

Upute za uporabu kompleta QuantiFERON[®]-TB Gold Plus ELISA Kit



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Inačica 1

IVD

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Za uporabu s epruvetama QuantiFERON[®]-TB Gold Plus Blood
Collection Tubes

CE₀₁₉₇

REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Njemačka

R4 **MAT**

1123669HR

Sadržaj

Predviđena uporaba	5
Predviđeni korisnik	5
Opis i načelo.....	6
Informacije o patogenu.....	6
Sažetak i objašnjenje	7
Načela ispitivanja	9
Uključeni materijali	11
Sadržaj kompleta	11
Dijelovi kompleta.....	12
Platforma i softver	12
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	13
Dodatni reagensi	13
Potrošni materijal	13
Oprema	13
Upozorenja i mjere opreza	14
Sigurnosne informacije.....	14
Informacije za slučaj nužde.....	15
Mjere opreza	16
Pohrana i rukovanje reagensima	18
Stabilnost tijekom uporabe	18
Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi.....	18
Pohrana i rukovanje ispitcima.....	19

Protokol: izvođenje ELISA testa	20
Rezultati (izračuni).....	26
Generiranje standardne krivulje i vrijednosti uzoraka.....	26
Kontrola kvalitete testa	28
Tumačenje rezultata	30
Ograničenja	32
Radne značajke.....	33
Klinička ispitivanja	33
Osjetljivost.....	35
Očekivane vrijednosti	43
Sažetak sigurnosti i radnog učinka.....	49
Radne značajke ispitivanja	50
Analitičke radne značajke	50
Odlaganje u otpad	63
Reference.....	64
Vodič za rješavanje problema	66
Simboli.....	69
Dodatak A: Tehnički podaci.....	72
Neodređeni rezultati	72
Zgrušani uzorci plazme	72
Uzorci lipemične plazme	72
Dodatak B: Skraćeni testni postupak ELISA.....	73
Informacije za naručivanje.....	75
Povijest revizija dokumenta	77

Predviđena uporaba

Ispitivanje QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) je *in vitro* dijagnostički test koji se izvodi s pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine ESAT-6 i CFP-10 radi stimuliranja stanica heparinizirane pune krvi. Otkrivanje interferona gama- γ (IFN- γ) enzimski vezanim imunosorbent ispitivanjem (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) upotrebljava se za identifikaciju *in vitro* odgovora na one peptidne antigene koji su povezani s infekcijom bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus je neizravni test na infekciju (uključujući bolest) bakterijom *M. tuberculosis* te je namijenjen uporabi uz procjenu rizika, radiografiju i ostale medicinske i dijagnostičke procjene.

Predviđeni korisnik

Ovaj komplet namijenjen je za profesionalnu uporabu.

Predviđeno je da ispitivanje QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) upotrebljava obučeno osoblje u laboratorijskom okruženju.

Opis i načelo

Informacije o patogenu

Tuberkuloza je zarazna bolest koju uzrokuje infekcija kompleksom organizama *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* i *M. caprae*), a koji se tipično šire na nove domaćine kapljičnim putem s pacijenata oboljelih od plućne tuberkuloze. Novozaražena osoba može se razboljeti od tuberkuloze u roku od nekoliko tjedana ili mjeseci, ali većina zaraženih osoba ostane zdrava. U nekih osoba postoji latentna tuberkulozna infekcija (Latent Tuberculosis Infection, LTBI), nezarazno asimptomatsko stanje, koje se nakon nekoliko mjeseci ili godina može razviti u tuberkulozu. Glavna svrha dijagnosticiranja latentne tuberkulozne infekcije (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) je razmatranje liječenja u svrhu sprječavanja tuberkuloze. Tijekom više od 100 godina jedini dostupan način dijagnosticiranja latentne tuberkulozne infekcije (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) bio je tuberkulinski kožni test (Tuberculin Skin Test, TST) (4). Kožna osjetljivost na tuberkulin razvija se 2 do 10 tjedana nakon infekcije. Međutim, neke zaražene osobe, uključujući oboljele od brojnih stanja koja ometaju imunološke funkcije, ali i one bez takvih stanja, ne reagiraju na tuberkulin. Nasuprot tome, neke osobe za koje nije vjerojatno da su zaražene bakterijom *M. tuberculosis* pokazuju znakove osjetljivosti na tuberkulin i imaju pozitivne rezultate tuberkulinskog kožnog testa (Tuberculin Skin Test, TST) nakon cijepljenja cjepivom Bacille Calmette-Guérin (BCG), zaraze drugim mikobakterijama, a ne kompleksom bakterija *M. tuberculosis* ili zbog drugih neodređenih čimbenika.

Valja razlikovati latentnu tuberkuloznu infekciju (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) od tuberkuloze, bolesti koja se mora prijaviti, a koja obično zahvaća pluća i donji dišni sustav, ali može zahvatiti i druge organske sustave. Tuberkuloza se dijagnosticira na temelju povijesnih, fizičkih, radioloških i mikobakterioloških nalaza.

Sažetak i objašnjenje

Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) četvrta je generacija tehnologije testiranja QuantiFERON-TB koja procjenjuje stanično posredovan odgovor putem kvantitativnog mjerenja IFN- γ u uzorku pune krvi. QFT-Plus je kvalitativan test za mjerenje stanicama posredovanih imunoloških (Cell-Mediated Immune, CMI) odgovora na peptidne antigene koji simuliraju proteine mikobakterija. Ti proteini, ESAT-6 i CFP-10, ne postoje ni u jednom BCG soju ni u većini netuberkuloznih mikobakterija, osim u *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1). Osobe zaražene kompleksom organizama *M. tuberculosis* obično u krvi imaju limfocite koji prepoznaju te i druge mikobakterijske antigene. U tom postupku prepoznavanja stvara se i otpušta citokin, IFN- γ . Glavna je svrha testa otkrivanje i nakon toga kvantifikacija IFN- γ .

Tuberkulinski kožni testovi i IGRA testovi korisni su, ali nedovoljni za dijagnosticiranje infekcije kompleksom *M. tuberculosis* u bolesnih pacijenata – pozitivan rezultat može pomoći pri dijagnozi tuberkuloze; međutim, infekcije drugim mikobakterijama (npr. *M. kansasii*) također mogu uzrokovati pozitivne rezultate. Za potvrdu ili isključivanje tuberkuloze potrebne su dodatne medicinske i dijagnostičke procjene.

Antigeni koji se upotrebljavaju u testu QFT-Plus su koktel peptida koji simuliraju proteine ESAT-6 i CFP-10. Brojna istraživanja pokazala su da ovi peptidni antigeni stimuliraju odgovore IFN- γ u T stanicama osoba zaraženih bakterijom *M. tuberculosis*, ali načelno ne u nezaraženih osoba i osoba cijepljenih BCG-om koje ne boluju od bolesti ili nemaju rizik od latentne tuberkulozne infekcije (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) (1,2,6,9). Međutim, liječenja ili stanja koja narušavaju imunološke funkcije potencijalno mogu smanjiti odgovore IFN- γ . Pacijenti zaraženi određenim drugim mikobakterijskim infekcijama također mogu reagirati na ESAT-6 i CFP-10 jer su geni koji kodiraju te proteine prisutni u bakterijama *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1,3,7).

Testna populacija za testiranje QFT-Plus su pacijenti s klinički potvrđenom aktivnom tuberkulozom i pacijenti s rizikom od infekcije tuberkulozom ili latentne tuberkulozne infekcije (Latent Tuberculosis Infection, LTBI). Ne primjenjuju se dobna, spolna ili druga ograničenja.

Pri infekciji bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) CD4⁺ T stanice imaju ključnu ulogu u imunološkoj kontroli zahvaljujući izlučivanju citokina IFN- γ . Sada postoje dokazi o tome da CD8⁺ T stanice sudjeluju u obrani domaćina od MTB-a proizvodeći IFN- γ i druge topive faktore koji aktiviraju makrofage u svrhu suzbijanja rasta MTB-a, uništavaju zaražene stanice ili izravno liziraju unutarstanični MTB. CD8⁺ stanice specifične za MTB koje proizvode IFN- γ otkrivene su kod ispitanika s latentnom tuberkuloznom infekcijom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) i aktivnom tuberkulozom (TB). Osim toga, opisano je da se CD8⁺ T limfociti specifični za ESAT-6 i CFP-10 češće pronalaze u ispitanika s aktivnom tuberkulozom (TB) u odnosu na one s latentnom tuberkuloznom infekcijom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) te ih se može dovesti u vezu s nedavnom izloženošću bakteriji MTB (8,10 – 12). K tome, CD8⁺ T stanice specifične za MTB koje proizvode IFN- γ otkrivene su i u ispitanika s aktivnom tuberkulozom (TB) uz koinfekciju virusom HIV (13, 14) te u male djece oboljele od tuberkuloze (TB) (15).

Test QFT-Plus ima dvije različite epruvete s TB antigenom: TB Antigen Tube 1 (TB1) i TB Antigen Tube 2 (TB2). Obje epruvete sadržavaju peptidne antigene iz skupine antigena povezanih s kompleksom bakterija MTB, ESAT-6 i CFP-10. I epruveta TB1 i epruveta TB2 sadržavaju peptide iz ESAT-6 i CFP-10 koji su namijenjeni izazivanju stanicama posredovanih imunoloških (Cell-Mediated Immune, CMI) odgovora CD4⁺ pomoćnih T limfocita. Epruveta TB2 sadržava dodatni skup peptida čiji je cilj induciranje stanicama posredovanih imunoloških (Cell-Mediated Immune, CMI) odgovora CD8⁺ citotoksičnih T limfocita.

Faktori rizika od infekcije bakterijom *M. tuberculosis* uključuju povijesne, medicinske ili epidemiološke prediktore tuberkuloze ili izloženosti tuberkulozi. Pogledajte najnoviju smjernicu SZO-a <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> za detaljne preporuke o dijagnosticiranju infekcije bakterijom *M. tuberculosis* (uključujući i bolest) te odabir osoba za testiranje (16). Test QFT-Plus testiran je na nekim skupinama pacijenata koje su indicirane za probir na infekciju tuberkulozom (TB) prema važećim smjernicama SZO-a (16), uključujući: osobe koje su bile pozitivne na virus humane imunodeficijencije (Human Immunodeficiency Virus, HIV), kontakte osoba koje su nedavno oboljele od tuberkuloze (TB) i stanovnike u vrlo bliskim okruženjima koji su bili izloženi odraslim osobama s visokim rizikom od tuberkuloze (TB) (5).

Načela ispitivanja

Test QFT-Plus kvalitativno je ispitivanje u kojem se upotrebljavaju specijalizirane epruvete za uzimanje krvi koje sadrže peptidne antigene koji simuliraju proteine *M. tuberculosis* i koje se upotrebljavaju za uzimanje pune krvi. Krv se inkubira u epruvetama od 16 do 24 sata, nakon čega se izdvaja plazma i testira na prisutnost IFN- γ proizvedenog kao odgovor na peptidne antigene.

Najprije se puna krv prikuplja u svaku od epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes, što uključuje epruvetu Nil, epruvetu TB1, epruvetu TB2 i epruvetu Mitogen. Umjesto toga, krv se može prikupiti u jednu epruvetu za uzimanje krvi koja sadržava litij-heparin ili natrij-heparin kao antikoagulans, a zatim prenijeti u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes trebaju se protresti kako bi se antigen izmiješao s krvi te ih treba što prije i u roku od 16 sati od prikupljanja inkubirati na temperaturi od 37 °C \pm 1 °C. Nakon inkubacije u trajanju od 16 do 24 sata epruvete se centrifugiraju, plazma se obrađuje te se ELISA testom mjeri količina IFN- γ (IU/ml). U testu QFT-Plus ELISA upotrebljava se rekombinantni humani IFN- γ standard, koji je ispitan u odnosu na referentni IFN- γ pripravak (NIH ref.: Gxg01-902-535). Rezultati testnih uzoraka izražavaju se u međunarodnim jedinicama po mililitru (IU/ml) u odnosu na standardnu krivulju pripremljenu testiranjem razrjeđivanja standarda isporučenog s kompletom.

Heterofilna (npr. humana anti-mišja) protutijela u serumu ili plazmi određenih osoba mogu uzrokovati smetnje u imunoispitivanjima. Djelovanje heterofilnih protutijela u testu QFT-Plus ELISA umanjeno je dodavanjem običnog mišjeg seruma u Green Diluent i uporabom fragmenata F(ab')₂ monoklonskog protutijela kao protutijela za hvatanje IFN- γ koje je nanoseno u jažice na mikrotitar pločicama.

Smatra se da je ispitivanje QFT-Plus pozitivno na IFN- γ odgovor kada vrijednost za bilo koju epruvetu s TB antigenom značajno premašuje Nil vrijednost IFN- γ izraženu u IU/ml. Uzorak plazme iz Mitogen epruvete služi kao pozitivna kontrola IFN- γ svakog testiranog ispitka. Slab odgovor na Mitogen (< 0,5 IU/ml) smatra se neodređenim rezultatom ako uzorak krvi pokazuje i negativan odgovor na TB antigene. Taj obrazac može nastati u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita zbog nepravilnog postupanja s ispitkom, punjenja/miješanja Mitogen epruvete ili nemogućnosti limfocita pacijenta da stvore IFN- γ . Do povišenih razina IFN- γ u Nil uzorku može doći u slučaju prisutnosti heterofilnih protutijela ili intrinzičnog lučenja IFN- γ . Nil epruveta prilagođava se za pozadinu (npr. povišene razine cirkulirajućeg IFN- γ ili prisutnost heterofilnih protutijela). Razina IFN- γ u Nil epruveti oduzima se od razine IFN- γ za epruvete s TB antigenom i Mitogen epruvetu. Mjerni raspon testa QFT-Plus ELISA iznosi do 10 IU/ml.

Uključeni materijali

Sadržaj kompleta

ELISA komponente Kataloški br.	Komplet s 2 pločice 622120	Referentni laboratorijski paket 622822
Microplate strips (Mikrotitar stripovi) (12 x 8 jažica) obloženi mišjim antihumanim IFN- γ monoklonskim protutijelom	2 kompleta mikrotitar stripova s 12 x 8 jažica	20 kompleta mikrotitar stripova s 12 x 8 jažica
IFN- γ Standard (IFN- γ standard), liofiliziran (sadržava rekombinantni humani IFN- γ , goveđi kazein, 0,01 % w/v timerosala)	1 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituira)	10 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituira)
Green Diluent (Zeleni diluens) (sadržava goveđi kazein, obični serum miša, 0,01 % w/v timerosala)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (100x koncentrirani konjugat), liofiliziran (mišji antihumani IFN- γ HRP, sadržava 0,01 % timerosala)	1 x 0,3 ml (kada se rekonstituira)	10 x 0,3 ml (kada se rekonstituira)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x koncentrirani pufer za ispiranje) (pH 7,2, sadržava 0,05 % v/v sredstva ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Otopina enzimskog supstrata) (sadržava H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimaska otopina za zaustavljanje reakcije) (sadržava 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
<i>Upute za uporabu kompleta QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

Dijelovi kompleta

Kontrole i kalibratori

U testu QFT-Plus ELISA upotrebljava se rekombinantni humani IFN- γ standard, koji je ispitan u odnosu na referentni IFN- γ pripravak (NIH ref.: Gxg01-902-535).

Platforma i softver

Softver za analizu QFT-Plus Analysis Software opcionalan je za uporabu i može se upotrebljavati za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata. Dostupan je za preuzimanje na www.qiagen.com.

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Dodatni reagensi

- epruvete QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- deionizirana ili destilirana voda, 2 litre

Potrošni materijal

- poklopac pločice za pločicu s 96 jažica
- **opcionalno:** mikroeprovete od 1 ml s čepovima u nosačima s formatom od 96 jažica ili neobložene mikropločice s plastičnim brtvama za pohranu plazme (22 pacijenta / nosač ili pločica)
- spremnici za reagense

Oprema*

- inkubator za temperaturu od $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (sa ili bez CO₂)
- kalibrirane pipete s varijabilnim volumenom za doziranje od 10 µl do 1000 µl, s jednokratnim vršcima
- kalibrirane višekanalne pipete za doziranje 50 µl i 100 µl s jednokratnim vršcima
- tresilica za mikrotitar pločice brzine od 500 i 1000 o/min
- uređaj za ispiranje mikrotitar pločica (radi sigurnosti prilikom rukovanja uzorcima plazme preporučuje se automatizirani uređaj za ispiranje pločica)
- čitač mikrotitar pločica s filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm
- vorteks miješalica varijabilne brzine
- centrifuga koja može centrifugirati epruvete za uzimanje krvi pri najmanje 3000 RCF (g)
- menzura, 1 litra ili 2 litre

* Prije uporabe provjerite jesu li instrumenti provjereni i kalibrirani prema preporukama proizvođača.

Upozorenja i mjere opreza

Imajte na umu da ćete ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s uređajem, ovisno o lokalnim propisima koje je potrebno proučiti, možda morati prijaviti proizvođaču i/ili njegovu ovlaštenom predstavniku i regulatornom tijelu koje je nadležno za korisnika i/ili pacijenta.

Za in vitro dijagnostičku uporabu.

Sigurnosne informacije

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi www.qiagen.com/safety. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati SDS za svaki komplet i komponentu kompleta QIAGEN.

- Ispitci i uzorci potencijalno su zarazni. Odlazite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim postupcima.
- Negativan rezultat testa QFT-Plus ne isključuje mogućnost infekcije bakterijom *M. tuberculosis* ili tuberkuloze: uzrok lažno negativnih rezultata može biti stadij infekcije (npr. ispitak primljen prije nastupanja staničnog imunog odgovora), neispravno rukovanje epruvetama za uzimanje krvi nakon venepunkcije, neispravno provođenje ispitivanja ili druge pojedinačne imunološke varijable, uključujući one povezane s komorbidnim stanjima. Proizvodnja heterofilnih protutijela ili nespecifičnog IFN- γ uzrokovana drugim upalnim stanjima može prikriti specifične odgovore na peptide ESAT-6 ili CFP-10.
- Pozitivan rezultat testa QFT-Plus ne bi trebao biti jedina ili definitivna osnova za utvrđivanje infekcije bakterijom *M. tuberculosis*. Neispravno provođenje ispitivanja može prouzročiti lažno pozitivne rezultate testa QFT-Plus.


- Nakon pozitivnog rezultata testa QFT-Plus potrebno je provesti daljnju medicinsku procjenu za aktivnu tuberkulozu (npr. bris na acidorezistentne bacile i uzgoj kulture, rendgenska snimka pluća itd.).
- Iako ni u jednom BCG soju niti u većini poznatih netuberkuloznih mikobakterija nema ESAT-6 i CFP-10, postoji mogućnost da je uzrok pozitivnog testa QFT-Plus infekcija bakterijama *M. kansasii*, *M. szulgai* ili *M. marinum*. U slučaju sumnje na takve infekcije potrebno je provesti alternativne testove.
- Lažno negativni rezultat testa QFT-Plus može biti uzrokovan neispravnim uzimanjem uzorka krvi ili nepravilnim rukovanjem ispitkom, što utječe na funkciju limfocita. Pogledajte odjeljak „Protokol: izvođenje ELISA testa” na stranici 20 za ispravno rukovanje ispitcima krvi. Kašnjenje u inkubaciji može uzrokovati lažno negativne ili neodređene rezultate, a drugi tehnički parametri mogu utjecati na sposobnost otkrivanja značajnog odgovora IFN- γ .

Informacije za slučaj nužde

CHEMTREC

Izvan SAD-a i Kanade +1 703-527-3887

Mjere opreza

<p>OPREZ</p> 	<p>S ljudskom krvlju postupajte kao s potencijalno infektivnom.</p> <p>Pridrđavajte se odgovarajućih smjernica o postupanju s krvlju. Uzorke i materijale koji dolaze u kontakt s krvlju ili krvnim proizvodima zbrinite sukladno državnim i lokalnim propisima.</p>
---	--

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sadržava: sumpornu kiselinu. Upozorenje! Može imati korozivno djelovanje na metale. Uzrokuje nadraživanje kože. Uzrokuje ozbiljno nadraživanje očiju. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

QuantiFERON Green Diluent



Sadržava: tartrazin. Upozorenje! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Izbjegavati ispuštanje u okoliš.

Dodatne informacije

Sigurnosno-tehnički listovi: www.qiagen.com/safety

- Timerosal se upotrebljava kao konzervans u nekim reagensima QFT-Plus. Može biti otrovan ako ga se proguta, udahne ili u dodiru s kožom.
- Odstupanja od *Uputa za uporabu QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* mogu dati pogrešne rezultate. Prije upotrebe pažljivo pročitajte upute.
- Nemojte upotrebljavati komplet ako bilo koja bočica reagensa pokazuje znakove oštećenja ili curenja prije upotrebe.
- **Važno:** pregledajte bočice prije upotrebe. Nemojte upotrebljavati bočice za konjugat ili IFN- γ standard ako bočice pokazuju znakove oštećenja ili ako je gumena brtva oštećena. Nemojte rukovati razbijenim bočicama. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza i odložite bočice na siguran način. Preporučuje se da bočice za konjugat ili IFN- γ standard otvarate s pomoću alata za skidanje osigurača na bočicama radi smanjenja opasnosti od ozljeda uzrokovanih poklopcem s metalnim osiguračem.
- Nemojte miješati ili upotrebljavati mikrotitar stripove, IFN- γ standard, diluens Green Diluent ili 100x koncentrirani konjugat iz različitih serija kompleta QFT-Plus. Ostali reagensi (20x koncentrirani pufer za ispiranje, otopina enzimskog supstrata i enzimska otopina za zaustavljanje odgovora) iz drugih kompleta mogu se mijenjati, pod uvjetom da reagensi ne prekoračuju datum isteka roka trajanja i da se podaci o seriji zabilježe.
- Odložite neupotrijebljene reagense i biološke uzorke u skladu s lokalnim i državnim propisima.
- Nemojte upotrebljavati komplet QFT-Plus ELISA kit nakon datuma isteka roka trajanja.
- Uvijek se morate pridržavati pravilnih laboratorijskih postupaka.
- Pobrinite se da je laboratorijska oprema kao što su uređaji za pranje pločica i čitači kalibrirana / odobrena za uporabu.

Pohrana i rukovanje reagensima

Potrebno je paziti na rokove trajanja i uvjete pohrane ispisane na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.

Stabilnost tijekom uporabe

- Čuvajte komplet ELISA na temperaturi od 2 – 8 °C.
- Otopinu enzimskog supstrata uvijek zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.

Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi

- Upute o rekonstituiranju reagensa potražite u odjeljku „Protokol: izvođenje ELISA testa” na stranici 20.
- Rekonstituirani standard iz kompleta može se čuvati do 3 mjeseca ako je pohranjen na temperaturi od 2 – 8 °C.

Zabilježite datum rekonstitucije standarda iz kompleta.

- Rekonstituirani 100x koncentrirani konjugat mora se i dalje čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C i potrošiti u roku od 3 mjeseca.

Zabilježite datum rekonstitucije konjugata.

- Konjugat jakosti za upotrebu mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
- Pufer za ispiranje jakosti za upotrebu može se čuvati na sobnoj temperaturi do 2 tjedna.
- Mikrotitar stripovi namijenjeni su isključivo za jednokratnu uporabu. Neiskorišteni stripovi mogu se ukloniti s okvira pločice i pohraniti za buduću uporabu.

Pohrana i rukovanje ispitcima

Pogledajte *Upute za uporabu epruveta QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes* (1123668) za pojedinosti o tijeku rada za uzimanje krvi za test QFT-Plus.

Protokol: izvođenje ELISA testa

Važne točke prije započinjanja

Postavljanje (vrijeme potrebno za izvođenje ispitivanja)

- Da bi dobio valjane rezultate ispitivanja QFT-Plus, rukovatelj treba izvršiti određene zadatke unutar zadanog vremena. Preporučuje se da rukovatelj prije uporabe ispitivanja pomno isplanira svaku fazu ispitivanja kako bi si ostavio dovoljno vremena da provede svaku fazu. U nastavku se navodi procijenjeno potrebno vrijeme; naznačeno je i vrijeme testiranja većeg broja uzoraka metodom skupne obrade.
 - približno 3 sata za jednu ELISA pločicu
 - < 1 sat rada
 - dodajte 10 do 15 minuta za svaku dodatnu pločicu

IFN- γ ELISA

- Pogledajte odjeljak „Sadržaj kompleta” na stranici 11 i odjeljak „Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni” na stranici 13 za materijale potrebne za izvođenje ELISA testa.

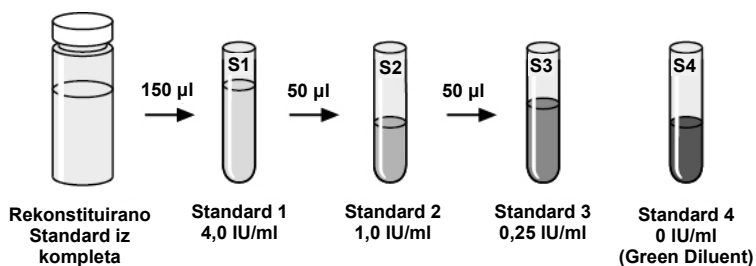
Postupak

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, prije uporabe moraju postići sobnu temperaturu ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ostavite najmanje 60 minuta za postizanje toplinske ravnoteže.
2. Uklonite nepotrebne stripove ELISA pločice s okvira, vratite ih u vrećicu od folije i pohranite ih do uporabe u hladnjaku.

3. Pripremite najmanje 1 strip za standarde QFT-Plus i dovoljan broj stripova za broj ispitanika koji se testiraju (pogledajte sliku 2 za preporučeni format pločice). Nakon uporabe sačuvajte okvir i poklopac za uporabu s preostalim stripovima.
- 3a. Rekonstituirajte IFN- γ standard količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na naljepnici bočice. Pažljivo promiješajte kako biste stvaranje pjene sveli na najmanju moguću mjeru i provjerite je li cijeli sadržaj bočice potpuno otopljen. Rekonstitucijom IFN- γ standarda na točan volumen dobivamo otopinu koncentracije 8,0 IU/ml.
- 3b. S pomoću rekonstituiranog standarda pripremite niz razrjeđivanja od 4 koncentracije IFN- γ (pogledajte sliku 1.).
- 3c. Trebala bi se generirati standardna krivulja sa sljedećim koncentracijama IFN- γ :
- S1 (Standard 1) sadržava 4,0 IU/ml
 - S2 (Standard 2) sadržava 1,0 IU/ml
 - S3 (Standard 3) sadržava 0,25 IU/ml
 - S4 (Standard 4) sadržava 0 IU/ml (samo Green Diluent [GD]).
- 3d. Standardi se moraju ispitati barem u duplikatu.
- 3e. Pripremite svježe razrijeđene otopine standarda iz kompleta za svaki postupak ELISA.

Postupak

A	Označite 4 epruvete: S1, S2, S3, S4
B	Dodajte 150 μ l GD-a u S1, S2, S3, S4
C	Dodajte 150 μ l standarda iz kompleta u S1 i dobro promiješajte
D	Preosite 50 μ l iz S1 u S2 i dobro promiješajte
E	Preosite 50 μ l iz S2 u S3 i dobro promiješajte
F	Samo GD služi kao nulti standard (S4)



Slika 1. Pripremanje niza razrjeđivanja standardne krivulje.

4. Rekonstituirajte liofilizirani 100x koncentrirani konjugat s 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Pažljivo promiješajte kako biste stvaranje pjene sveli na najmanju moguću mjeru i provjerite je li cijeli sadržaj bočice potpuno otopljen.
 - 4a. Konjugat jakosti za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100x koncentriranog konjugata razrijedi u diluensu Green Diluent (tablica 1.).
 - 4b. Konjugat jakosti za upotrebu treba se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
 - 4c. Neupotrijebljeni 100x koncentrirani konjugat odmah nakon upotrebe vratite na temperaturu od 2 °C do 8 °C.

Tablica 1. Priprema konjugata (jakosti za upotrebu)

Broj stripova	Volumen konjugata (koncentriran 100x)	Količina diluensa Green Diluent
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. Kad je riječ o uzorcima plazme izdvojenima iz epruveta za uzimanje krvi i zatim pohranjenima (u hladnjak ili zamrzivač), prije dodavanja u ELISA jažicu dobro promiješajte pohranjeni uzorak. Uzorci plazme mogu se čuvati u centrifugiranim epruветama QFT-Plus Blood Collection Tubes do 28 dana na temperaturi od 2 – 8 °C, a uzorci izdvojene plazme mogu se čuvati do 28 dana na temperaturi od 2 – 8 °C. Uzorci izdvojene plazme mogu se čuvati i na temperaturi ispod –20 °C (po mogućnosti nižoj od –70 °C) na dulje vrijeme.

Uzorci plazme mogu se prenijeti/upotrijebiti izravno iz centrifugiranih epruveta za uzimanje krvi radi mjerenja na pločici QFT-Plus ELISA.

Važno: ako se uzorci plazme planiraju izravno prenijeti iz centrifugiranih epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes, potrebno je izbjegavati bilo kakvo miješanje plazme. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

6. Dodajte 50 µl svježe pripremljenog konjugata jakosti za upotrebu u svaku jažicu ELISA pločice.

7. Dodajte 50 µl testnih uzoraka plazme u odgovarajuće jažice (pogledajte preporučeni raspored na ELISA pločici na slici 2.).
8. Konačno, dodajte 50 µl svakog standarda od 1 do 4 u odgovarajuće jažice na pločici (pogledajte preporučeni raspored na ELISA pločici na slici 2.). Standarde treba ispitati najmanje u duplikatu.

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

Slika 2. Preporučeni raspored ELISA pločice. S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (Uzorak 1. Nil kontrolni uzorak plazme), 1 TB1 (Uzorak 1. TB1 plazma), 1 TB2 (Uzorak 1. TB2 plazma), 1M (Uzorak 1. Mitogen plazma).

9. Prekrijte ELISA pločicu i dobro promiješajte konjugat i uzorke plazme / standarde u tresilici za mikrotitar pločice u trajanju od 1 minute na 500 do 1000 o/min. Izbjegavajte prskanje.
10. Prekrijte ELISA pločicu i inkubirajte je na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 120 ± 5 minuta. Za vrijeme inkubacije ELISA pločica se ne bi trebala izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti. Odstupanje od navedenog temperaturnog raspona može rezultirati pogrešnim rezultatima.
11. Za vrijeme inkubacije ELISA pločice pripremite pufer za ispiranje jakosti za upotrebu. Razrijedite jedan dio 20x koncentriranog pufera za ispiranje s 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro promiješajte. U kompletu se nalazi dovoljno 20x koncentriranog pufera za ispiranje da bi se dobile 2 litre pufera za ispiranje jakosti za upotrebu.

12. Nakon završetka inkubacije ELISA pločice isperite jažice ELISA pločice s 400 µl pufera za ispiranje jakosti za upotrebu. Provedite korak ispiranja najmanje 6 puta. Automatizirani uređaj za ispiranje pločica preporučuje se iz sigurnosnih razloga prilikom rukovanja uzorcima plazme.

Temeljito ispiranje vrlo je važno za učinak ispitivanja. Pazite da pri svakom ciklusu ispiranja sve jažice budu do vrha potpuno napunjene puferom za ispiranje.

Preporučujemo da između svakog ciklusa ispiranja ostavite najmanje 5 sekundi za namakanje.

U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati standardni dezinficijens koji se upotrebljava u laboratorijima. Pridržavajte se propisanih uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.

13. Lupkanjem istresite ELISA pločicu okrenutu prema dolje na upijajućem ručniku (koji ne otpušta vlakna) kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata u svaku jažicu pločice, prekrijte pločicu i dobro promiješajte s pomoću tresilice za mikrotitar pločice 1 minutu na 500 – 1000 o/min.
14. Prekrijte ELISA pločicu i inkubirajte je na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 30 minuta. Za vrijeme inkubacije ELISA pločica se ne bi trebala izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti.
15. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta dodajte 50 µl enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu na pločici istim redoslijedom kojim ste dodavali supstrat i dobro promiješajte na 500 do 1000 o/min s pomoću tresilice za mikrotitar pločice.
16. Izmjerite optičku gustoću (Optical Density, OD) jažica ELISA pločice u roku od 5 minuta od zaustavljanja reakcije s pomoću čitača mikrotitar pločica opremljenog filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm. Izračunavanje rezultata izvodi se s pomoću vrijednosti OD-a.

Rezultati (izračuni)

Za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata može se upotrijebiti softver za analizu QFT-Plus Analysis Software. Dostupan je na www.qiagen.com. Obvezno upotrebljavajte najnoviju inačicu softvera za analizu QFT-Plus Analysis Software.

Softver provodi procjenu kontrole kvalitete ispitivanja, generira standardnu krivulju i daje rezultat testa za svakog ispitanika, kao što je opisano u odjeljku „Tumačenje rezultata” na stranici 30. Softver prijavljuje sve koncentracije veće od 10 IU/ml kao „> 10” jer te vrijednosti prelaze potvrđeni linearni raspon testa ELISA.

Kao alternativa upotrebi softvera za analizu QFT-Plus Analysis Software, rezultati se mogu utvrditi i na temelju metode navedene u nastavku.

Generiranje standardne krivulje i vrijednosti uzoraka

Ako se ne upotrebljava softver za analizu QFT-Plus Analysis Software

Određivanje standardne krivulje i određivanje vrijednosti IU/ml uzorka zahtijevaju program za rad s proračunskim tablicama kao što je Microsoft® Excel® ako se ne upotrebljava softver za analizu QFT-Plus Analysis Software.

Uporaba programa za rad s proračunskim tablicama

1. Utvrdite srednje vrijednosti OD-a replikata standarda iz kompleta na svakoj pločici.
2. Izradite standardnu krivulju $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ grafičkim prikazom $\log_{(e)}$ srednje vrijednosti OD-a (y os) u odnosu na $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IU/ml (x os), izostavivši nulti standard iz izračuna. Izračunajte liniju najboljeg oblika standardne krivulje regresijskom analizom.

3. Upotrebljavajte standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- γ koncentracije (IU/ml) za svaki testni uzorak plazme s pomoću vrijednosti OD-a svakog uzorka.
4. Za te izračune mogu se upotrijebiti softverski paketi koji su dostupni uz čitače mikrotitar pločica, kao i standardne proračunske tablice ili programi za statistiku (kao npr. Microsoft Excel). Preporučujemo primjenu tih paketa za izračunavanje regresijske analize, koeficijenta varijacije standarda (Coefficient of Variation, % CV), kao i koeficijenta korelacije (r) za standardnu krivulju.

Izračun uzorka

Ako su za standarde dobivena sljedeća očitavanja optičke gustoće (Optical Density, OD), izračuni u kojima se upotrebljava $\log(e)$ slijede ona u tablici 2.

Tablica 2. Standardna krivulja

Standard	IU/ml	Vrijednosti OD-a i b	Srednja vrijednost OD	% CV	Log _(e) IU/ml	Log _(e) – srednja vrijednost (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	NP	-1,386	-2,079
Standard 4	0	0,034, 0,037	0,036	NP	NP	NP

Jednadžba krivulje je $y = 0,7885(X) - 0,9837$, pri čemu je „m” = 0,7885, a „c” = -0,9837. Te se vrijednosti upotrebljavaju u jednadžbi $X = (Y - c)/m$ kako bi se dobila vrijednost X. Na temelju standardne krivulje izračunati koeficijent korelacije (r) = 1,000. NP: nije primjenjivo.

Valjanost ispitivanja određuje se s pomoću kriterija navedenih pod „Kontrola kvalitete testa” na stranici 28.

Standardna krivulja (tablica 2.) upotrebljava se za pretvaranje odgovora OD-a antigena u međunarodne jedinice (IU/ml).

Tablica 3. Izračun uzorka

Antigen	Vrijednost OD	Log ₍₁₀₎ OD vrijednost	X	e ^x (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

Vrijednosti IFN- γ (u IU/ml) za TB1, TB2 i Mitogen ispravljene su za pozadinu oduzimanjem vrijednosti IU/ml dobivene za odgovarajuću kontrolu Nil. Te se ispravljene vrijednosti upotrebljavaju za tumačenje rezultata testa.

Kontrola kvalitete testa

Točnost rezultata testa ovisi o formiranju točne standardne krivulje. Stoga se rezultati izvedeni iz standarda moraju preispitati prije tumačenja rezultata uzorka testa.

Test ELISA valjan je ako su ispunjeni sljedeći kriteriji:

- Srednja vrijednost OD-a Standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.
- % CV za vrijednosti replikata za Standard 1 i Standard 2 mora biti ≤ 15 %.
- Replicirane vrijednosti OD-a Standarda 3 i Standarda 4 ne smiju odstupati od srednjih vrijednosti za više od 0,040 OD jedinica.
- Koeficijent korelacije (r) dobiven iz srednjih vrijednosti apsorbancije standarda mora biti $\geq 0,98$.
- Ako ovi kriteriji nisu ispunjeni, analiza nije valjana i mora se ponoviti.
- Srednja vrijednost OD-a nultog standarda (Green Diluent) trebala bi biti $\leq 0,150$. Ako je srednja vrijednost OD-a $> 0,150$, preporučuje se kontrola postupka ispiranja pločica.

Softver za analizu QFT-Plus Analysis Software izračunava i izvješćuje o tim parametrima za kontrolu kvalitete.

Svaki bi laboratorij trebao odrediti odgovarajuće vrste kontrolnih materijala i učestalost testiranja u skladu s lokalnim, državnim ili drugim primjenjivim akreditacijskim organizacijama. Potrebno je razmotriti vanjsku procjenu kvalitete i alternativne postupke validacije.

Napomena: plazme u koje je dodan rekombinantni IFN- γ pokazale su smanjenja koncentracije do 50 % kada su se čuvale na temperaturi od 2 – 8 °C te –20 °C. Rekombinantni IFN- γ ne preporučuje se za utvrđivanje kontrolnih standarda.

Tumačenje rezultata

Rezultati testa QFT-Plus tumače se na temelju sljedećih kriterija (tablica 4.).

Važno: za postavljanje dijagnoze odnosno isključivanje tuberkuloze i procjenu vjerojatnosti LTBI potrebna je kombinacija epidemioloških, povijesnih, medicinskih i dijagnostičkih nalaza koji se moraju uzeti u obzir pri tumačenju rezultata testa QFT-Plus. Pogledajte općenite smjernice za dijagnosticiranje i liječenje tuberkuloze (TB) i latentne tuberkulozne infekcije (Latent Tuberculosis Infection, LTBI):

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

Tablica 4. Tumačenje rezultata testa QFT-Plus

Nil (IU/ml)	TB1 minus Nil (IU/ml)	TB2 minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Rezultat testa QFT-Plus	Izvrješće/tumačenje
≤ 8,0	≥ 0,35 i ≥ 25 % vrijednosti Nil	Svejedno koliko	Svejedno koliko	Pozitivan [†]	Vjerojatna infekcija bakterijom <i>M. tuberculosis</i>
	Svejedno koliko	≥ 0,35 i ≥ 25 % vrijednosti Nil			
	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25 % vrijednosti Nil	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25 % vrijednosti Nil	≥ 0,50	Negativan	Infekcija bakterijom <i>M. tuberculosis</i> NIJE vjerojatna
	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25 % vrijednosti Nil	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25 % vrijednosti Nil	< 0,50	Neodređen [‡]	Vjerojatnost infekcije bakterijom <i>M. tuberculosis</i> ne može se utvrditi
> 8,0 [§]	Svejedno koliko				

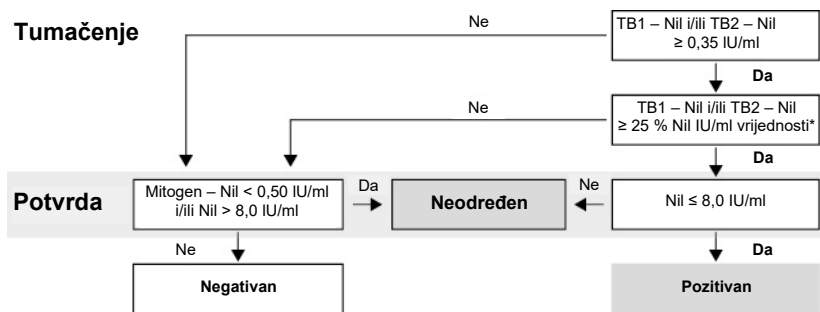
* Odgovori na Mitogen pozitivnu kontrolu (i povremeno TB antigen) mogu biti izvan raspona čitača mikrotitar pločica. To ne utječe na rezultate testa. Softver QFT-Plus vrijednosti > 10 IU/ml prijavljuje kao > 10 IU/ml.

[†] Ako se ne sumnja na infekciju bakterijom *M. tuberculosis*, prvobitno pozitivni rezultati mogu se potvrditi ponovnim testiranjem izvornih uzoraka plazme u duplikatu s pomoću testa QFT-Plus ELISA. Ako je ponovno testiranje jednog ili dvaju replikata pozitivno, rezultat testa trebao bi se smatrati pozitivnim.

[‡] Pogledajte „Vodič za rješavanje problema” na stranici 66 za moguće uzroke.

[§] U kliničkim je ispitivanjima manje od 0,25 % ispitanika imalo razine IFN- γ u vrijednosti od > 8,0 IU/ml za vrijednost Nil.

Magnituda izmjerene razine IFN- γ ne može se dovesti u uzajamnu vezu sa stadijem ili stupnjem infekcije, razinom imunog odgovora ili vjerojatnošću napredovanja u aktivnu bolest. Pozitivan odgovor na tuberkulozu (TB) u osoba negativnih na Mitogen je rijedak, ali je zabilježen u pacijenata oboljelih od tuberkuloze (TB). Ovo ukazuje na to da je IFN- γ odgovor na TB antigene veći od onog na mitogen, što je moguće jer razina mitogena ne stimulira maksimalno limfocite na proizvodnju IFN- γ .



Slika 3. Tumačenje testa QFT-Plus. *Da bi vrijednost TB1 minus Nil ili TB2 minus Nil bila valjana, $\geq 25\%$ Nil IU/ml vrijednosti mora biti iz iste epruvete kao i izvorni rezultat $\geq 0,35$ IU/ml.

Ograničenja

Rezultati testiranja QFT-Plus moraju se upotrebljavati u kombinaciji s epidemiološkom anamnezom svake osobe, njezinim trenutačnim zdravstvenim stanjem i drugim dijagnostičkim pretragama.

Osobe s Nil vrijednostima većima od 8 IU/ml klasificiraju se kao „Neodređeni” jer 25 % viši odgovor na TB antigene može biti izvan raspona mjerenja ispitivanja.

- Prediktivna vrijednost pozitivnog rezultata testa QFT-Plus pri dijagnosticiranju infekcije bakterijom *M. tuberculosis* ovisi o vjerojatnosti infekcije koja se procjenjuje na temelju povijesnih, epidemioloških, dijagnostičkih i drugih nalaza.
- Za postavljanje dijagnoze latentne tuberkulozne infekcije (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) potrebno je isključivanje tuberkuloze medicinskom procjenom, uključujući procjenu trenutačnih medicinskih i dijagnostičkih testova za bolest kako je navedeno.
- Negativan rezultat potrebno je razmotriti uzimajući u obzir medicinske podatke i podatke iz povijesti bolesti osobe koji se odnose na vjerojatnost infekcije bakterijom *M. tuberculosis* i potencijalni rizik od progresije tuberkuloze, pogotovo za osobe s narušenom funkcijom imunskog sustava.

Do nepouzdanih ili neodređenih rezultata može doći iz sljedećih razloga:

- odstupanja od postupka opisanog u ovim Uputama za uporabu
 - neispravnog transporta/rukovanja ispitkom krvi
 - povišenih razina cirkulirajućeg IFN- γ ili prisutnosti heterofilnih protutijela
 - premašivanja potvrđenih vremena za krv od uzimanja ispitka krvi do inkubacije.
- Pogledajte *Upute za uporabu za epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes (1123668)*.

Radne značajke

Klinička ispitivanja

Budući da nema utvrđenog standardnog testa za potvrđivanje ili isključivanje dijagnoze latentne tuberkulozne infekcije (Latent Tuberculosis Infection, LTBI), procjena osjetljivosti i specifičnosti za test QFT-Plus ne može se praktično ocijeniti. Specifičnost testa QFT-Plus približno je utvrđena procjenom stopa lažno pozitivnih rezultata u osoba s niskim rizikom (bez poznatih faktora rizika) za tuberkuloznu infekciju. Osjetljivost je približno utvrđena procjenom skupina ispitanika u studiji kod kojih je na temelju kulture potvrđena aktivna tuberkuloza (TB). Osim toga, radni učinak ispitivanja procijenjen je za pozitivnu i negativnu stopu u populaciji zdravih ispitanika s identificiranim faktorima rizika za infekciju tuberkulozom (mješovito rizična populacija).

Specifičnost

Provedena je multicentrična studija u kojoj je procijenjena klinička specifičnost testa QFT-Plus, a uključivala je 733 ispitanika u studiji za koje se smatralo da imaju nizak rizik od infekcije bakterijom *M. tuberculosis* ili da nemaju faktore rizika za izloženost infekciji ili bolesti. Demografski podaci i faktori rizika za izloženost tuberkulozi utvrđeni su s pomoću standardizirane ankete u vrijeme testiranja. Studija je provedena na četiri nezavisne lokacije, uključujući jednu u Sjedinjenim Američkim Državama, dvije u Japanu i jednu u Australiji. Test QFT-Plus uspoređen je s testom QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Sažetak kliničkih podataka o radnom učinku specifičnosti, stratificiran prema lokaciji i regiji studije, naveden je u tablici 5. Rezultati radnog učinka temeljeni su na ukupnom broju valjanih testova. Nije bilo neodređenih rezultata.

Tablica 5. Specifičnost testa QFT-Plus u niskorizičnoj populaciji

Lokacija	Br.	Pozitivan		Negativan		Neodređen		Specifičnost (95-postotni CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Sjedinjene Američke Države									
(br. 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)
Japan									
(br. 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)
(br. 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)
Ukupno u Japanu	322	4	7	318	315	0	0	98,76 % (318/322) (96,85 – 99,52)	97,83 % (315/322) (95,6 – 98,9)
Australija									
(br. 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)

Specifičnost testa QFT-Plus iznosila je 98,11 % u SAD-u, 97,83 % u Japanu i 95,48 % u Australiji. Ukupna specifičnost testa QFT-Plus iznosila je 97,27 % (713/733). Specifičnost testa QFT iznosila je 99,06 % u SAD-u, 98,76 % u Japanu i 95,98 % u Australiji. Ukupna specifičnost testa QFT iznosila je 98,09 % (719/733).

Prikazana je raščlamba rezultata prema vrsti epruvete s TB antigenom i njihovim kombinacijama kao primjer očekivanih rezultata u niskorizičnoj populaciji (tablica 6.).

Tablica 6. Rezultati studije specifičnosti testa QFT-Plus prema epruveti s TB antigenom

Tumačenje temeljeno na vrijednosti Nil za TB Antigen	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitivan prema TB1 i/ili TB2)*	Dosljedno pozitivan TB1 i TB2 (alternativna analiza)†
IU/ml u				
Pozitivan	10	18	20	8
Negativan	723	715	713	725
Neodređen	0	0	0	0
Specifičnost (95-postotni CI)	–	–	97,3% (713/733) (95,8 – 98,2)	–
Stopa negativnosti (95-postotni 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)

* Tumačenje na temelju TB antigena – vrijednost Nil $\geq 0,35$ IU/ml u obje (TB1 i TB2) ili bilo kojoj TB epruveti kako bi odgovarala kriterijima tumačenja testa QFT-Plus (TB1 ili TB2) da bi se utvrdio kao pozitivan.

† Alternativna analiza navedena je samo u svrhu informiranja.

Kod ispitanika s niskim rizikom od infekcije tuberkulozom (TB) ukupno 20/733 ispitanika imalo je pozitivan rezultat. Od navedenih je samo 8 ispitanika imalo vrijednost od $> 0,35$ IU/ml u epruveti TB1 i u epruveti TB2. Usporedba ispitivanja QFT s ispitivanjem QFT-Plus provedena je u niskorizičnoj kohorti studije i pokazala je ukupnu podudarnost od 97,5 % (713/733) i negativno postotno slaganje od 98,3 % (707/719).

Osjetljivost

Definitivni standardni test za LTBI ne postoji, ali odgovarajuća je zamjena mikrobiološka kultura bakterije *M. tuberculosis* zbog toga što je infekcija tuberkulozom (TB) neophodan prethodnik bolesti.

Provedena je multicentrična studija u kojoj je procijenjena klinička osjetljivost testa QFT-Plus, a uključivala je 434 ispitanika u studiji koji su imali znakove i simptome aktivne bolesti *M. tuberculosis* potvrđene kulturom i/ili PCR-om, a nisu bili na liječenju tuberkuloze (TB) ili im je liječenje trajalo ≤ 14 dana prije uzimanja krvi. Studija je provedena na 7 nezavisnih lokacija, uključujući tri lokacije u Sjedinjenim Američkim Državama, tri lokacije u Japanu i jednu lokaciju u Australiji. Test QFT-Plus uspoređen je s testom QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT). Sažetak podataka o radnom učinku kliničke osjetljivosti, stratificiran prema lokaciji studije i državi, naveden je u tablici 7. Rezultati radnog učinka temeljeni su na ukupnom broju valjanih testova. Učestalost neodređenih rezultata za testove QFT i QFT-Plus iznosila je 2,3 % (10/434) odnosno 2,5 % (11/434).

Tablica 7. Sažetak radnog učinka studije kliničke osjetljivosti prema lokaciji, zemlji i sveukupno

Lokacija	Br.	Pozitivan		Negativan		Neodređen		Osjetljivost (95-postotni CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Sjedinjene Američke Države									
(br. 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)
(br. 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)
(br. 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)
Ukupno u Sjedinjenim Američkim Državama	53	47	47	6	6	0	0	88,7 % (47/53) (77,4 – 94,7)	88,7 % (47/53) (77,4 – 94,7)
Japan									
(br. 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)
(br. 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)

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

Tablica se nastavlja s prethodne stranice

Tablica 7. Sažetak radnog učinka studije kliničke osjetljivosti prema lokaciji, zemlji i sveukupno (nastavak)

Lokacija	Br.	Pozitivan		Negativan		Neodređen		Osjetljivost (95-postotni CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(br. 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)
Ukupno u Japanu	352	328	322	15	19	9	11	95,63 % (328/343) (92,91 – 97,33)	94,43 % (322/341) (91,5 – 96,4)
Australija									
(br. 7) AU-2	29	27	29	1	0	1	0	96,43 % (27/28) (82,29 – 99,37)	100,0 % (29/29) (88,30 – 100,0)

Analiza u gore prikazanoj tablici ne uključuje neodređene rezultate.

Osjetljivost testa QFT-Plus iznosila je 88,7 % u SAD-u, 94,43 % u Japanu i 100,0 % u Australiji. Ukupna osjetljivost testa QFT-Plus iznosila je 94,09 % (398/423). Osjetljivost testa QFT iznosila je 88,7 % u SAD-u, 95,63 % u Japanu i 96,43 % u Australiji. Ukupna osjetljivost testa QFT iznosila je 94,81 % (402/424).

Prikazana je raščlamba rezultata prema vrsti epruvete s TB antigenom i kombinacijama epruveta kao primjer očekivanih rezultata u populaciji s potvrđenom infekcijom tuberkulozom (TN) (tablica 8.).

Tablica 8. Rezultati ispitivanja osjetljivosti testa QFT-Plus prema epruveti s TB antigenom

Tumačenje temeljeno na vrijednosti Nil za TB Antigen u IU/ml	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitivan prema TB1 i/ili TB2)
Pozitivan	388	397	398
Negativan	32	26	25
Neodređen	14	11	11
Osjetljivost* (95-postotni CI)	–	–	94 % (398/423) (91,4 – 96,0)
Stopa pozitivnosti* (95-postotni CI)	92,4 % (388/420) (89,4 – 94,6)	93,9 % (397/423) (91,1 – 95,8)	–

* Isključujući neodređene vrijednosti.

Usporedba ispitivanja QFT s ispitivanjem QFT-Plus procijenjena je u kohorti potvrđene aktivne tuberkuloze (TB) (kohorte studije osjetljivosti) i pokazala je ukupnu podudarnost od 95,9 % i pozitivno postotno slaganje od 97,3 % (391/402).

Tablica 9. Omjeri vjerojatnosti testa QFT-Plus

Lokacija*	Osjetljivost	Specifičnost	LR+	LR-
Australija	100,00 %	95,48 %	22,11	0,00
Japan	94,43 %	97,83 %	43,44	0,06
Sjedinjene Američke Države	88,68 %	98,11 %	47,00	0,12

* Ukupno

Radni učinak kod ispitanika s identificiranim faktorima rizika za infekciju MTB-om (mješovito rizični pojedinci)

Kohorta od 601 pojedinca s miješanim faktorima rizika od infekcije tuberkulozom (TB) (npr. pozitivnost na HIV, povijest liječenja aktivne ili latentne tuberkuloze (TB), izloženost aktivnom slučaju tuberkuloze (TB), status zdravstvenog djelatnika (Healthcare Worker, HCW)) procijenjena je testom QFT i testom QFT-Plus. Faktori rizika identificirani su s pomoću standardizirane ankete i pojedinci nisu pokazali nikakve simptome povezane s aktivnom tuberkulozom (TB) u vrijeme sudjelovanja u studiji. Demografski podaci i faktori rizika prijavljeni su u tablici 10. U ovoj populaciji, 68/601 (11,3 %) ispitanika imalo je pozitivan rezultat na testu QFT-Plus, s pozitivnim postotnim slaganjem (Positive Percent Agreement, PPA) i negativnim postotnim slaganjem (Negative Percent Agreement, NPA) od 98,44 % odnosno 99,07 % (tablica 11.). U ovoj kohorti od 68 ispitanika pozitivnih na testu QFT-Plus, ukupno 62 ispitanika bila su pozitivna primjenom epruvete TB1 i epruvete TB2, 2 ispitanika bila su pozitivna primjenom samo epruvete TB1, a 4 ispitanika bila su pozitivna primjenom samo epruvete TB2. Nisu uočeni neodređeni rezultati (0/601).

Tablica 10. Demografski podaci i faktori povezani s rizikom od infekcije tuberkulozom (TB) u miješanoj kohorti

Ukupno ispitanika (601)		Broj	Postotak
Spol	Muški	539	89,7 %
	Ženski	62	10,3 %
Dob (godine)	Raspon	18 – 70	–
	Srednja vrijednost	46,7	–
Cijepljeni BCG-om	Da	15	2,5 %
	Ne	586	97,5 %
HIV-pozitivni ili pozitivni na viruse HTLV na testu	Da	12	2,0 %
	Ne	589	98 %
S prethodnom dijagnozom aktivne tuberkuloze (TB)	Da	11	1,8 %
	Ne	590	98,2 %
S prethodno pozitivnim tuberkulinskim kožnim testom (Tuberculin Skin Test, TST) / Mantoux testom za tuberkulozu (TB)	Da	47	7,8 %
	Ne	554	92,2 %
Prethodno liječeni za aktivnu ili latentnu tuberkulozu (TB)	Da	35	5,8 %
	Ne	566	94,2 %
Živjeli, radili ili volontirali (> 1 mjesec) u zatvoru ili kaznionici	Da	373	62,1 %
	Ne	228	37,9 %
Živjeli, radili ili volontirali (> 1 mjesec) u skloništu za beskućnike	Da	525	87,4 %
	Ne	76	12,6 %
Zdravstveni djelatnik/ca	Da	8	1,3 %
	Ne	593	98,7 %
Bliski kontakt s osobom koja ima aktivnu bolest tuberkulozu ili za koju se sumnja da ima aktivnu bolest tuberkulozu	Da	9	1,5 %
	Ne	592	98,5 %

Tablica 11. Sažetak radnog učinka testa QFT-Plus u odnosu na test QFT kod ispitanika s poznatim faktorima rizika od infekcije latentnom tuberkulozom (TB)

		QFT		Ukupno
		Pozitivan (+)	Negativan (-)	
QFT-Plus	Pozitivan (+)	63	5*	68
	Negativan (-)	1*	532	533
	Ukupno	64	537	601

*Svih 6 nepodudarnih uzoraka imalo je razine IFN- γ u epruvetama s TB antigenom koje su bile blizu granične vrijednosti ispitivanja.

Pozitivno postotno slaganje (Positive Percent Agreement, PPA) i negativno postotno slaganje (Negative Percent Agreement, NPA) između rezultata testova QFT i QFT-Plus bila su sljedeća:

- Pozitivno postotno slaganje (Positive Percent Agreement, PPA): 98,44 % (63/64), 95-postotni CI (91,67, 99,72)
- Negativno postotno slaganje (Negative Percent Agreement, NPA): 99,07 % (532/537), 95-postotni CI (97,84, 99,60)

U tablici 12. u nastavku prikazuje se radni učinak testa QFT-Plus u usporedbi s testom QFT test kod ispitanika u studiji cijepljenih BCG-om.

Tablica 12. Radni učinak testa QFT-Plus u usporedbi s testom QFT kod ispitanika iz studije cijepljenih BCG-om (kombinirani podaci ispitanika u studiji za osjetljivost, specifičnost i LTBI)

		QFT		Ukupno
		Pozitivan (+)	Negativan (-)	
QFT-Plus	Pozitivan (+)	66	5	71
	Negativan (-)	3	268	271
	Ukupno	69	273	342*

* Dva ispitanika u studiji za osjetljivost isključena su iz analize zbog neodređenih rezultata

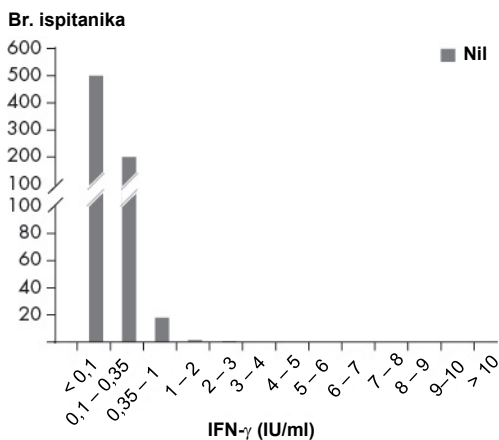
- PPA = 95,6 % (66/69), 95-postotni CI (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2 % (268/273), 95-postotni CI (95,79, 99,22)

Očekivane vrijednosti

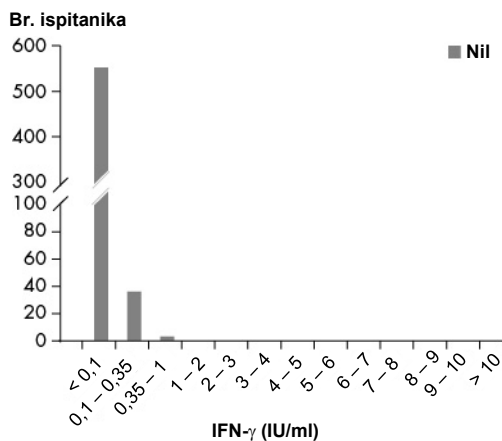
Uočene distribucije odgovora – stratificiran rizik

Brojni IFN- γ odgovori na TB1, TB2 i kontrolne epruvete uočeni su u kliničkim ispitivanjima i stratificirani prema riziku od infekcije bakterijom *M. tuberculosis* (slika 4 do slika 7). Mješovito rizična skupina sastoji se od ispitanika koji predstavljaju opću testnu populaciju, uključujući ispitanike s i bez faktora rizika za izloženost tuberkulozi i one kod kojih aktivna tuberkuloza nije vjerojatna (tj. LTBI).

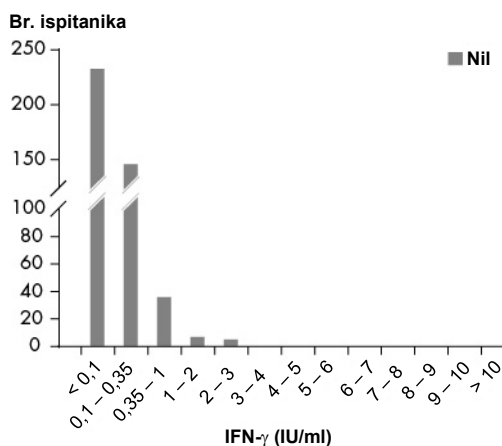
A



B

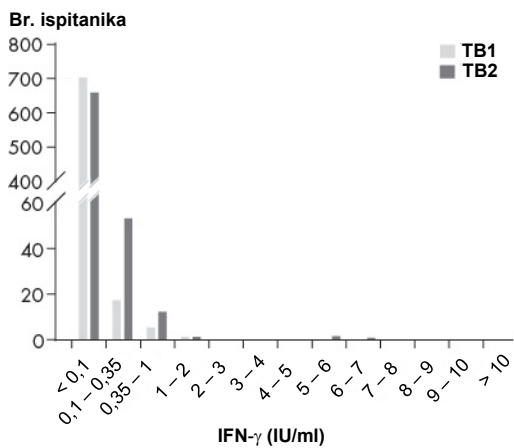


C

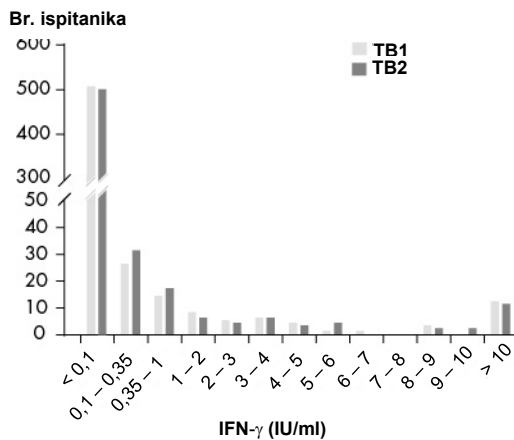


Slika 4. Distribucija vrijednosti Nil. A Distribucija vrijednosti Nil u niskorizičnoj populaciji (n = 744). B Distribucija vrijednosti Nil u mješovito rizičnoj populaciji (n = 601). C Distribucija vrijednosti Nil u populaciji kod koje je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture (n = 416).

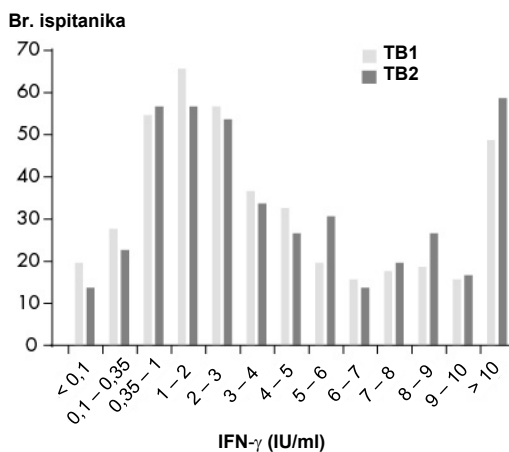
A



B

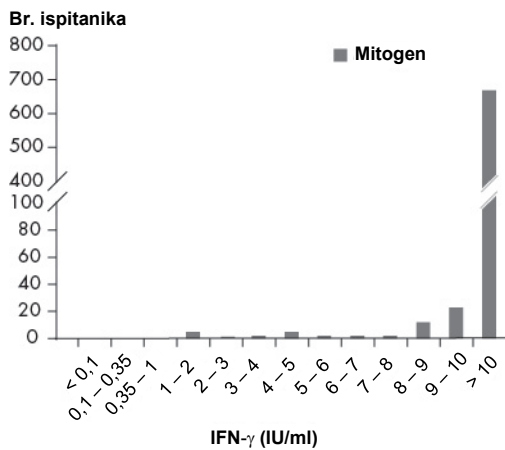


C

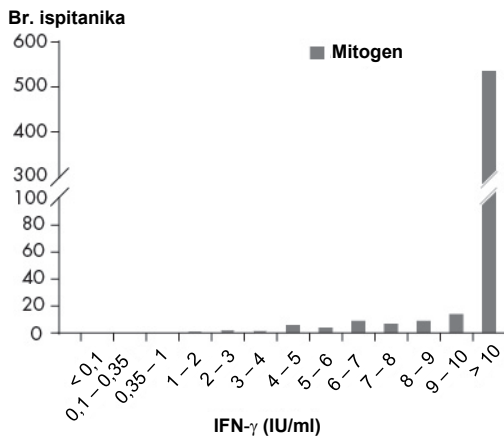


Slika 5. Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (Nil vrijednost oduzeta). **A** Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (vrijednost Nil oduzeta) u niskorizičnoj populaciji (n = 744). **B** Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (vrijednost Nil oduzeta) u mješovito rizičnoj populaciji (n = 601). **C** Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (vrijednost Nil oduzeta) u populaciji kod koje je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture (n = 416).

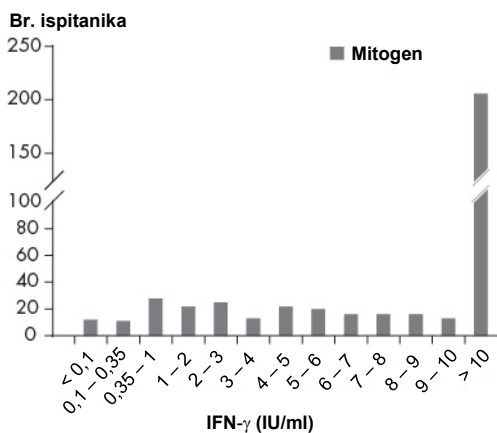
A



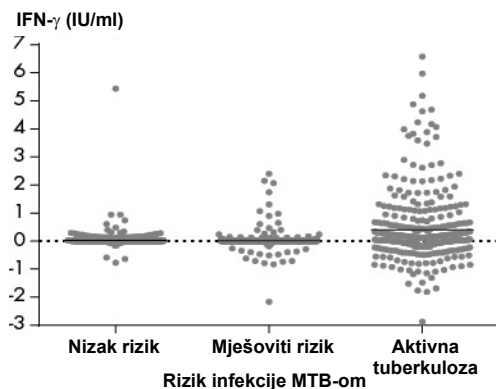
B



C



Slika 6. Distribucija vrijednosti Mitogen (vrijednost Nil oduzeta). **A** Distribucija vrijednosti Mitogen (vrijednost Nil oduzeta) u niskorizičnoj populaciji (n = 744). **B** Distribucija vrijednosti Mitogen (vrijednost Nil oduzeta) u mješovito rizičnoj populaciji (n = 601). **C** Distribucija vrijednosti Mitogen (vrijednost Nil oduzeta) u populaciji kod koje je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture (n = 415).



Slika 7. Uočena razlika između vrijednosti TB1 i TB2 (Nil vrijednost oduzeta), stratificirano prema riziku. Uključuje podatke iz kohorte studije s miješanim rizikom kako bi se prikazale razlike između kohorta s niskim rizikom, aktivnim rizikom i miješanim rizikom. Ova analiza podataka uključivala je kohortu s miješanim rizikom s poznatim faktorima rizika. Stoga je n = 733 u kohorti niskog rizika, n = 588 u kohorti miješanog rizika i n = 357 u kohorti s aktivnom tuberkulozom (TB). Kvantitativna razlika u IU/ml za svakog ispitanika dobivena je oduzimanjem vrijednosti TB1 od vrijednosti TB2.

Sažetak sigurnosti i radnog učinka

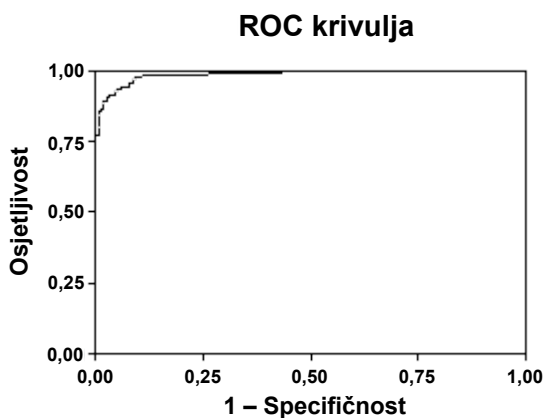
Sažetak sigurnosti i radnog učinka možete pronaći na web-mjestu baze podataka EUDAMED.

Radne značajke ispitivanja

Analitičke radne značajke

Granična vrijednost ispitivanja

Granična vrijednost ispitivanja QFT-Plus utvrđena je na temelju podataka 216 ispitanika bez identificiranih faktora rizika za izloženost tuberkulozi (TB), koji su bili cijepljeni BCG-om i za koje se pretpostavljalo da nemaju infekciju, te na temelju podataka 118 ispitanika kod kojih je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture. Podaci o osjetljivosti i specifičnosti kombinirani su i analizirani analizom krivulje operativnih karakteristika (Receiver Operator Characteristic, ROC). Podaci o osjetljivosti i specifičnosti analizirani analizom krivulje operativnih karakteristika (Receiver Operator Characteristic, ROC) pokazali su da optimalna granična vrijednost testa ELISA iznosi 0,35 IU/ml (pogledajte sliku 8).



Slika 8. ROC krivulja za odgovore na ESAT-6 i CFP-10.

Tablica 13. Vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti za test ELISA pri različitim graničnim vrijednostima

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

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

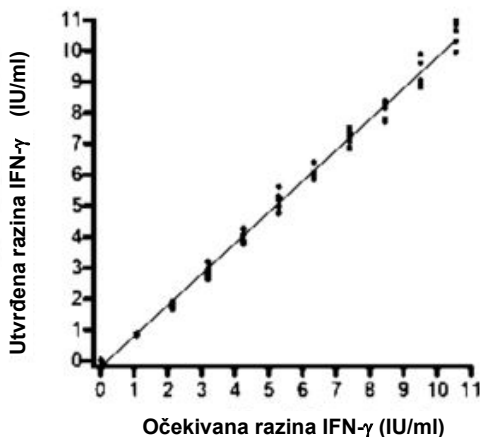
Tablica se nastavlja s prethodne stranice

Tablica 13. Vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti za test ELISA pri različitim graničnim vrijednostima

Granična vrijednost IU/ml IFN- γ	% osjetljivosti	95-postotni CI	% specifičnosti	95-postotni CI	Osjetljivost + specifičnost
0,47	85,59	od 77,94 % do 91,38 %	99,08	od 96,71 % do 99,89 %	184,67
0,48	84,75	od 76,97 % do 90,70 %	99,08	od 96,71 % do 99,89 %	183,83
0,50	83,90	od 76,00 % do 90,02 %	99,08	od 96,71 % do 99,89 %	182,98

Linearnost

Linearnost testa QFT-Plus ELISA dokazana je nasumičnim postavljanjem 5 replikata iz 11 poolova plazme poznatih IFN- γ koncentracija na pločici ELISA. Linija linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99 (slika 9.).



Slika 9. Ilustracija regresijske analize studije linearnosti – visoka srednja vrijednost poola = $-0,24 + 0,9964 \cdot \text{Očekivano}$.

Obnovljivost

Provedena je multicentrična studija obnovljivosti kojom se procjenjivao radni učinak testa QFT-Plus među lokacijama studija s više rukovatelja. Ovo je bila prospektivna studija provedena na tri vanjske lokacije za testiranje i jednoj lokaciji za uzimanje krvi. U studiju su bila uključena ukupno 32 pozitivna i 34 negativna ispitanika (utvrđeno testom QFT). Ispitanike u studiji činili su zdravstveni djelatnici u Sjedinjenim Američkim Državama. Ispitanici u studiji predstavljali su skupine s mješovitim rizikom od izloženosti tuberkulozi (TB) zbog svog zanimanja ili kao zdravstveni radnici rođeni u inozemstvu koji potječu s lokacije sa stopom tuberkuloze (TB) većom od 50/100.000.

Tri epruvete za uzimanje krvi s litij-heparinom dobivene su od svakog ispitanika u studiji na lokaciji za uzimanje krvi. Epruvete za uzimanje krvi s litij-heparinom tada su prebačene na svaku od tri lokacije za testiranje gdje su alikvotirane u dva skupa epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen i Nil) pa potom testirane u skladu s postupkom ispitivanja QFT-Plus. Na svakoj lokaciji najmanje dva rukovatelja nezavisno su obradila dva testa po ispitaniku u studiji. Nijednome rukovatelju nisu otkriveni rezultati koje su dobili drugi rukovatelji niti rezultat testa QFT ispitanika u studiji.

Na sve tri lokacije za testiranje generirano je šest rezultata po svakom od 66 ispitanika u studiji, što je rezultiralo dobivanjem ukupno 396 podatkovnih točaka. Sažetak rezultata obnovljivosti prikazan je u tablici 14.

Tablica 14. Sažetak rezultata studije obnovljivosti – % slaganja kvalitativnih rezultata između različitih rukovatelja unutar lokacije; N = 66 uzoraka pacijenata

Lokacija 1 – 2 rukovatelja	Lokacija 2 – 2 rukovatelja	Lokacija 3 – 3 rukovatelja
64/66 = 96,97 %	64/66 = 96,97 %	59/66 = 89,39 %
Slaganje kvalitativnih rezultata za skup epruveta 1 i skup epruveta 2	Slaganje kvalitativnih rezultata za skup epruveta 1 i skup epruveta 2	Slaganje kvalitativnih rezultata za skup epruveta 1 i skup epruveta 2

Kvalitativno postotno slaganje na svim lokacijama studije iznosi 94,7 % (375/396). U ovom izračunu ukupan broj rezultata testa koji se slažu (375) uključuje one slučajeve u kojima postoji slaganje svih 6 rezultata, slaganje 5 od 6 rezultata, slaganje 4 od 6 rezultata i slaganje 3 od 6 rezultata zajedno.

Ponovljivost među serijama

Provedena je studija kako bi se utvrdila varijabilnost epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes među serijama u odnosu na epruvete QFT. Testirano je ukupno 30 ispitanika (15 potvrđeno pozitivnih na tuberkulozu (TB) i 15 potvrđeno negativnih na tuberkulozu (TB), kako je utvrđeno testom QFT). Tri odvojene serije svake od epruveta QFT-Plus TB1, TB2 i QFT TB Blood Collection Tubes bile su uključene u ovu studiju. Testirana su tri replikata po davatelju po seriji epruvete za uzimanje krvi. Nil i Mitogen epruvete testirane su s po jednim replikatom.

Krv svakog ispitanika prikupljena je u epruvete za uzimanje krvi s litij-heparinom, a zatim je 1 ml krvi prebačen u svaku od epruveta QFT-Plus i QFT Blood Collection Tubes pa potom testiran u skladu s postupkom ispitivanja. Za svaku skupinu pozitivnih i negativnih uzoraka ukupna varijanca rezultata epruvete QFT-Plus tube ne smije biti značajno veća od ukupne varijance rezultata epruvete QFT. To je utvrđeno iz p-vrijednosti dobivene Leveneovim testom homogenosti varijance (Homogeneity of Variance, HOV). Ako p-vrijednost nije bila značajna ($p > 0,05$) i/ili je varijacija epruveta QFT-Plus TB bila manja od one za epruvetu QFT TB, tada je postojala varijanca između epruveta QFT-Plus i QFT TB.

Tablica 15. Usporedba varijanci između epruveta QFT-Plus i QFT TB Blood Collection Tubes primjenom Leveneovog HOV testa

Vrsta uzorka	Razlika	Učinak	Zavisna varijabla	P-vrijednost	Značajno
Pozitivan	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Zaostalo	0,0378	Da
Pozitivan	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Zaostalo	0,0540	Ne
Negativan	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Zaostalo	0,1025	Ne
Negativan	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Zaostalo	0,6344	Ne

Varijacija između epruveta QFT-Plus i QFT TB Blood Collection Tubes nije bila značajna, uz iznimku epruvete QFT-Plus TB2 kada je testirana s pozitivnim ispitanicima. Kada je analizirana procjena standardne devijacije, varijacija uočena kod epruvete QFT-Plus TB2 bila je manja (0,06089) nego kod epruvete QFT TB (0,07641), kao što je prikazano u tablici 16. Stoga varijanca epruveta QFT-Plus TB1 i TB2 Blood Collection Tubes nije bila veća od one za epruvetu QFT TB Blood Collection Tube.

Tablica 16. Standardna devijacija za preostalu količinu i 95-postotni interval pouzdanosti za pozitivne ispitanike

Vrsta uzorka	Vrsta isp.	Procijenjena standardna devijacija	95 % LCL	95 % UCL
Pozitivan	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Pozitivan	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Pozitivan	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

Ponovljivost unutar serije

Provedena je studija za procjenu obnovljivosti epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes unutar serije usporedbom koncentracije IFN- γ iz replikata krvi u epruvetama QFT-Plus TB Blood Collection Tubes.

Šest alikvota jednog uzorka krvi istih ispitanika s potvrđenom infekcijom tuberkulozom (TB) obrađeno je u 6 ponovljenih epruveta za uzimanje krvi iz jedne serije svake od epruveta QFT-Plus (TB1 i TB2). Testiranje je provedeno na 13 ispitanika. % CV je izračunat za svakog davatelja i za sve davatelje da bi se dobila srednja vrijednost za % CV kao što je prikazano u tablici 17.

Tablica 17. % CV za srednju vrijednost, standardnu devijaciju, minimalnu vrijednost, medijan i maksimalnu vrijednost u svakoj epruveti QFT-Plus TB Blood Collection Tube kod ispitanika pozitivnih na tuberkulozu (TB)

Epruveta QFT-Plus Tube	Količina uzorka	Srednja vrijednost (%CV)	Standardna devijacija	Minimalna vrijednost	Medijan	Maksimalna vrijednost
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Rezultati su pokazali da je srednja vrijednost za % CV za TB1 i TB2 iznosila ~13 %, čime je ispunjavala kriterije prihvatljivosti od ≤ 30 % i pokazala ponovljivost unutar serije.

Granica slijepe probe (Limit of Blank, LoB)

Granica slijepe probe (Limit of Blank, LoB) procijenjena je za ispitivanje QFT-Plus. Po dva replikata 14 pojedinačnih normalnih uzoraka humane plazme (kao slijepe probe) testirana su s pomoću 2 serije testa QFT-Plus ELISA, a testiranje su provela 3 rukovatelja u 3 dana testiranja, jedan rukovatelj po danu testiranja za ukupno 84 replikata iz svake serije kompleta ELISA.

Vrijednosti LoB (IU/ml) za 2 serije kompleta ELISA izračunate su odvojeno kako je prikazano u tablici 18.

Tablica 18. Vrijednosti LoB (IU/ml) za 2 serije kompleta QFT-Plus ELISA Kit

Komplet QFT-Plus ELISA Kit	Procijenjena vrijednost LoB (IU/ml)
Komplet 1	0,030
Komplet 2	0,040

Veća vrijednost LoB, 0,040 IU/ml, u obje serije kompleta QFT-Plus ELISA kit, prijavljena je kao konačna vrijednost LoB.

Granica detekcije (Limit of Detection, LoD)

Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) procijenjena je za ispitivanje QFT-Plus. Pool humane plazme negativne na tuberkulozu (TB) generiran je kombiniranjem 14 pojedinačnih uzoraka plazme. Svaki od 3 rukovatelja pripremio je referentnu standardnu otopinu IFN- γ vrijednosti 1,0 IU/ml razrijeđenu u puferu. Napravljen je niz razrjeđivanja od 8 koncentracija. Studija se provodila 3 dana, a provodila su je 3 naizmjenična rukovatelja s pomoću 2 serije kompleta QFT-Plus ELISA kit. Svaki dan testiranja 5 replikata svake koncentracije unutar svakog seta niza serijskih razrjeđivanja testirano je da bi se dobilo ukupno 45 replikata za svako razrjeđivanje koncentracije IFN- γ za svaku seriju kompleta QFT-Plus ELISA kit.

Vrijednost LoD za svaku testiranu seriju kompleta QFT-Plus ELISA kit izračunata je odvojeno kako je prikazano u tablici 19.

Tablica 19. Procijenjene vrijednosti LoD (IU/ml) za 2 serije kompleta QFT-Plus ELISA Kit

Komplet QFT-Plus ELISA Kit	Vjerojatnost	Procijenjena koncentracija (IU/ml)	Donja granica 95-postotne pouzdanosti za procjenu	Gornja granica 95-postotne pouzdanosti za procjenu
Komplet 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Komplet 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Veća vrijednost LoD izračunata u obje serije kompleta QFT-Plus ELISA kit od 0,065 IU/ml prijavljena je kao konačna vrijednost LoD.

Interferirajuće tvari

Provedena je studija kako bi se utvrdili učinci potencijalnih interferirajućih tvari na radni učinak testa QFT-Plus ELISA prilikom otkrivanja IFN- γ . Interferirajuće tvari uključene u ovo testiranje bile su sljedeće: trigliceridi (ukupni), hemoglobin, protein (ukupni serum), bilirubin (konjugirani), bilirubin (nekonjugirani), abakavir sulfat, ciklosporin i prednizolon. Pet poolova plazme poznatih koncentracija IFN- γ pripremljeno je primjenom različitih koncentracija interferirajućih tvari. Razina IFN- γ u osnovnom poolu prethodno je pripremljena s pomoću unaprijed određene količine prisutnog IFN- γ (približno 0,21, 0,45 i 1,4 IU/ml). Taj je pool potom upotrijebljen za pripremu poolova s interferirajućim tvarima. Testirane koncentracije interferirajućih tvari iznosile su 0 mg/dL, 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL i 20 mg/dL. Ciljne koncentracije interferirajućih tvari temeljile su se na referentnim intervalima, patološkim vrijednostima, terapijskim rasponima i toksičnim rasponima ili na preporuci dobavljača ili općenitim kliničkim razinama. Po šest replikata testirano je za svaku razinu koncentracije interferirajuće tvari u uzorku.

Za svaku koncentraciju uzorka proveden je T-test na dva uzorka, uspoređujući razliku srednje vrijednosti \log_{10} (IU/ml) primarne razine interferirajuće tvari i kontrole (tj. razine bez interferirajuće tvari) kako je prikazano u tablicama 20. i 21. Prijavljene su i procijenjena razlika srednjeg odgovora, zajedno s odgovarajućim granicama dvostrane 95-postotne pouzdanosti i p-vrijednosti.

Tablica 20. Log10 IU/ml: Tablica sažetka T-testa za razlike u srednjim vrijednostima između kontrolne i primarne razine interferirajuće tvari za svaku interferirajuću tvar i razinu koncentracije IFN- γ

Interferirajuća tvar	Razina interferirajuće tvari	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Varijance	Razlika srednje vrijednosti	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI	P-vrijednost	Uspješno
Trigliceridi	Visoka	1,4	Jednako	0,019	-0,040	0,077	0,491	Da
		0,45	Jednako	0,004	-0,022	0,030	0,732	Da
		0,21	Jednako	0,006	-0,035	0,047	0,759	Da
Hemoglobin	Visoka	1,4	Jednako	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Da
		0,45	Jednako	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Da
		0,21	Jednako	0,000	-0,034	0,035	0,980	Da
Protein	Visoka	1,4	Jednako	0,004	-0,034	0,042	0,836	Da
		0,45	Jednako	0,001	-0,38	0,040	0,962	Da
		0,21	Jednako	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Da
Konjugirani bilirubin	Visoka	1,4	Jednako	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Da
		0,45	Jednako	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Da
		0,21	Jednako	-0,014	0,074	0,046	0,625	Da
Nekonjugirani bilirubin	Visoka	1,4	Jednako	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Da
		0,45	Jednako	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Da
		0,21	Jednako	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Da
Abakavir	Visoka	1,4	Jednako	0,008	-0,025	0,041	0,601	Da
		0,45	Jednako	0,012	-0,019	0,044	0,412	Da
		0,21	Jednako	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Da

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

Tablica se nastavlja s prethodne stranice

Tablica 20. Log₁₀ IU/ml: Tablica sažetka T-testa za razlike u srednjim vrijednostima između kontrolne i primarne razine interferirajuće tvari za svaku interferirajuću tvar i razinu koncentracije IFN- γ

Interferirajuća tvar	Razina interferirajuće tvari	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Varijance	Razlika srednje vrijednosti	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI	P-vrijednost	Uspješno
Ciklosporin	Visoka	1,4	Jednako	0,014	-0,020	0,047	0,383	Da
		0,45	Jednako	0,005	-0,035	0,045	0,773	Da
		0,21	Jednako	0,024	-0,008	0,056	0,131	Da
Prednizolon	Visoka	1,4	Jednako	0,017	-0,017	0,050	0,293	Da
		0,45	Jednako	0,000	-0,036	0,036	0,979	Da
		0,21	Jednako	0,015	-0,035	0,065	0,524	Da

Tablica 21. Log10 IU/ml: Tablica sažetka T-testa za razlike u srednjim vrijednostima između kontrolne i visoke razine interferirajuće tvari za svaku interferirajuću tvar i razinu koncentracije IFN- γ

Interferirajuća tvar	Razina interferirajuće tvari	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Varijance	Razlika srednje vrijednosti	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI	P-vrijednost	Uspješno
Trigliceridi	Visoka	1,4	Jednako	0,053	-0,004	0,110	0,063	Da
		0,45	Jednako	0,039	-0,021	0,058	< 0,001	Da
		0,21	Jednako	0,034	-0,002	0,071	0,061	Da
Hemoglobin	Visoka	1,4	Jednako	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Da
		0,45	Jednako	0,016	-0,007	0,040	0,152	Da
		0,21	Jednako	0,014	-0,030	0,059	0,489	Da
Protein	Visoka	1,4	Jednako	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Da
		0,45	Jednako	0,000	-0,046	0,046	0,992	Da
		0,21	Jednako	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Da
Konjugirani bilirubin	Visoka	1,4	Jednako	0,001	-0,046	0,048	0,961	Da
		0,45	Jednako	0,012	-0,043	0,067	0,639	Da
		0,21	Jednako	0,015	-0,044	0,074	0,586	Da
Nekonjugirani bilirubin	Visoka	1,4	Jednako	0,015	-0,011	0,042	0,231	Da
		0,45	Jednako	0,015	-0,023	0,052	0,411	Da
		0,21	Jednako	0,012	-0,033	0,057	0,566	Da
Abakavir	Visoka	1,4	Jednako	0,013	-0,015	0,040	0,322	Da
		0,45	Jednako	0,015	-0,014	0,044	0,283	Da
		0,21	Jednako	0,008	-0,034	0,050	0,677	Da

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

Tablica se nastavlja s prethodne stranice

Tablica 21. Log₁₀ IU/ml: Tablica sažetka T-testa za razlike u srednjim vrijednostima između kontrolne i visoke razine interferirajuće tvari za svaku interferirajuću tvar i razinu koncentracije IFN- γ

Interferirajuća tvar	Razina interferirajuće tvari	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Varijance	Razlika srednje vrijednosti	Donji 95-postotni CI	Gornji 95-postotni CI	P-vrijednost	Uspješno
Ciklosporin	Visoka	1,4	Jednako	0,002	-0,019	0,024	0,816	Da
		0,45	Jednako	0,007	-0,030	0,043	0,682	Da
		0,21	Jednako	0,015	-0,007	0,038	0,155	Da
Prednizolon	Visoka	1,4	Jednako	0,007	-0,016	0,030	0,518	Da
		0,45	Jednako	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Da
		0,21	Jednako	0,021	-0,025	0,068	0,334	Da

Rezultat nije pokazao značajne razlike između primarne razine interferirajuće tvari i kontrole (razine bez interferirajuće tvari) kao ni za visoku razinu interferirajuće tvari, osim za razinu koncentracije triglicerida od 0,45 IU/ml. Utvrđeno je da je razlika srednje vrijednosti unutar +/-2 raspona standardne devijacije. To pokazuje da je razlika unutar očekivane varijabilnosti ispitivanja i da trigliceridi nisu imali interferirajući učinak na test QFT-Plus ELISA.

Odlaganje u otpad

Pridržavajte se odgovarajućih smjernica o postupanju s krvlju. Uzorke i materijale koji dolaze u kontakt s krvlju ili krvnim proizvodima zbrinite sukladno državnim i lokalnim propisima.

Reference

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.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku podršku na www.qiagen.com/Support (za kontaktne podatke posjetite stranicu www.qiagen.com).

Komentari i prijedlozi

Rješavanje problema na ELISA testu

Nespecifična boja reakcije

- | | |
|---|--|
| a) Nepotpuno ispiranje pločice | Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. Ovisno o primijenjenom uređaju za ispiranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Unakrsna kontaminacija ELISA jažica | Pažljivo pipetirajte i miješajte uzorak da biste smanjili rizik. |
| c) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao | Pobrinite se da se komplet upotrijebi prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od tri mjeseca od datuma rekonstitucije. |
| d) Otopina enzimskog supstrata kontaminirana | Bacite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Pobrinite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici. |
| e) Miješanje plazme u epruvetama QFT-Plus Blood Collection Tubes prije izdvajanja | Nakon centrifugiranja izbjegavajte pipetiranje prema gore i prema dolje ili bilo kakvo miješanje plazme prije izdvajanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela. |

Komentari i prijedlozi

Niska očitavanja optičke gustoće za standarde

- | | |
|---|--|
| a) Pogreška pri razrjeđivanju standarda | Razrjeđivanja standarda iz kompleta pripremajte točno prema ovoj Uputi za uporabu. |
| b) Pogrešno pipetiranje | Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača. |
| c) Temperatura inkubacije preniska | Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). |
| d) Vrijeme inkubacije prekratko | Inkubacija pločice s konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati 120 ± 5 minuta. Otopina enzimskog supstrata treba se inkubirati na pločici 30 minuta. |
| e) Upotrijebljen pogrešan filter za čitač pločica | Pločicu treba čitati na 450 nm s referentnim filtrom između 620 nm i 650 nm. |
| f) Reagensi su prehladni | Svi reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, moraju postići sobnu temperaturu prije početka ispitivanja. To traje oko 1 sat. |
| g) Vijek trajanja kompleta/komponenti je istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon datuma rekonstitucije. |

Jaka obojenost pozadine

- | | |
|-------------------------------------|--|
| a) Nepotpuno ispiranje pločice | Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 μ l pufera za ispiranje po jažici. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Temperatura inkubacije previsoka | Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). |

Komentari i prijedlozi




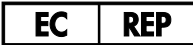










- c) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao Pobrinite se da upotrijebite komplet unutar roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od tri mjeseca od datuma rekonstitucije.
- d) Otopina enzimskog supstrata kontaminirana Bacite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Pobrinite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.

Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između duplikata

- a) Nepotpuno ispiranje pločice Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja.
- b) Pogreška pri razrjeđivanju standarda Pobrinite se da se razrjeđivanja standarda pripremaju točno prema ovoj Uputi za uporabu.
- c) Nedovoljno miješanje Prije nego što ih dodate na pločicu, dobro promiješajte reagense okretanjem ili laganim kružnim mućkanjem.
- d) Nedosljedna tehnika pipetiranja ili prekid tijekom pripremanja ispitivanja Uzorke i standarde treba dodavati kontinuirano. Svi reagensi trebaju biti pripremljeni prije početka ispitivanja.

Simboli

U uputama za uporabu ili na ambalaži i naljepnicama prikazuju se sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
	Sadržava reagensa dovoljno za <N> reakcija
	Upotrijebiti do
	Ovaj proizvod ispunjava zahtjeve Uredbe Europske unije 2017/746 o in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodima.
	Ovlašteni zastupnik u Europskoj zajednici / Europskoj uniji
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala (tj. oznaka komponente)
	Komponente
	Sadržava
	Broj
	Globalni broj trgovačke jedinice
	R se odnosi na reviziju uputa za uporabu, a n je broj revizije
	Ograničenje temperature

Simbol

Definicija simbola



Proizvođač



Pročitajte upute za uporabu



Zaštitite od svjetlosti



Upozorenje/oprez ili Oprez, pročitajte prateće dokumente

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

In vitro dijagnostički test koji se izvodi s pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine ESAT-6 i CFP-10 radi stimuliranja stanica heparinizirane pune krvi



Sadrži biološki materijal životinjskog porijekla



Sadrži biološki materijal ljudskog porijekla



Jedinstveni identifikator proizvoda

Simbol**Definicija simbola**

tartrazine

Sadržava tartrazin

sulfuric acid

Sadržava sumpornu kiselinu

Dodatak A: Tehnički podaci

Neodređeni rezultati

Neodređeni su rezultati neuobičajeni i mogu biti povezani s imunostimuliranim statusom testirane osobe (5), a mogu biti povezani i s brojnim tehničkim čimbenicima (npr. neodgovarajuće rukovanje/pohrana epruveta za uzimanje krvi, nepotpuno ispiranje ELISA pločice) u slučaju nepridržavanja prethodno navedenih uputa za uporabu.

Ako se sumnja na tehnički problem pri pohrani reagensa, uzimanju krvi ili rukovanju uzorcima krvi, treba ponoviti cijeli test QFT-Plus s novim ispitnicima krvi. ELISA test sa stimuliranim uzorcima plazme može se ponoviti ako se sumnja u neodgovarajuće ispiranje ili druga odstupanja od propisane ELISA metode testiranja. Liječnik po potrebi može odlučiti uzeti novi ispitak krvi ili provesti druge postupke.

Zgrušani uzorci plazme

Ako pri duljem pohranjivanju uzoraka plazme nastanu ugrušci fibrina, centrifugirajte uzorke kako bi se zgrušani materijal nataložio i plazma lakše pipetirala.

Uzorci lipemične plazme

Potrebno je paziti prilikom pipetiranja lipemičnih uzoraka jer masne naslage mogu blokirati vrške pipeta.

Dodatak B: Skraćeni testni postupak ELISA

1. ELISA komponente, osim 100x koncentriranog konjugata, ostavite da se stabiliziraju na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.

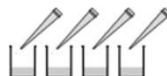


2. Rekonstituirajte standard iz kompleta destiliranom ili deioniziranom vodom na 8,0 IU/ml. Pripremite četiri (4) standardna razrjeđivanja.

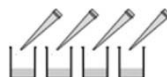


3. Rekonstituirajte 100x koncentrirani konjugat osušen u zamrznutom stanju s pomoću destilirane ili deionizirane vode.

4. Pripremite konjugat jakosti za upotrebu s pomoću diluensa Green Diluent i dodajte 50 μ l u svaku jažicu.



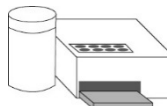
5. Dodajte 50 μ l testnog uzorka plazme i 50 μ l standarda u odgovarajuće jažice. Izmiješajte tresilicom.



6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.



7. Isperite jažice najmanje 6 puta s 400 μ l pufera za ispiranje po jažici.



8. Dodajte 100 μ l otopine enzimskog supstrata u svaku jažicu.
Izmiješajte tresilicom.



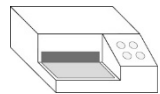
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.



10. Dodajte 50 μ l enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu. Izmiješajte tresilicom.



11. Očitajte rezultate na 450 nm s referentnim filtrom od 620 do 650 nm.



12. Analizirajte rezultate.



Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	Komplet ELISA s 2 pločice	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Komplet ELISA s 20 pločice	622822
Related products		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 epruveta (50 od kojih svaka sadržava Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 epruveta (25 od kojih svaka sadržava Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 epruveta (1 od kojih svaka sadržava Nil, TB1, TB2 i Mitogen po pakiranju), pakiranje od 10 komada	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 epruveta (50 od kojih svaka sadržava Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 epruveta (50 od kojih svaka sadržava Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 epruveta (1 od kojih svaka sadržava Nil, TB1, TB2 i Mitogen po pakiranju), pakiranje od 10 komada	623222

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju odgovornosti specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućim uputama za uporabu za komplet tvrtke QIAGEN. Upute za uporabu za komplete tvrtke QIAGEN dostupne su na www.qiagen.com ili ih možete zatražiti od Tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

Povijest revizija dokumenta

Datum	Izmjene
R2, lipanj 2021.	Uključene informacije o pakiranju za jednog pacijenta Revidirane tablice 10. i 11. radi razlikovanja podataka testa QFT-GIT u odnosu na podatke testa QFT-Plus Ažurirani odjeljak Opis i načelo radi dodavanja informacija o populaciji za testiranje i mjernom rasponu Dodana tablica 9. radi dodavanja podataka o omjeru vjerojatnosti testa QFT-Plus
R3, listopad 2021.	Kataloški broj vraćen na izvorne kataloške brojeve Dodana izjava o jednokratnoj uporabi za mikrotitar stripove u sadržaju kompleta
R4, ožujak 2023.	Ispravci oblikovanja

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

Ugovor o ograničenoj licenciji za komplet QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim uputama za uporabu i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane na panelu. Tvrtka QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenta ovog panela s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom panelu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovim uputama za uporabu i drugim protokolima dostupnima na stranici www.qiagen.com. Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ovaj panel i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj panel i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, preradivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog panela potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s panelom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na www.qiagen.com.

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (grupa QIAGEN) Proclin®, Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

03/2023 L1123669 1123669HR © 2023 QIAGEN, sva prava pridržana.

Narudžbe www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com |
Web-mjesto www.qiagen.com