



Март 2023 г.

Инструкции за употреба на набора QuantiFERON[®]-TB Gold Plus ELISA Kit



2 × 96 (622120)



20 × 96 (622822)

Версия 1

IVD

За инвитро диагностика

За употреба с QuantiFERON[®]-TB Gold Plus Blood Collection
Tubes

CE₀₁₉₇

REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Германия

R4 **MAT**

1123669BG

Съдържание

Предвидена употреба	5
Потребители, за които е предназначен	5
Описание и принцип	6
Информация за патогена	6
Кратко изложение и обяснение	7
Принципи на анализа	10
Предоставени материали	12
Съдържание на набора	12
Компоненти на набора	13
Платформа и софтуер	13
Необходими, но непредоставени материали	14
Допълнителни реактиви	14
Консумативи	14
Оборудване	14
Предупреждения и предпазни мерки	15
Информация за безопасността	15
Информация за спешни случаи	16
Предпазни мерки	17
Съхранение и боравене с реактиви	19
Стабилност при употреба	19
Разтворени и неизползвани реактиви	19
Съхранение и работа с проби	20

Протокол: Извършване на ELISA	21
Резултати (Изчисления)	27
Генериране на стандартна крива и стойности на алиquotната част	27
Качествен контрол на теста	29
Интерпретиране на резултатите	31
Ограничения	33
Работни характеристики	34
Клинични проучвания	34
Чувствителност	37
Очаквани стойности	44
Обобщение на безопасността и ефективността	50
Характеристики на ефективността на анализа	51
Характеристики на анализа	51
Изхвърляне	65
Цитирани източници	66
Ръководство за отстраняване на проблеми	68
Символи	71
Приложение А: Техническа информация	74
Неопределени резултати	74
Плазмени проби със съсиреци	74
Липемични плазмени проби	74
Приложение В: Съкратена процедура на теста ELISA	75
Информация за поръчка	77
Хронология на редакциите на документа	78

Предвидена употреба

Анализът QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) представлява тест за *инвитро* диагностика, който използва пептиден коктейл, симулиращ протеините ESAT-6 и CFP-10, за стимулиране на клетките в хепаринизирана цяла кръв. Откриването на интерферон- γ (IFN- γ) чрез ензимно свързан имunosорбентен анализ (ELISA) се използва за идентифициране на *инвитро* отговорите към онези пептидни антигени, които се свързват с инфекция с *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus е индиректен тест за инфекция с *M. tuberculosis* (включително заболяване) и е предназначен за съвместна употреба с оценка на риска, рентгенография и други медицински и диагностични оценки.

Потребители, за които е предназначен

Този набор е предназначен за професионална употреба.

Анализът QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) трябва да се използва от обучен персонал в лабораторна среда.

Описание и принцип

Информация за патогена

Туберкулозата е заразна болест, причинявана от инфекция с микроорганизми от комплекса *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, и *M. Caprae*), които обикновено се разпространяват в нови гостоприемници по въздушно-капков път от пациенти с туберкулозно заболяване на дихателната система. Инфектираният индивид може да се разболее от туберкулоза в рамките на седмици или месеци, но повечето такива индивиди остават в добро здравословно състояние. Латентната туберкулозна инфекция (ЛТБИ), която представлява незаразно асимптомно състояние, персистира при някои от тях, като тези индивиди могат да развият туберкулоза месеци или години по-късно. Основната цел на диагностицирането на ЛТБИ е да се обсъди медикаментозно лечение за предотвратяване на туберкулозно заболяване. В продължение на повече от 100 години туберкулиновият кожен тест (ТКТ) беше единственият наличен метод за диагностициране на (4) ЛТБИ. Кожната чувствителност към туберкулин се развива от 2 до 10 седмици след инфектирането. Въпреки това някои инфектирани индивиди, включително и такива с най-различни състояния, възпрепятстващи имунните функции, както и други индивиди без тези състояния, не реагират на туберкулин. И обратно, някои индивиди с малка вероятност за инфекция с *M. tuberculosis* показват чувствителност към туберкулин и имат положителни ТКТ резултати след ваксинация с бацила на Calmette-Guérin (BCG), инфекция с микобактерии, различни от комплекса *M. tuberculosis*, или неустановени други причинители.

ЛТБИ трябва да се разграничава от туберкулозно заболяване – състояние, което подлежи на докладване и обикновено засяга белите дробове и долните дихателни пътища, въпреки че и други органи системи могат да бъдат засегнати. Туберкулозното заболяване се диагностицира на базата на анамнестични, физикални, рентгенологични и микобактериологични находки.

Кратко изложение и обяснение

Тестът QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) е четвърто поколение технология за изследване на QuantiFERON-TB, която оценява клетъчно-медирания отговор чрез количествено измерване на IFN- γ в проба от цяла кръв. QFT-Plus е качествен тест, който измерва клетъчно-медираните имунни (cell-mediated immune, CMI) отговори спрямо пептидни антигени, които симулират микобактериални протеини. Тези протеини – ESAT-6 и CFP-10 – липсват във всички BCG щамове и в повечето нетуберкулозни микобактерии с изключение на *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum* (1). Лицата, инфектирани с микроорганизми от комплекса *M. tuberculosis*, обикновено имат в кръвта си лимфоцити, които разпознават тези и други микобактериални антигени. Този процес на разпознаване включва образуване и секретирание на цитокина IFN- γ . Откриването и последващото количествено определяне на IFN- γ е в основата на този тест.

Туберкулиновите кожни тестове и тестовете IGRA са полезни, но недостатъчни за диагностициране на инфекция с комплекса от *M. tuberculosis* при болни пациенти – положителният резултат може да подкрепи диагнозата на туберкулозно заболяване; въпреки това инфекциите с други микобактерии (напр. *M. kansasii*) също могат да доведат до положителни резултати. Необходими са и други медицински и диагностични оценки за потвърждаване или изключване на туберкулозно заболяване.

Използваните в QFT-Plus антигени представляват пептиден коктейл, симулиращ протеините ESAT-6 и CFP-10. Многобройни проучвания са показали, че тези пептидни антигени стимулират отговори спрямо IFN- γ в Т-клетки от индивиди, инфектирани с *M. tuberculosis*, но по принцип не и от неинфектирани или ваксинирани с BCG лица без заболяване или риск за ЛТБИ (1,2,6,9). Медикаментозни лечения или състояния, които нарушават имунните функции, обаче потенциално могат да отслабят отговорите към IFN- γ . Пациенти с някои други микобактериални инфекции също могат да бъдат чувствителни към ESAT-6 и CFP-10, тъй като гените, кодиращи тези протеини, са налице в *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum* (1,3,7).

Популацията за тестване с QFT-Plus са пациенти с клинично потвърдена активна туберкулоза и пациенти с риск от туберкулозна инфекция или латентна туберкулозна инфекция (ЛТБИ). Не се прилагат възрастови, полови или други ограничения.

При инфекцията *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), CD4⁺ Т-клетките играят роля с критично значение в имунологичния контрол чрез секретиране на цитокина IFN- γ . Понастоящем има данни в подкрепа на ролята на CD8⁺ Т-клетките, участващи в защитата на гостоприемника срещу MTB чрез произвеждане на IFN- γ и други разтворими фактори, които активират макрофагите за потискане на растежа на MTB, убиване на инфектираните клетки или директно лизиране на интрацелуларния MTB. Произвеждащи IFN- γ специфични за MTB CD8⁺ клетки се откриват при пациенти с активна TB с активна ЛТБИ. Освен това специфичните за ESAT-6 и CFP-10 CD8⁺ Т-лимфоцити се описват като по-често откривани при пациенти с активно туберкулозно заболяване, в сравнение с ЛТБИ, и може да бъдат свързани със скорошна експозиция на MTB (8,10-12). В допълнение, специфичните за MTB CD8⁺ Т-клетки, произвеждащи IFN- γ , също се откриват при пациенти с активна туберкулоза и ко-инфекция с HIV (13, 14), както и при малки деца с туберкулозно заболяване (15).

QFT-Plus разполага с две отделни епруветки с туберкулозен антиген: TB Antigen Tube 1 (TB1) и TB Antigen Tube 2 (TB2). И двете епруветки съдържат пептидни антигени от свързани с комплекса MTB антигени, ESAT-6 и CFP-10. Епруветките TB1 и TB2 съдържат пептиди от ESAT-6 и CFP-10, които са предназначени да предизвикат клетъчно-медирирани имунни (cell-mediated immune, CMI) отговори от помощните CD4⁺ Т-лимфоцити; епруветката TB2 съдържа допълнителен набор от пептиди, насочени към индуциране на CMI отговори от цитотоксичните CD8⁺ Т-лимфоцити.

Рисковите фактори за инфекция с *M. tuberculosis* включват анамнестични, медицински или епидемиологични предиктори за заболяване от туберкулоза или излагане на туберкулоза. Направете справка с най-новото ръководство на СЗО <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> за подробни препоръки относно диагностицирането на инфекция с *M. tuberculosis* (включително заболяване) и подбора на лица за изследване (16). QFT-Plus е тестван при някои групи пациенти, показани за скрининг за туберкулозна инфекция съгласно настоящите насоки на СЗО (16), включително: лица, които са дали положителен резултат за човешки имунодефицитен вирус (ХИВ), контактни лица на скорошни пациенти с туберкулоза, обитатели на места с висока концентрация на туберкулозно болни и възрастни с висок риск от туберкулоза (5).

Принципи на анализа

QFT-Plus е качествен анализ, който използва специализирани епруветки за вземане на кръв, съдържащи пептидни антигени, симулиращи протеини на *M. tuberculosis*, които се използват за взимане на цяла кръв. Инкубирането на кръвта става в епруветките в продължение на 16 до 24 часа, след което плазмата се събира и се тества за наличието на IFN- γ , продуциран в отговор на пептидните антигени.

Първо се взема цяла кръв във всяка от епруветките QFT-Plus Blood Collection Tubes, които включват епруветка Nil, епруветка TB1, епруветка TB2 и епруветка Mitogen. Алтернативно, кръвта може да се вземе в епруветка за еднократно вземане на кръв с литиев или натриев хепарин като антикоагулант и след това да се прехвърли в QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Епруветките QFT-Plus Blood Collection Tubes се разклащат, за да се смесят антигените с кръвта и трябва да се инкубират при температура $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ възможно най-скоро и в рамките на 16 часа след вземането. След инкубационен период от 16 до 24 часа епруветките се центрофугират, плазмата се обработва и количеството на IFN- γ (IU/ml) се измерва чрез ELISA. QFT-Plus ELISA използва рекомбинантен човешки IFN- γ стандарт, който е анализиран спрямо референтен IFN- γ (NIH реф.: Gxg01-902-535). Резултатите от тестовите аликвотни части се отчитат в международни единици на ml (IU/ml) в сравнение със стандартната крива, генерирана чрез тестване на разреждания на стандарта, предоставен в набора.

Известно е, че хетерофилните (напр. човешки антимиши) антитела в серума или плазмата на определени лица предизвикват интерференция с имунни анализи. Ефектът на хетерофилните антитела в QFT-Plus ELISA е сведен до минимум чрез добавяне на нормален миши серум към зеления разреждател и използването на F(ab')₂ фрагменти на моноклонално антитяло като IFN- γ антитяло, с което са покрити микроплаките.

Анализът QFT-Plus се счита за положителен за IFN- γ отговор към която и да епруветка с туберкулозния антиген, който е значително над стойността Nil за IFN- γ в IU/ml. Плазмената проба от епруветката с Mitogen служи като IFN- γ положителна контрола за всяка тествана проба. Слабият отговор към Mitogen (<0,5 IU/ml) посочва неопределен резултат, когато кръвната аликвотна част също е с отрицателен отговор към туберкулозните антигени. Това може да се получи при недостатъчно лимфоцити, намалена лимфоцитна активност поради неправилно обработване на пробата, напълване/смесване на епруветката с Mitogen или невъзможност на лимфоцитите на пациента да произведат IFN- γ . Завишени нива на IFN- γ в аликвотната част Nil може да възникнат при наличие на хетерофилни антитела или при характерно секретиране на IFN- γ . Епруветката Nil регулира фона (напр. завишени нива на циркулиращ IFN- γ или наличие на хетерофилни антитела). Нивото на IFN- γ за епруветката Nil се изважда от нивото на IFN- γ за епруветките с туберкулозен антиген и епруветката с Mitogen. Измервателният диапазон на QFT-Plus ELISA е до 10 IU/ml.

Предоставени материали

Съдържание на набора

Компоненти на ELISA Каталожен №	Набор с 2 плаки 622120	Пакет за референтна лаборатория 622822
Microplate strips (Ленти микроплаки) (12 × 8 ямки), покрити с мише античовешко IFN-γ моноклонално антитяло	2 комплекта ленти микроплаки с 12 × 8 ямки	20 комплекта ленти микроплаки с 12 × 8 ямки
IFN-γ Standard, (IFN-γ стандарт), лиофилизиран (съдържа рекомбинантен човешки IFN-γ, говежди казеин, 0,01% w/v тимерозал)	1 × флакон (8 IU/ml в разтворено състояние)	10 × флакона (8 IU/ml в разтворено състояние)
Green Diluent (Зелен разредител) (съдържа говежди казеин, нормален миши серум, 0,01% w/v тимерозал)	1 x 30 ml	10 × 30 ml
Conjugate 100X Concentrate (Конюгат 100X концентрат), лиофилизиран (миши античовешки IFN-γ HRP, съдържа 0,01% тимерозал)	1 × 0,3 ml (в разтворено състояние)	10 × 0,3 ml (в разтворено състояние)
Wash Buffer 20x Concentrate (Промивен буфер 20x концентрат) (pH 7,2, съдържа 0,05% v/v ProClin® 300)	1 × 100 ml	10 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Разтвор на ензимен субстрат) (съдържа H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' тетраметилбензидин)	1 x 30 ml	10 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопирац разтвор) (съдържа 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 × 15 ml	10 × 15 ml
<i>Инструкции за употреба на набор QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

Компоненти на набора

Контроли и калибратори

QFT-Plus ELISA използва рекомбинантен човешки IFN- γ стандарт, който е анализиран спрямо референтен IFN- γ (NIH реф.: Gxg01-902-535).

Платформа и софтуер

QFT-Plus Analysis Software е за използване по избор и може да се използва за анализиране на необработените данни и изчисляване на резултатите. Той може да бъде изтеглен от www.qiagen.com.

Необходими, но непредоставени материали

Допълнителни реактиви

- Епруветки QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Дейонизирана или дестилирана вода, 2 литра

Консумативи

- Капак за плаки за 96-ямкова плака
- **По избор:** Микроепруветки от 1 ml с капачки в стелажи с 96 ямки или непокрити микроплаки с пластмасови уплътнения за съхранение на плазма (22 пациенти/стелаж или плака)
- Резервоари за реактиви

Оборудване*

- 37 °C ± 1 °C инкубатор (със или без CO₂)
- Калибрирани пипети с променлив обем за пипетиране от 10 µl до 1000 µl с връхчета за еднократна употреба
- Калибрирани мултиканални пипети с възможност за пипетиране на 50 µl и 100 µl с връхчета за еднократна употреба
- Шейкър за микроплаки с възможност за скорости между 500 и 1000 rpm
- Промивно устройство за микроплаки (препоръчва се автоматизирано промивно устройство за плаки за безопасност при боравене с плазмени проби)
- Четец за микроплаки, снабден с филтър 450 nm и референтен филтър от 620 nm до 650 nm
- Вортекс с променлива скорост
- Центрофуга, която може да центрофугира епруветките за вземане на кръв поне до 3000 RCF (g)
- Градуиран цилиндър, 1 или 2 литра

* Преди употреба се уверете, че апаратите са проверени и калибрирани съгласно препоръките на производителя.

Предупреждения и предпазни мерки

Имайте предвид, че може да е необходимо да направите справка с местните разпоредби относно докладване на сериозни инциденти, възникнали във връзка с изделието, на производителя и/или на оторизиран негов представител, и на регулаторния орган в страната по местожителство на потребителя и/или пациента.

За инвитро диагностика.

Информация за безопасността

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Тези листове можете да намерите онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.

- Пробите и аликвотните части са потенциално заразни. Изхвърлете аликвотната част и отпадъка от анализа в съответствие с местните процедури за безопасност.
- Отрицателният резултат от QFT-Plus не изключва възможността от инфекция с *M. tuberculosis* или туберкулозно заболяване: фалшиво отрицателните резултати могат да се дължат на стадия на инфекцията (напр. пробата е получена преди развитието на клетъчен имунен отговор), неправилна работа с епруветките за вземане на кръв след венепункция, неправилно извършване на анализа или други индивидуални имунологични променливи, включително тези свързани с коморбидни състояния. Хетерофилните антитела или неспецифичното производство на IFN- γ от други възпалителни процеси могат да маскират специфични реакции към пептидите на ESAT-6 или CFP-10.


- Положителният резултат от QFT-Plus не трябва да бъде единствената или окончателната база за установяване на инфекция с *M. tuberculosis*. Неправилното извършване на анализа може да доведе до фалшиво-положителни резултати от QFT-Plus.
- Положителният резултат от QFT-Plus трябва да бъде последван от медицинска оценка за активно туберкулозно заболяване (напр. намазка и посявка на киселинноустойчиви бацили, рентгенография на бял дроб).
- Тъй като ESAT-6 и CFP-10 липсват във всички BCG щамове и в повечето известни нетуберкулозни микобактерии, възможно е положителният резултат от QFT-Plus да се дължи на инфекция от *M. kansasii*, *M. szulgai* или *M. marinum*. Ако се подозират такива инфекции, трябва да се извършат алтернативни тестове.
- Фалшиво-отрицателен резултат от QFT-Plus може да бъде причинен от неправилно вземане на кръвна проба или неправилно боравене с пробата, засягаща функцията на лимфоцитите. Моля, вижте раздел „Протокол: Извършване на ELISA“, стр. 21, за правилно боравене с кръвните проби. Забавянето в инкубацията може да причини фалшиви негативни или неопределени резултати, а други технически параметри могат да повлияят на способността за откриване на значителен IFN- γ отговор.

Информация за спешни случаи

CHEMTREC

Извън САЩ и Канада +1 703-527-3887

Предпазни мерки

<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Работете с човешка кръв като с потенциално заразна.</p> <p>Спазвайте приложимите указания за работа с кръв. Изхвърляйте аликвотните части и материалите, които са в контакт с кръв или кръвни продукти, в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.</p>
--	---

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Съдържа: сярна киселина. Предупреждение! Може да бъде корозивно за металите. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

QuantiFERON Green Diluent



Съдържа: тартазин. Предупреждение! Може да предизвика алергична реакция на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. Да се избягва изпускане в околната среда.

Допълнителна информация

Информационни листове за безопасност (ИЛБ): www.qiagen.com/safety

- Тимерозал се използва като консервант в някои реактиви на QFT-Plus. Той може да бъде токсичен при поглъщане вдишване или контакт с кожата.
- Отклоненията от *Инструкциите за употреба на QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* могат да доведат до погрешни резултати. Прочетете внимателно инструкциите преди употреба.
- Не използвайте набора, ако преди употреба някоя от бутилките с реактиви е с признаци на повреда или утечка.
- **Важно:** Преди употреба огледайте флаконите. Не използвайте флаконите с конюгат или IFN- γ стандарт, ако забележите признаци на повреда или ако гумената запушалка е повредена. Не работете със счупени флакони. Прилагайте подходящите предпазни мерки за безопасност с оглед на безопасното изхвърляне на флаконите. Препоръчва се да използвате инструмент за отстраняване на метална обкатка за отваряне на флаконите с конюгат или IFN- γ стандарт с цел свеждане до минимум на риска от нараняване от металната обкатка.
- Не смесвайте и не използвайте ленти микроплаки, IFN- γ стандарт, зелен разреждател или конюгат 100x концентрат от различни партиди на набора на QFT-Plus. Другите реактиви (Промивен буфер 20x концентрат, разтвор на ензимен субстрат и ензимен стопиращ разтвор) могат да бъдат разменяни между наборите, при условие че реактивите не са с изтекъл срок на годност и данните на партидата отговарят на регистрираните.
- Изхвърлете неизползваните реактиви и биологични аликвотни части в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.
- Не използвайте набора QFT-Plus ELISA Kit след изтичане на срока на годност.
- Необходимо е винаги да се спазват правилните лабораторни процедури.
- Уверете се, че лабораторното оборудване като например промивните устройства за плаки и четците са калибрирани/валидирани за употреба.

Съхранение и боравене с реактиви

Трябва да се проверяват датите на изтичане на сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани върху опаковката и етикетите на всички компоненти. Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.

Стабилност при употреба

- Съхранявайте набора за ELISA при температура от 2 – 8 °С.
- Винаги предпазвайте разтвора на ензимния субстрат от пряка слънчева светлина.

Разтворени и неизползвани реактиви

- За указания как да разтворите реактивите вижте раздела „Протокол: Извършване на ELISA“, стр. 21.
- Разтвореният стандарт на набора може да се използва в срок до 3 месеца, ако се съхранява при температура от 2 – 8 °С.

Запишете датата на разтваряне на стандарта на набора.

- След като бъде разтворен, неизползваният конюгат 100x концентрат трябва да се върне на мястото за съхранение при температура от 2 – 8 °С и да се използва в срок до 3 месеца.

Запишете датата на разтваряне на конюгата.

- Конюгатът с работна концентрация трябва да използва в рамките на 6 часа от приготвянето.
- Промивният буфер с работна концентрация трябва да се съхранява при стайна температура за период до 2 седмици.
- Лентите микроплаки са само за еднократна употреба. Неизползваните плаки могат да се извадят от рамката на плаката и да се съхранят за бъдеща употреба.

Съхранение и работа с проби

Вижте *Инструкциите за употреба на QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes* (1123668) за подробности относно работната процедура за вземане на кръв за теста QFT-Plus.

Протокол: Извършване на ELISA

Важни моменти преди започване

Приготвяне (Време, необходимо за извършване на анализа)

- За да получи валидни резултати от анализа QFT-Plus, операторът трябва да изпълни конкретни задачи в рамките на определено време. Преди да използва анализа, се препоръчва операторът да планира внимателно всеки етап от анализа, за да има достатъчно време за извършване на всеки от етапите. Приблизителното време е представено по-долу; посочено е също времето за тестване на множество аликвотни части, когато са групирани в партиди.
 - Около 3 часа за една плака за ELISA
 - < 1 час работа
 - Добавете 10 до 15 минути за всяка допълнителна плака

IFN- γ ELISA

- Вижте разделите „Съдържание на набора“, страница 12 и „Необходими, но непредоставени материали“, страница 14 за информацията относно материалите, необходими за извършване на ELISA.

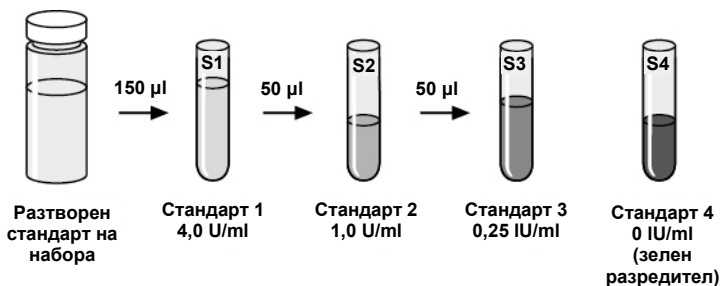
Процедура

1. Преди употреба всички плазмени проби и реактиви, с изключение на конюгат 100X концентрат, трябва да се темперират до стайна температура ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Отделете 60 минути за достигане на стайна температура.
2. Отстранете от рамката лентите в плаката за ELISA, които не са необходими, затворете отново фолиевата опаковка и ги върнете обратно в хладилника за съхранение, докато ви потрябват.

3. Отделете най-малко 1 лента за QFT-Plus стандартите и достатъчно ленти за броя на тестваните лица (вижте Фигура 2 за информацията относно препоръчания формат на плаката). След употреба запазете рамката и капака за употреба с останалите ленти.
- 3а. Разтворете IFN- γ стандарта с обема дейонизирана или дестилирана вода, посочен на етикета на флакона. Смесвайте внимателно за намаляване до минимум на образуването на пяна и се уверете, че цялото съдържание на флакона е напълно разтворено. При разтварянето на стандарта IFN- γ до посочения обем ще се получи разтвор с концентрация 8,0 IU/ml.
- 3б. Като използвате разтворения стандарт, пригответе разреждени серии с четири концентрации на IFN- γ (вижте Фигура 1).
- 3с. Необходимо е да се генерира стандартна крива със следните концентрации на IFN- γ :
- S1 (Стандарт 1) съдържа 4,0 IU/ml
 - S2 (Стандарт 2) съдържа 1,0 IU/ml
 - S3 (Стандарт 3) съдържа 0,25 IU/ml
 - S4 (Стандарт 4) съдържа 0 IU/ml (само зелен разредител [GD]).
- 3д. Стандартите трябва да се анализират поне двукратно.
- 3е. Подгответе пресни разреждания на стандарта на набора за всяка сесия на ELISA.

Процедура

А	Означете четирите епруветки: S1, S2, S3, S4
Б	Добавете 150 μ l от GD в S1, S2, S3, S4
В	Добавете 150 μ l от стандарта на набора в S1 и смесете щателно
Г	Прехвърлете 50 μ l от S1 в S2 и смесете щателно
Д	Прехвърлете 50 μ l от S2 в S3 и смесете щателно
Е	GD самостоятелно служи като нулев стандарт (S4)



Фигура 1. Генериране на стандартна крива чрез серийно разреждане.

4. Разтворете лиофилизиращия конюгат 100x концентрат с 0,3 ml дейонизирана или дестилирана вода. Смесвайте внимателно за намаляване до минимум на образуването на пяна и се уверете, че цялото съдържание на флакона е напълно разтворено.
 - 4а. Конюгатът с работна концентрация се приготвя чрез разреждане на необходимото количество разтворен конюгат 100X концентрат в зелен разредител (Таблица 1).
 - 4б. Конюгатът с работна концентрация трябва да се използва в рамките на 6 часа от приготвянето.
 - 4с. Върнете неизползвания конюгат 100x концентрат на съхранение при температура от 2 °C до 8 °C веднага след употреба.

Таблица 1. Приготвяне на конюгата (работна концентрация)

Брой на лентите	Обем на конюгата (100x концентрат)	Обем на зеления разредител
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. За плазмени проби, събрани от епруветки за вземане на кръв и впоследствие съхранени (в хладилник или замразени), разбъркайте добре съхранената проба преди добавяне към ямката за ELISA. Плазмените проби могат да се съхраняват в центрофугирани епруветки QFT-Plus Blood Collection Tubes до 28 дни при температура от 2 – 8 °C. Събраните плазмени проби могат да се съхраняват до 28 дни при температура от 2 – 8 °C, както и под –20 °C (за предпочитане под –70 °C) за продължителни периоди.

Плазмените проби могат да се заредят/използват за измерване директно от центрофугирани епруветки за вземане на кръв в плаката за QFT-Plus ELISA.

Важно: Ако плазмените проби се прехвърлят директно от центрофугираните епруветки QFT-Plus Blood Collection Tubes, всякакво смесване на плазма трябва да се избягва. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

6. Добавете 50 µl прясно приготвен конюгат с работна концентрация към всяка ямка на плаката за ELISA.

7. Добавете 50 µl от тестовите плазмени проби в съответните ямки (вижте препоръчаното разполагане на плаката за ELISA на Фигура 2).
8. Добавете 50 µl от всеки от стандартите от 1 до 4 в съответните ямки на плаката (вижте препоръчаното разполагане на плаката за ELISA на фигура 2).

Стандартите трябва да се анализират поне двукратно.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
Б	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
В	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
Г	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
Д	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
Е	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
Ж	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
З	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Фигура 2. Препоръчано разполагане на плаката за ELISA. S1 (Стандарт 1), S2 (Стандарт 2),

S3 (Стандарт 3), S4 (Стандарт 4). 1N (Аликвотна част 1. Контролна плазма Nil),

1 TB1 (Аликвотна част 1. TB1 плазма), 1 TB2 (Аликвотна част 1. TB2 плазма), 1M (Аликвотна част 1. Плазма с Mitogen).

9. Покрийте плаката за ELISA и смесете конюгата и плазмените проби/стандартите щателно, като използвате шейкър за микроплаки за 1 минута при 500 до 1000 rpm. Да се избягват пръски.
10. Покрийте плаката за ELISA и инкубирайте при стайна температура ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) за 120 ± 5 минути. Плаките за ELISA не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането. Отклоненията от посочения температурен диапазон може да доведат до грешни резултати.
11. По време на инкубирането на плаките за ELISA пригответе промивен буфер с работна концентрация. Разреждете една част промивен буфер 20x концентрат с 19 части дейонизирана или дестилирана вода и смесете щателно. Предоставен е достатъчно промивен буфер 20x концентрат за приготвянето на 2 литра промивен буфер с работна концентрация.

12. Когато инкубацията на плаката за ELISA приключи, промийте ямките на плаката за ELISA с 400 µl промивен буфер с работна концентрация. Извършете стъпката на промиване поне 6 пъти. От съображения за безопасност при работа с плазмени проби се препоръчва употребата на автоматизирано промивно устройство за плаки.

Щателното промиване е много важно за ефективността на анализа. Уверете се, че всяка ямка е изцяло напълнена с промивен буфер до горната част на ямката за всеки цикъл на промиване. Препоръчва се период на наkisване от поне 5 секунди между всеки цикъл.

Трябва да се добави стандартен лабораторен дезинфектант в резервоара за отпадните течности, както и да се спазват установените процедури за обеззаразяване на потенциално заразни материали.

13. Почукайте плаките за ELISA с лицевата част надолу върху абсорбираща салфетка (без власинки), за да отстраните остатъчния буфер за промиване.

Добавете 100 µl разтвор на ензимен субстрат във всяка ямка на плаката, покрийте плаката и смесете щателно, като използвате шейкър за микроплаки в продължение на 1 минута при 500 до 1000 rpm.

14. Покрийте плаката за ELISA и инкубирайте при стайна температура (22 °C ± 5 °C) за 30 минути. Плаките за ELISA не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.

15. След 30-минутното инкубиране добавете по 50 µl ензимен стопиращ разтвор във всяка ямка на плаката в същата последователност, в която е добавен субстратът, и смесете щателно при 500 до 1000 rpm, като използвате шейкър за микроплаки.

16. Измерете оптичната плътност (Optical Density, OD) за всяка ямка от плаката за ELISA в рамките на 5 минути от спирането на реакцията, като използвате четеща за микроплаки, снабден с филтър за 450 nm и с референтен филтър за 620 nm до 650 nm. Стойностите на OD се използват за изчисляване на резултатите.

Резултати (Изчисления)

QFT-Plus Analysis Software може да се използва за анализиране на необработените данни и изчисляване на резултатите. Той е достъпен на www.qiagen.com. Уверете се, че използвате най-актуалната версия на QFT-Plus Analysis Software.

Софтуерът извършва оценка за контрол на качеството на анализа, генерира стандартна крива и предоставя резултат от теста за всеки индивид, както е описано подробно в раздела „Интерпретиране на резултатите“ на стр. 31. Софтуерът отчита всички концентрации по-големи от 10 IU/ml като „>10“, тъй като тези стойности са извън валидирания линеен диапазон на ELISA.

Като алтернатива на използването на QFT-Plus Analysis Software резултатите могат да бъдат определени и по следния метод.

Генериране на стандартна крива и стойности на алиquotната част

Ако не се използва QFT-Plus Analysis Software

Определянето на стандартната крива и стойностите на алиquotната част в IU/ml изисква програма за електронни таблици като например Microsoft® Excel®, ако не се използва QFT-Plus Analysis Software.

Използване на програма за електронни таблици

1. Определете средните стойности на OD на репликатите на стандарта на набора за всяка плака.

2. Създайте $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ стандартна крива чрез нанасяне на $\log_{(e)}$ на средната OD (оста y) спрямо $\log_{(e)}$ на концентрацията на IFN- γ на стандартите в IU/ml (оста x), като пропуснете нулевия стандарт от тези изчисления. Изчислете линията на най-добро съвпадение за стандартната крива чрез регресионен анализ.
3. Използвайте стандартната крива за определяне на концентрацията на IFN- γ (IU/ml) за всяка от тестовите плазмени проби, като използвате OD стойността за всяка аликвотна част.
4. Тези изчисления могат да се извършват с помощта на софтуерните пакети, налични с четците за микроплаки, и стандартна електронна таблица или статистически софтуер (като Microsoft Excel). Препоръчва се тези пакети да се използват за изчисляване на регресионния анализ, коефициента на вариация (coefficient of variation, % CV) за стандартите и коефициента на корелация (r) на стандартната крива.

Изчисляване на проби

Ако са получени следните показания на OD за стандартите, изчисленията с помощта на $\log_{(e)}$ ще следват тези в Таблица 2.

Таблица 2. Стандартна крива

Стандарт	IU/ml	OD стойности a и b	Средна OD	%CV	Log _(e) IU/ml	Log _(e) Средна (OD)
Стандарт 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Стандарт 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Стандарт 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	Неприложимо	-1,386	-2,079
Стандарт 4	0	0,034, 0,037	0,036	Неприложимо	Неприложимо	Неприложимо

Уравнението на кривата е $y = 0,7885(X) - 0,9837$, където „m“ = 0,7885 и „c“ = -0,9837. Тези стойности се използват в уравнението $X = (Y - c)/m$ за намиране на „X“. Въз основа на стандартната крива, изчисленият коефициент на корелация е (r) = 1000. Неприложимо: Не е приложимо.

Валидността на анализа се определя, използвайки критериите, посочени в раздел „Качествен контрол на теста”, стр. 29.

Стандартната крива (Таблица 2) се използва за преобразуване на OD на антигенните отговори в международни единици (IU/ml).

Таблица 3. Изчисляване на проби

Антиген	Стойност на OD	Стойност на OD за Log _(e)	X	e ^X (IU/ml)	Антиген – 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

Стойностите на IFN- γ (в IU/ml) за TB1, TB2 и Mitogen се коригират за фон чрез изваждане на стойността в IU/ml, получена за съответната контрола Nil. Тези коригирани стойности се използват за интерпретация на резултатите от теста.

Качествен контрол на теста

Точността на резултатите от теста зависи от генерирането на точна стандартна крива. Поради това резултатите, базирани на стандартите, трябва да се проверят, преди резултатите от теста на алиquotната част да могат да бъдат интерпретирани.

За да е валиден ELISA:

- Средната стойност на OD за Стандарт 1 трябва да е $\geq 0,600$.
- Коефициентът на вариация % CV за стойностите на репликите на Стандарт 1 и Стандарт 2 трябва да е $\leq 15\%$.

- Стойностите на OD на копията на Стандарт 3 и Стандарт 4 не трябва да се различават с повече от 0,040 единици оптична плътност от тяхната средна стойност.
- Коефициентът на корелация (r), изчислен от средните стойности на абсорбция на стандартите, трябва да е $\geq 0,98$.
- Ако горепосочените критерии не са удовлетворени, работният цикъл е невалиден и трябва да се повтори.
- Средната стойност на OD за нулевия стандарт (зелен разределител) трябва да е $\leq 0,150$. Ако средната стойност на OD е $> 0,150$, трябва да се провери процедурата за промиване на плаката.

Софтуерът QFT-Plus Analysis Software изчислява и докладва тези параметри за качествен контрол.

Всяка лаборатория трябва да определи подходящи видове материали за контрол и честота на тестване в съответствие с приложимите местни, държавни и федерални разпоредби или такива на други акредитиращи организации. Трябва да се вземат предвид външната оценка на качеството и други алтернативни процедури за валидиране.

Забележка: Плазмите, обогатени с рекомбинантен IFN- γ , показват намаление на концентрацията с до 50%, когато се съхраняват при температура от 2 – 8 °C и -20 °C. Рекомбинантният IFN- γ не се препоръчва за установяване на стандарти за контрол.

Интерпретиране на резултатите

Резултатите от QFT-Plus се интерпретират чрез използване на следните критерии (Таблица 4).

Важно: Диагностицирането или изключването на туберкулозно заболяване и оценката на вероятността за ЛТБИ изисква комбинация от епидемиологични, анамнестични, медицински и диагностични находки, които трябва да се имат предвид при интерпретацията на резултатите от QFT-Plus. Вижте общите насоки за диагностициране и лечение на туберкулозното заболяване и ЛТБИ:

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

Таблица 4. Интерпретация на резултатите от теста QFT-Plus

Nil (IU/ml)	TB1 минус Nil (IU/ml)	TB2 минус Nil (IU/ml)	Mitogen минус Nil (IU/ml)*	Резултат от QFT-Plus	Съобщаване/ интерпретация
≤ 8,0	≥ 0,35 и ≥ 25% от Nil	Всяка	Всяка	Положителен [†]	Инфекция с <i>M. tuberculosis</i> е вероятна
	Всяка	≥ 0,35 и ≥ 25% от Nil			
	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от Nil	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от Nil	≥ 0,50	Отрицателен	Инфекция с <i>M. tuberculosis</i> НЕ е вероятна
	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от Nil	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от Nil	< 0,50	Неопределен [‡]	Вероятността от инфекция с <i>M. tuberculosis</i> не може да бъде определена
> 8,0 [§]	Всяка				

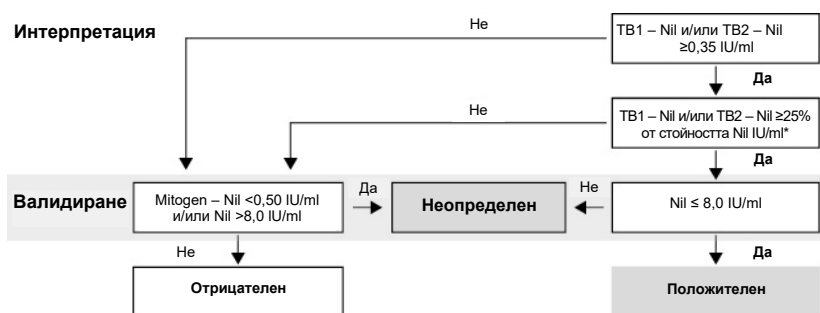
* Отговорите към Mitogen-положителната контрола (и понякога към туберкулозните антигени) могат да са извън диапазона на четеца за микроплака. Това не оказва влияние върху резултатите от теста. Стойности, които са > 10 IU/ml, се отчитат от софтуера QFT-Plus като > 10 IU/ml.

[†] Когато не се подозира инфекция с *M. tuberculosis*, първоначалните положителни резултати могат да се потвърдят чрез повторно тестване на оригиналните плазмени проби, дублирани в QFT-Plus ELISA. Ако повторното тестване на едното или и двете копия е положително, трябва да се счита, че резултатът от теста е положителен.

[‡] Вижте раздела „Ръководство за отстраняване на проблеми“, страница 68 за възможните причини.

[§] В клинични проучвания по-малко от 0,25% от участниците имат нива на IFN-γ > 8,0 IU/ml за стойност Nil.

Величината на измереното IFN- γ ниво не е в корелация със стадия или степента на инфекцията, нивото на имунния отговор или вероятността за прогресиране към активно заболяване. Положителният отговор за туберкулоза при отрицателни за Mitogen лица е рядък но е наблюдаван при пациенти с туберкулозно заболяване. Той посочва, че IFN- γ отговорът към туберкулозните антигени е по-висок от този към Mitogen, което е възможно, тъй като нивото на Mitogen не стимулира максимално произвеждането на IFN- γ от лимфоцитите.



Фигура 3. Интерпретация на теста QFT-Plus. *За да бъде валидна стойността на TB1 минус Nil или TB2 минус Nil, стойността $\geq 25\%$ от Nil IU/ml трябва да е от същата епруветка като първоначалния резултат $\geq 0,35$ IU/ml.

Ограничения

Резултатите от теста QFT-Plus трябва да се използват заедно с епидемиологичната анамнеза на отделните индивиди, текущия медицински статус и други диагностични изследвания.

Резултатът на лица със стойности Nil над 8 IU/ml се определят като „неопределен“, защото един по-висок с 25% отговор към TB антигени може да бъде извън диапазона за измерване на анализа.

- Прогнозната стойност на положителния резултат от QFT-Plus за диагностициране на инфекция с *M. tuberculosis* зависи от вероятността за инфекция, която се оценява въз основа на анамнестични, епидемиологични, диагностични и други данни.
- Постановянето на диагноза на ЛТБИ изисква заболяването от туберкулоза да бъде изключено чрез медицинска оценка, включваща оценка на текущите медицински и диагностични тестове за заболяването, както е посочено.
- Негативният резултат трябва да се разглежда в комбинация с медицинските и анамнестични данни на индивида, свързани с вероятността от инфекция с *M. tuberculosis* и потенциалния риск от развитие на туберкулозно заболяване, особено за лица с компрометирана имунна функция.

Ненадеждни или неопределени резултати могат да се получат поради:

- Отклонения от процедурата, описана в Инструкциите за употреба
- Неправилно транспортиране/работа с кръвната проба
- Повишени нива на циркулиращ IFN- γ или наличие на хетерофилни антитела
- Превишаване на времето за валидиране на кръвта от вземането на кръвната проба до инкубацията. Вижте *Инструкциите за употреба на QFT-Plus Blood Collection Tubes* (1123668).

Работни характеристики

Клинични проучвания

Тъй като няма определен стандартен тест за потвърждаване или изключване на диагнозата на ЛТБИ, предвиждането за чувствителността и специфичността за QFT-Plus не може да се оцени практически. Специфичността на QFT-Plus е определена приблизително чрез оценяване на фалшиво положителните резултати при лица с нисък риск (без известни рискови фактори) за туберкуозна инфекция. Чувствителността е определена приблизително чрез оценяване на групи участници в проучването с потвърдено чрез посявка активно туберкуозно заболяване. В допълнение, ефективността на анализа е оценена по отношение на положителната и отрицателната честота в популация от здрави участници с идентифицирани рискови фактори за туберкуозна инфекция (смесена рискова популация).

Специфичност

Проведено е многоцентрово проучване за оценка на клиничната специфичност на QFT-Plus, включващо 733 участници в проучването, за които се е считало, че имат нисък риск от инфекция с *M. tuberculosis* или нямат рискови фактори за излагане на инфекция или заболяване. Демографските данни и рисковите фактори за експозиция на туберкулоза са определени чрез стандартизирано проучване по време на тестването. Проучването е проведено в четири независими центъра, включително един в САЩ, два в Япония и един в Австралия. Тестът QFT-Plus е сравнен с теста QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). В Таблица 5 е представено обобщение на данните за клиничната ефективност, стратифицирани по центрове на проучването и региони. Резултатите от ефективността се основават на общия брой валидни тестове. Няма неопределени резултати.

Таблица 5. Специфичност на QFT-Plus при популация с нисък риск

Център	Брой	Положителен		Отрицателен		Неопределен		Специфичност (95% CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Съединени Щати									
(#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)
Япония									
(#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)
(#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)
Общо за Япония	322	4	7	318	315	0	0	98,76% (318/322) (96,85 – 99,52)	97,83% (315/322) (95,6 – 98,9)
Австралия									
(#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)

Специфичността на QFT-Plus е 98,11% в САЩ, 97,83% в Япония и 95,48% в Австралия. Общата специфичност на QFT-Plus е 97,27% (713/733). Специфичността на QFT е 99,06% в САЩ, 98,76% в Япония и 95,98% в Австралия. Общата специфичност на QFT е 98,09% (719/733).

Показана е разбивка на резултатите по видове туберкулозни антигени и комбинации от тях, за да се даде пример за очакваните резултати при популация с нисък риск (Таблица 6).

Таблица 6. Резултати от проучването за специфичност на QFT-Plus по епруветка с туберкулозен антиген

Интерпретация основана на антиген за туберкулоза – Nil			QFT-Plus (положителен резултат по TB1 и/или TB2)*	Конкордантно положителни TB1 и TB2 (алтернативен анализ)†
IU/ml в	TB1	TB2		
Положителен	10	18	20	8
Отрицателен	723	715	713	725
Неопределен	0	0	0	0
Специфичност (95% CI)	–	–	97,3% (713/733) (95,8 – 98,2)	–
Отрицателна честота (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)

* Интерпретация основана на стойност на TB антигена – Nil $\geq 0,35$ IU/ml в двете (TB1 и TB2) или в една от TB епруветките, която да отговаря на критериите за тълкуване, за да се определи QFT-Plus (TB1 или TB2) като положителен.

† Алтернативният анализ е представен само за информация.

При участници с нисък риск от заразяване с инфекция от туберкулоза общо 20/733 участници получиха положителен резултат. От тях само при 8 участници стойността е $>0,35$ IU/ml и в двете епруветки TB1 и TB2. Сравнението на анализите QFT и QFT-Plus е извършено в проучвателната кохорта с нисък риск и показва общо съответствие от 97,5% (715/733) и процентно съвпадение на отрицателните резултати 98,3% (707/719).

Чувствителност

Тъй като няма установен стандартен тест за ЛТБИ, най-подходящият заместител е микробиологичната посевка за *M. tuberculosis*, тъй като за инфекциите с туберкулоза е необходим предшественик на заболяването.

Проведено е многоцентрово проучване за оценка на клиничната чувствителност на QFT-Plus, включващо 434 участници в проучването, които са имали признаци и симптоми на активно заболяване от *M. tuberculosis*, потвърдени чрез култура и/или PCR, и не са били на лечение за туберкулоза или са били на лечение ≤ 14 дни преди вземането на кръв. Проучването е проведено в 7 независими центъра, включително три центъра в Съединените щати, три в Япония и един център в Австралия. Тестът QFT-Plus е сравнен с теста QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT). В Таблица 7 е представено обобщение на данните за ефективността на клиничната чувствителност по центрове на проучването и държави. Резултатите от ефективността се основават на общия брой валидни тестове. Честотата на неопределените резултати за QFT и QFT-Plus е съответно 2,3% (10/434) и 2,5% (11/434).

Таблица 7. Резюме на резултатите от проучването за клинична чувствителност, стратифицирано по центрове, държави и общо

Център	Брой	Положителен		Отрицателен		Неопределен		Чувствителност (95% CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Съединени Щати									
(#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)
(#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)
(#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)
Общо за Съединените Щати	53	47	47	6	6	0	0	88,7% (47/53) (77,4 – 94,7)	88,7% (47/53) (77,4 – 94,7)
Япония									
(#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)
(#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)

Таблицата продължава на следващата страница

Таблицата продължава от предишната страница

Таблица 7. Обобщение на резултатите от проучването за клинична чувствителност, стратифицирано по центрове, държави и общо (продължение)

Център	Брой	Положителен		Отрицателен		Неопределен		Чувствителност (95% CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(#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)
Общо за Япония	352	328	322	15	19	9	11	95,63% (328/343) (92,91 – 97,33)	94,43% (322/341) (91,5 – 96,4)
Австралия									
(#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)

Анализът в таблицата по-горе не включва неопределени резултати.

Чувствителността на QFT-Plus е 88,7% в САЩ, 94,43% в Япония и 100,0% в Австралия. Общата чувствителност на QFT-Plus е 94,09% (398/423). Чувствителността на QFT е 88,7% в САЩ, 95,63% в Япония и 96,43% в Австралия. Общата чувствителност на QFT е 94,81% (402/424).

Показана е разбивка на резултатите по видове епруветки с антиген на туберкулозата и комбинации от епруветки, за да се даде пример за очакваните резултати при популация с потвърдена инфекция с туберкулоза (Таблица 8).

Таблица 8. Резултати от проучването за чувствителност на QFT-Plus по епруветка с туберкулозен антиген

Интерпретация основана на антиген за туберкулоза – Nil в IU/ml	TB1	TB2	QFT-Plus (положителен резултат по TB1 и/или TB2)
Положителен	388	397	398
Отрицателен	32	26	25
Неопределен	14	11	11
Чувствителност* (95% CI)	–	–	94% (398/423) (91,4 – 96,0)
Положителна честота* (95% CI)	92,4% (388/420) (89,4 – 94,6)	93,9% (397/423) (91,1 – 95,8)	–

* Изключване на неопределени стойности.

Сравнението на анализите QFT и QFT-Plus беше оценено в кохортата с потвърдена с култура активна туберкулоза (кохорти за изследване на чувствителността) и показва общо съответствие от 95,9% и положително процентно съвпадение на положителните резултати от 97,3% (391/402).

Таблица 9. Коефициенти на вероятност на QFT-Plus

Център*	Чувствителност	Специфичност	LR+	LR-
Австралия	100,00%	95,48%	22,11	0,00
Япония	94,43%	97,83%	43,44	0,06
Съединени Щати	88,68%	98,11%	47,00	0,12

* Общо

Представяне при лица с идентифицирани рискови фактори за МТВ инфекция (индивиди със смесен риск)

Кохорта от 601 лица със смесени рискови фактори за туберкулозна инфекция (напр. ХИВ позитивност, анамнеза за лечение на активна или латентна туберкулоза, експозиция на случай на активна туберкулоза, статут на HCW и т.н.) е оценена с тестовете QFT и QFT-Plus. Рисковите фактори бяха идентифицирани чрез стандартизирано проучване, а по време на набирането на лицата нямаха симптоми, свързани с активна туберкулоза. Демографските данни и рисковите фактори са представени в Таблица 10. В тази популация 68/601 (11,3%) лица върнаха положителен резултат от QFT-Plus, като положителното процентно съгласие (Positive Percent Agreement, PPA) и отрицателното процентно съгласие (Negative Percent Agreement, NPA) бяха съответно 98,44% и 99,07% (Таблица 11). В тази кохорта от 68 лица, общо 62 пациенти са с положителни резултати от QFT-Plus за двете епруветки TB1 и TB2, 2 участници са положителни само по TB1, а 4 участници са положителни само по TB2. Не са наблюдавани неопределени резултати (0/601).

Таблица 10. Демографски данни и фактори, свързани с риска от заразяване с туберкулоза, в смесена кохорта

Общ брой участници (601)		Номер	Процент
Пол	Мъж	539	89,7%
	Жена	62	10,3%
Възраст (години)	Диапазон	18 – 70	–
	Средна	46,7	–
Ваксиниран с BCG	Да	15	2,5%
	Не	586	97,5%
HIV позитивен или с положителен тест за HTLV вируси	Да	12	2,0%
	Не	589	98%
Предходно диагностициран с активна ТБ	Да	11	1,8%
	Не	590	98,2%
С положителен туберкулинов кожен тест (Tuberculin Skin Test, TST)/Манту тест за ТБ	Да	47	7,8%
	Не	554	92,2%
Бил е лекуван за активна или латентна ТБ	Да	35	5,8%
	Не	566	94,2%
Живял, работил или е бил доброволец (за повече от 1 месец) в затвор	Да	373	62,1%
	Не	228	37,9%
Живял работил или е бил доброволец (за повече от 1 месец) в подслон за бездомни	Да	525	87,4%
	Не	76	12,6%
Медицински работник	Да	8	1,3%
	Не	593	98,7%
Близък контакт с болен или с подозрение за наличие на активно ТБ заболяване	Да	9	1,5%
	Не	592	98,5%

Таблица 11. Обобщени резултати на QFT-Plus спрямо QFT при участници с известни рискови фактори за латентна туберкулозна инфекция

		QFT		
		Положителен (+)	Отрицателен (-)	Общо
QFT-Plus	Положителен (+)	63	5*	68
	Отрицателен (-)	1*	532	533
	Общо	64	537	601

*Всичките 6 несъгласувани проби са имали нива на IFN- γ в епруветките с ТВ антиген, които са били близки до границата на анализа.

Процентно съвпадение на положителните резултати (Positive Percent Agreement, PPA) и процентно съвпадение на отрицателните резултати (Negative Percent Agreement, NPA) между резултатите от QFT и QFT-Plus са както следва:

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

Таблица 12 по-долу илюстрира ефективността на QFT-Plus в сравнение с теста QFT при участници в проучването, ваксинирани с BCG.

Таблица 12. Представянето на QFT-Plus в сравнение с теста QFT при участници в проучването, ваксинирани с BCG (комбинирани данни за чувствителност, специфичност и изследвани лица с ЛТБИ)

		QFT		
		Положителен (+)	Отрицателен (-)	Общо
QFT-Plus	Положителен (+)	66	5	71
	Отрицателен (-)	3	268	271
	Общо	69	273	342*

* Двама участници в проучването на чувствителността бяха изключени от анализа поради неопределени резултати

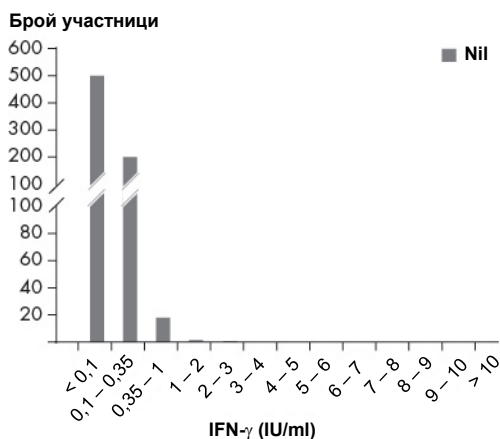
- PPA = 95,6% (66/69), 95%CI (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2% (268/273), 95%CI (95,79, 99,22)

Очаквани стойности

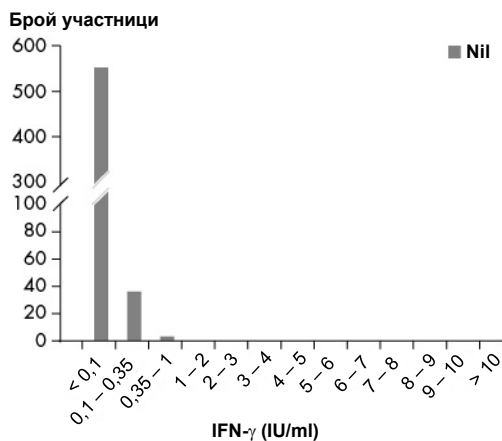
Наблюдавани разпределения на отговорите – стратифицирани по риск

В клиничните проучвания са наблюдавани различни IFN- γ отговори към епруветките TB1, TB2 и тази с контролата, като отговорите са стратифицирани по риск от инфекция с *M. tuberculosis* (Фигури 4 до Фигура 7). Групата със смесен риск се състои от участници, представителни за общата тествана популация, включително участници със и без рискови фактори за експозиция на туберкулоза, както и случаи, при които няма вероятност за туберкулозата (т.е. ЛТБИ).

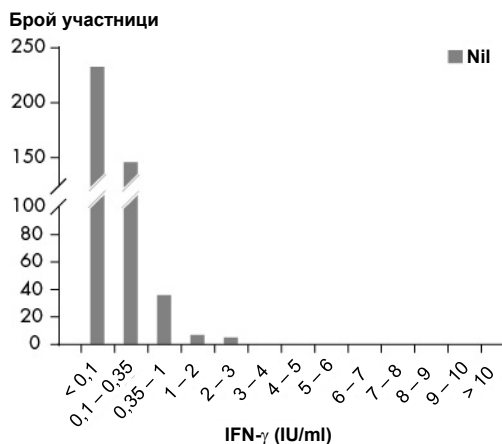
A



Б

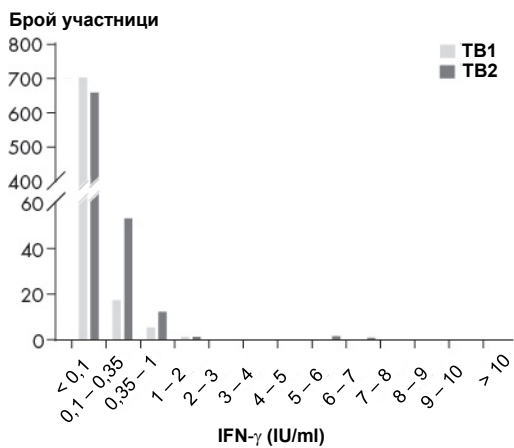


В

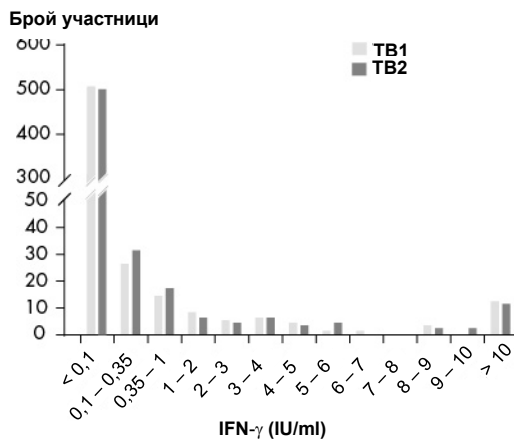


Фигура 4. Разпределение на Nil. А Разпределение на стойности Nil в нискорискова популация (n=744). Б Разпределение на стойности на Nil в популация със смесен риск (n=601). В Разпределение на стойности Nil в популация с потвърдена с култура инфекция с *M. tuberculosis* (n=416).

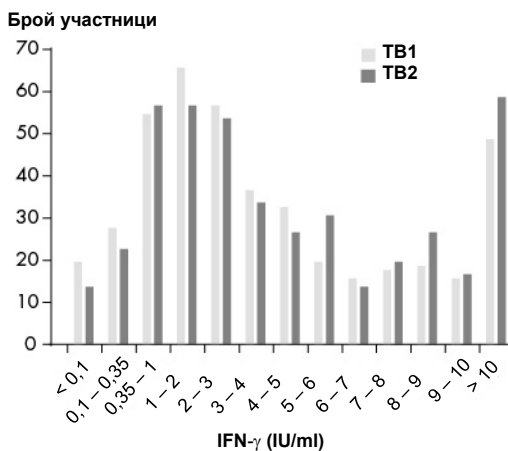
A



Б

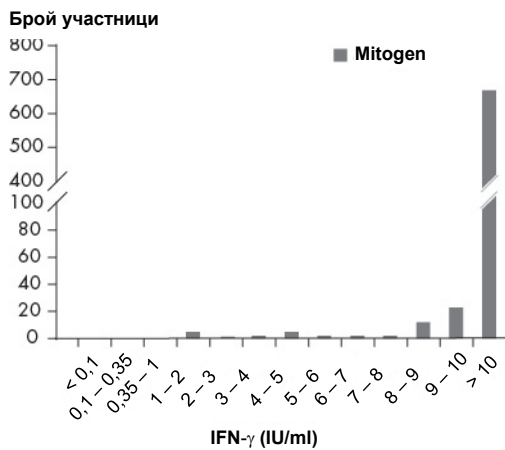


В

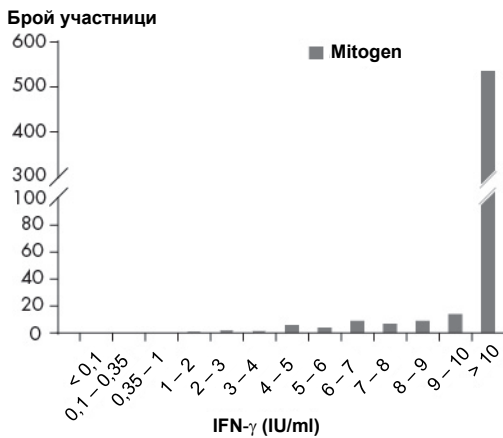


Фигура 5. Разпределение на TB1 и TB2 (извадена Nil). **А** Разпределение на стойности за TB1 и TB2 (извадена Nil) в нискорискова популация (n=744). **Б** Разпределение на стойности за TB1 и TB2 (извадена Nil) в популация със смесен риск (n=601). **В** Разпределение на стойности за TB1 и TB2 (извадена Nil) в популация с потвърдена с култура инфекция с *M. tuberculosis* (n=416).

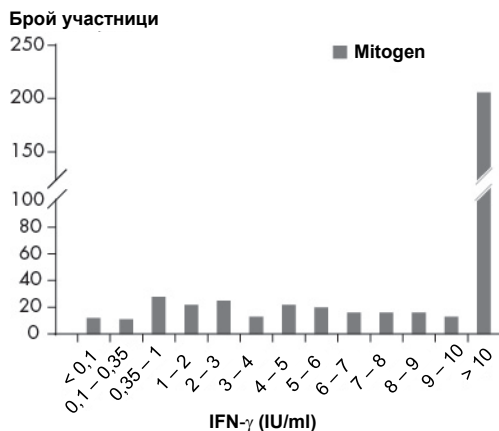
А



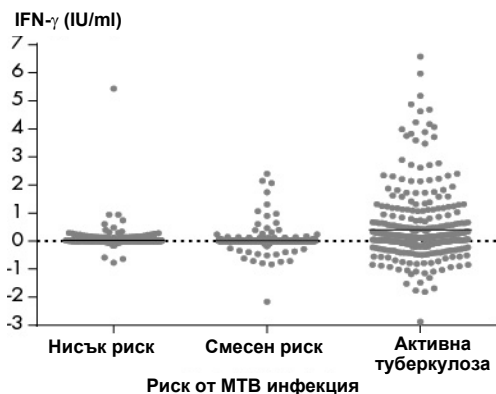
Б



В



Фигура 6. Разпределение на Mitogen (извадена Nil). **А** Разпределение на стойностите за Mitogen (извадена Nil) в нискорискова популация (n=744). **Б** Разпределение на стойностите за Mitogen (извадена Nil) в популация със смесен риск (n=601). **В** Разпределение на стойностите за Mitogen (извадена Nil) в популация с потвърдена с култура инфекция с *M. tuberculosis* (n=415).



Фигура 7. Наблюдавани разлики между стойностите на TB1 и TB2 (извадена Nil), стратифицирани по риск. Включва данни от кохортното проучване със смесен риск, за да покаже разликите между кохортите с нисък, активен и смесен риск. Този анализ на данните включва кохорта със смесен риск и известни рисков фактори. Поради това от кохортата с нисък риск са взети $n=733$, от кохортата със смесен риск $n=588$ и от кохортата с активна туберкулоза $n=357$. Количествената разлика в IU/ml за всеки участник е получена чрез изваждане на стойността на TB1 от стойността на TB2.

Обобщение на безопасността и ефективността

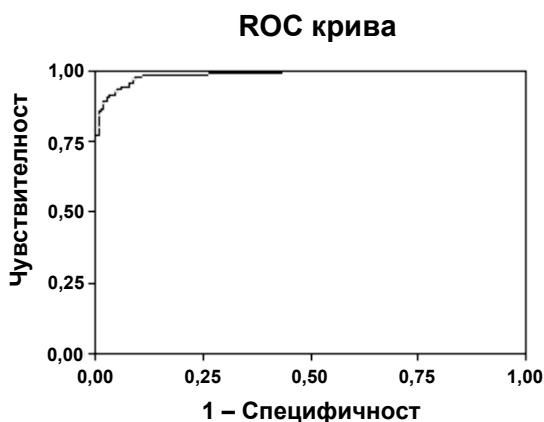
Обобщението на безопасността и ефективността може да бъде намерено на уебсайта EUDAMED.

Характеристики на ефективността на анализа

Характеристики на анализа

Граница на анализа

Границата на анализа QFT-Plus е определена въз основа на данни от 216 участници без установени рискови фактори за излагане на туберкулоза, които са били ваксинирани с BCG и за които се предполага, че не са инфектирани, и 118 лица с потвърдена чрез посявка инфекция с *M. tuberculosis*. Данните за чувствителността и специфичността бяха комбинирани и анализирани чрез анализ на кривата за чувствителност спрямо процента фалшиви положителни резултати (Receiver Operator Characteristic, ROC). Данните за чувствителността и специфичността, анализирани с помощта на ROC анализа, показаха, че оптималната граница на ELISA е 0,35 IU/ml (вж. Фигура 8).



Фигура 8. ROC крива за отговорите на ESAT-6 и CFP-10.

Таблица 13. Стойности на чувствителност и специфичност за ELISA при различни гранични стойности

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

Таблицата продължава на следващата страница

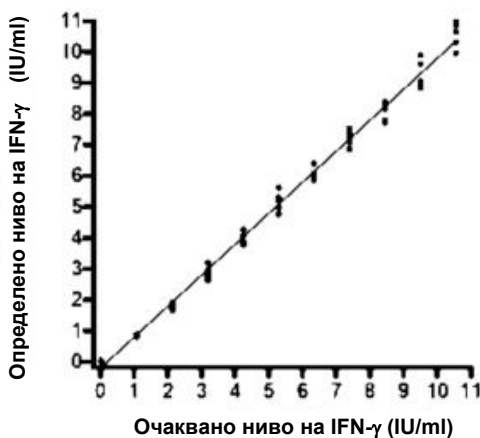
Таблицата продължава от предишната страница

Таблица 13. Стойности на чувствителност и специфичност за ELISA при различни гранични стойности

Гранична стойност IU/ml IFN- γ	Чувствителност %	95% CI	Специфичност %	95%CI	Чувствителност + специфичност
0,47	85,59	77,94% – 91,38%	99,08	96,71% – 99,89%	184,67
0,48	84,75	76,97% – 90,70%	99,08	96,71% – 99,89%	183,83
0,50	83,90	76,00% – 90,02%	99,08	96,71% – 99,89%	182,98

Линейност

Доказано е, че QFT-Plus ELISA е линеен чрез поставяне на 5 репликата на 11 сборни плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ на случаен принцип в плака за ELISA. Линейната регресионна линия е с наклон $1,002 \pm 0,011$ и корелационен коефициент 0,99 (Фигура 9).



Фигура 9. Илюстрация на регресионния анализ за изследване на линейността – Висока средна стойност на сборната група = $-0,24 + 0,9964 \cdot$ Очаквано.

Възпроизводимост

Проведено е многоцентрово проучване на възпроизводимостта за оценка на ефективността на анализа QFT-Plus в центрове на проучването с множество оператори. Това е проспективно проучване, проведено в три външни центъра за тестване и един център за вземане на кръв. Включени са общо 32 положителни и 34 отрицателни (определени чрез теста QFT) участници в проучването. Участниците по проучването са медицински работници в Съединените щати. Участниците в проучването представляваха групи със смесен риск за излагане на туберкулоза поради професията си или като медицински работници, родени в чужбина, произхождащи от място с честота на туберкулоза над 50/100 000.

Три епруветки за взимане на кръв с литиев хепарин бяха събрани от всеки изследван участник в центъра за вземане на кръв. След това епруветките за вземане на кръв с литиев хепарин бяха прехвърлени на всеки от трите центъра за тестване, където бяха разделени на аликвотни части в два набора епруветки QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen и Nil), след което бяха тествани в съответствие с процедурата за анализ QFT-Plus. Във всеки център най-малко двама оператори са извършвали независимо двата теста за всеки участник в проучването. Всеки оператор беше заслепен за резултатите, получени от другия оператор, както и за резултатите от QFT теста на участника в проучването.

Налице са шест резултата, генерирани във всичките три центъра за тестване за всеки от шестте участника в проучването, което доведе до събирането на общо 396 точки от данни. Обобщение на резултатите от обобщението за възпроизводимост е представено в Таблица 14.

Таблица 14. Обобщение на резултатите от проучването за възпроизводимост – % съвпадение на качествените резултати между операторите от центровете; N = 66 проби от пациенти

Център 1 – 2 оператори	Център 2 – 2 оператори	Център 3 – 3 оператори
64/66 = 96,97%	64/66 = 96,97%	59/66 = 89,39%
Съвпадение на качествените резултати от набор епруветка 1 и набор епруветка 2	Съвпадение на качествените резултати от набор епруветка 1 и набор епруветка 2	Съвпадение на качествените резултати от набор епруветка 1 и набор епруветка 2

Качественото процентно съвпадение във всички центрове по проучването е 94,7% (375/396). При това изчисление общият брой на резултатите от тестовете, при които има съгласие (375), включва случаите, при които има съгласие на всички 6 резултата, съгласие на 5 от 6 резултата, съгласие на 4 от 6 резултата и съгласие на 3 от 6 резултата, взети заедно.

Повторяемост между партидите

Беше проведено проучване за определяне на вариабилността между епруветките QFT-Plus Blood Collection Tubes в сравнение с епруветките QFT. Бяха тествани общо 30 участници (15 потвърдено положителни за туберкулоза и 15 потвърдено отрицателни за туберкулоза, определени чрез теста QFT). Всяка от епруветките за вземане на кръв QFT-Plus TB1, TB2 и QFT TB Blood Collection Tubes от три отделни партии бяха включени в това проучване. Тествани са три репликата на донор на партида епруветки за вземане на кръв. Епруветките Nil и Mitogen бяха тествани с по едно повторение.

Кръвта от всеки участник е взета в епруветки за вземане на кръв с литиев хепарин и след това 1 ml кръв е прехвърлена във всяка от епруветките за вземане на кръв QFT-Plus и QFT Blood Collection Tubes и тествана в съответствие с процедурата за анализ. За всяка положителна и отрицателна група проби общата дисперсия на резултатите от епруветката QFT-Plus не трябва да е значително по-голяма от общата дисперсия на резултатите от епруветката QFT. Това се определя от р-стойността, получена чрез теста за хомогенност на вариациите (Homogeneity of Variance, HOV) на Левен. Ако р-стойността не е значима ($p > 0,05$) и/или вариацията на епруветките QFT-Plus TB е по-малка от тази на епруветката QFT TB, то тогава е имало вариация между епруветките QFT-Plus и QFT TB.

Таблица 15. Сравнение на вариациите между епруветките за вземане на кръв QFT-Plus и QFT TB Blood Collection Tubes с помощта на теста за хомогенност на вариациите (Homogeneity of Variance, HOV) на Левен

Вид на аликвотната част	Разлика	Действие	Зависим	P-стойност	Значим
Положителен	TB2 спрямо QFT	Sub_Type	Остатъчен	0,0378	Да
Положителен	TB2 спрямо QFT	Sub_Type	Остатъчен	0,0540	Не
Отрицателен	TB2 спрямо QFT	Sub_Type	Остатъчен	0,1025	Не
Отрицателен	TB2 спрямо QFT	Sub_Type	Остатъчен	0,6344	Не

Разликите между епруветките за вземане на кръв QFT-Plus и QFT TB Blood Collection Tubes не са значителни, с изключение на епруветката QFT-Plus TB2, когато е тествана с положителни участници. Когато се анализира оценката на стандартното отклонение, вариацията, наблюдавана при епруетка QFT-Plus TB2, е по-малка (0,06089), отколкото при епруветката QFT TB (0,07641), както е показано в Таблица 16. Следователно дисперсията на епруветките QFT-Plus TB1 и TB2 Blood Collection Tubes не е по-голяма от тази на епруветката QFT TB Blood Collection Tube.

Таблица 16. Стандартно отклонение за остатъка и 95% доверителен интервал за положителни участници

Вид на аликвотната част	Подтип	Оценка на стандартно отклонение	95% LCL	95% UCL
Положителен	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Положителен	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Положителен	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

Повторяемост в рамките на партидата

Проведено е проучване за оценка на възпроизводимостта в рамките на партидата на епруветките QFT-Plus Blood Collection Tubes чрез сравняване на концентрацията на IFN- γ от повторения на епруветки за вземане на кръв QFT-Plus TB Blood Collection Tubes.

Шест аликвоти от една кръвна проба от едни и същи участници с потвърдена туберкуозна инфекция бяха пуснати в 6 повтарящи се епруветки за вземане на кръв от по една партида от двете епруветки QFT-Plus (TB1 и TB2). Тестването беше извършено при 13 участници. %CV е изчислен за всеки донор и за всички донори, за да се получи среден %CV, както е показано в Таблица 17.

Таблица 17. %CV за средната стойност, стандартното отклонение, минимума, медианата и максимума във всяка епруветка QFT-Plus TB Blood Collection Tube при положителни за туберкулоза участници

Епруветка QFT-Plus	Размер на аликвотната част	Средна стойност (%CV)	Стандартно отклонение	Минимум	Медиана	Максимум
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Резултатите показват, че средният %CV за TB1 и TB2 е ~13%, което отговаря на критериите за приемане $\leq 30\%$ и демонстрира повторяемост в рамките на партидата.

Граница на празна проба (Limit of Blank, LoB)

Беше оценена границата на празна проба (Limit of Blank, LoB) за анализа QFT-Plus. Два репликата, всеки от по 14 отделни проби от нормални човешки плазмени проби (като празни проби), бяха тествани с 2 партиди QFT-Plus ELISA от 3 оператора в 3 дни на тестване, по един оператор на ден на тестване за общо 84 репликата от всяка партида от набора ELISA.

Стойностите на LoB (IU/mL) за 2 партиди от набора ELISA бяха изчислени отделно, както е показано в Таблица 18.

Таблица 18. Стойности на LoB (IU/mL) за 2 партиди от набора QFT-Plus ELISA Kit

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

По-голямата стойност на LoB от 0,040 IU/mL в двете партиди на набора QFT-Plus ELISA kit, беше отчетена като крайна стойност на LoB.

Граница на откриване (Limit of Detection, LoD)

Беше оценена границата на откриване (Limit of Detection, LoD) за анализа QFT-Plus. Чрез комбиниране на 14 отделни плазмени проби с човешка плазма беше генерирана туберкулозна сборна проба. Всеки от трите оператора приготви стандартен референтен IFN- γ разтвор при 1,0 IU/mL, разреден в буфер. Направени бяха серии от разреждания с 8 концентрации. Проучването е проведено в продължение на 3 дни от 3 редуващи се оператори, използвайки 2 партиди с набори QFT-Plus ELISA Kit. За всеки ден на изпитване бяха тествани по 5 репликата от всяка концентрация във всеки набор от серийни разреждания за общо 45 репликата за всяко разреждане на концентрацията на IFN- γ всяка партида от набора QFT-Plus ELISA Kit.

Стойността на LoD за всяка от тестваните партиди от набора QFT-Plus ELISA Kit бяха изчислени отделно, както е показано в Таблица 19.

Таблица 19. Изчислени стойности на LoD (IU/mL) за 2 партиди от набора QFT-Plus ELISA Kit

QFT-Plus ELISA Kit	Вероятност	Изчислена концентрация (IU/ml)	Долна 95% доверителна граница за оценка	Горна 95% доверителна граница за оценка
Набор 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Набор 2	0,95	0,065	0,060	0,073

По-голямата стойност на LoD от 0,065 IU/mL в двете партиди на набора QFT-Plus ELISA Kit беше отчетена като крайна стойност на LoD.

Интерфериращи вещества

Проведено е проучване за определяне на ефектите на потенциално интерфериращи вещества върху ефективността на QFT-Plus ELISA за откриване на IFN- γ . Интерферентите, включени в това проучване, са: триглицериди (общо), хемоглобин, белтък (общ серум), билирубин (конюгиран), билирубин (неконюгиран), абакавир сулфат, циклоспорин и преднизолон. Пет сборни плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ бяха приготвени с използване на различни интерферентни концентрации. Базовото ниво на IFN- γ в сборната проба беше подготвено с предварително определено налично количество IFN- γ (приблизително 0,21, 0,45 и 1,4 IU/mL). След това тази сборна проба беше използвана за подготовка на интерферентните сборни проби. Тестваните концентрации на интерферентни вещества са 0 mg/dL, 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL и 20 mg/dL. Целевите интерферентни концентрации се основават на референтни интервали, патологични стойности, терапевтични диапазони и токсични диапазони или според препоръките на продавача или общо приетите клинични нива. Бяха тествани шест репликата за всяко ниво на концентрация на интерферентна проба.

За всяка концентрация на пробата беше извършен - тест с две проби, сравнявайки разликата със средната стойност на \log_{10} (IU/mL) на първичното интерферентно ниво в сравнение с контролата (т.е. ниво без интерференция), както е показано в Таблице 20 и 21. Изчислената разлика в отговора в средния диапазон, заедно със съответните двустранни 95% доверителни интервали и р-стойността също бяха отчетени.

Таблица 20. Log10 IU/mL: Обобщена таблица на Т-теста за разликите в средните стойности между контролното и първичното интерферентно ниво за всяко ниво на концентрация на интерферент и IFN- γ

Интерферент	Интерферентно ниво	Концентрация на пробата (IU/ml)	Вариации	Средна разлика	Долна граница на 95% CI	Горна граница 95% CI	P-стойност	Успешен
Триглицериди	Високо	1,4	Равни	0,019	-0,040	0,077	0,491	Да
		0,45	Равни	0,004	-0,022	0,030	0,732	Да
		0,21	Равни	0,006	-0,035	0,047	0,759	Да
Хемоглобин	Високо	1,4	Равни	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Да
		0,45	Равни	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Да
		0,21	Равни	0,000	-0,034	0,035	0,980	Да
Белтък	Високо	1,4	Равни	0,004	-0,034	0,042	0,836	Да
		0,45	Равни	0,001	-0,38	0,040	0,962	Да
		0,21	Равни	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Да
Билирубин (конюгиран)	Високо	1,4	Равни	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Да
		0,45	Равни	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Да
		0,21	Равни	-0,014	0,074	0,046	0,625	Да
Неконюгиран билирубин	Високо	1,4	Равни	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Да
		0,45	Равни	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Да
		0,21	Равни	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Да
Абакавир	Високо	1,4	Равни	0,008	-0,025	0,041	0,601	Да
		0,45	Равни	0,012	-0,019	0,044	0,412	Да
		0,21	Равни	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Да

Таблицата продължава на следващата страница

Таблицата продължава от предишната страница

Таблица 20. Log₁₀ IU/mL: Обобщена таблица на Т-теста за разликите в средните стойности между контролното и първичното интерферентно ниво за всяко ниво на концентрация на интерферент и IFN- γ

Интерферент	Интерферентно ниво	Концентрация на пробата (IU/ml)	Вариации	Средна разлика	Долна граница на 95% CI	Горна граница на 95% CI	P-стойност	Успешен
Циклоспорин	Високо	1,4	Равни	0,014	-0,020	0,047	0,383	Да
		0,45	Равни	0,005	-0,035	0,045	0,773	Да
		0,21	Равни	0,024	-0,008	0,056	0,131	Да
Преднизолон	Високо	1,4	Равни	0,017	-0,017	0,050	0,293	Да
		0,45	Равни	0,000	-0,036	0,036	0,979	Да
		0,21	Равни	0,015	-0,035	0,065	0,524	Да

Таблица 21. Log10 IU/mL: Обобщена таблица на Т-теста за разликите в средните стойности между контролното и високото интерферентно ниво за всяко ниво на концентрация на интерферент и IFN- γ

Интерферент	Интерферентно ниво	Концентрация на пробата (IU/ml)	Вариации	Средна разлика	Долна граница на 95% CI	Горна граница 95% CI	P-стойност	Успешен
Триглицериди	Високо	1,4	Равни	0,053	-0,004	0,110	0,063	Да
		0,45	Равни	0,039	-0,021	0,058	< 0,001	Да
		0,21	Равни	0,034	-0,002	0,071	0,061	Да
Хемоглобин	Високо	1,4	Равни	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Да
		0,45	Равни	0,016	-0,007	0,040	0,152	Да
		0,21	Равни	0,014	-0,030	0,059	0,489	Да
Белтък	Високо	1,4	Равни	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Да
		0,45	Равни	0,000	-0,046	0,046	0,992	Да
		0,21	Равни	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Да
Билирубин (конюгиран)	Високо	1,4	Равни	0,001	-0,046	0,048	0,961	Да
		0,45	Равни	0,012	-0,043	0,067	0,639	Да
		0,21	Равни	0,015	-0,044	0,074	0,586	Да
Неконюгиран билирубин	Високо	1,4	Равни	0,015	-0,011	0,042	0,231	Да
		0,45	Равни	0,015	-0,023	0,052	0,411	Да
		0,21	Равни	0,012	-0,033	0,057	0,566	Да
Абакавир	Високо	1,4	Равни	0,013	-0,015	0,040	0,322	Да
		0,45	Равни	0,015	-0,014	0,044	0,283	Да
		0,21	Равни	0,008	-0,034	0,050	0,677	Да

Таблицата продължава на следващата страница

Таблицата продължава от предишната страница

Таблица 21. Log₁₀ IU/mL: Обобщена таблица на Т-теста за разликите в средните стойности между контролното и високото интерферентно ниво за всяко ниво на концентрация на интерферент и IFN- γ

Интерферент	Интерферентно ниво	Концентрация на пробата (IU/ml)	Вариации	Средна разлика	Долна граница на 95% CI	Горна граница на 95% CI	P-стойност	Успешен
Циклоспорин	Високо	1,4	Равни	0,002	-0,019	0,024	0,816	Да
		0,45	Равни	0,007	-0,030	0,043	0,682	Да
		0,21	Равни	0,015	-0,007	0,038	0,155	Да
Преднизолон	Високо	1,4	Равни	0,007	-0,016	0,030	0,518	Да
		0,45	Равни	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Да
		0,21	Равни	0,021	-0,025	0,068	0,334	Да

Резултатите не показват значими разлики между първичното ниво на интерференция и контролата (ниво без интерференция) и за високото интерферентно ниво, с изключение на нивото на концентрация на триглицериди от 0,45 IU/mL. Средната разлика беше определена в рамките на +/- 2 стандартни отклонения. Това показва, че разликата е в рамките на очакваната вариабилност на анализа и че триглицеридите не оказват смущаващ ефект върху QFT-Plus ELISA.

Изхвърляне

Спазвайте приложимите указания за работа с кръв. Изхвърляйте аликвотните части и материалите, които са в контакт с кръв или кръвни продукти, в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.

Цитирани източници

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.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. Техническо съдействие и повече информация можете да получите от нашия Център за техническа поддръжка на адрес www.qiagen.com/Support (за информация за контакт посетете www.qiagen.com).

Коментари и предложения

Отстраняване на проблеми при ELISA

Неспецифично оцветяване

- | | |
|--|---|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Кръстосано замърсяване на ямките за ELISA | Внимавайте по време на пипетирането и смесването на аликвотната част за свеждане на риска до минимум. |
| в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100x концентрата се използват в рамките на три месеца сред датата на разтварянето. |
| г) Разтворът на ензимния субстрат е замърсен | Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реактиви. |
| д) Смесване на плазмата в епруветките QFT-Plus Blood Collection Tubes преди събиране | След центрофугирането избягвайте изтегляне и капване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела. |

Коментари и предложения

Ниски отчитания на оптичната плътност за стандартите

- | | |
|--|---|
| а) Грешка при разреждането на стандарта | Уверете се, че разрежданията на стандарта на набора са извършени правилно в съответствие с настоящите Инструкции за употреба. |
| б) Грешка при пипетирането | Уверете се, че пипетите са калибрирани и се използват съгласно инструкциите на производителя. |
| в) Температурата на инкубиране е прекалено ниска | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (22 ± 5 °C). |
| г) Времето на инкубиране е твърде кратко | Инкубирането на плаките с конюгат, стандарти и аликвотни части трябва да е за 120 ± 5 минути. Разтворът на ензимен субстрат трябва да се инкубира в плаката за 30 минути. |
| д) Използван е неправилен филтър на четеца за плаки | Плаките трябва да се отчитат при 450 nm с референтен филтър между 620 и 650 nm. |
| е) Реактивите са твърде студени | Всички реактиви, с изключение на конюгат 100x концентрата, трябва да се темперират до стайна температура преди започване на анализа. Това отнема около 1 час. |
| ж) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100x концентрат се използват в рамките на 3 месеца след датата на разтварянето. |

Висок фон

- | | |
|---------------------------------|--|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
|---------------------------------|--|

Коментари и предложения

- | | |
|---|---|
| б) Температурата на инкубиране е твърде висока | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (22 ± 5 °C). |
| в) Наборът/ компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва в рамките на указания срок на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100x концентрата се използват в рамките на три месеца след датата на разтварянето. |
| г) Разтворът на ензимния субстрат е замърсен | Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реактиви. |

Нелинейна стандартна крива и променливост на двойните проби

- | | |
|---|---|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 μ l/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Грешка при разреждането на стандарта | Уверете се, че разрежданията на стандарта са извършени правилно в съответствие с настоящите Инструкции за употреба. |
| в) Лошо смесване | Смесвайте добре реактивите чрез обръщане или леко разбъркване преди прибавянето им към плаката. |
| г) Непостоянна техника на пипетиране или прекъсване по време на извършване на анализа | Прибавянето на алиquotната част и стандарта трябва да се извършва без прекъсване. Всички реактиви трябва да бъдат приготвени преди началото на анализа. |

Символи

Следните символи се фигурират в инструкциите за употреба или на опаковката и етикетите:

Символ

Описание на символа



<N>

Съдържа достатъчно реактиви за <N> реакции



Използвайте до



Този продукт отговаря на изискванията на Европейски регламент 2017/746 за медицински изделия за инвитро диагностика.

EC

REP

Упълномощен представител в Европейската общност/ Европейския съюз

IVD

Медицинско изделие за инвитро диагностика

REF

Каталожен номер

LOT

Партиден номер

MAT

Номер на материала (т.е., етикет на компонента)

COMP

Компоненти

CONT

Съдържа

NUM

Номер

GTIN

Глобален номер на търговска единица

Rn

„R“ означава редакция на Инструкциите за употреба, а „n“ е номерът на редакцията

Символ

Описание на символа



Температурни ограничения



Производител



Направете справка с инструкциите за употреба



Да се пази от светлина



Предупреждение/внимание или Внимание, направете справка с придружаващите документи

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

Тест за инвитро диагностика, който използва пептиден коктейл, симулиращ протеините ESAT-6 и CFP-10, за стимулиране на клетките в хепаринизирана цяла кръв



Съдържа биологичен материал от животински произход



Съдържа биологичен материал от човешки произход

Символ**Описание на символа**

UDI

Уникален идентификатор на изделието

tartrazine

Съдържа Тартразин

sulfuric acid

Съдържа сярна киселина

Приложение А: Техническа информация

Неопределени резултати

Неопределените резултати са нечести и може да са свързани с имунния статус на тестваното лице (5), но може и да са свързани с няколко технически фактора, (напр. неправилно боравене/съхранение на епруветките за вземане на кръв, непълно промиване на плаките за ELISA), ако не се спазват горепосочените инструкции за употреба.

При съмнение за технически проблеми при съхранението на реактивите, вземането на кръв или работата с кръвните аликвотни части повторете целия тест QFT-Plus с нови кръвни проби. Повторното ELISA тестване на стимулирани плазми може да се извърши при съмнение за недостатъчно промиване или други отклонения от процедурата на теста ELISA. Лекарите могат да изберат да изтеглят повторно проба или да извършат други процедури по целесъобразност.

Плазмени проби със съсиреци

Ако при продължително съхраняване на плазмените проби се появят фибринови съсиреци, пробите се центрофугират, за да се утаи съсиреният материал и да се улесни пипетирането на плазмата.

Липемични плазмени проби

Необходимо е да се внимава при пипетиране на липемични проби, тъй като масните отлагания могат да блокират върха на пипетата.

Приложение В: Съкратена процедура на теста ELISA

1. Темперирайте ELISA компонентите, с изключение на конюгата 100X концентрат, до стайна температура за най-малко 60 минути.



2. Разтворете стандарта на набора до 8,0 IU/ml с дестилирана или дейонизирана вода. Подгответе четири (4) разреждания на стандарта.

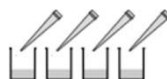


3. Разтворете лиофилизирания конюгат 100x концентрат с дестилирана или дейонизирана вода.

4. Пригответе конюгат с работна концентрация в зеления разредител и добавете 50 µl във всяка ямка.



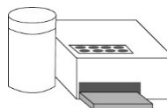
5. Добавете 50 µl от тестовите плазмени проби и 50 µl стандарти в съответните ямки. Смесете с шейкър.



6. Инкубирайте за 120 минути на стайна температура.



7. Промийте ямките най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер.



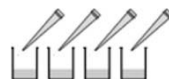
8. Добавете 100 μ l разтвор на ензимен субстрат в ямките.
Смесете с шейкър.



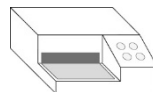
9. Инкубирайте за 30 минути на стайна температура.



10. Добавете 50 μ l ензимен стопиращ разтвор във всички ямки.
Смесете с шейкър.



11. Отчетете резултатите при 450 nm с референтен филтър 620 до 650 nm.



12. Анализирайте резултатите.



Информация за поръчка

Продукт	Съдържание	Кат. №
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	Набор за ELISA с 2 плаки	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Набор за ELISA с 20 плаки	622822
Related products		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 епруветки (по 50 броя от Nil, TB1, TB2 и Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 епруветки (по 25 броя от Nil, TB1, TB2 и Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 епруветки (по 1 брой от Nil, TB1, TB2 и Mitogen/ пакет), пакет от 10	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 епруветки (по 50 броя от Nil, TB1, TB2 и Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 епруветки (по 50 броя от Nil, TB1, TB2 и Mitogen)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 епруветки (по 1 брой от Nil, TB1, TB2 и Mitogen/ пакет), пакет от 10	623222

За актуална лицензионна информация и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте инструкциите за употреба на съответния набор QIAGEN. Ръководствата за употреба на набора QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за технически услуги на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Хронология на редакциите на документа

Дата	Промени
R2, юни 2021 г.	<p>Включена информация за пакет за употреба при един пациент</p> <p>Преразгледани Таблици 10 и 11, за да се разграничат данните от QFT-GIT и QFT-Plus</p> <p>Актуализиран раздел Описание и принцип, за да се добави информация за тестовата популация и обхвата на измерване</p> <p>Добавена е Таблица 9 за добавяне на данни за съотношението на вероятност на QFT-Plus</p>
R3, октомври 2021 г.	<p>Връщане на каталожните номера към оригиналните каталожни номера</p> <p>Добавена декларация за еднократна употреба за ленти за микроплаки в съдържанието на набора</p>
R4, Март 2023 г.	Форматиране на файлове

Тази страница умишлено е оставена празна

Ограничено лицензионно споразумение за набора QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit

Употребата на този продукт означава, че всеки купувач или потребител на продукта приема следните условия:

1. Продуктът може да се използва само по протоколите, предоставени с продукта и тези Инструкции за употреба, и само с компонентите, съдържащи се в набора. QIAGEN не предоставя лиценз по никакви права върху своята интелектуална собственост за употребата или включването на приложените компоненти на този набор с компоненти, които не са включени в този набор, освен както е описано в протоколите, предоставени с продукта, тези Инструкции за употреба и допълнителните протоколи, които могат да се изтеглят от адрес www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са тествани щателно или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти се лицензират за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от всички други лицензи, изрични или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора се съгласяват да не предприемат и да не позволяват на други лица да предприемат стъпки, които могат да улеснят или да доведат до някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®, Регистрираните имена, търговските марки и пр., използвани в настоящия документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона.

03/2023 L1123669 1123669BG © 2023 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчки: www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка support.qiagen.com |
Уебсайт www.qiagen.com