

# Návod k použití soupravy QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus ELISA Kit



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Verze 1

**IVD**

K diagnostickému použití in vitro

Pro použití s odběrovými zkumavkami QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus Blood Collection Tubes

**CE**<sub>0197</sub>

**REF**

622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo

R4 **MAT**

1123669CS



# Obsah

Zamýšlené použití .....	5
Určený uživatel .....	5
Popis a principy .....	6
Informace o patogenech .....	6
Shrnutí a vysvětlení .....	6
Princip analýzy .....	9
Dodávané materiály .....	11
Obsah soupravy .....	11
Součásti soupravy .....	12
Platforma a software .....	12
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky .....	13
Další reagensy .....	13
Spotřební materiály .....	13
Vybavení .....	13
Varování a bezpečnostní opatření .....	14
Informace o bezpečnosti .....	14
Informace pro případ nouze .....	15
Bezpečnostní opatření .....	16
Skladování reagensů a manipulace s nimi .....	18
Stabilita při používání .....	18
Rekonstituovaná a nepoužitá činidla .....	18
Uchovávání alikvoty a manipulace s ním .....	19

Protokol: Provedení analýzy ELISA.....	20
Výsledky (výpočty) .....	26
Generování standardní křivky a hodnot alikvotů .....	26
Kontrola kvality testu .....	28
Interpretace výsledků .....	30
Omezení .....	32
Charakteristika funkčních vlastností .....	33
Klinické studie .....	33
Citlivost .....	35
Očekávané hodnoty .....	43
Shrnutí bezpečnosti a funkčních vlastností .....	49
Charakteristika funkčních vlastností analýzy .....	50
Analytická účinnost .....	50
Likvidace .....	63
Literatura .....	64
Návod na řešení potíží .....	66
Symboly.....	69
Příloha A: Technické údaje.....	72
Nejednoznačné výsledky .....	72
Sražení vzorků plazmy .....	72
Lipemické vzorky plazmy .....	72
Příloha B: Zkrácený postup testu ELISA .....	73
Informace pro objednání.....	75
Historie revizí dokumentu .....	77

## Zamýšlené použití

Analýza QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) je diagnostický test *in vitro* s použitím směsi peptidů simulující bílkoviny ESAT-6 a CFP-10 ke stimulaci buněk v heparinizované plné krvi. Detekce interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pomocí analýzy ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se používá ke zjištění *in vitro* reakcí na tyto peptidové antigeny, které souvisí s infekcí *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus je nepřímý test infekce bacilem *M. tuberculosis* (včetně onemocnění) a je určen pro použití ve spojení s posouzením rizik, radiografií a dalšími zdravotními a diagnostickými hodnoceními.

## Určený uživatel

Tato sada je určena pro profesionální použití.

Analýza QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) je určena pro použití vyškolenými pracovníky v laboratorním prostředí.

# Popis a principy

## Informace o patogenech

Tuberkulóza je nakažlivé onemocnění způsobené infekcí komplexem mikroorganismů *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* a *M. caprae*), které se typicky přenáší na nové hostitele vzduchem v podobě kapének šířených od pacientů s tuberkulózou plic. Nově nakažený jedinec může onemocnět tuberkulózou v době od několika týdnů až po několik měsíců, ale stav většiny nakažených osob zůstává dobrý. Latentní tuberkulóza (Latent tuberculosis infection, LTBI) je nenakažlivý asymptomatický stav, který přetrvává u některých osob, u nichž se onemocnění tuberkulózou může rozvinout o několik měsíců nebo let později. Hlavním účelem diagnostikování LTBI je zvážit léčbu pro prevenci rozvoje tuberkulózy. Přes 100 let byl tuberkulinový kožní test (Tuberculin Skin Test, TST) jedinou dostupnou možností pro diagnostiku LTBI (4). Kožní reakce na tuberkulin se rozvine 2 až 10 týdnů po infekci. U některých infikovaných osob, včetně těch se širokou škálou zdravotních stavů, které narušují funkci imunitního systému, ale také bez těchto stavů, však nedochází k reakci na tuberkulin. Naopak některé osoby, u nichž je nepravděpodobné, že jsou infikováni *M. tuberculosis*, vykazují citlivost na tuberkulin a mají pozitivní výsledky TST po očkování bacilem Calmette-Guérin (BCG), po infekci jinou mykobakterií než komplexem mikroorganismů *M. tuberculosis*, nebo vlivem jiných neurčených faktorů.

LTBI musí být odlišena od aktivní tuberkulózy, což je onemocnění podléhající hlášení, které obvykle zasahuje plicí a dolní cesty dýchací, ale postiženy mohou být i jiné orgánové soustavy. Tuberkulóza je diagnostikována na základě anamnézy, fyzických, radiologických a mykobakteriologických nálezů.

## Shrnutí a vysvětlení

Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) je čtvrtou generací v technologii testování QuantiFERON-TB, která hodnotí buňkami zprostředkovanou odpověď prostřednictvím

kvantitativního měření IFN- $\gamma$  v alikvotu plné krve. QFT-Plus je kvalitativní test, který měří buněčné imunitní (Cell-Mediated Immune, CMI) odpovědi na peptidové antigeny, které simulují mykobakteriální bílkoviny. Tyto bílkoviny, ESAT-6 a CFP-10, chybí u všech kmenů BCG a většiny netuberkulózních mykobakterií s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* (1). Krev osob infikovaných komplexem *M. tuberculosis* obvykle obsahuje lymfocyty, které tyto a jiné mykobakteriální antigeny rozpoznají. Tento proces rozpoznání zahrnuje vytvoření a sekreci cytokinu, IFN- $\gamma$ . Detekce a následná kvantifikace IFN- $\gamma$  tvoří základ tohoto testu.

Tuberkulinové kožní testy a testy IGRA jsou pro diagnostiku infekce komplexem *M. tuberculosis* u nemocných pacientů užitečné, ale nedostatečné – pozitivní výsledek může podpořit diagnózu onemocnění tuberkulózou; pozitivní výsledky však mohou způsobit i infekce jinými mykobakteriemi (např. *M. kansasii*). Pro potvrzení nebo vyloučení onemocnění tuberkulózou jsou nutná další lékařská a diagnostická hodnocení.

Antigeny použité v testu QFT-Plus jsou směsí peptidů simulující bílkoviny ESAT-6 a CFP-10. V četných studiích se ukázalo, že tyto peptidové antigeny stimulují odpovědi IFN- $\gamma$  u T-buněk získaných od osob infikovaných bakterií *M. tuberculosis*, ale obecně nikoli od neinfikovaných osob nebo osob očkovaných BCG bez onemocnění nebo rizika LTBI (1,2,6,9). Nicméně léčby či stavy, které narušují funkci imunitního systému, můžou potenciálně omezit odpovědi IFN- $\gamma$ . U pacientů s některými dalšími mykobakteriálními infekcemi se také mohou vyskytnout reakce na ESAT-6 a CFP-10, protože geny těchto bílkovin se vyskytují u *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* (1,3,7).

Testovanou populací pro testování QFT-Plus jsou pacienti s klinicky potvrzenou aktivní tuberkulózou a pacienti s rizikem tuberkulózní infekce nebo latentní tuberkulózní infekce (Latent Tuberculosis Infection, LTBI). Neplatí pro ně žádná věková, genderová ani jiná omezení.

Při infekci bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) hrají CD4<sup>+</sup> T-buňky důležitou úlohu v imunologické kontrole prostřednictvím jejich sekrece cytokinu IFN- $\gamma$ . Nyní existují důkazy, že se CD8<sup>+</sup> T-buňky účastní základní obrany před infekcí MTB produkcí IFN- $\gamma$  a dalších rozpustných faktorů, které aktivují makrofágy k potlačení růstu MTB, ničení infikovaných buněk nebo přímým rozkladem MTB uvnitř buněk. U osob s LTBI a s aktivní TBC byly detekovány buňky CD8<sup>+</sup> specifické pro MTB produkující IFN- $\gamma$ . Kromě toho bylo popsáno, že CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty specifické pro ESAT-6 a CFP-10 byly častěji detekovány u subjektů s aktivní TBC v porovnání s LTBI a mohou souviset s nedávnou expozicí MTB (8,10–12). Dále CD8<sup>+</sup> T-buňky specifické pro MTB produkující IFN- $\gamma$  byly také detekovány u subjektů s aktivní TBC se souběžnou infekcí HIV (13,14) a u malých dětí s onemocněním TBC (15).

QFT-Plus obsahuje dvě odlišné zkumavky TB Antigen: zkumavku TB Antigen 1 (TB1) a zkumavku TB Antigen 2 (TB2). Obě zkumavky obsahují peptidové antigeny z antigenů spojených s komplexem MTB, ESAT-6 a CFP-10. Zkumavka TB1 i TB2 obsahuje peptidy z ESAT-6 a CFP-10, které jsou navrženy ke zjištění buněčných imunitních odpovědí CMI z CD4<sup>+</sup> pomocných T-lymfocytů, zkumavka TB2 obsahuje dodatečnou sadu peptidů zaměřenou na indukci CMI odpovědí z CD8<sup>+</sup> cytotoxických T-lymfocytů.

Rizikové faktory pro infekci bakterií *M. tuberculosis* zahrnují anamnestické, lékařské nebo epidemiologické prediktory onemocnění tuberkulózu nebo expozice tuberkulóze. Podrobná doporučení týkající se diagnostiky infekce bakterií *M. tuberculosis* (včetně onemocnění) a výběru osob k testování naleznete v nejnovějším pokynu WHO <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> (16). QFT-Plus byl testován u některých skupin pacientů indikovaných ke screeningu infekce TBC podle aktuálních pokynů WHO (16), včetně: osob, které byly pozitivně testovány na virus lidské imunodeficiencie (HIV), kontaktů nedávných pacientů s TBC a obyvatel v prostředí s vysokou koncentrací osob, kteří byli vystaveni dospělým s vysokým rizikem TBC (5).



## Princip analýzy

QFT-Plus je kvalitativní analýza, která využívá specializované zkumavky pro odběr krve obsahující peptidové antigeny simulující bílkoviny bakterie *M. tuberculosis*, které se používají k odběru plné krve. Inkubace krve probíhá ve zkumavkách po dobu 16 až 24 hodin. Po této době se odebere plazma, která je testována na přítomnost IFN- $\gamma$  produkovaného v reakci na peptidové antigeny.

Nejprve se odebere plná krev do každé zkumavky QFT-Plus Blood Collection Tubes, mezi které patří zkumavka Nil, zkumavka TB1, TB2 a zkumavka Mitogen. Krev může být také případně odebrána do jedné odběrové zkumavky, která obsahuje heparin lithný nebo sodný jako antikoagulant a poté přenesena do zkumavek QFT-Plus Blood Collection Tubes.

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

Je známo, že heterofilní (např. lidské protimyší) protilátky v séru nebo plazmě určitých jedinců způsobují interferenci s imunitními analýzami. Vliv heterofilních protilátek je v testu QFT-Plus ELISA minimalizován přidáním normálního myšího séra do zeleného ředícího roztoku a použitím monoklonálních fragmentů protilátek F(ab')<sub>2</sub> jako protilátky k zachycení IFN- $\gamma$ , kterou jsou potaženy jamky mikrotitračních destiček.

Analýza QFT-Plus je považována za pozitivní na odpověď IFN- $\gamma$ , pokud je hodnota kterékoliv zkumavky TB Antigen významně vyšší než hodnota Nil IFN- $\gamma$  IU/ml. Vzorek plazmy ze zkumavky Mitogen slouží jako pozitivní kontrola IFN- $\gamma$  pro každý testovaný vzorek. Nízká odpověď na Mitogen ( $< 0,5$  IU/ml) označuje nejednoznačný výsledek, pokud má alikvot krve také negativní odpověď na TB antigeny. K této situaci může docházet při nedostatku lymfocytů, snížené aktivitě lymfocytů v důsledku nesprávného zacházení se vzorkem, nesprávného plnění/mísení zkumavky Mitogen nebo neschopnosti lymfocytů pacienta vytvářet IFN- $\gamma$ . Při přítomnosti heterofilních protilátek nebo vlastního sekretu IFN- $\gamma$  se mohou ve vzorku objevit zvýšené hladiny IFN- $\gamma$ . Zkumavka Nil upravuje pozadí (např. zvýšené hladiny IFN- $\gamma$  v krevním oběhu nebo přítomnost heterofilních protilátek). Hladina IFN- $\gamma$  ze zkumavky Nil je odečtena od hladiny IFN- $\gamma$  ze zkumavek TB Antigen a Mitogen. Rozsah měření testu QFT-Plus ELISA je až 10 IU/ml.

# Dodávané materiály

## Obsah soupravy

<b>Součásti analýzy ELISA</b>	<b>Sada 2 destiček</b>	<b>Referenční laboratorní balení</b>
<b>Katalogové č.</b>	<b>622120</b>	<b>622822</b>
Microplate Strips (Stripy mikrotitračních destiček, 12 × 8 jamek) pokryté myší monoklonální protilátkou proti lidskému IFN- $\gamma$	2 sady stripů mikrotitračních destiček s 12 × 8 jamkami	20 sady stripů mikrotitračních destiček s 12 × 8 jamkami
IFN- $\gamma$ Standard (standardní IFN-gama), lyofylizovaný (obsahuje rekombinantní lidský IFN- $\gamma$ , bovinní kasein, Thimerosal 0,01 % hm./obj.)	1 × lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)	10 × lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)
Green Diluent (Zelený ředící roztok) (obsahuje bovinní kasein, normální myší sérum, Thimerosal 0,01 % hm./obj.)	1 × 30 ml	10 × 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Konjugát 100× koncentrát), lyofilizovaný (myší protilátkou proti lidskému IFN- $\gamma$ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01 %)	1 × 0,3 ml (po rekonstituci)	10 × 0,3 ml (po rekonstituci)
Wash Buffer 20x Concentrate (20× koncentrát promývacího činidla) (pH 7,2; obsahuje 0,05 % obj. ProClin® 300)	1 × 100 ml	10 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztok enzymového substrátu; obsahuje H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin)	1 × 30 ml	10 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Zastavovací roztok enzymů) (obsahuje 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 × 15 ml	10 × 15 ml
<i>Návod k použití soupravy QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

## Součásti soupravy

### Kontroly a kalibrátory

Analýza QFT-Plus ELISA využívá rekombinantní lidský IFN- $\gamma$  standard, jenž byl srovnán s referenčním přípravkem IFN- $\gamma$  (ref. NIH: Gxg01-902-535).

### Platforma a software

Pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků může být volitelně použit software QFT-Plus Analysis Software. Ten je k dispozici ke stažení na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

## Další reagensie

- Zkumavky pro odběr krve QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Deionizovaná nebo destilovaná voda, 2 litry

## Spotřební materiály

- Víčko na 96jamkovou destičku
- **Volitelné:** Mikrozukumavky o objemu 1 ml s víčky ve stojanech 96jamkového formátu nebo nepotažené mikrotitrační destičky s plastovým těsněním pro skladování plazmy (22 pacientů / stojan nebo destička)
- Nádobky na reagensie

## Vybavení\*

- Inkubátor  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  (s nebo bez  $\text{CO}_2$ )
- Kalibrované pipety s proměnným objemem pro dávkování  $10\ \mu\text{l}$  až  $1\ 000\ \mu\text{l}$  s jednorázovými špičkami
- Kalibrovaná vícekanálová pipeta pro dávkování  $50\ \mu\text{l}$  a  $100\ \mu\text{l}$  s jednorázovými špičkami
- Třepačka mikrotitračních destiček s 500 až 1 000 otáčkami za minutu
- Promývačka mikrotitračních destiček (z důvodu bezpečnosti při manipulaci se vzorky plazmy se doporučuje automatická promývačka destiček)
- Čtečka mikrotitračních destiček s filtrem  $450\ \text{nm}$  a referenčním filtrem  $620\ \text{nm}$  až  $650\ \text{nm}$
- Vortex s proměnlivou rychlostí
- Odstředivka schopná odstředit zkumavky pro odběr krve alespoň na  $3\ 000\ \text{RCF}$  (g)
- Odměrný válec, objem 1 litr nebo 2 litry

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

# Varování a bezpečnostní opatření

Vezměte prosím na vědomí, že podle místních předpisů od vás může být vyžadováno nahlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobci a/nebo jeho autorizovanému zástupci a regulačnímu orgánu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.

K diagnostickému použití in vitro.

## Informace o bezpečnosti

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

- Vzorokly a alikvoty jsou potenciálně infekční. Vzorokly a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Negativní výsledek testu QFT-Plus nevyklučuje možnost infekce bakterií *M. tuberculosis* nebo onemocnění tuberkulózu: falešně negativní výsledky mohou být způsobeny stádiem infekce (např. vzorek získaný před rozvojem buněčné imunitní reakce), nesprávnou manipulací se zkumavkami na odběr krve po odběru ze žíly, nesprávným provedením analýzy nebo jinými individuálními imunologickými proměnnými včetně těch, které souvisejí s případnými komorbiditami. Heterofilní protilátky nebo nespecifická produkce IFN- $\gamma$  při jiných zánětlivých stavech mohou specifické reakce na peptidy viru ESAT-6 nebo CFP-10 maskovat.


- Pozitivní výsledek testu QFT-Plus by neměl být jediným nebo definitivním základem pro stanovení infekce bakterií *M. tuberculosis*. Nesprávné provedení analýzy může způsobit falešně pozitivní výsledky testu QFT-Plus.
- Pozitivní výsledek testu QFT-Plus by měl být ověřen dalším lékařským vyšetřením na aktivní tuberkulózu (např. sčítání a kultivace pro detekci acidorezistentních tyčinek, rtg hrudníku).
- Zatímco bílkoviny ESAT-6 a CFP-10 u všech kmenů BCG a u většiny známých netuberkulózních mykobakterií chybí, je možné, že pozitivní výsledek testu QFT-Plus může být způsoben v důsledku infekce bakteriemi *M. kansasii*, *M. szulgai* nebo *M. marinum*. Pokud existuje podezření na takové infekce, je nutné provést alternativní testy.
- Falešně negativní výsledek testu QFT-Plus může být způsoben nesprávným odběrem alikvoty krve nebo nesprávnou manipulací se vzorkem, ovlivňující funkci lymfocytů. Správné zacházení se vzorky krve naleznete v části „Protokol: Provedení analýzy ELISA“ na straně 20. Prodleva v inkubaci může způsobit falešně negativní nebo nejednoznačné výsledky a další technické parametry mohou ovlivnit schopnost detekovat významnou odpověď IFN- $\gamma$ .

## Informace pro případ nouze

CHEMTREC

Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

## Bezpečnostní opatření

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

### QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



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

### QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

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

### QuantiFERON Green Diluent



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

### QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

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



## Další informace

Bezpečnostní listy: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- Thimerosal se používá jako konzervační látka v některých reagentcích testu QFT-Plus. Může být toxický po požití, vdechnutí nebo styku s kůží.
- Odchytky od informací uvedených v *návodu k použití QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* mohou způsobit chybné výsledky. Před použitím si prosím pečlivě přečtěte pokyny.
- Nepoužívejte soupravu, pokud jakákoliv láhev s činidlem vykazuje před použitím známky poškození nebo netěsnosti.
- **Důležité:** Před použitím zkontrolujte lahvičky. Nepoužívejte konjugované lahvičky ani lahvičky standardního IFN- $\gamma$ , pokud vykazují známky poškození nebo pokud došlo k porušení pryžového těsnění. Nemanipulujte s poškozenými lahvičkami. S použitím náležitých bezpečnostních opatření lahvičky bezpečně zlikvidujte. K otevření konjugovaných lahviček nebo lahviček standardního IFN- $\gamma$  doporučujeme použít dekrimpovací kleštičky, čímž se minimalizuje riziko zranění kovovým zvlněným víčkem.
- Nepoužívejte společně stripky mikrotitračních destiček, standardní IFN- $\gamma$ , zelený ředící roztok nebo 100 $\times$  koncentrát konjugátu z různých šarží souprav QFT-Plus. Ostatní reagentce (20 $\times$  koncentrát promývacího pufru, roztok enzymového substrátu a zastavovací roztok enzymů) mohou být používány z různých šarží souprav za předpokladu, že u nich nevypřela doba použitelnosti a že jsou zaznamenány informace o dané šarži.
- Nepoužité reagentce a biologické vzorky zlikvidujte v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- Nepoužívejte soupravu QFT-Plus ELISA Kit po vypršení doby použitelnosti.
- Vždy je nutno dodržovat správné laboratorní postupy.
- Zajistěte, aby laboratorní vybavení, například promývačky a čtečky destiček, bylo kalibrováno/validováno pro použití.

# Skladování reagensů a manipulace s nimi

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

## Stabilita při používání

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

## Rekonstituovaná a nepoužitá činidla

- Pokyny ke způsobu rekonstituce reagensů obsahuje část „Protokol: Provedení analýzy ELISA“ na straně 20.
- Rekonstituovaný standard soupravy může být uchovávan až po dobu 3 měsíců, pokud je skladován při teplotě 2–8 °C.

Poznačte si datum, kdy byl standard soupravy rekonstituován.

- Po rekonstituci musí být 100× koncentrát konjugátu převeden zpět na skladovací teplotu 2–8 °C a musí být spotřebován do 3 měsíců.

Poznačte si datum, kdy byl konjugát rekonstituován.

- Pracovní roztok konjugátu musí být použit do 6 hodin od přípravy.
- Pracovní roztok promývacího pufru může být uchován při pokojové teplotě po dobu až 2 týdnů.
- Stripy mikrotitračních destiček jsou určeny pouze k jednorázovému použití. Nepoužité stripy lze vyjmout z rámečku destičky a uložit pro další použití.

## Uchovávání alikvotu a manipulace s ním

Podrobnosti o postupu odběru krve pro test QFT-Plus naleznete v *návodu k použití zkumavek QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes (1123668)*.

# Protokol: Provedení analýzy ELISA

## Důležité body před zahájením používání

### Nastavení (čas potřebný k provedení analýzy)

- Aby bylo možné získat platné výsledky analýzy QFT-Plus, musí operátor provádět specifické úkony ve stanovených časech. Před použitím analýzy se doporučuje, aby operátor pečlivě naplánoval každou fázi analýzy, aby měl na provedení každé fáze dostatek času. Odhadovaný potřebný čas je uveden níže; je také uveden čas potřebný k testování více alikvotů v dávkovém zpracování.
  - Přibližně 3 hodiny pro jednu destičku ELISA
  - < 1 hodina práce
  - Pro každou další destičku přidejte 10 až 15 minut

## IFN- $\gamma$ ELISA

- Materiál potřebný k provedení analýzy ELISA je uveden v části „Obsah soupravy“, strana 11 a „Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky“, strana 13.

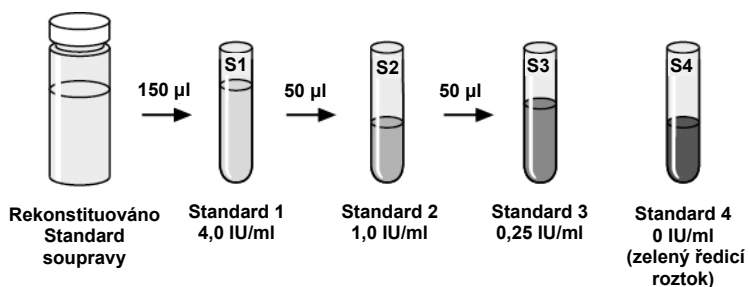
## Postup

1. Všechny vzorky plazmy a reagentie, kromě konjugátu 100× koncentráту, musejí být před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nechte temperovat alespoň 60 minut.
2. Z rámečku destičky ELISA vyjměte stripy, které nejsou vyžadovány, opět zalepte fólií, a vraťte do chladničky do doby, kdy je budete potřebovat.

3. Ponechte alespoň 1 strip pro standardy QFT-Plus a dostatečný počet stripů pro počet testovaných subjektů (viz obrázek 2, kde naleznete doporučený formát destiček). Po použití rámeček uchovejte a uzavřete pro použití se zbývajícími stripy.
- 3a. Rekonstituujte standardní IFN- $\gamma$  pomocí objemu deionizované nebo destilované vody uvedeného na štítku lahvičky. Jemně promíchejte, abyste minimalizovali pění, a zajistěte, aby se celý obsah lahvičky zcela rozpustil. Rekonstitucí standardu IFN- $\gamma$  na správný objem se získá roztok o koncentraci 8,0 IU/ml.
- 3b. Pomocí rekonstituovaného standardu připravte řadu ředění 4 koncentrací IFN- $\gamma$  (viz obrázek 1).
- 3c. Měla by být vytvořena standardní křivka s následujícími koncentracemi IFN- $\gamma$ :
- S1 (Standard 1) obsahuje 4,0 IU/ml
  - S2 (Standard 2) obsahuje 1,0 IU/ml
  - S3 (Standard 3) obsahuje 0,25 IU/ml
  - S4 (Standard 4) obsahuje 0 IU/ml (samotný zelený ředící roztok [Green Diluent, GD]).
- 3d. Standardy musejí být analyzovány alespoň v duplikátu.
- 3e. Připravte čerstvá ředění standardu soupravy pro každou relaci testu ELISA.

### Postup

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



**Obrázek 1. Příprava standardní křivky s řadou ředění.**

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

**Tabulka 1. Příprava konjugátu (pracovní roztok)**

Počet stripů	Objem konjugátu (100× koncentrát)	Objem zeleného ředícího roztoku
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Vzorky plazmy odebrané ze zkumavek pro odběr krve, které byly následně uloženy (ochlazeny nebo zmrazeny), před přidáním do jamky analýzy ELISA důkladně promíchejte. Vzorky plazmy lze uchovávat v odstředěných zkumavkách QFT-Plus Blood Collection Tubes po dobu až 28 dní při teplotě 2–8 °C. Případně lze odebrané vzorky plazmy uchovávat po dobu až 28 dní při teplotě 2–8 °C. Odebrané vzorky plazmy lze také dlouhodobě skladovat při teplotě nižší než –20 °C (nejlépe při teplotě do –70 °C).

Vzorky plazmy je možné za účelem měření naplnit/používat přímo z odstředěných zkumavek pro odběr krve do destičky QFT-Plus ELISA.

**Důležité:** Jestliže mají být vzorky plazmy přeneseny přímo z odstředěných zkumavek QFT-Plus Blood Collection Tubes, plazmu nepromíchejte. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

6. Přidejte 50 µl čerstvě připraveného pracovního roztoku konjugátu do jednotlivých jamek destičky ELISA.

7. Přidejte 50 µl vzorku plazmy pro test do příslušných jamek (viz doporučené rozvržení destičky ELISA na obrázku 2).

8. Nakonec přidejte po 50 µl Standardů 1 až 4 do příslušných jamek destičky (viz doporučené uspořádání destičky ELISA na obrázku 2). Standardy by měly být analyzovány alespoň v duplikátu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<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

**Obrázek 2. Doporučené uspořádání destiček ELISA.** S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (vzorek 1. kontrolní plazma Nil), 1 TB1 (vzorek 1. plazma TB1), 1 TB2 (vzorek 1. plazma TB2), 1M (vzorek 1. plazma Mitogen).

9. Zakryjte destičku ELISA a promíchejte důkladně konjugát a vzorky plazmy / standardy pomocí třepačky mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty při otáčkách 500 až 1 000 ot/min. Zabraňte stříkání.
10. Zakryjte destičku ELISA a inkubujte při pokojové teplotě ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) po dobu  $120 \pm 5$  minut. Destička ELISA by během inkubace neměla být vystavena přímému slunečnímu světlu. Odchylení od předepsaného rozmezí teplot může vést k chybným výsledkům.
11. Během inkubace destičky ELISA připravte pracovní roztok promývacího pufru. Zředte jeden díl promývacího pufru  $20\times$  koncentrátu 19 díly deionizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte. K dispozici je dostatek promývacího pufru  $20\times$  koncentrátu k přípravě 2 litrů pracovního promývacího pufru.
12. Po dokončení inkubace destičky ELISA promyjte jamky destičky ELISA 400 µl pracovního roztoku promývacího pufru. Promývací krok proveďte nejméně 6krát. Při manipulaci se vzorky plazmy se z bezpečnostních důvodů doporučuje automatická promývačka destiček.



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

Do odpadního zásobníku by měl být přidán standardní laboratorní dezinfekční prostředek a je nutné dodržovat zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.

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

## Výsledky (výpočty)

Pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků může být použit software QFT-Plus Analysis Software. Ten je k dispozici na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Ujistěte se, že používáte nejnovější verzi softwaru QFT-Plus Analysis Software.

Software provádí vyhodnocení kontroly kvality analýzy, vytváří standardní křivku a poskytuje výsledky testu pro každý subjekt, jak je uvedeno v části „Interpretace výsledků“ na straně 30. Software hlásí všechny koncentrace vyšší než 10 IU/ml jako „> 10“, protože tyto hodnoty jsou mimo validovaný lineární rozsah analýzy ELISA.

Jako alternativa k použití softwaru QFT-Plus Analysis Software je možné výsledky stanovit dle následující metody.

### Generování standardní křivky a hodnot alikvotů

#### Pokud není použit software QFT-Plus Analysis Software

Pokud není použit software QFT-Plus Analysis Software, stanovení standardní křivky a určení hodnot IU/ml u alikvotu vyžaduje tabulkový procesor, například Microsoft® Excel®.

#### Použití tabulkového procesoru

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

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

## Výpočet vzorku

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

**Tabulka 2. Standardní křivka**

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

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

Pomocí kritérií, uvedených v části „Kontrola kvality testu“ na straně 28, se určí platnost analýzy.

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

**Tabulka 3. Výpočet vzorku**

Antigen	Hodnota OD	Log <sub>(e)</sub> hodnoty OD	X	e <sup>X</sup> (IU/ml)	Antigen–Nil (IU/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	–
TB1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,16
TB2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Hodnoty IFN- $\gamma$  (v IU/ml) pro TB1, TB2 a Mitogen jsou korigovány na pozadí odečtením hodnoty IU/ml získané pro příslušnou kontrolu Nil. Tyto korigované hodnoty se používají pro interpretaci výsledků testu.

## Kontrola kvality testu

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

Aby byla analýza ELISA platná:

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

Software QFT-Plus Analysis Software vypočítá tyto parametry kontroly kvality a vytvoří zprávu.

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

**Poznámka:** Plazma s přidaným rekombinantním IFN- $\gamma$  vykazuje snížení koncentrace až o 50 % při skladování při teplotě 2–8 °C a –20 °C. Rekombinantní IFN- $\gamma$  se nedoporučuje pro stanovení kontrolních standardů.

# Interpretace výsledků

Výsledky testu QFT-Plus jsou interpretovány pomocí následujících kritérií (tabulka 4).

**Důležité:** Diagnostika nebo vyloučení onemocnění tuberkulózou a posouzení pravděpodobnosti LTBI vyžaduje použití kombinace epidemiologických, historických, zdravotních a diagnostických nálezů, které musí být vzaty v úvahu při interpretaci výsledků testu QFT-Plus. Viz obecné pokyny k diagnostice a léčbě onemocnění TBC a LTBI: (<https://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/default.htm>).

**Tabulka 4. Interpretace výsledků testu QFT-Plus**

Nil (IU/ml)	TB1 mínus Nil (IU/ml)	TB2 mínus Nil (IU/ml)	Mitogen mínus Nil (IU/ml)*	Výsledek testu QFT-Plus	Zpráva/Interpretace
≤ 8,0	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Jakákoliv	Jakákoliv	Pozitivní†	Infekce <i>M. tuberculosis</i> je pravděpodobná
	Jakákoliv	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil			
	< 0,35 nebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,35 nebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	≥ 0,50	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	< 0,35 nebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,35 nebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,50	Nejednoznačný‡	Pravděpodobnost infekce <i>M. tuberculosis</i> není možné stanovit
> 8,0§	Jakákoliv				

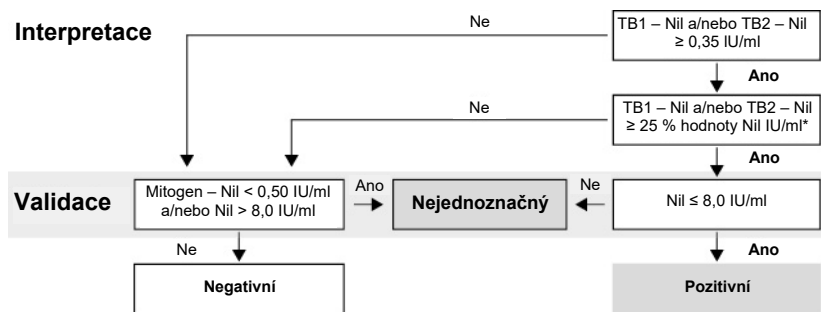
\* Odezvy na pozitivní kontrolu Mitogen (a občas na TB Antigen) mohou být mimo rozsah čtečky mikrotitračních destiček. To nemá žádný dopad na výsledky testu. Hodnoty > 10 IU/ml označuje software QFT-Plus jako > 10 IU/ml.

† V případech, kdy neexistuje podezření na infekci bakterií *M. tuberculosis*, mohou být původně pozitivní výsledky ověřeny opakovaným testováním původních vzorků plazmy v duplikátu analýzou QFT-Plus ELISA. Pokud je opakované testování jednoho nebo obou replikátů pozitivní, považuje se výsledek testu za pozitivní.

‡ Možné příčiny viz část „Návod na řešení potíží“, strana 66.

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

Magnituda měřené hladiny IFN- $\gamma$  se nemůže korelovat se stádiem nebo stupněm infekce, úrovní imunitní odpovědi nebo pravděpodobností progresu do aktivního onemocnění. Pozitivní odezva TBC u osob, které jsou negativní na Mitogen je vzácná, ale docházelo k ní u pacientů s aktivní TBC. To indikuje, že odezva IFN- $\gamma$  na TB antigeny je větší než na Mitogen, což je možné, protože hladina Mitogenu nestimuluje produkci IFN- $\gamma$  lymfocyty maximálně.



**Obrázek 3. Interpretace testu QFT-Plus.** \*Aby byly hodnoty TB1 mínus Nil nebo TB2 mínus Nil platné, musí být hodnota  $\geq 25\%$  Nil IU/ml ze stejné zkumavky jako původní výsledek  $\geq 0,35$  IU/ml.

## Omezení

Výsledky testu QFT-Plus musí být použity společně s epidemiologickou anamnézou každého jedince, současným zdravotním stavem a dalšími diagnostickými hodnoceními.

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

- Prediktivní hodnota pozitivního výsledku testu QFT-Plus při diagnostice infekce *M. tuberculosis* závisí na pravděpodobnosti infekce, která se posuzuje na základě anamnestických, epidemiologických, diagnostických a dalších zjištění.
- Diagnóza LTBI vyžaduje, aby onemocnění tuberkulózou bylo vyloučeno lékařským zhodnocením včetně posouzení aktuálních lékařských a diagnostických testů na toto onemocnění, jak je uvedeno.
- Negativní výsledek je třeba zvážit spolu s lékařskými záznamy a údaji z anamnézy jednotlivce, které se týkají pravděpodobnosti infekce *M. tuberculosis* potenciálního rizika progrese onemocnění tuberkulózou, zejména u jedinců s oslabenou imunitní funkcí.

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

- Odchylky od postupu popsaného v návodu k použití
- Nesprávná přeprava vzorku krve / manipulace s ním
- Zvýšené hladiny IFN- $\gamma$  v krevním oběhu nebo přítomnost heterofilních protilátek
- Překročení validované doby od odběru vzorku krve do inkubace Viz *návod k použití zkumavek pro odběr krve QFT-Plus Blood Collection Tubes (1123668)*.



# Charakteristika funkčních vlastností

## Klinické studie

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný definitivní standardní test pro potvrzení nebo vyloučení diagnózy infekce LTBI, nelze pro test QFT-Plus prakticky vyhodnotit odhad citlivosti a specificity. Přibližná specifická testu QFT-Plus byla stanovena vyhodnocením míry falešně pozitivních výsledků u osob s nízkým rizikem (bez známých rizikových faktorů) tuberkulózní infekce. Přibližná citlivost byla stanovena vyhodnocením skupin subjektů studie s aktivním onemocněním TBC potvrzeným kultivací. Kromě toho byly vyhodnoceny funkční vlastnosti analýzy z hlediska pozitivní a negativní míry u populace zdravých osob se zjištěnými rizikovými faktory tuberkulózní infekce (populace se smíšeným rizikem).

## Specifická

Byla provedena multicentrická studie hodnotící klinickou specifickou testu QFT-Plus, která zahrnovala 733 subjektů studie, u nichž bylo předpokládáno buď nízké riziko infekce bakterií *M. tuberculosis*, nebo nebyly předpokládány žádné rizikové faktory pro vystavení infekci či onemocnění. Demografické informace a rizikové faktory expozice TBC byly stanoveny pomocí standardizovaného dotazníku během testování. Studie byla provedena na čtyřech nezávislých pracovištích, včetně jednoho ve Spojených státech, dvou v Japonsku a jednoho v Austrálii. Test QFT-Plus byl porovnáván s testem QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Souhrn údajů o klinické specifické, stratifikované podle místa studie a regionu, je uveden v tabulce 5. Výsledky výkonnosti jsou založeny na celkovém počtu platných testů. Nebyly zjištěny žádné nejednoznačné výsledky.

**Tabulka 5. Specificita testu QFT-Plus v populaci s nízkým rizikem**

Pracoviště	N	Pozitivní		Negativní		Nejednoznačný		Specificita (95% CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
<b>Spojené státy</b>									
(č. 1) USA-4	212	2	4	210	208	0	0	99,06 % (210/212) (96,63– 99,74)	98,11 % (208/212) (95,25– 99,26)
<b>Japonsko</b>									
(č. 2) JPN-3	106	1	2	105	104	0	0	99,06 % (105/106) (94,85– 99,83)	98,11 % (104/106) (93,38– 99,48)
(č. 3) JPN-1	216	3	5	213	211	0	0	98,61 % (213/216) (96,00– 99,53)	97,69 % (211/216) (94,70– 99,01)
Japonsko celkem	322	4	7	318	315	0	0	98,76 % (318/322) (96,85– 99,52)	97,83 % (315/322) (95,6– 98,9)
<b>Austrálie</b>									
(č. 4) AU-3	199	8	9	191	190	0	0	95,98 % (191/199) (92,27– 97,95)	95,48 % (190/199) (91,63– 97,60)

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

Rozdělení výsledků podle typu zkumavky TB Antigen a jejich kombinací je uvedeno jako příklad očekávaných výsledků v populaci s nízkým rizikem (tabulka 6).

**Tabulka 6. Výsledky studie specifity testu QFT-Plus podle zkumavky TB Antigen**

Interpretace na základě TB Antigenu – Nil				
IU/ml v	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitivní u TB1 a/nebo TB2)*	Konkordantní pozitivita TB1 a TB2 (alternativní analýza)†
Pozitivní	10	18	20	8
Negativní	723	715	713	725
Nejednoznačný	0	0	0	0
Specifita (95% CI)	–	–	97,3 % (713/733) (95,8–98,2)	–
Míra negativity (95 % CI)	98,6 % (723/733) (97,5–99,3)	97,5 % (715/733) (96,2–98,4)	–	98,9 % (725/733) (97,9–99,5)

\* Interpretace založená na hodnotě TB antigenu – Nil  $\geq 0,35$  IU/ml v obou (TB1 a TB2) nebo v jedné ze zkumavek TB, aby splňovala interpretační kritéria pro stanovení positivity QFT- Plus (TB1 nebo TB2).

† Alternativní analýza je uvedena pouze pro informaci.

U subjektů s nízkým rizikem infekce TBC mělo pozitivní výsledek celkem 20/733 subjektů. Z nich pouze 8 subjektů mělo hodnotu  $> 0,35$  IU/ml ve zkumavkách TB1 i TB2. Ve studijní kohortě s nízkým rizikem bylo provedeno srovnání analýz QFT a QFT- Plus, které ukázalo celkovou shodu 97,5 % (715/733) a míru negativní shody 98,3 % (707/719).

## Citlivost

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný definitivní standardní test pro LTBI, je vhodnou náhradou mikrobiologická kultivace *M. tuberculosis*, protože infekce TBC je nezbytným předstupněm onemocnění.

Byla provedena multicentrická studie hodnotící klinickou citlivost QFT-Plus, která zahrnovala 434 subjektů studie, u nichž se vyskytly známky a příznaky aktivního onemocnění vyvolaného bakterií *M. tuberculosis*, potvrzené kultivací a/nebo PCR, a kteří nebyli léčeni na

TBC nebo byli léčeni  $\leq 14$  dní před odběrem krve. Studie byla provedena na 7 nezávislých pracovištích, včetně tří pracovišť ve Spojených státech, tří pracovišť v Japonsku a jednoho pracoviště v Austrálii. Test QFT-Plus byl porovnáván s testem QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT). Souhrn údajů o klinické citlivosti, stratifikované podle místa studie a země, je uveden v tabulce 7. Výsledky výkonnosti jsou založeny na celkovém počtu platných testů. Četnost nejednoznačných výsledků pro QFT a QFT-Plus byla 2,3 % (10/434), respektive 2,5 % (11/434).

**Tabulka 7. Shrnutí výkonnosti studie klinické citlivosti stratifikované podle místa, země a celkově**

Pracoviště	N	Pozitivní		Negativní		Nejednoznačný		Citlivost (95 % CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
<b>Spojené státy</b>									
(č. 1) USA-5	15	13	13	2	2	0	0	86,67 % (13/15) (62,12– 96,26)	86,67 % (13/15) (62,12– 96,26)
(č. 2) USA-1	33	29	29	4	4	0	0	87,88 % (29/33) (72,67– 95,18)	87,88 % (29/33) (72,67– 95,18)
(č. 3) USA-4	5	5	5	0	0	0	0	100,0 % (5/5) (56,55– 100,0)	100,0 % (5/5) (56,55– 100,0)
Spojené státy celkem	53	47	47	6	6	0	0	88,7 % (47/53) (77,4– 94,7)	88,7 % (47/53) (77,4–94,7)
<b>Japonsko</b>									
(č. 4) JPN-2	76	72	67	1	3	3	6	98,63 % (72/73) (92,64– 99,76)	95,71 % (67/70) (88,14– 98,53)
(č. 5) JPN-3	99	97	98	2	1	0	0	97,98 % (97/99) (92,93– 99,44)	98,99 % (98/99) (94,50– 99,82)

Tabulka pokračuje na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

**Tabulka 7. Shrnutí výkonnosti studie klinické citlivosti stratifikované podle místa, země a celkově (pokračování)**

Pracoviště	N	Pozitivní		Negativní		Nejednoznačný		Citlivost (95 % CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(č. 6) JPN-1	177	159	157	12	15	6	5	92,98 % (159/171) (88,14– 95,94)	91,28 % (157/172) (86,11– 94,64)
Japonsko celkem	352	328	322	15	19	9	11	95,63 % (328/343) (92,91– 97,33)	94,43 % (322/341) (91,5– 96,4)
<b>Austrálie</b>									
(č. 7) AU-2	29	27	29	1	0	1	0	96,43 % (27/28) (82,29– 99,37)	100,0 % (29/29) (88,30– 100,0)

Analýza ve výše uvedené tabulce nezahrnuje nejednoznačné výsledky.

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

Rozdělení výsledků podle typu zkumavky TB Antigen a kombinace zkumavek je uvedeno jako příklad očekávaných výsledků u populace s potvrzenou infekcí TBC (tabulka 8).

**Tabulka 8. Výsledky studie citlivosti testu QFT-Plus podle zkumavky TB antigen**

Interpretace na základě TB Antigenů – Nil v IU/ml	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitivní u TB1 a/nebo TB2)
Pozitivní	388	397	398
Negativní	32	26	25
Nejednoznačný	14	11	11
Citlivost* (95 % CI)	–	–	94 % (398/423) (91,4–96,0)
Míra pozitivity* (95 % CI)	92,4 % (388/420) (89,4–94,6)	93,9 % (397/423) (91,1–95,8)	–

\* s vyloučením nejednoznačných hodnot

Srovnání analýz QFT a QFT-Plus bylo hodnoceno v kohortě s kulturačně potvrzenou aktivní TBC (kohorty studie citlivosti) a ukázalo celkovou shodu 95,9 % a míru pozitivní shody 97,3 % (391/402).

**Tabulka 9. Poměry pravděpodobnosti u testu QFT-Plus**

Pracoviště*	Citlivost	Specificita	LR+	LR-
Austrálie	100,00 %	95,48 %	22,11	0,00
Japonsko	94,43 %	97,83 %	43,44	0,06
Spojené státy	88,68 %	98,11 %	47,00	0,12

\*Celkem

## Výkonnost u osob s identifikovanými rizikovými faktory pro infekci MTB (osoby se smíšeným rizikem)

Kohorta 601 osob se smíšenými rizikovými faktory pro infekci TBC (např. HIV pozitivita, anamnéza léčby aktivní nebo latentní TBC, expozice aktivnímu případu TBC, status HCW atd.) byla hodnocena pomocí testů QFT i QFT-Plus. Rizikové faktory byly identifikovány pomocí standardizovaného dotazníku a jedinci v době náboru nevykazovali žádné příznaky spojené s aktivní TBC. Demografické údaje a rizikové faktory jsou uvedeny v tabulce 10. V této populaci mělo 68/601 (11,3 %) osob pozitivní výsledek testu QFT-Plus, přičemž míra pozitivní shody (positive percent agreement, PPA) činila 98,44 % a míra negativní shody (Negative Percent Agreement, NPA) činila 99,07 % (tabulka 11). V této kohortě 68 subjektů s pozitivním výsledkem testu QFT-Plus bylo celkem 62 subjektů pozitivních jak u zkumavky TB1, tak u zkumavky TB2, 2 subjekty byly pozitivní pouze u zkumavky TB1 a 4 subjekty byly pozitivní pouze u zkumavky TB2. Nebyly zaznamenány žádné nejednoznačné výsledky (0/601).



**Tabulka 10. Demografické údaje a faktory spojené s rizikem infekce TBC ve smíšené kohortě**

<b>Celkem subjektů (601)</b>		<b>Počet</b>	<b>Procento</b>
Pohlaví	Mužské	539	89,7 %
	Ženské	62	10,3 %
Věk (roky)	Rozsah	18–70	–
	Průměr	46,7	
Očkování BCG	Ano	15	2,5 %
	Ne	586	97,5 %
HIV pozitivní nebo pozitivní test na HTLV viry	Ano	12	2,0 %
	Ne	589	98 %
Dřívější diagnóza aktivní TBC	Ano	11	1,8 %
	Ne	590	98,2 %
Pozitivní tuberkulinový kožní test (Tuberculin Skin Test, TST) / Mantouxova zkouška na TBC	Ano	47	7,8 %
	Ne	554	92,2 %
Dřívější léčba aktivní nebo latentní TBC	Ano	35	5,8 %
	Ne	566	94,2 %
Pobyt, práce nebo dobrovolnická činnost (> 1 měsíc) ve vězení	Ano	373	62,1 %
	Ne	228	37,9 %
Pobyt, práce nebo dobrovolnická činnost (> 1 měsíc) v útulku pro bezdomovce	Ano	525	87,4 %
	Ne	76	12,6 %
Pracovník ve zdravotnictví	Ano	8	1,3 %
	Ne	593	98,7 %
Blízký kontakt s osobou s aktivním onemocněním TBC nebo s podezřením na toto onemocnění	Ano	9	1,5 %
	Ne	592	98,5 %

**Tabulka 11. Souhrnná výkonnost testu QFT-Plus oproti QFT u osob se známými rizikovými faktory pro latentní TBC infekci**

		QFT		
		Pozitivní (+)	Negativní (-)	Celkem
QFT-Plus	Pozitivní (+)	63	5*	68
	Negativní (-)	1*	532	533
	Celkem	64	537	601

\*Všech 6 neshodných alikvotů mělo hladiny IFN- $\gamma$  ve zkumavkách TB Antigen Tube, které se blížily mezní hodnotě analýzy.

Míra pozitivní shody (Positive Percent Agreement, PPA) a míra negativní shody (Negative Percent Agreement, NPA) mezi výsledky testů QFT a QFT-Plus byly následující:

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

Tabulka 12 níže znázorňuje výkonnost testu QFT-Plus ve srovnání s testem QFT u subjektů studie očkovaných BCG vakcínou.

**Tabulka 12. Výkonnost testu QFT-Plus ve srovnání s testem QFT u subjektů studie očkovaných BCG vakcínou (kombinované údaje z citlivosti, specifity a subjektů studie LTBI)**

		QFT		
		Pozitivní (+)	Negativní (-)	Celkem
QFT-Plus	Pozitivní (+)	66	5	71
	Negativní (-)	3	268	271
	Celkem	69	273	342*

\*Dva subjekty studie citlivosti byly z analýzy vyloučeny z důvodu nejednoznačných výsledků

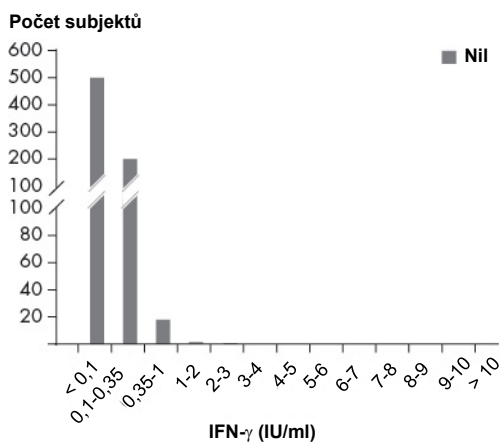
- PPA = 95,6 % (66/69), 95 % CI (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2 % (268/273), 95 % CI (95,79, 99,22)

## Očekávané hodnoty

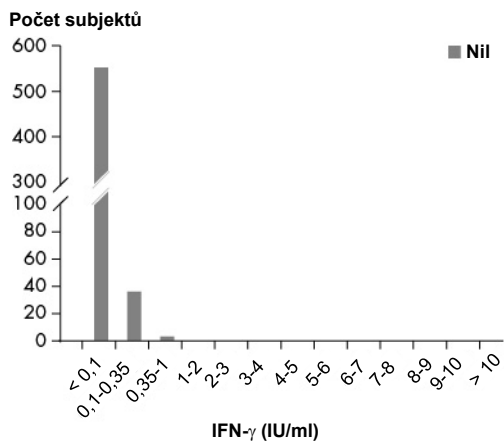
### Pozorované distribuce reakcí – stratifikace dle rizika

Během klinických hodnocení byla pozorována řada různých reakcí testu IFN- $\gamma$  na zkumavky TB1, TB2 a kontrolní zkumavky a byly stratifikovány podle rizika infekce *M. tuberculosis* (obrázky 4 až 7). Skupina se smíšeným rizikem se skládá ze zástupců pacientů a subjektů ze všeobecné testované populace, včetně subjektů s rizikovými faktory expozice TBC i bez nich a u nichž nebyl pravděpodobný výskyt aktivní TBC (tj. LTBI).

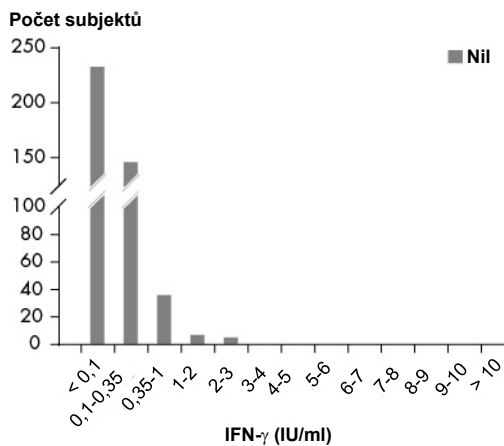
A



B

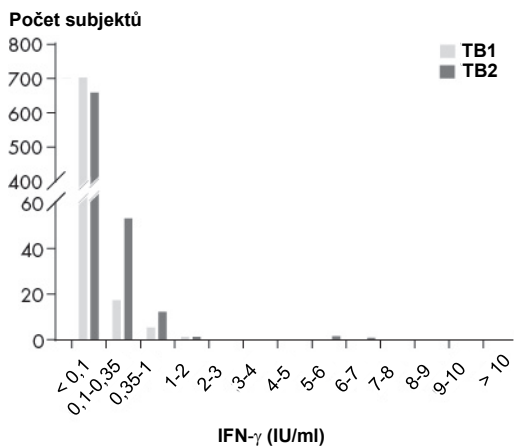


C

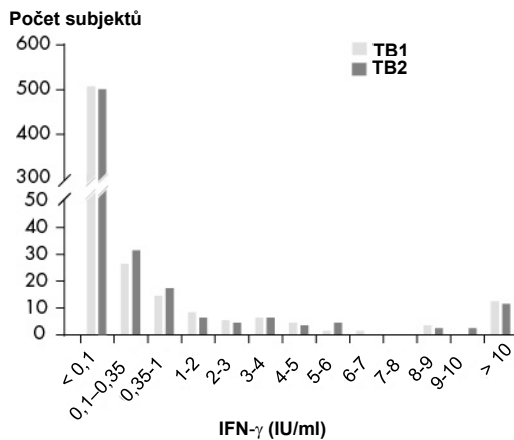


**Obrázek 4. Distribuce Nil.** **A** Distribuce hodnot Nil u populace s nízkým rizikem (n = 744). **B** Distribuce hodnot Nil u populace se smíšeným rizikem (n = 601). **C** Distribuce hodnot Nil u populace s infekcí *M. tuberculosis* potvrzenou kultivací (n = 416).

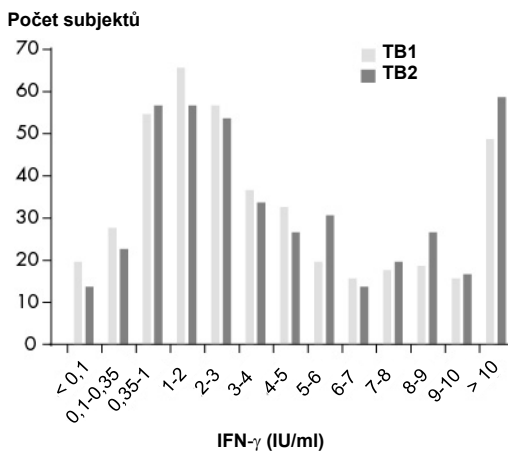
A



B

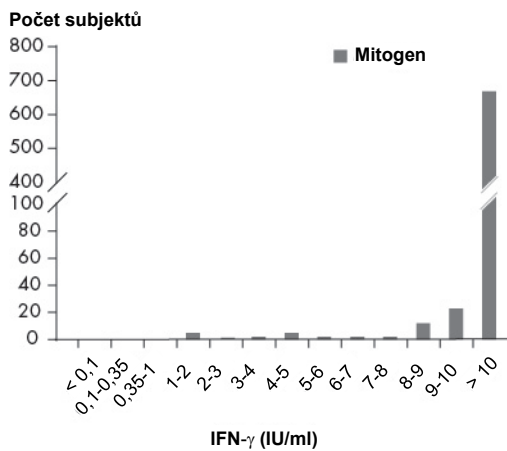


C

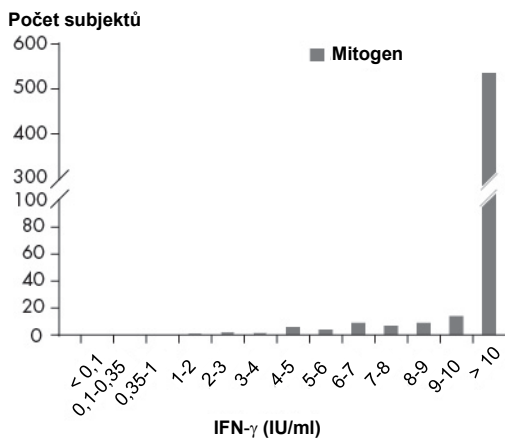


**Obrázek 5. Distribuce TB1 a TB2 (Nil odečteno).** **A** Distribuce hodnot TB1 a TB2 (Nil odečteno) u populace s nízkým rizikem (n = 744). **B** Distribuce hodnot TB1 a TB2 (Nil odečteno) u populace se smíšeným rizikem (n = 601). **C** Distribuce hodnot TB1 a TB2 (Nil odečteno) u populace s infekcí *M. tuberculosis* potvrzenou kultivací (n = 416).

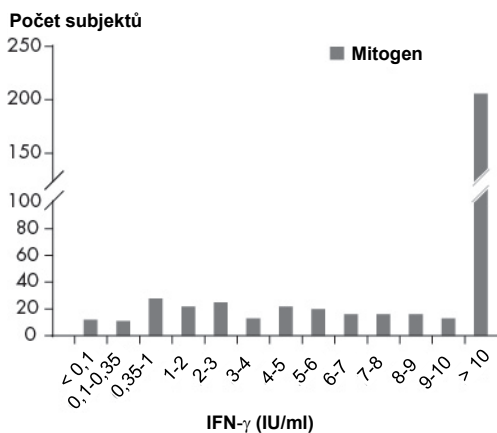
A



B

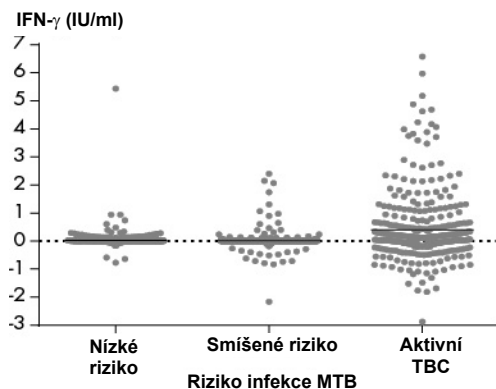


C



**Obrázek 6. Distribuce Mitogenu (Nil odečteno).** **A** Distribuce hodnot Mitogenu (Nil odečteno) u populace s nízkým rizikem (n = 744). **B** Distribuce hodnot Mitogenu (Nil odečteno) u populace se smíšeným rizikem (n = 601). **C** Distribuce hodnot Mitogenu (Nil odečteno) u populace s infekcí *M. tuberculosis* potvrzenou kultivací (n = 415).





**Obrázek 7. Pozorovaný rozdíl mezi hodnotami TB1 a TB2 (Nil odečteno), stratifikovaný podle rizika.** Zahrnuje údaje z kohortové studie se smíšeným rizikem, které ukazují rozdíly mezi kohortami s nízkým rizikem, aktivním rizikem a smíšeným rizikem. Tato analýza dat zahrnovala kohortu se smíšeným rizikem se známými rizikovými faktory. Proto z kohorty s nízkým rizikem  $n = 733$ , z kohorty se smíšeným rizikem  $n = 588$  a z kohorty s aktivní TBC  $n = 357$ . Kvantitativní rozdíl pro každý subjekt v IU/ml byl získán odečtením hodnoty TB1 od hodnoty TB2.

## Shrnutí bezpečnosti a funkčních vlastností

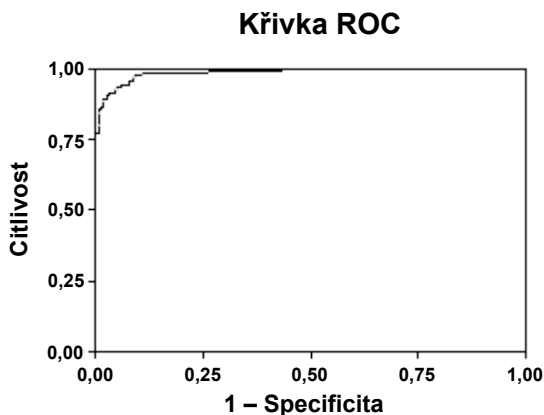
Shrnutí bezpečnosti a funkčních vlastností naleznete na webových stránkách EUDAMED.

# Charakteristika funkčních vlastností analýzy

## Analytická účinnost

### Mezní hodnota analýzy

Mezní hodnota analýzy QFT-Plus byla stanovena na základě údajů od 216 subjektů bez identifikovaných rizikových faktorů pro expozici TBC, kteří byli očkováni BCG vakcínou a u nichž se předpokládá, že jsou bez infekce, a 118 subjektů s infekcí bakterií *M. tuberculosis* potvrzenou kultivací. Údaje o citlivosti a specifičnosti byly zkombinovány a analyzovány pomocí analýzy křivky ROC (Receiver Operator Characteristic). Údaje o citlivosti a specifičnosti analyzované pomocí analýzy ROC ukázaly, že optimální mezní hodnota analýzy ELISA je 0,35 IU/ml (viz obrázek 8).



**Obrázek 8. Křivka ROC pro odpovědi ESAT-6 a CFP-10.**

**Tabulka 13. Hodnoty citlivosti a specifacity pro test ELISA při různých mezních hodnotách**

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

Tabulka pokračuje na další straně

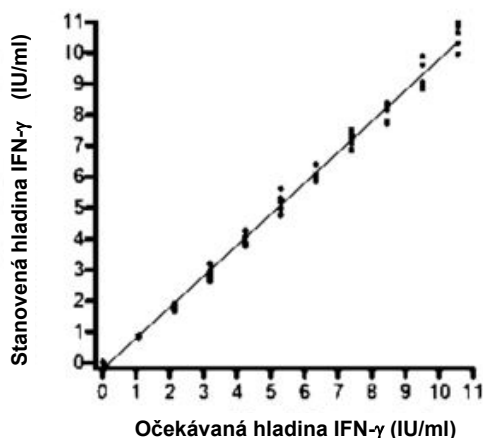
Pokračování tabulky z předchozí strany

**Tabulka 13. Hodnoty citlivosti a specifity pro test ELISA při různých mezních hodnotách**

Mezní hodnota IU/ml IFN- $\gamma$	Citlivost %	95 % CI	Specifita %	95 % CI	Citlivost + specifita
0,47	85,59	77,94 % až 91,38 %	99,08	96,71 % až 99,89 %	184,67
0,48	84,75	76,97 % až 90,70 %	99,08	96,71 % až 99,89 %	183,83
0,50	83,90	76,00 % až 90,02 %	99,08	96,71 % až 99,89 %	182,98

## Linearita

Linearita analýzy QFT-Plus ELISA se prokázala náhodným umístěním 5 replikátů 11 směsí plazmy se známými koncentracemi IFN- $\gamma$  na destičku ELISA. Křivka lineární regrese měla směrnici  $1,002 \pm 0,011$  a korelační koeficient 0,99 (obrázek 9).



**Obrázek 9. Ilustrace studie linearity s regresní analýzou – High Pool Mean =  $-0,24 + 0,9964 -$  očekáváno.**

## Reprodukovatelnost

Byla provedena multicentrická studie reprodukovatelnosti s cílem vyhodnotit výkonnost testu QFT-Plus na různých pracovištích provádějících studii s více operátory. Jednalo se o prospektivní studii prováděnou na třech externích pracovištích provádějících test a jednom pracovišti odběru. Do studie bylo zařazeno celkem 32 pozitivních a 34 negativních subjektů (stanoveno testem QFT). Subjekty studie tvořili pracovníci ve zdravotnictví ve Spojených státech. Subjekty studie představovaly skupiny se smíšeným rizikem expozice TBC vzhledem k jejich povolání nebo vzhledem k tomu, že šlo o pracovníky ve zdravotnictví narozené v zahraničí, kteří pocházeli z oblasti s výskytem tuberkulózy vyšším než 50 na 100 000 obyvatel.

Od každého subjektu studie byly na pracovišti odběru získány tři zkumavky pro odběr krve s heparinem lithným. Zkumavky pro odběr krve s heparinem lithným byly poté převezeny na každé ze tří pracovišť provádějících test, kde byly alikvotovány do dvou sad zkumavek pro odběr krve QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen a Nil) a poté testovány v souladu s postupem analýzy QFT-Plus. Na každém pracovišti prováděli dva testy pro každý subjekt studie nezávisle na sobě nejméně dva operátoři. Jednotliví operátoři nebyli obeznámeni s výsledky získanými druhým operátorem ani výsledky testu QFT u subjektu studie.

Na všech třech pracovištích provádějících test bylo získáno šest výsledků pro každý z 66 subjektů studie, což představuje celkem 396 datových bodů. Přehled souhrnných výsledků reprodukovatelnosti je uveden v tabulce 14.

**Tabulka 14. Shrnutí výsledků studie reprodukovatelnosti – shoda kvalitativních výsledků mezi operátory v rámci pracoviště v %; N = 66 patientských vzorků**

<b>Pracoviště 1 – 2 operátoři</b>	<b>Pracoviště 2 – 2 operátoři</b>	<b>Pracoviště 3 – 3 operátoři</b>
64/66 = 96,97 % Shoda kvalitativních výsledků soupravy zkumavek 1 a soupravy zkumavek 2	64/66 = 96,97 % Shoda kvalitativních výsledků soupravy zkumavek 1 a soupravy zkumavek 2	59/66 = 89,39 % Shoda kvalitativních výsledků soupravy zkumavek 1 a soupravy zkumavek 2

Kvalitativní míra shody na všech pracovištích provádějících studii je 94,7 % (375/396). Při tomto výpočtu zahrnuje celkový počet shodných výsledků testů (375) kombinaci případů, kdy je shoda všech 6 výsledků, shoda 5 ze 6 výsledků, shoda 4 ze 6 výsledků a shoda 3 ze 6 výsledků.

## Opakovatelnost mezi šaržemi

Byla provedena studie s cílem stanovit variabilitu mezi jednotlivými šaržemi zkumavek pro odběr krve QFT-Plus Blood Collection Tubes ve srovnání se zkumavkami QFT. Celkem bylo testováno 30 subjektů (15 potvrzených TBC pozitivních a 15 potvrzených TBC negativních pomocí testu QFT). Do této studie byly zahrnuty tři samostatné šarže zkumavek pro odběr krve QFT-Plus TB1, TB2 a QFT TB Blood Collection Tubes. Byly testovány tři replikáty na dárce a šarži zkumavky pro odběr krve. Zkumavky Nil a Mitogen byly testovány vždy s jedním replikátem.

Krev každého subjektu byla odebrána do zkumavek pro odběr krve s heparinem lithným a poté byl 1 ml krve přenesen do každé zkumavky QFT-Plus and QFT Blood Collection Tubes a testován v souladu s postupem analýzy. Pro každou skupinu pozitivních a negativních alikvotů nesměl být celkový rozptyl výsledků zkumavek QFT- Plus významně větší než celkový rozptyl výsledků zkumavek QFT. To bylo stanoveno na základě p-hodnoty dané Levenovým testem homogenity rozptylu (Homogeneity of Variance, HOV). Pokud p-hodnota nebyla signifikantní ( $p > 0,05$ ) a/nebo rozptyl zkumavek QFT-Plus TB byl nižší než rozptyl zkumavek QFT TB, pak mezi zkumavkami QFT-Plus a QFT TB Tubes existoval rozptyl.

**Tabulka 15. Porovnání rozptylu mezi zkumavkami pro odběr krve QFT-Plus a QFT TB Blood Collection Tubes pomocí Levenova HOV testu**

Typ alikvoty	Rozdíl	Účinek	Závislý	P-hodnota	Významný
Pozitivní	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Reziduum	0,0378	Ano
Pozitivní	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Reziduum	0,0540	Ne
Negativní	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Reziduum	0,1025	Ne
Negativní	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Reziduum	0,6344	Ne

Rozptyl mezi zkumavkami pro odběr krve QFT-Plus a QFT TB Blood Collection Tubes nebyl významný s výjimkou zkumavky QFT-Plus TB2 při testování s pozitivními subjekty. Při analýze odhadu směrodatné odchytky byl rozptyl pozorovaný u zkumavky QFT-Plus TB2 menší (0,06089) než u zkumavky QFT TB (0,07641), jak ukazuje tabulka 16. Rozptyl zkumavek pro odběr krve QFT-Plus TB1 Tube a TB2 Blood Collection Tubes tedy nebyl větší než u zkumavky QFT TB Blood Collection Tube.

**Tabulka 16. Směrodatná odchytky pro reziduum a 95% interval spolehlivosti pro pozitivní subjekty**

Typ alikvotu	Podtyp	Odhad směrodatné odchytky	95 % LCL	95 % UCL
Pozitivní	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Pozitivní	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Pozitivní	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

## Opakovatelnost v rámci šarže

Byla provedena studie k posouzení reprodukovatelnosti v rámci šarže zkumavek pro odběr krve QFT-Plus Blood Collection Tubes porovnáním koncentrace IFN- $\gamma$  z replikátů zkumavek pro odběr krve QFT-Plus TB Blood Collection Tubes.

Šest alikvotů jednoho vzorku krve od stejných subjektů s potvrzenou TBC infekcí bylo provedeno v 6 opakovaných zkumavkách pro odběr krve vždy z jedné šarže obou zkumavek QFT-Plus Tubes (TB1 a TB2). Testování bylo provedeno u 13 subjektů. Pro každého dárce zvlášť a pro všechny dárce bylo vypočteno % CV a vytvořeno průměrné % CV, jak je uvedeno v tabulce 17.

**Tabulka 17. % CV pro průměr, směrodatnou odchylku, minimum, medián a maximum v každé zkumavce pro odběr krve QFT-Plus TB Blood Collection Tube u subjektů pozitivních na TBC**

QFT-Plus Tube	Objem alikvotu	Průměr (%CV)	Směrodatná odchylka	Minimální	Medián	Maximální
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Výsledky ukázaly, že průměrné % CV pro TB1 a TB2 bylo ~13 %, což splňuje kritéria přijatelnosti  $\leq 30$  % a prokazuje opakovatelnost v rámci šarže.

### Mez slepého alikvotu (Limit of Blank, LoB)

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

Hodnoty LoB (IU/ml) pro 2 šarže soupravy ELISA byly vypočteny samostatně, jak je uvedeno v tabulce 18.

**Tabulka 18. Hodnoty LoB (IU/ml) pro 2 šarže soupravy QFT-Plus ELISA Kit**

QFT-Plus ELISA Kit	Odhadovaná hodnota LoB (IU/ml)
Souprava 1	0,030
Souprava 2	0,040

Vyšší hodnota LoB, 0,040 IU/ml, z obou šarží soupravy QFT-Plus ELISA Kit, byla uvedena jako konečná hodnota LoB.



## Limit detekce (Limit of Detection, LoD)

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

Hodnota LoD pro každou z testovaných šarží soupravy QFT-Plus ELISA kit byla vypočtena samostatně, jak je uvedeno v tabulce 19.

**Tabulka 19. Odhadované hodnoty LoD (IU/ml) pro 2 šarže soupravy QFT-Plus ELISA Kit**

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

Jako konečná hodnota LoD byla uvedena vyšší hodnota LoD vypočtená pro obě šarže soupravy QFT-Plus ELISA kit – 0,065 IU/ml.

### Interferující látky

Byla provedena studie s cílem stanovit vliv potenciálních interferujících látek na účinnost detekce IFN- $\gamma$  při analýze QFT-Plus ELISA. Interferující látky zahrnuté do tohoto testování byly: triglyceridy (celkové), hemoglobin, protein (celkové sérum), bilirubin (konjugovaný), bilirubin (nekonjugovaný), abakavir sulfát, cyklosporin a prednisolon. Bylo připraveno pět plazmatických směsí se známými koncentracemi IFN- $\gamma$  s použitím různých koncentrací interferujících látek. Základní hladina IFN- $\gamma$  ve směsi byla předem připravena s předem stanoveným množstvím IFN- $\gamma$  (přibližně 0,21, 0,45 a 1,4 IU/ml). Tato směs byla poté použita k přípravě směsí interferujících látek. Testované koncentrace interferujících látek byly 0 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl a 20 mg/dl. Cílové koncentrace interferujících látek byly založeny na referenčních intervalech, patologických hodnotách, terapeutických rozmezích a toxických rozmezích nebo podle doporučení prodejce či obecných klinických úrovní. Pro každou úroveň koncentrace vzorku interferujících látek bylo testováno šest replikátů.

Pro každou koncentraci alikvotu byl proveden dvouvýběrový t-test, který porovnával rozdíly střední hodnoty log<sub>10</sub> (IU/ml) primární hladiny interferující látky s kontrolou (tj. hladinou bez interferující látky), jak je uvedeno v tabulce 20 a 21. Byl rovněž uveden odhadovaný rozdíl v průměrné odpovědi spolu s odpovídajícími oboustrannými 95% mezemi spolehlivosti a p-hodnotou.

**Tabulka 20. Log10 IU/ml: Souhrnná tabulka t-testu pro rozdíly středních hodnot mezi kontrolní hladinou a primární hladinou interferující látky pro každou interferující látku a každou úroveň koncentrace IFN- $\gamma$**

Interferující látka	Hladina interferující látky	Koncentrace alikvoty (IU/ml)	Rozptyly	Rozdíl střední hodnoty	Dolní 95% CI	Horní 95% CI	P-hodnota	Splněno
Triglyceridy	Vysoká	1,4	Rovna	0,019	-0,040	0,077	0,491	Ano
		0,45	Rovna	0,004	-0,022	0,030	0,732	Ano
		0,21	Rovna	0,006	-0,035	0,047	0,759	Ano
Hemoglobin	Vysoká	1,4	Rovna	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Ano
		0,45	Rovna	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Ano
		0,21	Rovna	0,000	-0,034	0,035	0,980	Ano
Protein	Vysoká	1,4	Rovna	0,004	-0,034	0,042	0,836	Ano
		0,45	Rovna	0,001	-0,38	0,040	0,962	Ano
		0,21	Rovna	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Ano
Konjugovaný bilirubin	Vysoká	1,4	Rovna	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Ano
		0,45	Rovna	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Ano
		0,21	Rovna	-0,014	0,074	0,046	0,625	Ano
Nekonjugovaný bilirubin	Vysoká	1,4	Rovna	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Ano
		0,45	Rovna	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Ano
		0,21	Rovna	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Ano
Abakavir	Vysoká	1,4	Rovna	0,008	-0,025	0,041	0,601	Ano
		0,45	Rovna	0,012	-0,019	0,044	0,412	Ano
		0,21	Rovna	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Ano

Tabulka pokračuje na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

**Tabulka 20. Log<sub>10</sub> IU/ml: Souhrnná tabulka t-testu pro rozdíly středních hodnot mezi kontrolní hladinou a primární hladinou interferující látky pro každou interferující látku a každou úroveň koncentrace IFN- $\gamma$**

Interferující látka	Hladina interferující látky	Koncentrace alikvoty (IU/ml)	Rozptyly	Rozdíl střední hodnoty	Dolní 95% CI	Horní 95% CI	P-hodnota	Splněno
Cyklosporin	Vysoká	1,4	Rovna	0,014	-0,020	0,047	0,383	Ano
		0,45	Rovna	0,005	-0,035	0,045	0,773	Ano
		0,21	Rovna	0,024	-0,008	0,056	0,131	Ano
Prednisolon	Vysoká	1,4	Rovna	0,017	-0,017	0,050	0,293	Ano
		0,45	Rovna	0,000	-0,036	0,036	0,979	Ano
		0,21	Rovna	0,015	-0,035	0,065	0,524	Ano

**Tabulka 21. Log<sub>10</sub> IU/ml: Souhrnná tabulka t-testu pro rozdíly středních hodnot mezi kontrolní hladinou a vysokou hladinou interferující látky pro každou interferující látku a každou úroveň koncentrace IFN- $\gamma$**

Interferující látka	Hladina interferující látky	Koncentrace alikvoty (IU/ml)	Rozptyly	Rozdíl střední hodnoty	Dolní 95% CI	Horní 95% CI	P-hodnota	Splněno
Triglyceridy	Vysoká	1,4	Rovna	0,053	-0,004	0,110	0,063	Ano
		0,45	Rovna	0,039	-0,021	0,058	< 0,001	Ano
		0,21	Rovna	0,034	-0,002	0,071	0,061	Ano
Hemoglobin	Vysoká	1,4	Rovna	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Ano
		0,45	Rovna	0,016	-0,007	0,040	0,152	Ano
		0,21	Rovna	0,014	-0,030	0,059	0,489	Ano
Protein	Vysoká	1,4	Rovna	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Ano
		0,45	Rovna	0,000	-0,046	0,046	0,992	Ano
		0,21	Rovna	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Ano
Konjugovaný bilirubin	Vysoká	1,4	Rovna	0,001	-0,046	0,048	0,961	Ano
		0,45	Rovna	0,012	-0,043	0,067	0,639	Ano
		0,21	Rovna	0,015	-0,044	0,074	0,586	Ano
Nekongugovaný bilirubin	Vysoká	1,4	Rovna	0,015	-0,011	0,042	0,231	Ano
		0,45	Rovna	0,015	-0,023	0,052	0,411	Ano
		0,21	Rovna	0,012	-0,033	0,057	0,566	Ano
Abakavir	Vysoká	1,4	Rovna	0,013	-0,015	0,040	0,322	Ano
		0,45	Rovna	0,015	-0,014	0,044	0,283	Ano
		0,21	Rovna	0,008	-0,034	0,050	0,677	Ano

Tabulka pokračuje na další straně

Pokračování tabulky z předchozí strany

**Tabulka 21. Log10 IU/ml: Souhrnná tabulka t-testu pro rozdíly středních hodnot mezi kontrolní hladinou a vysokou hladinou interferující látky pro každou interferující látku a každou úroveň koncentrace IFN- $\gamma$**

Interferující látka	Hladina interferující látky	Koncentrace alikvoty (IU/ml)	Rozptyly	Rozdíl střední hodnoty	Dolní 95% CI	Horní 95% CI	P-hodnota	Splněno
Cyklosporin	Vysoká	1,4	Rovna	0,002	-0,019	0,024	0,816	Ano
		0,45	Rovna	0,007	-0,030	0,043	0,682	Ano
		0,21	Rovna	0,015	-0,007	0,038	0,155	Ano
Prednisolon	Vysoká	1,4	Rovna	0,007	-0,016	0,030	0,518	Ano
		0,45	Rovna	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Ano
		0,21	Rovna	0,021	-0,025	0,068	0,334	Ano

Výsledky neprokázaly žádné významné rozdíly mezi primární hladinou interferující látky a kontrolou (hladina bez interferující látky) a pro vysokou hladinu interferující látky s výjimkou hladiny koncentrace triglyceridů 0,45 IU/ml. Rozdíl střední hodnoty byl stanoven v rozmezí +/- 2 směrodatné odchylky. To dokazuje, že rozdíl je v rámci očekávané variability analýzy a že triglyceridy neměly rušivý vliv na analýzu QFT-Plus ELISA.

## Likvidace

Dodržujte příslušné postupy pro zacházení s krví. Alikvoty a materiály, které byly v kontaktu s krví nebo krevními produkty, likvidujte v souladu s federálními, státními a místními předpisy.

# 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.

# Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Technickou pomoc a více informací vám poskytne naše Centrum technické podpory na webových stránkách [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (kontaktní údaje naleznete na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentáře a návrhy

---

### Řešení potíží s analýzou ELISA

#### Nespecifické zbarvení

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

#### Nízké hodnoty optické hustoty pro standardy

## Komentáře a návrhy

---

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

## Vysoké pozadí

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

## Komentáře a návrhy

---















- d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla.

### Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátu

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

# Symbols

V návodu k použití anebo na obalu a značení jsou uvedeny následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
	Obsahuje dostatek reagií pro <N> reakcí
	Použijte do
	Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
	Zplnomocněný zástupce pro Evropské společenství / Evropskou unii
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (tj. označení dílu)
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Globální číslo obchodní položky GTIN
	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Teplotní rozmezí

## Symbol

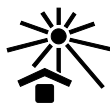
## Definice symbolu



Výrobce



Viz návod k použití



Chraňte před světlem



Varování/upozornění nebo Upozornění, viz průvodní dokumenty

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

Diagnostický test in vitro používající směsi peptidů simulující bílkoviny ESAT-6 a CFP-10 ke stimulaci buněk v heparinizované plné krvi



Obsahuje biologický materiál živočišného původu



Obsahuje biologický materiál lidského původu



Jedinečný identifikátor zařízení

## Symbol

## Definice symbolu

---

**tartrazine**

Obsahuje tartrazin

**sulfuric acid**

Obsahuje kyselinu sírovou

# Příloha A: Technické údaje

## Nejednoznačné výsledky

Nejednoznačné výsledky jsou vzácné a mohou souviset se stavem imunity testovaných osob (5), avšak mohou se také vztahovat k množství technických faktorů (např. nevhodná manipulace se zkumavkami pro odběr krve, neúplné promytí destiček ELISA), pokud není dodržován výše uvedený návod k použití.

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

## Sražení vzorků plazmy

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

## Lipemické vzorky plazmy

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



## Příloha B: Zkrácený postup testu ELISA

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



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

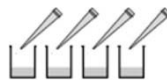


3. Rekonstituujte mrazem sušený konjugát 100x koncentrát pomocí destilované nebo deionizované vody.

4. Připravte pracovní roztok konjugátu v zeleném ředicím roztoku a do všech jamek přidejte 50  $\mu$ l.



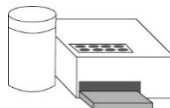
5. Do příslušných jamek přidejte 50  $\mu$ l testovaných vzorků plazmy a 50  $\mu$ l standardů. Promíchejte pomocí třepačky.



6. Inkubujte po dobu 120 minut při pokojové teplotě.



7. Promyjte jamky alespoň 6krát pomocí 400  $\mu$ l promývacího pufru na jamku.



8. Přidejte do jamek 100  $\mu$ l roztoku enzymového substrátu. Promíchejte pomocí třepačky.



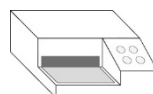
9. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě.



10. Přidejte do jamek 50  $\mu$ l zastavovacího roztoku enzymů.  
Promíchejte pomocí třepačky.



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



12. Proveďte analýzu výsledků.



## Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
QuantIFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	Souprava ELISA se 2 destičkami	622120
QuantIFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Souprava ELISA se 20 destičkami	622822
<b>Related products</b>		
QuantIFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 zkumavek (po 50 zkumavkách Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	622526
QuantIFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 zkumavek (po 25 zkumavkách Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	622423
QuantIFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 zkumavek (po 1 zkumavce Nil, TB1, TB2 a Mitogen / balení), balení 10 kusů	622222
QuantIFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 zkumavek (po 50 zkumavkách Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	623526
QuantIFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 zkumavek (po 50 zkumavkách Nil, TB1, TB2 a Mitogen)	623423
QuantIFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 zkumavek (po 1 zkumavce Nil, TB1, TB2 a Mitogen / balení), balení 10 kusů	623222

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příslušném návodu k použití soupravy QIAGEN. Návody k použití k soupravám QIAGEN jsou k dispozici na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od oddělení technických služeb společnosti QIAGEN či místního distributora.

## Historie revizí dokumentu

<b>Datum</b>	<b>Změny</b>
R2, červen 2021	Zahrnutý informace o balení pro jednoho pacienta Tabulky 10 a 11 byly revidovány, aby se rozlišily údaje o QFT-GIT a QFT-Plus. Aktualizována část Popis a principy o informace o testované populaci a rozsahu měření Přidána tabulka 9, aby byly doplněny údaje o poměru pravděpodobnosti QFT-Plus.
R3, říjen 2021	Katalogové číslo vráceno zpět na původní katalogová čísla Přidáno prohlášení o jednorázovém použití pro stripy mikrotitračních destiček v části Obsah soupravy
R4, březen 2023	Opravy formátování

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

### Omezená licenční smlouva pro soupravu QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit

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

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

Pro aktualizovanou licenční ustanovení viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

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

03/2023 L1123669 1123669CS © 2023 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)