589	98%
Wcześniejsze rozpoznanie czynnej postaci gruźlicy	Tak	11	1,8%
	Nie	590	98,2%
Pozytywny wynik skórnej próby tuberkulinowej (Tuberculin Skin Test, TST)/testu Mantoux pod kątem gruźlicy	Tak	47	7,8%
	Nie	554	92,2%
Leczenie gruźlicy w postaci czynnej lub utajonej w przeszłości	Tak	35	5,8%
	Nie	566	94,2%
Pobyt, praca lub wolontariat (>1 miesiąc) w areszcie lub więzieniu	Tak	373	62,1%
	Nie	228	37,9%
Pobyt, praca lub wolontariat (>1 miesiąc) w schronisku dla osób bezdomnych	Tak	525	87,4%
	Nie	76	12,6%
Pracownik ochrony zdrowia	Tak	8	1,3%
	Nie	593	98,7%
Bliski kontakt z osobą, u której rozpoznano lub podejrzewa się czynną postać choroby gruźliczej	Tak	9	1,5%
	Nie	592	98,5%

**Tabela 11. Podsumowanie skuteczności testu QFT-Plus w porównaniu z testem QFT u pacjentów ze znanymi czynnikami ryzyka utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy**

		QFT		
		Pozytywny (+)	Negatywny (-)	Łącznie
QFT-Plus	Pozytywny (+)	63	5*	68
	Negatywny (-)	1*	532	533
	Łącznie	64	537	601

\*W przypadku wszystkich 6 próbek z niezgodnym wynikiem wartość stężenia IFN- $\gamma$  w próbce TB Antigen była zbliżona do punktu odcięcia oznaczenia.

Zgodność procentowa wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentowa wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA) między wynikami testów QFT i QFT-Plus była następująca:

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

W poniższej Tabeli 12 przedstawiono skuteczność testu QFT-Plus w porównaniu z testem QFT wśród pacjentów zaszczepionych szczepionką BCG.

**Tabela 12. Skuteczność testu QFT-Plus w porównaniu z testem QFT wśród pacjentów zaszczepionych szczepionką BCG (łącznie dane pochodzące od pacjentów biorących udział w badaniach pod kątem czułości, swoistości i LTBI)**

		QFT		
		Pozytywny (+)	Negatywny (-)	Łącznie
QFT-Plus	Pozytywny (+)	66	5	71
	Negatywny (-)	3	268	271
	Łącznie	69	273	342*

\*Z analizy wykluczono dane dwóch pacjentów biorących udział w badaniu pod kątem czułości ze względu na uzyskanie wyniku nieokreślonego

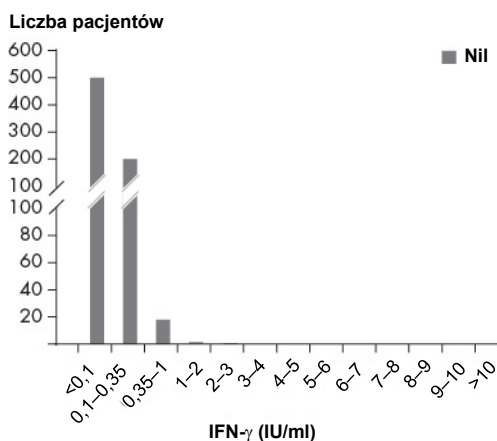
- PPA = 95,6% (66/69), 95-procentowy przedział ufności (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2% (268/273), 95-procentowy przedział ufności (95,79, 99,22)

## Wartości oczekiwane

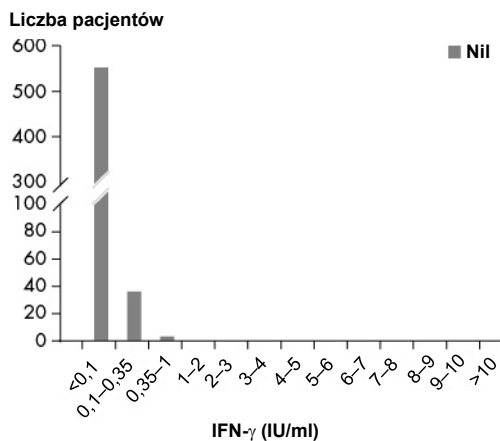
### Zaobserwowany rozkład odpowiedzi — z podziałem według ryzyka

W badaniach klinicznych zaobserwowano zakres odpowiedzi indukowanej IFN- $\gamma$  w próbkach TB1, TB2 i próbce kontrolnej. Wyniki podzielono według ryzyka zakażenia *M. tuberculosis* (od Ryc. 4 do Ryc. 7). Grupa mieszanego ryzyka składała się z pacjentów reprezentatywnych dla ogólnej populacji badanej, obejmującej pacjentów obciążonych i nieobciążonych czynnikami ryzyka narażenia na gruźlicę oraz pacjentów, w przypadku których aktywne zakażenie gruźlicą jest mało prawdopodobne (tj. LTBI).

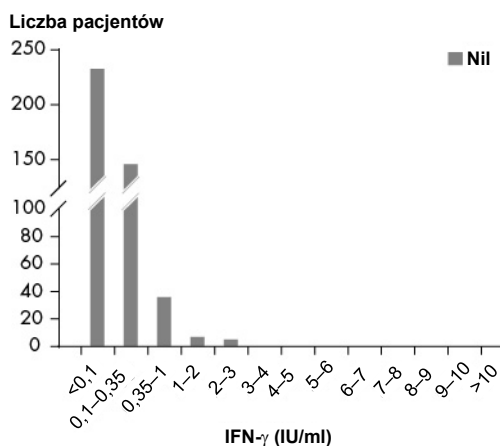
A



B

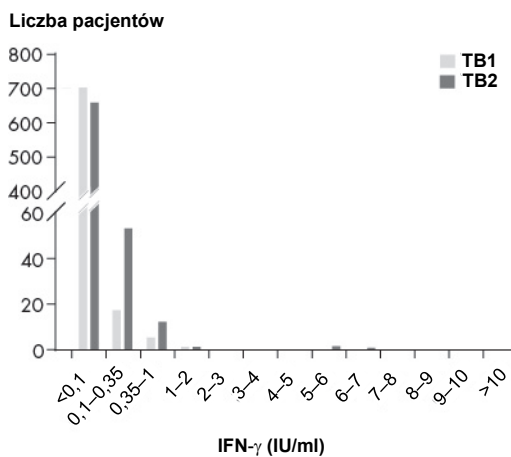


C

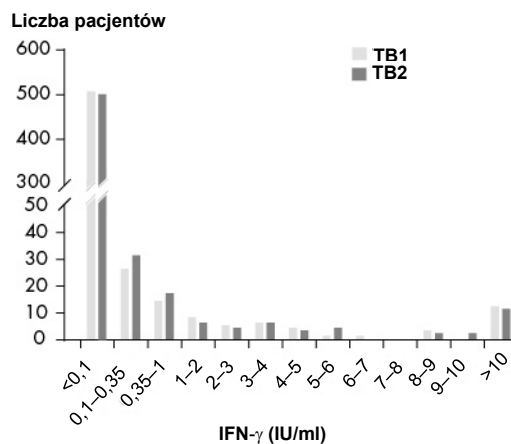


**Ryc. 4. Rozkład wartości próbówki Nil.** A Rozkład wartości próbówki Nil w populacji niskiego ryzyka (n=744). B Rozkład wartości próbówki Nil w populacji mieszanego ryzyka (n=601). C Rozkład wartości próbówki Nil w populacji z potwierdzonym przez posiew zakażeniem *M. tuberculosis* (n=416).

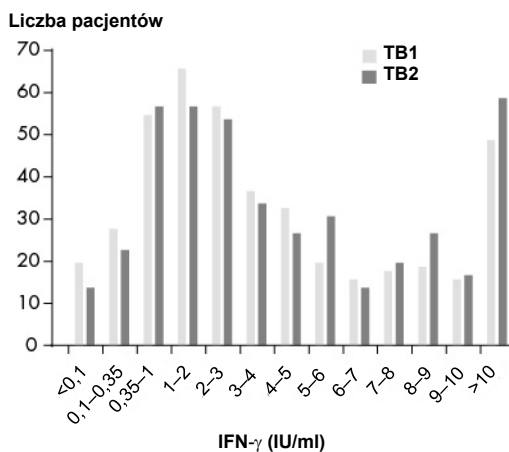
A



B

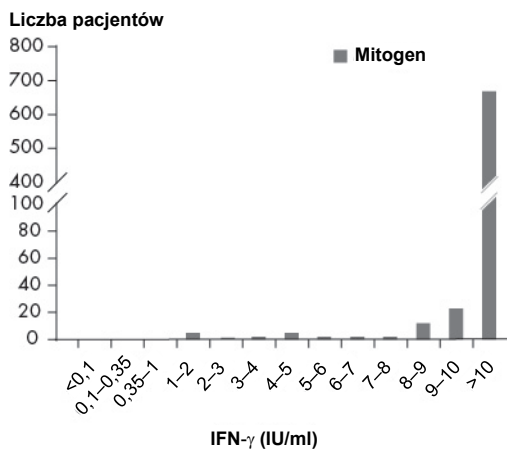


C

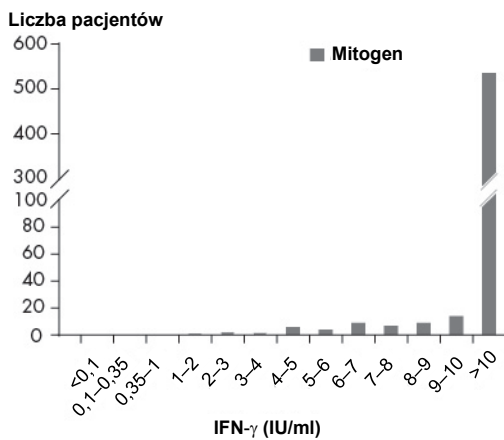


**Ryc. 5. Rozkład wartości próbówek TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbówki Nil).** **A** Rozkład wartości próbówek TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbówki Nil) w populacji niskiego ryzyka (n=744). **B** Rozkład wartości próbówek TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbówki Nil) w populacji mieszanego ryzyka (n=601). **C** Rozkład wartości próbówek TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbówki Nil) w populacji z potwierdzonym przez posiew zakażeniem *M. tuberculosis* (n=416).

A

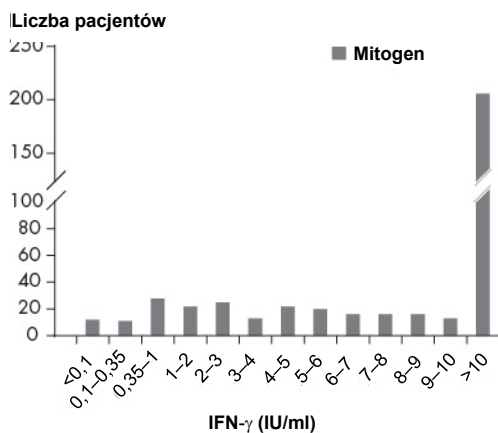


B

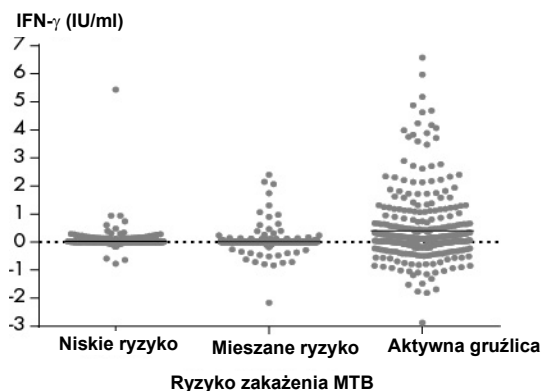




C



**Ryc. 6. Rozkład wartości próbówki Mitogen (po odjęciu wartości próbówki Nil).** **A** Rozkład wartości próbówki Mitogen (po odjęciu wartości próbówki Nil) w populacji niskiego ryzyka (n=744). **B** Rozkład wartości próbówki Mitogen (po odjęciu wartości próbówki Nil) w populacji mieszanego ryzyka (n=601). **C** Rozkład wartości próbówki Mitogen (po odjęciu wartości próbówki Nil) w populacji z potwierdzonym przez posiew zakażeniem *M. tuberculosis* (n=415).



**Ryc. 7. Zaobserwowana różnica pomiędzy wartościami probówek TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbki Nil), podział według ryzyka.** Uwzględniono dane z kohorty badania o mieszanym ryzyku w celu wykazania różnic między kohortami o niskim ryzyku, ryzyku aktywnego zakażenia i ryzyku mieszanym. Ta analiza danych obejmuje kohortę mieszanego ryzyka ze znanymi czynnikami ryzyka. Podział przedstawia się następująco: kohorta niskiego ryzyka: n=733; kohorta mieszanego ryzyka: n=588; kohorta pacjentów z czynną postacią gruźlicy: n=357. Różnicę ilościową w IU/ml dla poszczególnych pacjentów obliczono, odejmując wartość próbki TB1 od wartości próbki TB2.

## Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności

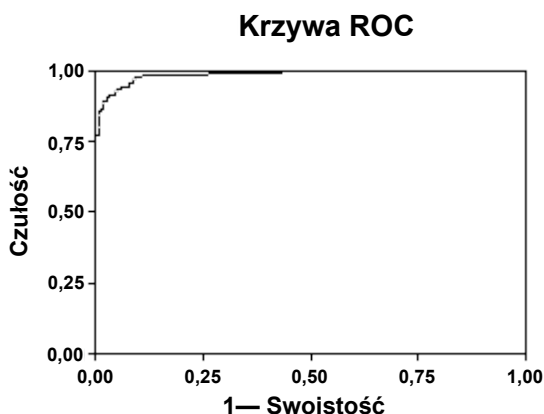
Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności jest dostępne na stronie internetowej EUDAMED.

# Parametry skuteczności oznaczenia

## Skuteczność analityczna

### Punkt odcięcia oznaczenia

Punkt odcięcia oznaczenia QFT-Plus został określony na podstawie danych uzyskanych od 216 pacjentów, u których nie zidentyfikowano czynników ryzyka narażenia na kontakt z prątkami gruźlicy, którzy zostali zaszczepieni szczepionką BCG i którzy zostali uznani za niezakażonych, a także danych uzyskanych od 118 pacjentów, u których przez posiew potwierdzono zakażenie *M. tuberculosis*. Dane dotyczące czułości i swoistości zostały połączone i przeanalizowane za pomocą analizy krzywej ROC (ang. Receiver Operator Characteristic). Dane dotyczące czułości i swoistości przeanalizowane za pomocą analizy ROC wykazały, że optymalny punkt odcięcia oznaczenia ELISA wyniósł 0,35 IU/ml (patrz Ryc. 8).



Ryc. 8. Krzywa ROC dla odpowiedzi na antygeny ESAT-6 i CFP-10.

**Tabela 13. Wartości czułości i swoistości testu ELISA przy różnych punktach odcięcia**

Punkt odcięcia — IFN- $\gamma$ w IU/ml	Czułość (%)	95-procentowy przedział ufnosci	Swoistość (%)	95-procentowy przedział ufnosci	Czułość + swoistość
0,20	91,53	Od 84,97% do 95,86%	96,31	Od 92,87% do 98,40%	187,84
0,23	91,53	Od 84,97% do 95,86%	96,77	Od 93,47% do 98,69%	188,30
0,26	90,68	Od 83,93% do 95,25%	96,77	Od 93,47% do 98,69%	187,45
0,28	90,68	Od 83,93% do 95,25%	97,24	Od 94,08% do 98,98%	187,92
0,30	89,83	Od 82,91% do 94,63%	97,24	Od 94,08% do 98,98%	187,07
0,31	88,98	Od 81,90% do 94,00%	97,24	Od 94,08% do 98,98%	186,22
0,33	88,98	Od 81,90% do 94,00%	97,70	Od 94,71% do 99,25%	186,68
0,35	88,98	Od 81,90% do 94,00%	98,16	Od 95,35% do 99,50%	187,14
0,39	88,14	Od 80,90% do 93,36%	98,16	Od 95,35% do 99,50%	186,3
0,42	87,29	Od 79,90% do 92,71%	98,16	Od 95,35% do 99,50%	185,45
0,43	86,44	Od 78,92% do 92,05%	98,16	Od 95,35% do 99,50%	184,6
0,45	86,44	Od 78,92% do 92,05%	98,62	Od 96,01% do 99,71%	185,06

Ciąg dalszy tabeli na następnym stronie

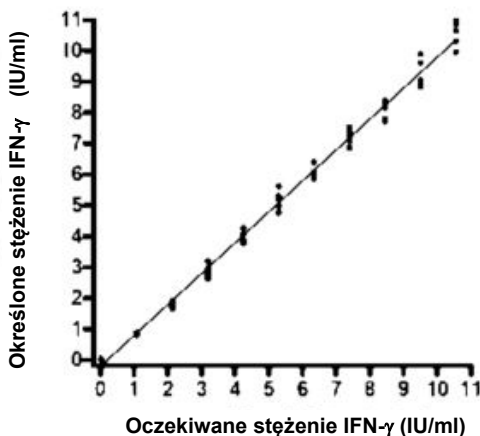
Ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony

**Tabela 13. Wartości czułości i swoistości testu ELISA przy różnych punktach odcięcia**

Punkt odcięcia — IFN- $\gamma$ w IU/ml	Czułość (%)	95-procentowy przedział ufności	Swoistość (%)	95-procentowy przedział ufności	Czułość + swoistość
0,47	85,59	Od 77,94% do 91,38%	99,08	Od 96,71% do 99,89%	184,67
0,48	84,75	Od 76,97% do 90,70%	99,08	Od 96,71% do 99,89%	183,83
0,50	83,90	Od 76,00% do 90,02%	99,08	Od 96,71% do 99,89%	182,98

## Liniowość

Liniowość testu QFT-Plus ELISA wykazano poprzez losowe naniesienie na płytkę ELISA 5 powtórzeń 11 pul osocza o znanym stężeniu IFN- $\gamma$ . Prosta regresji liniowej ma nachylenie równe  $1,002 \pm 0,011$  i współczynnik korelacji wynoszący 0,99 (Ryc. 9).



**Ryc. 9. Ilustracja przedstawia analizę regresji liniowej — średnia poziomu puli o wysokim stężeniu =  $-0,24 + 0,9964 \cdot \text{Poziom oczekiwany}$ .**

## Odtwarzalność

Przeprowadzono wielośrodkowe badanie odtwarzalności, aby ocenić skuteczność oznaczenia QFT-Plus wykonywanego przez różnych operatorów w wielu ośrodkach badawczych. Było to badanie prospektywne przeprowadzone w trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych i jednym ośrodku, w którym pobierano próbki. Do badania włączono łącznie 32 pacjentów z wynikiem pozytywnym i 34 pacjentów z wynikiem negatywnym (według testu QFT). Pacjentami byli pracownicy ochrony zdrowia w Stanach Zjednoczonych. Pacjenci stanowili grupy mieszanego ryzyka narażenia na kontakt z prątkami gruźlicy ze względu na ich zawód lub fakt przynależności do grupy pracowników ochrony zdrowia urodzonych za granicą w miejscach, gdzie zachorowalność na gruźlicę przekracza 50/100 000 osób.

W ośrodku pobierania od każdego pacjenta uzyskano krew w trzech próbkach do pobierania krwi z heparyną litową. Następnie zawierające krew próbki do pobierania krwi z heparyną litową trafiły do trzech ośrodków badawczych, gdzie ich zawartość została rozdzielona do dwóch zestawów próbek QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen i Nil) i przetestowana zgodnie z procedurą oznaczenia QFT-Plus. W każdym ośrodku co najmniej dwóch operatorów przeprowadziło dwa niezależne testy próbek poszczególnych pacjentów. Żaden z operatorów nie znał wyników uzyskanych przez drugiego operatora ani wyników testu QFT pacjenta.

Łącznie we wszystkich trzech ośrodkach badawczych wygenerowano sześć wyników dla każdego z 66 pacjentów, co w rezultacie dało 396 punktów danych. Podsumowanie wyników pomiaru odtwarzalności znajduje się w Tabeli 14.

**Tabela 14. Podsumowanie wyników pomiaru odtwarzalności — zgodność % wyników jakościowych między operatorami w obrębie ośrodka, N = 66 próbek pacjentów**

Ośrodek 1 — 2 operatorów	Ośrodek 2 — 2 operatorów	Ośrodek 3 — 3 operatorów
64/66= 96,97%	64/66= 96,97%	59/66= 89,39%
Zgodność wyników jakościowych zestawu próbek 1 i 2	Zgodność wyników jakościowych zestawu próbek 1 i 2	Zgodność wyników jakościowych zestawu próbek 1 i 2

Zgodność procentowa wyników jakościowych wśród wszystkich ośrodków badawczych wynosi 94,7% (375/396). Łączna liczba zgodnych wyników testów (375) wykorzystana do obliczenia tej wartości obejmuje przypadki zgodności wszystkich 6 wyników, zgodności 5 z 6 wyników, zgodności 4 z 6 wyników i zgodności 3 z 6 wyników.

### Powtarzalność między seriami

Przeprowadzono badanie w celu określenia zmienności między seriami próbek QFT-Plus Blood Collection Tubes w porównaniu do próbek QFT. Do badania włączono łącznie 30 pacjentów (15 pacjentów z pozytywnymi wynikami w kierunku gruźlicy oraz 15 pacjentów z wynikami negatywnymi potwierdzonymi testem QFT). Do przeprowadzenia badania zostały użyte po trzy oddzielne serie zarówno próbek QFT-Plus TB1, TB2, jak i próbek QFT TB Blood Collection Tubes. Wykonano test trzech powtórzeń dla każdego dawcy na każdą serię próbek do pobierania krwi. W przypadku próbek Nil i Mitogen wykonano po jednym powtórzeniu.

Krew od każdego pacjenta została pobrana do próbek do pobierania krwi z heparyną litową, a następnie przeniesiono po 1 ml krwi do każdej z próbek QFT-Plus i QFT Blood Collection Tubes i przetestowano zgodnie z procedurą oznaczenia. Całkowita wariancja wyników uzyskanych w próbkach QFT-Plus dla każdej grupy próbek pozytywnych i negatywnych nie mogła być istotnie wyższa od całkowitej wariancji wyników uzyskanych w próbkach QFT. Zostało to określone na podstawie wartości  $p$  uzyskanej w teście jednorodności wariancji Levene'a (Homogeneity of Variance, HOV). Jeśli wartość  $p$  wskazywała na wynik nieistotny statystycznie ( $p > 0,05$ ) i/lub zmienność w przypadku próbek QFT-Plus TB była niższa niż w przypadku próbek QFT TB, stwierdzano wariancję między wynikami uzyskanymi w próbkach QFT-Plus a wynikami uzyskanymi w próbkach QFT.

**Tabela 15. Porównanie wariancji między próbkami QFT-Plus i QFT TB Blood Collection Tubes za pomocą testu HOV Levene'a**

Typ próbki	Różnica	Wpływ	Zależność	Wartość p	Istotność
Pozytywna	TB2 a QFT	Podtyp	Resztkowa	0,0378	Tak
Pozytywna	TB2 a QFT	Podtyp	Resztkowa	0,0540	Nie
Negatywna	TB2 a QFT	Podtyp	Resztkowa	0,1025	Nie
Negatywna	TB2 a QFT	Podtyp	Resztkowa	0,6344	Nie

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zmienności między próbkami QFT-Plus i QFT TB Blood Collection Tubes, z wyjątkiem próbki QFT-Plus TB2 podczas wykonywania testów na próbkach pozytywnych. W ramach analizy oszacowania odchylenia standardowego ustalono, że zmienność obserwowana dla próbki QFT-Plus TB2 była mniejsza (0,06089) niż w przypadku próbki QFT TB (0,07641), patrz Tabela 16. Z tego względu wariancja dla próbek QFT-Plus TB1 i TB2 Blood Collection Tubes nie była większa niż wariancja dla próbki QFT TB Blood Collection Tube.

**Tabela 16. Odchylenie standardowe składnika resztkowego i 95-procentowy przedział ufności dla próbek pozytywnych**

Typ próbki	Podtyp	Oszacowane odchylenie standardowe	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Lower Confidence Limit, LCL)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Upper Confidence Limit, UCL)
Pozytywna	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Pozytywna	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Pozytywna	TB2	0,06089	0,05439	0,06917



## Powtarzalność w ramach serii

W celu oceny odtwarzalności w ramach serii probówek QFT-Plus Blood Collection Tubes przeprowadzono badanie polegające na porównaniu stężenia IFN- $\gamma$  w powtórzeniach uzyskanych z próbek krwi pobranych do probówek QFT-Plus TB Blood Collection Tubes.

Sześć porcji jednej próbki krwi pochodzącej od danego pacjenta z potwierdzonym zakażeniem prątkami gruźlicy przeanalizowano w 6 powtórzeniach przy użyciu obu probówek do pobierania krwi z jednej serii probówek QFT-Plus (TB1 i TB2). Badanie zostało przeprowadzone na próbkach od 13 pacjentów. Wartość %CV obliczono dla każdego dawcy i dla wszystkich dawców łącznie w celu wygenerowania średniej wartości %CV przedstawionej w Tabeli 17.

**Tabela 17. Procentowa wartość CV średniej, odchylenia standardowego, wartości minimalnej, mediany i wartości maksymalnej w poszczególnych próbkach QFT-Plus TB Blood Collection Tube na podstawie próbek pochodzących od pacjentów z pozytywnym wynikiem pod kątem zakażenia prątkami gruźlicy**

Probówka QFT-Plus	Wielkość próby	Średnia (%CV)	Odchylenie standardowe	Minimum	Mediana	Maksimum
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Wyniki wykazały, że średnia wartość %CV dla próbek TB1 i TB2 wynosiła ~13%, co oznacza spełnienie kryteriów akceptacji zakładających wartość  $\leq 30\%$  i wykazuje powtarzalność w ramach serii.

### Granica próby ślepej (Limit of Blank, LoB)

Dla oznaczenia QFT-Plus określono granicę próby ślepej (Limit of Blank, LoB). Po dwa powtórzenia każdej z 14 odrębnych próbek prawidłowego osocza ludzkiego (próby ślepe) zostały przetestowane przy użyciu 2 serii oznaczenia QFT-Plus ELISA przez 3 operatorów i w 3 dniach badań; jeden operator przypadają na jeden dzień badań. Łącznie za pomocą obu serii zestawu do wykonywania testu ELISA przebadano 84 powtórzenia.

Wartości granicy LoB (IU/ml) dla 2 serii zestawu do wykonywania testu ELISA zostały obliczone osobno, jak pokazano w Tabeli 18.

**Tabela 18. Wartości granicy LoB (IU/ml) dla 2 serii zestawu QFT-Plus ELISA Kit**

Zestaw QFT-Plus ELISA Kit	Szacunkowa wartość LoB (IU/ml)
Zestaw 1	0,030
Zestaw 2	0,040

Wyższa wartość granicy LoB, 0,040 IU/ml, w przypadku obu serii zestawu QFT-Plus ELISA kit została określona jako ostateczna wartość granicy LoB.

## Granica wykrywalności (Limit of Detection, LoD)

Dla oznaczenia QFT-Plus określono granicę wykrywalności (Limit of Detection, LoD). Pulę ludzkiego osocza negatywnego względem gruźlicy otrzymano poprzez połączenie 14 odrębnych próbek osocza. Każdy z 3 operatorów przygotował rozcieńczony buforem roztwór podstawowy referencyjnego wzorca IFN- $\gamma$  w stężeniu 1,0 IU/ml. Wykonano szereg rozcieńczeń roztworów o 8 stężeniach. Testy były wykonywane w ciągu 3 dni, przez 3 zmieniających się operatorów, przy użyciu 2 serii zestawu QFT-Plus ELISA kit. Każdego dnia testów przetestowano po 5 powtórzeń każdego stężenia z każdego szeregu rozcieńczeń, co dało 45 powtórzeń dla każdego rozcieńczenia IFN- $\gamma$  każdej serii zestawu QFT-Plus ELISA kit.

Wartość granicy LoD dla każdej przetestowanej serii zestawu QFT-Plus ELISA kit została obliczona osobno, jak pokazano w Tabeli 19.

**Tabela 19. Szacunkowe wartości granicy LoD (IU/ml) dla 2 serii zestawu QFT-Plus ELISA Kit**

Zestaw QFT-Plus ELISA Kit	Prawdopodobieństwo	Szacunkowe stężenie (IU/ml)	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności dla szacunkowego stężenia	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności dla szacunkowego stężenia
Zestaw 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Zestaw 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Wyższa wartość granicy LoD, 0,065 IU/ml, w przypadku obu serii zestawu QFT-Plus ELISA kit została określona jako ostateczna wartość granicy LoD.

## Substancje zakłócające

Przeprowadzono badanie mające na celu określenie wpływu substancji potencjalnie zakłócających na wykrywanie IFN- $\gamma$  podczas wykonywania oznaczenia QFT-Plus ELISA. Do badania wykorzystano następujące substancje zakłócające: trójglicerydy (całkowite), hemoglobinę, białko (całkowite w surowicy), bilirubinę (związaną), bilirubinę (niezwiązaną), siarczan abakawiru, cyklosporynę i prednizolon. Przygotowano pięć pul osocza ze znanym stężeniem IFN- $\gamma$  przy użyciu różnych stężeń substancji zakłócających. Pula z wyjściowym poziomem IFN- $\gamma$  została wcześniej przygotowana przy użyciu uprzednio określonej ilości obecnego IFN- $\gamma$  (około 0,21, 0,45 i 1,4 IU/ml). Pula została następnie wykorzystana do przygotowania pul z substancjami zakłócającymi. Badane stężenia substancji zakłócających wynosiły 0 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl i 20 mg/dl. Docelowe stężenia substancji zakłócających zostały określone na podstawie zakresów referencyjnych, wartości patologicznych, zakresów terapeutycznych i zakresów toksyczności lub zgodnie z zaleceniami dostawcy lub ogólnymi poziomami klinicznymi. Przetestowano sześć powtórzeń dla każdego poziomu stężenia substancji zakłócającej w próbce.

Dla każdego stężenia próbki został przeprowadzony test t dla dwóch prób, porównujący różnicę średnich wartości  $\log_{10}$  (IU/ml) głównego poziomu substancji zakłócającej i próby kontrolnej (tj. poziomu bez substancji zakłócającej), jak pokazano w Tabeli 20 i 21. Szacowana różnica w średniej odpowiedzi wraz z odpowiednimi dwustronnymi granicami 95-procentowych przedziałów ufności oraz wartość p także zostały uwzględnione.

**Tabela 20. Log10 IU/ml: Tabela z podsumowaniem testu t przedstawiająca różnice w średnich między kontrolnym i głównym poziomem substancji zakłócającej dla każdego poziomu stężenia IFN- $\gamma$  i każdej substancji zakłócającej**

Substancja zakłócająca	Poziom substancji zakłócającej	Stężenie próbki (IU/ml)	Wariancje	Różnica w średniej	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Wartość p	Powodzenie
Trójglicerydy	Wysoki	1,4	Równe	0,019	-0,040	0,077	0,491	Tak
		0,45	Równe	0,004	-0,022	0,030	0,732	Tak
		0,21	Równe	0,006	-0,035	0,047	0,759	Tak
Hemoglobina	Wysoki	1,4	Równe	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Tak
		0,45	Równe	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Tak
		0,21	Równe	0,000	-0,034	0,035	0,980	Tak
Białko	Wysoki	1,4	Równe	0,004	-0,034	0,042	0,836	Tak
		0,45	Równe	0,001	-0,38	0,040	0,962	Tak
		0,21	Równe	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Tak
Bilirubina związana	Wysoki	1,4	Równe	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Tak
		0,45	Równe	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Tak
		0,21	Równe	-0,014	0,074	0,046	0,625	Tak
Bilirubina niezwiązana	Wysoki	1,4	Równe	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Tak
		0,45	Równe	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Tak
		0,21	Równe	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Tak
Abakawir	Wysoki	1,4	Równe	0,008	-0,025	0,041	0,601	Tak
		0,45	Równe	0,012	-0,019	0,044	0,412	Tak
		0,21	Równe	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Tak

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony

**Tabela 20. Log<sub>10</sub> IU/ml: Tabela z podsumowaniem testu t przedstawiająca różnice w średnich między kontrolnym i głównym poziomem substancji zakłócającej dla każdego poziomu stężenia IFN- $\gamma$  i każdej substancji zakłócającej**

Substancja zakłócająca	Poziom substancji zakłócającej	Stężenie próbki (IU/ml)	Wariancje	Różnica w średniej	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Wartość p	Powodzenie
Cyklosporyna	Wysoki	1,4	Równe	0,014	-0,020	0,047	0,383	Tak
		0,45	Równe	0,005	-0,035	0,045	0,773	Tak
		0,21	Równe	0,024	-0,008	0,056	0,131	Tak
Prednizolon	Wysoki	1,4	Równe	0,017	-0,017	0,050	0,293	Tak
		0,45	Równe	0,000	-0,036	0,036	0,979	Tak
		0,21	Równe	0,015	-0,035	0,065	0,524	Tak

**Tabela 21. Log10 IU/ml: Tabela z podsumowaniem testu t przedstawiająca różnice w średnich między kontrolnym i wysokim poziomem substancji zakłócającej dla każdego poziomu stężenia IFN- $\gamma$  i każdej substancji zakłócającej**

Substancja zakłócająca	Poziom substancji i zakłócającej	Stężenie próbki (IU/ml)	Wariancje	Różnica w średniej	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Wartość p	Powodzenie
Trójglicerydy	Wysoki	1,4	Równe	0,053	-0,004	0,110	0,063	Tak
		0,45	Równe	0,039	-0,021	0,058	<0,001	Tak
		0,21	Równe	0,034	-0,002	0,071	0,061	Tak
Hemoglobina	Wysoki	1,4	Równe	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Tak
		0,45	Równe	0,016	-0,007	0,040	0,152	Tak
		0,21	Równe	0,014	-0,030	0,059	0,489	Tak
Białko	Wysoki	1,4	Równe	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Tak
		0,45	Równe	0,000	-0,046	0,046	0,992	Tak
		0,21	Równe	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Tak
Bilirubina związana	Wysoki	1,4	Równe	0,001	-0,046	0,048	0,961	Tak
		0,45	Równe	0,012	-0,043	0,067	0,639	Tak
		0,21	Równe	0,015	-0,044	0,074	0,586	Tak
Bilirubina niezwiązana	Wysoki	1,4	Równe	0,015	-0,011	0,042	0,231	Tak
		0,45	Równe	0,015	-0,023	0,052	0,411	Tak
		0,21	Równe	0,012	-0,033	0,057	0,566	Tak
Abakawir	Wysoki	1,4	Równe	0,013	-0,015	0,040	0,322	Tak
		0,45	Równe	0,015	-0,014	0,044	0,283	Tak
		0,21	Równe	0,008	-0,034	0,050	0,677	Tak

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony

**Tabela 21. Log<sub>10</sub> IU/ml: Tabela z podsumowaniem testu t przedstawiająca różnice w średnich między kontrolnym i wysokim poziomem substancji zakłócającej dla każdego poziomu stężenia IFN- $\gamma$  i każdej substancji zakłócającej**

Substancja zakłócająca	Poziom substancji zakłócającej	Stężenie próbki (IU/ml)	Wariancje	Różnica w średniej	Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Górna granica 95-procentowego przedziału ufności (Confidence Interval, CI)	Wartość p	Powodzenie
Cyklosporyna	Wysoki	1,4	Równe	0,002	-0,019	0,024	0,816	Tak
		0,45	Równe	0,007	-0,030	0,043	0,682	Tak
		0,21	Równe	0,015	-0,007	0,038	0,155	Tak
Prednizolon	Wysoki	1,4	Równe	0,007	-0,016	0,030	0,518	Tak
		0,45	Równe	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Tak
		0,21	Równe	0,021	-0,025	0,068	0,334	Tak

Wyniki nie wykazały istotnych różnic między głównym poziomem substancji zakłócającej i próbą kontrolną (poziom bez substancji zakłócającej) oraz dla wysokiego poziomu substancji zakłócającej z wyjątkiem trójglicerydów w stężeniu na poziomie 0,45 IU/ml. Różnica w średniej mieści się w zakresie +/- dwukrotności wartości odchyłeń standardowych. Pokazuje to, że różnica mieści się w oczekiwanym zakresie zmienności oznaczenia oraz że trójglicerydy nie mają zakłócającego wpływu na oznaczenie QFT-Plus ELISA.



## Usuwanie

Należy przestrzegać odpowiednich wytycznych dotyczących postępowania z krwią. Próbki i materiały, które wejdą w kontakt z krwią lub produktami krwiopochodnymi, należy utylizować zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.

## Literatura

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.

# Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może być przydatna w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (w celu uzyskania danych kontaktowych należy odwiedzić stronę [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentarze i wskazówki

---

### Rozwiązywanie problemów z testem ELISA

#### Rozwój niespecyficznego koloru

- |   |   |
|---|---|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki  | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu płuczącego na każdy dołek. W zależności od wykorzystywanej płytki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund. |
| b) Zanieczyszczenie krzyżowe dołków ELISA   | Aby zminimalizować ryzyko, należy uważać podczas pipetowania i mieszania próbek.  |
| c) Przetknięty zestaw/składniki   | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności używanego zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu są używane nie dłużej niż przez trzy miesiące po dacie zrekonstruowania.  |
| d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu   | W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki na odczynniki są czyste.   |
| e) Wymieszanie osocza w probówkach QFT-Plus Blood Collection Tubes przed zebraniem osocza | Po odwirowaniu i przed zebraniem osocza należy unikać pipetowania w górę i w dół i mieszania osocza w jakikolwiek sposób. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.  |

## Komentarze i wskazówki

---

### Niska gęstość optyczna odczytów wzorców

- |  |   |
|--|---|
| a) Błąd rozcieńczania wzorca           | Sprawdzić, czy rozcieńczenia wzorca dołączonego do zestawu zostały przygotowane w prawidłowy sposób, zgodnie z niniejszą instrukcją użycia.   |
| b) Błąd pipetowania                    | Pipety należy skalibrować i używać ich zgodnie z instrukcjami producenta.   |
| c) Zbyt niska temperatura inkubacji    | Inkubacja płytki do testu ELISA powinna przebiegać w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).   |
| d) Zbyt krótki czas inkubacji          | Inkubacja płytki z koniugatem, wzorcami i próbkami powinna trwać $120 \pm 5$ minut. Inkubacja roztworu substratu enzymu na płytce powinna trwać 30 minut.   |
| e) Nieprawidłowy filtr czytnika płytek | Płytkę należy odczytać przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm.  |
| f) Zbyt niska temperatura odczynników  | Przed rozpoczęciem oznaczenia wszystkie odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową. Zajmuje to około 1 godzinę.  |
| g) Przetępiony zestaw/składniki        | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności używanego zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu są używane nie dłużej niż przez 3 miesiące po dacie zrekonstruowania. |

### Duży szum tła

- |                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki   | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 $\mu\text{l}$ buforu płuczającego na każdy dołek. Może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund. |
| b) Zbyt wysoka temperatura inkubacji | Inkubacja płytki do testu ELISA powinna przebiegać w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).   |

## Komentarze i wskazówki

---














- |   |  |
|---|--|
| c) Przeteterminowany zestaw/składniki       | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu są używane nie dłużej niż przez trzy miesiące po dacie zrekonstruowania. |
| d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu | W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki na odczynniki są czyste.  |

## Nieliniowa krzywa wzorcowa i różnice między wynikami powtórzeń

- |  |  |
|--|--|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki   | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu płuczającego na każdy dołek. Może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund. |
| b) Błąd rozcieńczania wzorca   | Sprawdzić, czy rozcieńczenia wzorca zostały przygotowane w prawidłowy sposób, zgodny z niniejszą instrukcją użycia.  |
| c) Niedokładne wymieszanie   | Dokładnie wymieszać odczynniki poprzez odwracanie fiolek lub łagodne wytrząsanie przed dodaniem ich na płytkę.   |
| d) Niespójna technika pipetowania lub przerwa podczas przeprowadzania oznaczenia | Dodawanie próbki i wzorca powinno być wykonywane w sposób ciągły. Wszystkie odczynniki należy przygotować przed rozpoczęciem oznaczenia.   |

# Symbole

Poniższe symbole znajdują się w instrukcji użycia lub na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
 <N>	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Data ważności
	Ten produkt spełnia wymogi Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
	Upoważniony przedstawiciel na terytorium Wspólnoty Europejskiej/Unii Europejskiej
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału (tj. oznaczenie składnika)
	Składniki
	Zawiera
	Numer
	Globalny numer jednostki handlowej
Rn	R oznacza wydanie Instrukcji użycia, a n to numer wydania
	Zakres temperatury

## Symbol

## Definicja symbolu



Producent



Zapoznać się z instrukcją użycia



Chronić przed światłem



Ostrzeżenie/przestroga lub przestrogi — zapoznać się z dokumentacją towarzyszącą

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

Test diagnostyczny in vitro wykorzystujący koktajl peptydowy naśladujący działanie białek ESAT-6 i CFP-10 w celu stymulacji komórek w heparynizowanej krwi pełnej



Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego



Zawiera materiał biologiczny pochodzenia ludzkiego



Niepowtarzalny identyfikator wyrobu



**Symbol****Definicja symbolu**

---

**tartrazine**

Zawiera tartrazynę

**sulfuric acid**

Zawiera kwas siarkowy

# Załącznik A: Informacje techniczne

## Wyniki nieokreślone

Wyniki nieokreślone są rzadkie i mogą wynikać ze statusu immunologicznego badanych osób (5), lecz mogą także być związane z wieloma czynnikami technicznymi (np. nieprawidłowym postępowaniem z próbką do pobierania krwi, nieprawidłowym przechowywaniem próbki do pobierania krwi, niedokładnym płukaniem płytki do testu ELISA) w razie nieprzestrzegania przedstawionej powyżej instrukcji użycia.

W przypadku podejrzenia problemów technicznych z przechowywaniem odczynników, pobieraniem krwi lub postępowaniem z próbkami krwi należy powtórzyć cały test QFT-Plus z wykorzystaniem nowych próbek krwi. Powtórzenie testu ELISA osocza po stymulacji można wykonać w przypadku podejrzenia niedokładnego płukania lub innych przypadków odstępiania od określonych procedur testu ELISA. Lekarz może zdecydować o ponownym pobraniu próbki lub wykonaniu innych procedur, odpowiednio do potrzeb.

## Skrzepnięte próbki osocza

Jeśli przy długotrwałym przechowywaniu próbek osocza dojdzie do wytrącenia skrzepów fibryny, należy odwirować próbki, aby strącić skrzep i umożliwić pipetowanie osocza.

## Lipemiczne próbki osocza

Podczas pipetowania lipemicznych próbek należy zachować należyłą ostrożność, ponieważ osady z tłuszczu mogą blokować końcówki do pipety.

## Załącznik B: Skrócony opis procedury testu ELISA

1. Odczekać przynajmniej 60 minut, aż składniki testu ELISA, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, osiągną temperaturę pokojową.



2. Zrekonstruować wzorzec zestawu do stężenia 8,0 IU/ml, używając destylowanej lub dejonizowanej wody. Przygotować cztery (4) rozcieńczenia wzorca.



3. Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego 100x stężonego koncentratu koniugatu z wykorzystaniem wody destylowanej lub dejonizowanej.

4. Przygotować stężenie robocze koniugatu za pomocą zielonego rozcieńczalnika i dodać po 50 µl roztworu do każdego dołka.



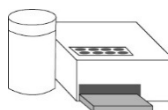
5. Dodać po 50 µl badanych próbek osocza i po 50 µl rozcieńczeń wzorca do odpowiednich dołków. Wymieszać na wytrząsarce.



6. Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej.



7. Przepłukać studzienki co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu płuczącego na każdy dołek.



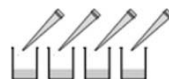
8. Dodać po 100  $\mu$ l roztworu substratu enzymu do dołków.  
Wymieszać na wytrząsarce.



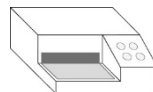
9. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.



10. Dodać po 50  $\mu$ l roztworu powstrzymującego działanie enzymu do każdego dołka. Wymieszać na wytrząsarce.



11. Odczytać wyniki przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm.



12. Przeprowadzić analizę wyników.



## Dane do zamówień

Produkt	Zawartość	Nr kat.
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	Zestaw ELISA zawierający 2 płytki	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Zestaw ELISA zawierający 20 płytek	622822
<b>Related products</b>		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 probówek (po 50 z każdego rodzaju — Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 probówek (po 25 z każdego rodzaju — Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 probówek (po 1 z każdego rodzaju — Nil, TB1, TB2 i Mitogen/ pakiet), pakiet 10	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 probówek (po 50 z każdego rodzaju — Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 probówek (po 50 z każdego rodzaju — Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	623423

QuantiFERON-TB Gold Plus  
High Altitude Single Patient  
Pack

40 probówek  
(po 1 z każdego  
rodzaju — Nil, TB1, TB2  
i Mitogen/pakiet), pakiet  
10

623222

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji użycia zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje użycia zestawów firmy QIAGEN są dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

## Historia zmian dokumentu

Data	Zmiany
R2, czerwiec 2021 r.	Dodano informacje o pakiecie do stosowania u jednego pacjenta Zmieniono zawartość tabel 10 i 11 w celu rozróżnienia danych dotyczących produktów QFT-GIT i QFT-Plus Zaktualizowano sekcję Opis i zasada procedury o informacje dotyczące populacji badanej oraz zakresu pomiarowego Dodano Tabelę 9z danymi dotyczącymi wskaźników wiarygodności w przypadku testu QFT-Plus
R3, październik 2021 r.	Przywrócono pierwotne numery katalogowe W sekcji Zawartość zestawu dodano informację o tym, że paski mikroplótkowe są przeznaczone do użytku jednorazowego
R4, marzec 2023 r.	Poprawiono formatowanie

Strona celowo pozostawiona pusta



#### **Umowa ograniczonej licencji dla zestawu QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit**

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją użycia i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji użycia oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy panel i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Panel oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji, wyrażonych ani dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik panelu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®, Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

03/2023 L1123669 1123669PL © 2023 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

Składanie zamówień [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Pomoc techniczna [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Strona WWW [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)