

Uputstvo za upotrebu za QuantiFERON[®]-TB Gold Plus ELISA Kit



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Verzija 1



Za korišćenje u in vitro dijagnostici

Za korišćenje sa epruvetama QuantiFERON[®]-TB Gold Plus Blood
Collection Tubes



622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Nemačka



1123669SR

Sadržaj

Namena.....	5
Predviđeni korisnik	5
Opis i princip rada	6
Informacije o patogenima	6
Zbirni pregled i objašnjenje	7
Principi ispitivanja.....	9
Obezbeđeni materijal	11
Sadržaj kompleta	11
Komponente u kompletu	12
Platforma i softver	12
Potreban materijal koji se ne isporučuje	13
Dodatni reagensi	13
Potrošni materijal	13
Oprema	13
Upozorenja i mere opreza	14
Informacije o bezbednosti	14
Informacije za hitne slučajeve	15
Mere opreza	16
Čuvanje reagenasa i rukovanje njima	18
Stabilnost tokom upotrebe	18
Rekonstituisani i neupotrebljeni reagensi	18
Čuvanje uzoraka i rukovanje njima.....	19

Protokol: izvođenje testa ELISA	20
Rezultati (proračuni)	26
Formiranje krive standarda i vrednosti uzoraka	26
Kontrola kvaliteta testa	28
Tumačenje rezultata	30
Ograničenja	32
Karakteristike učinka	33
Kliničke studije	33
Osetljivost	35
Očekivane vrednosti	43
Zbirni pregled bezbednosti i učinka	49
Karakteristike učinka ispitivanja	50
Analitički učinak	50
Odlaganje u otpad	63
Reference	64
Vodič za rešavanje problema	66
Simboli	69
Dodatak A: Tehničke informacije	72
Nejasni rezultati	72
Zgrušani uzorci plazme	72
Lipemični uzorci plazme	72
Dodatak B: Skraćena procedura za test ELISA	73
Informacije za naručivanje	75
Istorija revizija dokumenta	77

Namena

Ispitivanje QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) je *in vitro* dijagnostički test koji stimuliše ćelije u hepariniziranoj punoj krvi pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine ESAT-6 i CFP-10. Otkrivanje proteina interferon- γ (IFN- γ) putem ispitivanja ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) služi za identifikaciju *in vitro* reakcija na ove peptidne antigene koji su povezani sa infekcijom bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus je indirektan test za infekciju bakterijom *M. tuberculosis* (uključujući oboljenje) i predviđen je za upotrebu u kombinaciji sa procenom rizika, radiografijom i drugim medicinskim i dijagnostičkim procenama.

Predviđeni korisnik

Komplet je predviđen za profesionalnu upotrebu.

Ispitivanje QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) smeju da koriste obučena lica u laboratorijama.

Opis i princip rada

Informacije o patogenima

Tuberkuloza je prenosiva bolest koju uzrokuje infekcija kompleksom organizama *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* i *M. caprae*), koja se najčešće prenosi na nove domaćine vazдушnim putem preko kapljičnih jezgara sa pacijenata obolelih od respiratorne tuberkuloze. Osoba koja je prvi put zaražena može da se razboli od tuberkuloze u roku od nekoliko nedelja ili par meseci, ali većina inficiranih osoba se ne razboli. Kod pojedinih osoba postoji latentna infekcija tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI), asimptomatsko stanje koje se ne prenosi na druge, a te osobe mogu da se razbole od tuberkuloze mesecima ili godinama kasnije. Glavna svrha dijagnostikovanja latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) je razmatranje lečenja kojim se sprečava oboljevanje od tuberkuloze. Tuberkulinski kožni test (Tuberculin Skin Test, TST) predstavljao je jedini dostupan način za dijagnostikovanje latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) duže od 100 godina (4). Kožna osetljivost na tuberkulin razvija se od 2 do 10 nedelja nakon inficiranja. Međutim, pojedine inficirane osobe, uključujući osobe sa širokim opsegom oboljenja koja umanjuju imunološke funkcije, ali i osobe bez ovih oboljenja, ne reaguju na tuberkulin. Suprotno tome, pojedine osobe kod kojih postoji mala verovatnoća da su zaraženi bakterijom *M. tuberculosis* pokazuju osetljivost na tuberkulin i imaju pozitivne testove na tuberkulinsku kožnu probu (Tuberculin Skin Test, TST) nakon vakcinacije bacilom Calmette-Guérin (BCG), infekcije mikobakterijom koja nije iz kompleksa *M. tuberculosis* ili zbog drugih neodređenih faktora.

Mora se napraviti razlika između latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) i bolesti tuberkuloze, stanja koje se mora prijaviti i koje najčešće pogađa pluća i donje disajne puteve, iako sistemi drugih organa takođe mogu da budu zaraženi. Dijagnoza bolesti tuberkuloze se uspostavlja na osnovu istorijskih, fizičkih, radioloških i mikobakterioloških rezultata.

Zbirni pregled i objašnjenje

Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) je četvrta generacija tehnologije testiranja QuantiFERON-TB kojim se procenjuje ćelijski odgovor putem kvantitativnog merenja proteina IFN- γ u uzorku pune krvi. QFT-Plus je kvalitativni test koji meri ćelijski imunski odgovor (Cell-Mediated Immune, CMI) na peptidne antigene koji simuliraju mikobakterijske proteine. Ovi proteini, ESAT-6 i CFP-10, ne nalaze se ni u jednoj BCG vrsti, niti u većini netuberkuloznih mikobakterija, sa izuzetkom sledećih: *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1). Osobe inficirane kompleksom organizama *M. tuberculosis* najčešće imaju limfocite u krvi koji prepoznaju ove i druge mikobakterijske antigene. Ovaj proces prepoznavanja uključuje generisanje i sekreciju citokina, IFN- γ . Otkrivanje i naknadna kvantifikacija proteina IFN- γ čine osnovu ovog testa.

Tuberkulinski kožni testovi i IGRA testovi su korisni, ali nisu dovoljni za dijagnostikovanje infekcije kompleksom bakterija *M. tuberculosis* kod bolesnih pacijenata, jer pozitivni rezultat može da podupre dijagnostikovanje bolesti tuberkuloze. Međutim, infekcije koje izazivaju druge mikobakterije (npr. *M. kansasii*) takođe mogu da dovedu po pozitivnih rezultata. Druge medicinske i dijagnostičke procene neophodne su da bi se potvrdila ili isključila bolest tuberkuloze.

Antigeni koji se koriste u testu QFT-Plus su peptidni kokteli koji stimulišu proteine ESAT-6 i CFP-10. Veliki broj studija pokazao je da ovi peptidni antigeni stimulišu IFN- γ odgovore u T ćelijama kod osoba zaraženih bakterijom *M. tuberculosis*, ali generalno ne kod osoba koje nisu zaražene niti kod osoba koje su primile BCG vakcinu i koje nisu obolele ili kod kojih ne postoji rizik od latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) (1,2,6,9). Međutim, medicinska lečenja ili stanja koja mogu da oslabe funkcije imunološkog sistema potencijalno mogu da smanje IFN- γ odgovore. Pacijenti sa određenim mikobakterijskim infekcijama takođe mogu da budu respozivni na ESAT-6 i CFP-10, jer se geni koji kodiraju ove proteine nalaze u *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1,3,7).

Populacija za testiranje pomoću testa QFT-Plus obuhvata pacijente sa klinički potvrđenom aktivnom tuberkulozom i pacijente koji su izloženi riziku od infekcije tuberkulozom ili latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI). Nisu primenljiva nikakva ograničenja u pogledu starosti, pola ili drugog tipa.

U toku infekcije bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), CD4⁺ T ćelije igraju ključnu ulogu u imunološkoj kontroli preko sekrecije citokina IFN- γ . Dokazi sada podržavaju ulogu CD8⁺ T ćelija koje doprinose odbrani domaćina od MTB-a tako što proizvode protein IFN- γ i druge rastvorljive faktore, koji aktiviraju makrofage kako bi se smanjio rast MTB-a, ubile inficirane ćelije ili direktno rastvorio međućelijski MTB. IFN- γ koji proizvodi CD8⁺ ćelije specifične za MTB detektovan je kod ispitanika sa latentnom infekcijom tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) i sa aktivnom tuberkulozom. Pored toga, ESAT-6 i CFP-10 specifični CD8⁺ T limfociti su opisani kao oni koji se često otkrivaju kod ispitanika sa aktivnom tuberkulozom u poređenju sa latentnom infekcijom tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) i mogu da se povežu sa nedavnom izloženošću MTB-u (8,10–12). Pored toga, MTB specifične CD8⁺ T ćelije koje proizvode protein IFN- γ su otkrivene kod ispitanika sa aktivnom infekcijom tuberkulozom sa koinfekcijom virusom humane imunodefijencije (Human Immunodeficiency Virus, HIV) (13,14), kao i kod male dece sa bolešću tuberkuloze (15).

QFT-Plus ima dve posebne epruvete TB Antigen Tube: TB Antigen Tube 1 (TB1) i TB Antigen Tube 2 (TB2). Obe epruvete sadrže peptidne antigene iz antigena povezanih sa kompleksom MTB organizama, ESAT-6 i CFP-10. Epruvete TB1 i TB2 sadrže peptide iz ESAT-6 i CFP-10 koji su napravljeni da podstaknu ćelijske imunske odgovore (Cell-Mediated Immune, CMI) od CD4⁺ T-pomoćnih limfocita; dok epruveta TB2 sadrži dodatni komplet peptida koji ima za cilj indukciju ćelijskih imunskih odgovora (Cell-Mediated Immune, CMI) od CD8⁺ citotoksičnih T limfocita.

Faktori rizika od infekcije bakterijom *M. tuberculosis* obuhvataju istorijske, medicinske ili epidemiološke prediktore za bolest tuberkuloze ili izloženost tuberkulozi. Pogledajte najnovije smernice SZO <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> za detaljne preporuke o dijagnostikovanju infekcije bakterijom *M. tuberculosis* (uključujući i bolest) i izboru lica za testiranje (16). QFT-Plus je testiran u pojedinim grupama pacijenata kojima je indikovano skrining na infekciju tuberkulozom u skladu sa aktuelnim smernicama SZO (16), uključujući: osobe koje su imale pozitivan nalaz na testu na virus humane imunodefijencije (Human Immunodeficiency Virus, HIV), osobe koje su bile u kontaktu sa pacijentima koji su nedavno bolovali od tuberkuloze i osobe koje žive u okruženjima sa velikom cirkulacijom ljudi, a koje su bile izložene odraslim osobama pod visokim rizikom od pojave tuberkuloze (5).

Principi ispitivanja

QFT-Plus je kvalitativno ispitivanje u kojem se koriste specijalizovane epruvete za prikupljanje uzoraka krvi koje sadrže peptidne antigene koji simuliraju proteine bakterije *M. tuberculosis*, a koriste se za prikupljanje pune krvi. Inkubacija krvi se odvija u epruvetama u trajanju od 16 do 24 sata, nakon čega se plazma prikuplja i testira na prisustvo proteina IFN- γ dobijenog kao odgovor na peptidne antigene.

Prvo se prikuplja puna krv u svaku od QFT-Plus Blood Collection Tubes, a to su: Nil epruveta, TB1 epruveta, TB2 epruveta i Mitogen epruveta. Osim toga, krv može da se prikupi u jednu epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi koja sadrži litijum heparin ili natrijum heparin kao antikoagulans, a da se zatim prebaci u epruvetu QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes treba da se protresu za mešanje antigena sa krvlju i moraju da se inkubiraju na temperaturi od 37 °C \pm 1 °C u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 16 sati nakon prikupljanja. Nakon perioda inkubacije od 16 do 24 sata, epruvete se centrifugiraju, plazma se obrađuje, a količina proteina IFN- γ (IU/ml) meri se testom ELISA. QFT-Plus ELISA koristi rekombinantni humani IFN- γ standard, koji je ispitan u odnosu na referentnu pripremu proteina IFN- γ (NIH ref: Gxg01-902-535). Rezultati test uzoraka su navedeni u međunarodnim jedinicama po mililitru (IU/ml) u odnosu na krivu standarda pripremljenu probnim razblaživanjima standarda koji se dobija u kompletu.

Poznato je da heterofilna (npr. humana anti-mišja) antitela u serumu ili plazmi ometaju imunoispitivanja kod nekih pojedinaca. Efekat heterofilnih antitela na test QFT-Plus ELISA umanjen je na najmanju moguću meru dodavanjem normalnog mišjeg seruma u zeleni razblaživač i primenom fragmenata F(ab')₂ monoklonskih antitela kao antitela koja se vezuju za protein IFN- γ i oblažu bunarčiće mikroploče.

QFT-Plus ispitivanje se smatra pozitivnim na IFN- γ odgovor kada su vrednosti u epruveti TB Antigen Tube znatno iznad vrednosti za IFN- γ IU/ml u Nil epruveti. Uzorak plazme iz Mitogen epruvete služi kao IFN- γ pozitivna kontrola za svaki testirani uzorak. Nizak odgovor na Mitogen (< 0,5 IU/ml) ukazuje na nejasan rezultat kada uzorak krvi ima i negativan odgovor na antigene tuberkuloze. Ovaj šablon može da se pojavi u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita usled nepravilnog rukovanja uzorkom, punjenja/mešanja epruvete Mitogen ili u slučaju nemogućnosti limfocita pacijenta da generišu protein IFN- γ . Do povišenih nivoa proteina IFN- γ u uzorku u epruveti Nil može doći usled prisustva heterofilnih antitela ili intrinzične sekrecije proteina IFN- γ . Nil epruveta se podešava za pozadinu (npr. povišeni nivoi cirkulisanja proteina IFN- γ ili prisustvo heterofilnih antitela). Nivo proteina IFN- γ u Nil epruveti oduzima se od nivoa IFN- γ proteina za epruvetu TB Antigenom Tube i Mitogen epruvetu. Gornja vrednost opsega QFT-Plus ELISA iznosi 10 IU/ml.

Obezbeđeni materijal

Sadržaj kompleta

Komponente testa ELISA Kataloški br.	Komplet sa 2 ploče 622120	Referentno laboratorijsko pakovanje 622822
Microplate strips (Trake za mikroploču) (12 x 8 udubljenja) premazane slojem mišjeg anti-humanog IFN- γ monoklonskog antitela	2 kompleta traka za mikroploču sa udubljenjima 12 x 8	20 kompleta traka za mikroploču sa udubljenjima 12 x 8
IFN- γ Standard (IFN- γ standard), liofilizovani (sadrži rekombinantni humani protein IFN- γ , goveđi kazein, 0,01% w/v timerosal)	1 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituiše)	10 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituiše)
Green Diluent (Zeleni razblaživač) (sadrži goveđi kazein, normalni mišji serum, 0,01% w/v timerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Koncentrovani konjugat od 100x), liofilizovani (mišji anti-human protein IFN- γ HRP, sadrži 0,01% timerosal)	1 x 0,3 ml (kada se rekonstituiše)	10 x 0,3 ml (kada se rekonstituiše)
Wash Buffer 20x Concentrate (Koncentrovani pufer za ispiranje od 20x) (pH 7,2, sadrži 0,05% v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Rastvor enzimskog supstrata) (sadrži H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije) (sadrži 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
<i>Uputstvo za upotrebu za QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

Komponente u kompletu

Kontrole i kalibratori

QFT-Plus ELISA koristi rekombinantni humani IFN- γ standard, koji je ispitan u odnosu na referentnu pripremu proteina IFN- γ (NIH ref: Gxg01-902-535).

Platforma i softver

Softver QFT-Plus Analysis Software može se koristiti za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata, ali njegova upotreba nije obavezna. Dostupan je za preuzimanje na stranici www.qiagen.com.

Potreban materijal koji se ne isporučuje

Dodatni reagensi

- QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Dejonizovana ili destilovana voda, 2 litra

Potrošni materijal

- Poklopac ploče za ploču sa 96 bunarčića
- **Opciono:** Mikroeprovete od 1 ml sa poklopcima u nosačima formata sa 96 bunarčića ili nepremazane mikroploče sa plastičnim zatvaračima za čuvanje plazme (nosač ili ploča za po 22 pacijenta)
- Rezervoari za reagense

Oprema*

- Inkubator na temperaturi $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (sa CO₂ ili bez njega)
- Kalibrisane pipete promenljive zapremine koje mogu da doziraju od 10 µl do 1000 µl sa vrhovima za jednokratnu upotrebu
- Kalibrisana pipeta sa više kanala koja može da dozira 50 µl i 100 µl sa vrhovima za jednokratnu upotrebu
- Šejker za mikroploče koji može da dostigne brzinu između 500 i 1000 obrtaja/minuti
- Perač mikroploče (radi bezbednog rukovanja uzorcima plazme preporučuje se automatski perač mikroploče)
- Čitač mikroploče opremljen filterom od 450 nm i referentnim filterom od 620 nm do 650 nm
- Vorteks mešalica promenljive brzine
- Centrifuga sa mogućnošću centrifugiranja epruveta za prikupljanje uzoraka krvi brzinom od najmanje 3000 RCF (g)
- Stepenovani cilindar od 1 ili 2 litre

* Pre upotrebe proverite da li su instrumenti provereni i kalibrisani u skladu sa preporukama proizvođača.

Upozorenja i mere opreza

Imajte u vidu da ćete možda morati da konsultujete lokalne propise kada proizvođaču i/ili njegovom ovlašćenom predstavniku i regulatornim telima koja su na snazi u zemlji u kojoj se nalazi korisnik i/ili pacijent prijavljujete ozbiljne incidente koji su se desili u vezi sa uređajem.

Za korišćenje u in vitro dijagnostici.

Informacije o bezbednosti

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate listove sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS) za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.

- Biološki i analitički uzorci potencijalno su infektivni. Odložite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu sa bezbednosnim procedurama koje su važeće u vašoj zemlji.
- Negativni QFT-Plus rezultat ne eliminiše mogućnost infekcije bakterijom *M. tuberculosis* ili bolest tuberkuloze: do lažno negativnih rezultata može da dođe zbog stadijuma infekcije (npr. uzorak dobijen pre razvoja ćelijskog imunološkog odgovora), nepravilnog rukovanja epruvetama za prikupljanje uzoraka krvi nakon venepunkcije, nepravilne performanse ispitivanja ili drugih imunologičkih promenljivih, uključujući one u vezi sa bilo kakvim komorbiditetima. Proizvodnja heterofilnih antitela ili nespecifičnog proteina IFN- γ kod drugih zapaljenskih stanja može maskirati specifične odgovore na peptide virusa ESAT-6 ili CFP-10.


- Pozitivan QFT-Plus rezultat ne bi trebalo da bude jedina ili definitivna osnova za utvrđivanje infekcije bakterijom *M. tuberculosis*. Pogrešan učinak ispitivanja može da dovede do lažno-pozitivnih rezultata ispitivanja QFT-Plus.
- Nakon pozitivnog QFT-Plus rezultata, trebalo bi nastaviti sa daljom medicinskom procenom za aktivnu tuberkulozu (npr. razmaz i kultura acidorezistentnih bacila (Acid Fast Bacilli, AFB), rendgenski snimak grudi).
- Iako se ESAT-6 i CFP-10 ne nalaze u svim BCG vrstama niti u najpoznatijim mikobakterijama koje ne izazivaju tuberkulozu, pozitivan QFT-Plus rezultat može da se pojavi usled infekcije bakterijom *M. kansasii*, *M. szulgai* ili *M. marinum*. Ako se sumnja na takve infekcije, trebalo bi obaviti i druge testove.
- Lažno negativni rezultat ispitivanja QFT-Plus može biti posledica nepravilnog prikupljanja uzoraka krvi ili nepravilnog rukovanja biološkim uzorkom, što utiče na funkciju limfocita. Informacije o pravilnom rukovanju uzorcima krvi pronađite u odeljku „Protokol: izvođenje testa ELISA“ na strani 20. Odlaganje inkubacije može dovesti do lažno negativnih ili nejasnih rezultata, dok na sposobnost otkrivanja značajnog IFN- γ odgovora mogu uticati i drugi tehnički parametri.

Informacije za hitne slučajeve

CHEMTREC

Van SAD i Kanade +1 703-527-3887

Mere opreza

<p>OPREZ</p> 	<p>Rukujte humanom krvlju kao da je potencijalno infektivna.</p> <p>Sledite relevantne smernice za rukovanje krvlju. Odlazite uzorke i materijale koji su došli u kontakt sa krvlju ili krvnim proizvodima u skladu sa saveznim, državnim i lokalnim zakonskim propisima.</p>
---	---

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sadrži: sumpornu kiselinu. Upozorenje! Dovodi do korozije metala. Dovodi do iritacije kože. Dovodi do ozbiljne iritacije kože. Nosite zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/zaštitu za oči i zaštitu za lice.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Upozorenje! Dovodi do blage iritacije kože. Nosite zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/zaštitu za oči i zaštitu za lice.

QuantiFERON Green Diluent



Sadrži: tartrazin. Upozorenje! Može da dovede do alergijske reakcije na koži. Nosite zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/zaštitu za oči i zaštitu za lice.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Štetno po vodene organizme sa dugoročnim posledicama. Izbegavajte ispuštanje u okruženje.

Dodatne informacije

Listovi sa bezbednosnim podacima: www.qiagen.com/safety

- Timerosal se koristi kao konzervans u nekim reagensima QFT-Plus. Može da bude toksičan prilikom gutanja, udisanja ili kontakta sa kožom.
- Odstupanja od uputstva za upotrebu za *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* mogu da dovedu do pogrešnih rezultata. Pažljivo pročitajte uputstva pre upotrebe.
- Nemojte da koristite komplet ako neka od bočica sa reagensima pokazuje znake oštećenja ili curenja pre upotrebe.
- **Važno:** Pregledajte bočice pre upotrebe. Nemojte da koristite bočice za konjugat ili IFN- γ standard ako na bočicama postoje znaci oštećenja ili ako je oštećen gumeni poklopac. Nemojte da radite sa slomljenim bočicama. Preduzmite odgovarajuće mere opreza prilikom bezbednog odlaganja bočica. Za otvaranje bočica za konjugat ili IFN- γ standard preporučujemo da koristite klešta za otvaranje bočica da biste rizik od povrede metalnim poklopcem sveli na najmanju meru.
- Nemojte da mešate ili da koristite trake za mikroploču, IFN- γ standard, zeleni razblaživač ili koncentrovani konjugat od 100x iz različitih QFT-Plus serija kompleta. Drugi reagensi (koncentrovani pufer za ispiranje od 20x, rastvor enzimskog supstrata i enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije) mogu da se razmenjuju među kompletima pod uslovom da su reagensi u okviru roka upotrebe i da su zabeleženi detalji serije.
- Neupotrebijene reagense i biološke uzorke odložite na otpad u skladu sa državnim i lokalnim zakonskim propisima.
- Nemojte da koristite komplet QFT-Plus ELISA Kit nakon isteka roka upotrebe.
- Uvek se treba pridržavati ispravnih laboratorijskih procedura.
- Uverite se da je laboratorijska oprema, kao što su peraći ploče i čitači, kalibrisana/potvrđena za korišćenje.

Čuvanje reagenasa i rukovanje njima

Obratite pažnju na datume isteka roka upotrebe i uslove čuvanja koji su odštampani na kutiji i nalepnicama svih komponenti. Nemojte da koristite komponente kojima je istekao rok upotrebe ili koje su nepropisno čuvane.

Stabilnost tokom upotrebe

- Komplet ELISA čuvajte na temperaturi 2–8 °C.
- Rastvor enzimskog supstrata uvek štite od direktne sunčeve svetlosti.

Rekonstituisani i neupotrebljeni reagensi

- Uputstva o tome kako da rekonstituišete reagense potražite u odeljku „Protokol: izvođenje testa ELISA“ na strani 20.
- Rekonstituisani standard iz kompleta može da se čuva najviše 3 meseca na temperaturi 2–8 °C.

Zabeležite datum rekonstitucije standarda iz kompleta.

- Rekonstituisani koncentrovani konjugat od 100x mora se vratiti u skladište na temperaturu 2–8 °C i mora se iskoristiti u roku od 3 meseca.

Zabeležite datum rekonstitucije konjugata.

- Konjugat spreman za upotrebu mora da se upotrebi u roku od 6 sati od pripreme.
- Pufer za ispiranje spreman za upotrebu može da se čuva na sobnoj temperaturi najduže 2 nedelje.
- Trake za mikroploču su namenjene samo za jednokratnu upotrebu. Neiskorišćene trake mogu da se uklone sa okvira ploče i uskladište radi naknadne upotrebe.

Čuvanje uzoraka i rukovanje njima

Pojedinosti o postupku prikupljanja krvi za test QFT-Plus potražite u *Uputstvu za upotrebu za QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes* (1123668).

Protokol: izvođenje testa ELISA

Važne napomene pre početka

Postavka (vreme potrebno za izvođenje ispitivanja)

- U cilju dobijanja važećih rezultata ispitivanja QFT-Plus, korisnik mora da obavi određene zadatke u utvrđenom roku. Preporučujemo da pre izvođenja korisnik pažljivo isplanira svaku fazu ispitivanja da bi za izvođenje svake faze odvojio odgovarajuće vreme. Procena vremena data je u nastavku; navedeno je i vreme za istovremeno testiranje više uzoraka.
 - Približno 3 sata za jednu ploču za test ELISA
 - < 1 sat rada
 - Dodajte od 10 do 15 minuta za svaku narednu ploču

IFN- γ ELISA

- Informacije o materijalima potrebnim za izvođenje testa ELISA potražite u odeljku „Sadržaj kompleta“ na strani 11 i odeljku „Potreban materijal koji se ne isporučuje“ na strani 13.

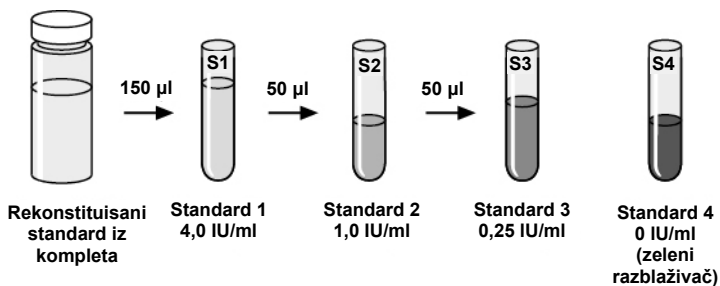
Procedura

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim koncentrovanog konjugata od 100x, moraju postići sobnu temperaturu ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pre korišćenja. Za kalibrisanje temperature planirajte najmanje 60 minuta.
2. Izvadite suvišne trake za ploče za test ELISA iz okvira, vratite ih u kesicu od folije i čuvajte u frižideru dok vam ponovo ne zatrebaju.

3. Obezbedite najmanje 1 traku za standarde QFT-Plus i dovoljno traka za broj testiranih ispitanika (pogledajte Sliku 2 za preporučeni format ploče). Nakon korišćenja sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.
- 3a. Rekonstituišite IFN- γ standard pomoću određene količine dejonizovane ili destilovane vode navedene na nalepnici bočice. Lagano promešajte da biste stvaranje pene sveli na najmanju meru i vodite računa da se kompletan sadržaj bočice u potpunosti rastvori. Rekonstitucija IFN- γ standarda na ispravnu zapreminu daje rastvor koncentracije od 8,0 IU/ml.
- 3b. Pomoću rekonstituisanog standarda pripremite seriju razblaživanja 4 koncentracije proteina IFN- γ (pogledajte Sliku 1).
- 3c. Krivu standarda treba generisati sa koncentracijama proteina IFN- γ u nastavku:
- S1 (Standard 1) sadrži 4,0 IU/ml,
 - S2 (Standard 2) sadrži 1,0 IU/ml,
 - S3 (Standard 3) sadrži 0,25 IU/ml,
 - S4 (Standard 4) sadrži 0 IU/ml (samo zeleni razblaživač (Green Diluent, GD)).
- 3d. Standardi moraju da se ispituju najmanje u duplikatu.
- 3e. Pripremite sveža razblaživanja standarda iz kompleta za svaku ELISA sesiju.

Procedura

A	Obeležite 4 epruvete: S1, S2, S3, S4
B	Dodajte 150 μ l zelenog razblaživača (Green Diluent, GD) u S1, S2, S3, S4
C	Dodajte 150 μ l standarda iz kompleta u S1 i dobro promešajte
D	Prebacite 50 μ l iz S1 u S2 i dobro promešajte
E	Prebacite 50 μ l iz S2 u S3 i dobro promešajte
F	Sam zeleni razblaživač (Green Diluent, GD) služi kao nulti standard (S4)



Slika 1. Priprema serije razblaživanja za krivu standarda.

4. Rekonstituišite liofilizovani koncentrovani konjugat od 100x sa 0,3 ml dejonizovane ili destilovane vode. Lagano promešajte da biste stvaranje pene sveli na najmanju meru i vodite računa da se kompletan sadržaj bočice u potpunosti rastvori.
 - 4a. Konjugat spreman za upotrebu priprema se razblaživanjem potrebne količine rekonstituisanog koncentrovanog konjugata od 100x zelenim razblaživačem (Tabela 1).
 - 4b. Konjugat spreman za upotrebu treba da se upotrebi u roku od 6 sati od pripreme.
 - 4c. Vratite sav neiskorišćen koncentrovani konjugat od 100x na temperaturu od 2 °C do 8 °C odmah nakon upotrebe.

Tabela 1. Priprema konjugata (spremnog za upotrebu)

Broj traka	Zapremina konjugata (koncentrat od 100x)	Zapremina zelenog razblaživača
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. Uzorke plazme prikupljene iz epruveta za prikupljanje uzoraka krvi koji se naknadno skladište (u frižideru ili se zamrzavaju) dobro promešajte pre dodavanja u udubljene ploče za test ELISA. Uzorci plazme se mogu čuvati u centrifugiranim epruvetama QFT-Plus Blood Collection Tubes najduže 28 dana na temperaturi 2–8 °C. Prikupljeni uzorci plazme mogu se čuvati najduže 28 dana na temperaturi 2–8 °C. Prikupljeni uzorci plazme mogu se čuvati i na temperaturi ispod –20 °C (najbolje na temperaturi ispod –70 °C) tokom dužeg perioda.

Radi merenja uzorci plazme mogu da se postave direktno iz centrifugiranih epruveta za prikupljanje uzoraka krvi na ploču za test QFT-Plus ELISA ili da se koriste direktno na njoj.

Važno: Ako uzorci plazme treba da se prebace direktno iz centrifugiranih epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes, izbegavajte bilo kakvo mešanje plazme. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.

6. Dodajte 50 µl sveže pripremljenog konjugata spreznog za upotrebu u svako udubljeno ploče za test ELISA.

7. Dodajte 50 µl uzorka plazme za testiranje u odgovarajuća udubljenja (pogledajte preporučeni raspored ploče za test ELISA na Slici 2).
8. Na kraju, dodajte po 50 µl standarda od 1 do 4 u odgovarajuća udubljenja ploče (pogledajte preporučeni raspored ploče za test ELISA na Slici 2). Standardi bi trebalo da se ispitaju 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 ploče za test ELISA. S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (uzorak 1. Nil kontrolna plazma), 1 TB1 (uzorak 1. TB1 plazma), 1 TB2 (uzorak 1. TB2 plazma), 1M (uzorak 1. plazma Mitogen).

9. Stavite poklopac preko ploče za test ELISA i dobro promešajte konjugat i uzorke plazme/standarde na šejkeru za mikroploče u trajanju od 1 minuta brzinom od 500 do 1000 obrtaja/minuti. Izbegavajte prskanje.
10. Stavite poklopac preko ploče za test ELISA i inkubirajte na sobnoj temperaturi (na $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 120 ± 5 minuta. Ploča za test ELISA ne sme da se izlaže direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije. Odstupanje od određenog temperaturnog opsega može dovesti do pogrešnih rezultata.
11. Dok traje inkubacija ploče za test ELISA pripremite pufer za ispiranje spreman za upotrebu. Razblažite jedan deo koncentrovanog pufera za ispiranje od 20x sa 19 delova dejonizovane ili destilovane vode i dobro promešajte. Obezbeđeno je dovoljno koncentrovanog pufera za ispiranje od 20x za pripremu 2 litre pufera za ispiranje spremnog za upotrebu.

12. Nakon završetka inkubacije ploče za test ELISA isperite udubljenja ploče za test ELISA sa 400 µl pufera za ispiranje spremnog za upotrebu. Korak ispiranja obavite najmanje 6 puta. Prilikom rukovanja uzorcima plazme preporučuje se upotreba automatskog perača ploče iz bezbednosnih razloga.

Temeljno ispiranje je veoma važno za učinak ispitivanja. Uverite se da je svako udubljenje do vrha ispunjeno puferom za ispiranje u svakom ciklusu ispiranja.

Preporučuje se potapanje od najmanje 5 sekundi između ciklusa.

Potrebno je da se standardno laboratorijsko sredstvo za dezinfekciju doda u odvodni rezervoar i da se prate procedure za dekontaminaciju potencijalno zaraznog materijala.

13. Ploču za test ELISA okrenite na upijajući ubrus (koji ne ostavlja vlakna) da biste uklonili ostatke pufera za ispiranje. Dodajte 100 µl rastvora enzimskog supstrata u svako udubljenje ploče, stavite poklopac preko ploče i dobro promešajte u trajanju od 1 minuta pri brzini 500–1000 obrtaja/minuti na šejkeru za mikroploče.
14. Stavite poklopac preko ploče za test ELISA i inkubirajte na sobnoj temperaturi (na $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 30 minuta. Ploča za test ELISA ne sme da se izlaže direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije.
15. Nakon 30 minuta inkubacije, dodajte 50 µl enzimskog rastvora za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje ploče istim redosledom kojim je dodavan supstrat i dobro promešajte brzinom od 500 do 1000 obrtaja/minuti na šejkeru za mikroploče.
16. Izmerite optičku gustinu (Optical Density, OD) udubljenja ploče za test ELISA u roku od 5 minuta od zaustavljanja reakcije pomoću čitača mikroploče sa filterom od 450 nm i referentnim filterom od 620 nm do 650 nm. Vrednosti optičke gustine (Optical Density, OD) koriste se za izračunavanje rezultata.

Rezultati (proračuni)

QFT-Plus Analysis Software se koristi za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata. Dostupan je na stranici www.qiagen.com. Proverite da li koristite najnoviju verziju softvera QFT-Plus Analysis Software.

Ovaj softver obavlja procenu kontrole kvaliteta ispitivanja, generiše krivu standarda i obezbeđuje rezultate testiranja za svakog ispitanika, kao što je detaljno navedeno u odeljku „Tumačenje rezultata “ na strani 30. Softver izdaje sve rezultate sa koncentracijom iznad 10 IU/ml kao „> 10“ jer su te vrednosti ispod potvrđenog linearnog opsega za test ELISA.

Kao alternativno rešenje u odnosu na QFT-Plus Analysis Software, rezultati mogu da se utvrde i korišćenjem sledećeg metoda.

Formiranje krive standarda i vrednosti uzoraka

Ako se ne koristi QFT-Plus Analysis Software

Ako se ne koristi softver QFT-Plus Analysis Software, određivanje krive standarda i vrednosti uzoraka u IU/ml zahteva korišćenje programa za unakrsne tabele, kao što je Microsoft® Excel®.

Korišćenje programa za unakrsne tabele

1. Odredite srednju vrednost optičke gustine (Optical Density, OD) replikata standarda iz kompleta na svakoj ploči.
2. Konstruišite krivu standarda $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ tako što ćete grafički prikazati $\log_{(e)}$ srednje vrednosti optičke gustine (Optical Density, OD) (y osa) u odnosu na $\log_{(e)}$ koncentracije proteina IFN- γ standarda u IU/ml (x osa), izuzimajući nulti standard iz tih proračuna. Regresionom analizom izračunajte najbolju pravu krive standarda.

- Pomoću krive standarda odredite koncentraciju proteina IFN- γ (IU/ml) za svaki od uzoraka plazme za testiranje koristeći vrednost optičke gustine (Optical Density, OD) svakog uzorka.
- Ove proračune možete da obavite pomoću softverskih paketa koji su dostupni uz čitače mikroploče i standardnog programa za unakrsne tabele ili programa za statistiku (kao što je Microsoft Excel). Preporučuje se da se ovi paketi koriste za izračunavanje regresione analize, koeficijenta varijacije (Coefficient of Variation, %CV) za standarde i koeficijenta korelacije (r) za krivu standarda.

Izračunavanje vrednosti uzoraka

Ako su za standarde dobijene očitane vrednosti optičke gustine (Optical Density, OD) u nastavku, proračuni dobijeni korišćenjem $\log(e)$ navedeni su u Tabeli 2.

Tabela 2. Kriva standarda

Standard	IU/ml	Vrednosti OD a i b	Srednja vrednost OD	%CV	$\text{Log}_{(e)}$ IU/ml	Srednja vrednost $\text{Log}_{(e)}$ (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	n. p.	-1,386	-2,079
Standard 4	0	0,034, 0,037	0,036	n. p.	n. p.	n. p.

Jednačina krive je $y = 0,7885(X) - 0,9837$, gde je „m“ = 0,7885 i „c“ = -0,9837. Te vrednosti se koriste u jednačini $X = (Y - c)/m$ sa nepoznatom X. Na osnovu krive standarda izračunati koeficijent korelacije (r) = 1,000. n. p.: nije primenjivo.

Validnost ispitivanja se određuje kriterijumima navedenim u odeljku „Kontrola kvaliteta testa“ na strani 28.

Kriva standarda (Tabela 2) koristi se za pretvaranje optičke gustine (Optical Density, OD) odgovora na antigen u međunarodne jedinice (IU/ml).

Tabela 3. Izračunavanje vrednosti uzoraka

Antigen	Vrednost OD	Vrednost OD za $\log_{(e)}$	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

Vrednosti proteina IFN- γ (u IU/ml) za TB1, TB2 i Mitogen korigovane su za pozadinu oduzimanjem vrednosti u IU/ml dobijene za odgovarajuću kontrolu Nil. Korigovane vrednosti se koriste za tumačenje rezultata testa.

Kontrola kvaliteta testa

Tačnost rezultata testa zavisi od pravilnog formiranja krive standarda. Zbog toga je neophodno da se ispitaju rezultati dobijeni iz standarda da bi rezultati testiranja uzoraka mogli da se protumače.

ELISA test je važeći ako su ispunjeni sledeći uslovi:

- Srednja vrednost optičke gustine (Optical Density, OD) za standard 1 mora da bude $\geq 0,600$.
- Procenat koeficijenta varijacije (Coefficient of Variation, %CV) za vrednosti replikata standarda 1 i standarda 2 mora da bude $\leq 15\%$.
- Ponovljene vrednosti optičke gustine (Optical Density, OD) za standarde 3 i 4 ne smeju da odstupaju za više od 0,040 jedinica optičke gustine od svoje srednje vrednosti.
- Koeficijent korelacije (r) izračunat iz srednjih vrednosti apsorpcije standarda mora da bude $\geq 0,98$.

- Ako gorenavedeni kriterijumi nisu ispunjeni, test nije važeći i mora da se ponovi.
- Srednja vrednost optičke gustine (Optical Density, OD) nultog standarda (zeleni razblaživač) treba da bude $\leq 0,150$. Ako je srednja vrednost OD $> 0,150$, mora da se istraži procedura ispiranja ploče.

QFT-Plus Analysis Software izračunava i prijavljuje ove parametre za kontrolu kvaliteta.

Svaka laboratorija treba da odredi odgovarajuće tipove kontrolnih materijala i učestalost testiranja u skladu sa propisima državnih i lokalnih organizacija i drugih odgovarajućih organizacija za akreditaciju. Treba uzeti u obzir procedure spoljašnje procene kvaliteta i druge procedure validacije.

Napomena: Pokazano je da u uzorcima plazme kojima je dodat rekombinantni protein IFN- γ dolazi do smanjenja koncentracije do 50% ako se čuvaju na temperaturama 2–8 °C i –20 °C. Rekombinantni protein IFN- γ ne preporučuje se za uspostavljanje standarda kontrole.

Tumačenje rezultata

Rezultati testa QFT-Plus se tumače na osnovu sledećih kriterijuma (Tabela 4).

Važno: Dijagnostikovanje ili isključivanje bolesti tuberkuloze, kao i procena mogućnosti stanja latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI) zahteva kombinaciju epidemioloških, istorijskih, medicinskih i dijagnostičkih rezultata koje bi trebalo uzeti u obzir kada se tumače QFT-Plus rezultati. Pogledajte opšte smernice o dijagnostikovanju i lečenju bolesti tuberkuloze i latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI):

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

Tabela 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	Izveštaj/tumačenje
≤ 8,0	≥ 0,35 i ≥ 25% od Nil-a	Bilo koja vrednost	Bilo koja vrednost	Pozitivno [†]	<i>M. tuberculosis</i> infekcija jeste verovatna
	Bilo koja vrednost	≥ 0,35 i ≥ 25% od Nil-a			
	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25% Nil-a	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25% Nil-a	≥ 0,50	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE verovatna
	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25% Nil-a	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25% Nil-a	< 0,50	Nejasno [‡]	Verovatnoća <i>M. tuberculosis</i> infekcije ne može da se odredi
> 8,0 [§]	Bilo koja vrednost				

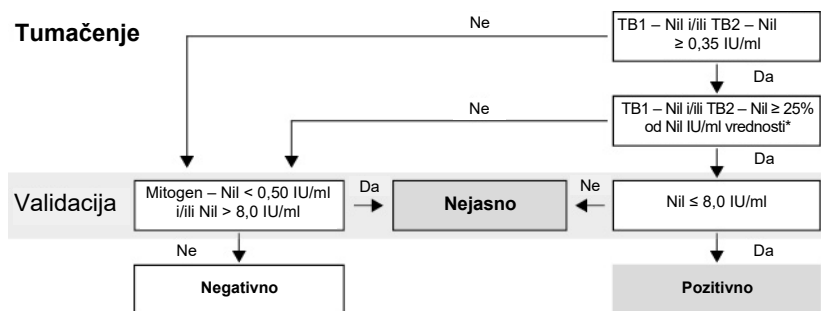
* Odgovori na Mitogen pozitivnu kontrolu (i povremeno antigeni tuberkuloze) mogu da budu izvan opsega čitača mikroploče. Ovo nema uticaja na rezultate testa. Vrednosti > 10 IU/ml softver QFT-Plus prijavljuje kao > 10 IU/ml.

[†] U slučajevima u kojima ne postoji sumnja na infekciju bakterijom *M. tuberculosis*, prvobitno pozitivni rezultati mogu da se potvrde ako se originalni uzorci plazme ponovno testiraju u duplikatima pomoću testa QFT-Plus ELISA. Ako je ponovljeno testiranje jednog ili oba replikata pozitivno, rezultat testa smatra se pozitivnim.

[‡] Pogledajte odeljak „Vodič za rešavanje problema“ na strani 66 da biste videli moguće uzroke.

[§] U kliničkim ispitivanjima manje od 0,25% ispitanika imalo je nivo proteina IFN-γ u vrednosti od > 8,0 IU/ml za vrednost Nil.

Magnituda izmerenog nivoa IFN- γ ne može da se poveže sa stadijumom ili stepenom infekcije, nivoom imunološkog odgovora ili mogućnosti napredovanja ka aktivnoj bolesti. Pozitivan rezultat na tuberkulozu kod osoba koje su negativne na Mitogen je redak ali je viđen kod pacijenata sa bolešću tuberkuloze. Ovo pokazuje da je IFN- γ odgovor na antigen tuberkuloze veći od odgovora na Mitogen, što je moguće jer Mitogen nivo ne stimuliše maksimalno proizvodnju IFN- γ od strane limfocita.



Slika 3. Tumačenje testa QFT-Plus. *Da bi vrednosti TB1 minus Nil ili TB2 minus Nil bile važeće, $\geq 25\%$ od Nil IU/ml vrednosti mora da bude iz iste epruvete kao i originalni rezultat $\geq 0,35$ IU/ml.

Ograničenja

Rezultati QFT-Plus testiranja moraju da se koriste u kombinaciji sa epidemiološkom istorijom svakog pojedinca, trenutnim medicinskim statusom i drugim dijagnostičkim procenama.

Pojedinci sa vrednostima Nil većim od 8 IU/ml klasifikuju se kao „nejasni“ zato što 25% veći odgovor antigena tuberkuloze može da bude izvan opsega merenja ispitivanja.

- Prediktivna vrednost pozitivnog rezultata QFT-Plus pri dijagnostikovanju infekcije bakterijom *M. tuberculosis* zavisi od verovatnoće infekcije, što se procenjuje istorijskim, epidemiološkim, dijagnostičkim i drugim nalazima.
- Kako bi se dijagnostikovala latentna infekcija tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI), neophodno je da se bolest tuberkuloze isključi putem medicinske procene, koja obuhvata procenu aktuelnih medicinskih i dijagnostičkih testova za bolest, onako kako je indikovano.
- Negativan rezultat se mora uzeti u obzir zajedno sa medicinskim i istorijskim podacima pojedinca koji se odnose na mogućnost infekcije bakterijom *M. tuberculosis* i mogućeg rizika od progresije bolesti tuberkuloze, naročito kod pojedinaca sa narušenom funkcijom imuniteta.

Nepouzdana ili nejasni rezultati mogu da se jave u sledećim slučajevima:

- Odstupanja od procedure navedene u Uputstvu za upotrebu.
- Nepravilan transport uzoraka krvi ili rukovanje njima.
- Povišeni nivo cirkulišućeg proteina IFN- γ ili prisustvo heterofilnih antitela.
- Prekoračenje potvrđenog vremena od prikupljanja uzorka za krv do inkubacije.
Pogledajte *Uputstvo za upotrebu za QFT-Plus Blood Collection Tubes* (1123668).

Karakteristike učinka

Kliničke studije

Pošto ne postoji određeni test standarda za potvrđivanje ili izuzimanje dijagnoze latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI), procena osetljivosti i specifičnosti za QFT-Plus ne može praktično da se oceni. Specifičnost testa QFT-Plus je približno određena na osnovu procene lažno pozitivnih stopa kod osoba sa niskim rizikom (bez poznatih faktora rizika) od infekcije tuberkulozom. Osetljivost je približno određena procenom grupe pacijenata sa aktivnom bolešću tuberkuloze sa pozitivnom kulturom. Pored toga, učinak ispitivanja je procenjen u pogledu stopa pozitivnih i negativnih rezultata u populaciji zdravih ispitanika sa identifikovanim faktorima rizika za infekciju tuberkulozom (populacija mešovitog rizika).

Specifičnost

Multicentrična studija u kojoj je procenjena klinička specifičnost testa QFT-Plus sprovedena je sa 733 studijskih ispitanika za koje se smatralo da su izloženi niskom riziku od infekcije bakterijom *M. tuberculosis* ili da ne postoje faktori rizika od infekcije ili bolesti. Demografski podaci i faktori rizika za izloženost tuberkulozi određeni su pomoću standardne ankete u vreme testiranja. Studija je sprovedena na četiri nezavisne lokacije, pri čemu je jedna bila u Sjedinjenim Državama, dve u Japanu, a jedna u Australiji. Test QFT-Plus je upoređen sa testom QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). U Tabeli 5 naveden je zbirni pregled podataka o učinku kliničke specifičnosti, koji je stratifikovan prema lokaciji studije i regionu. Rezultati učinka zasnovani su na ukupnom broju važećih testova. Nije bilo nejasnih rezultata.

Tabela 5. Specifičnost testa QFT-Plus u populaciji niskog rizika

Lokacija	N	Pozitivno		Negativno		Nejasno		Specifičnost (95% CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Sjedinjene Države									
(#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									
(#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)
Ukupno za Japan	322	4	7	318	315	0	0	98,76% (318/322) (96,85– 99,52)	97,83% (315/322) (95,6–98,9)
Australija									
(#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, 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, 98,76% u Japanu i 95,98% u Australiji. Ukupna specifičnost testa QFT iznosila je 98,09% (719/733).

Navodimo analizu rezultata prema tipu epruvete TB Antigen Tube i njihovim kombinacijama kako bismo pružili primer očekivanih rezultata u populaciji niskog rizika (Tabela 6).

Tabela 6. Rezultati studije specifičnosti testa QFT-Plus prema epruveti TB Antigen Tube

Tumačenje na osnovu vrednosti Nil za antigen tuberkuloze IU/ml u	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitivno prema TB1 i/ili TB2)*	Usaglašeno pozitivni TB1 i TB2 (alternativna analiza) [†]
Pozitivno	10	18	20	8
Negativno	723	715	713	725
Nejasno	0	0	0	0
Specifičnost (95% CI)	–	–	97,3% (713/733) (95,8–98,2)	–
Stopa negativnih rezultata (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)

* Tumačenje je zasnovano na vrednosti Nil antigena tuberkuloze $\geq 0,35$ IU/ml za obe (TB1 i TB2) ili bilo koju TB epruvetu kako bi se zadovoljili kriterijumi tumačenja za pozitivan rezultat testa QFT-Plus (TB1 ili TB2).

[†] Alternativna analiza navedena je samo u informativne svrhe.

Među ispitanicima sa niskim rizikom od infekcije tuberkulozom, kod ukupno 20 od 733 ispitanika utvrđen je pozitivan rezultat. Među njima, kod samo 8 ispitanika utvrđena je vrednost $> 0,35$ IU/ml u TB1 i u TB2 epruveti. Upoređivanje QFT testa u odnosu na ispitivanja QFT-Plus sprovedeno je u studijskoj kohorti niskog rizika i utvrđena je ukupna saglasnost od 97,5% (715/733), dok je procenat negativnog slaganja iznosio 98,3% (707/719).

Osetljivost

Iako ne postoji određeni standardni test za latentnu infekciju tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI), odgovarajući surogat je mikrobiološka kultura bakterije *M. tuberculosis*, zato što je infekcija tuberkulozom obavezni prethodnik bolesti.

Multicentrična studija u kojoj je procenjena klinička osetljivost testa QFT-Plus sprovedena je sa 434 studijska ispitanika kod kojih su zapaženi znakovi i simptomi aktivne bolesti izazvane bakterijom *M. tuberculosis*, što je potvrđeno pozitivnom kulturom i/ili PCR testom, a koji nisu lečeni zbog tuberkuloze ili u roku od ≤ 14 dana od lečenja pre prikupljanja uzorka krvi. Studija je sprovedena na 7 nezavisnih lokacija, uključujući tri lokacije u Sjedinjenim Državama, tri lokacije u Japanu i jednu u Australiji. Test QFT-Plus je upoređen sa testom QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT). U Tabeli 7 naveden je zbirni pregled podataka o učinku kliničke osetljivosti, koji su stratifikovani prema lokaciji studije i zemlji. Rezultati učinka zasnovani su na ukupnom broju važećih testova. Učestalost nejasnih rezultata za QFT i QFT-Plus iznosila je 2,3% (10/434) i 2,5% (11/434), tim redosledom.

Tabela 7. Zbirni pregled podatka o učinku u studiji kliničke osetljivosti sa stratifikacijom prema lokaciji, zemlji i ukupno

Lokacija	N	Pozitivno		Negativno		Nejasno		Osetljivost (95% CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Sjedinjene Države									
(#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)
Ukupno za Sjedinjene Države	53	47	47	6	6	0	0	88,7% (47/53) (77,4–94,7)	88,7% (47/53) (77,4–94,7)
Japan									
(#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)

Nastavak tabele na sledećoj strani

Tabela se nastavlja sa prethodne strane

Tabela 7. Zbirni pregled podataka o učinku u studiji kliničke osetljivosti sa stratifikacijom prema lokaciji, zemlji i ukupno (nastavak)

Lokacija	N	Pozitivno		Negativno		Nejasno		Osetljivost (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)
Ukupno za Japan	352	328	322	15	19	9	11	95,63% (328/343) (92,91– 97,33)	94,43% (322/341) (91,5–96,4)
Australija									
(#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 tabeli iznad ne obuhvata nejasne rezultate.

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

Navodimo analizu rezultata prema tipu epruvete TB Antigen Tube i kombinacijama epruveta kako bismo pružili primer očekivanih rezultata u populaciji sa potvrđenom tuberkulozom (Tabela 8).

Tabela 8. Rezultati studije osetljivosti testa QFT-Plus prema epruveti TB Antigen Tube

Tumačenje na osnovu vrednosti Nil za antigen tuberkuloze u IU/ml	TB1	TB2	QFT-Plus (pozitivno prema TB1 i/ili TB2)
Pozitivno	388	397	398
Negativno	32	26	25
Nejasno	14	11	11
Osetljivost* (95% CI)	–	–	94% (398/423) (91,4–96,0)
Stopa pozitivnih rezultata* (95% CI)	92,4% (388/420) (89,4–94,6)	93,9% (397/423) (91,1–95,8)	–

* Sa izuzetkom nejasnih vrednosti.

Poređenje ispitivanja QFT i QFT-Plus procenjeno je u kohorti sa aktivnom tuberkulozom sa pozitivnom kulturom (kohorte u studiji osetljivosti) i utvrđeni su ukupna saglasnost od 95,9% i procenat pozitivnog slaganja od 97,3% (391/402).

Tabela 9. Odnosi verovatnoće za QFT-Plus

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

* Ukupno

Učinak kod ispitanika sa identifikovanim infekcijom MTB (pojedinci sa mešovitim rizikom)

Kohorta od 601 pojedinca sa mešovitim faktorima rizika od infekcije tuberkulozom (npr. pozitivan nalaz na virus humane imunodeficijencije (Human Immunodeficiency Virus, HIV), istorija terapija na aktivnu ili latentnu tuberkulozu, izloženost pojedincu sa aktivnom tuberkulozom, status zdravstvenog radnika itd.) procenjena je QFT i QFT-Plus testovima. Faktori rizika su identifikovani pomoću standardizovanog upitnika. Kod ispitanika nisu zapaženi simptomi u vezi sa aktivnom tuberkulozom u vreme uključanja u studiju. Demografski podaci i faktori rizika navedeni su u Tabeli 10. U ovoj populaciji, kod 68/601 (11,3%) ispitanika prijavljen je pozitivan rezultat na testu QFT-Plus, uz procenat pozitivnog slaganja (Positive Percent Agreement, PPA) i procenat negativnog slaganja (Negative Percent Agreement, NPA) od 98,44% i 99,07%, tim redosledom (Tabela 11). U ovoj kohorti od 68 ispitanika koji su bili pozitivni prema testu QFT-Plus, ukupno 62 ispitanika su bila pozitivna u TB1 i u TB2 epruveti, 2 ispitanika su bila pozitivna samo u TB1 epruveti, a 4 su bila pozitivna samo u TB2 epruveti. Nisu zapaženi nejasni rezultati (0/601).

Tabela 10. Demografski podaci i faktori povezani sa rizikom od infekcije tuberkulozom u mešovitoj kohorti

Ukupno ispitanika (601)		Broj	Procenat
Pol	Muški	539	89,7%
	Ženski	62	10,3%
Uzrast (godine života)	Opseg	18–70	–
	Srednja vrednost	46,7	–
Vakcinisan BCG vakcinom	Da	15	2,5%
	Ne	586	97,5%
HIV pozitivan ili pozitivan test na HTLV viruse	Da	12	2,0%
	Ne	589	98%
Prethodna dijagnoza aktivne tuberkuloze	Da	11	1,8%
	Ne	590	98,2%
Imao je pozitivan rezultat na tuberkulinsku kožnu probu (Tuberculin Skin Test, TST) / Mantoux-ovu probu na tuberkulozu	Da	47	7,8%
	Ne	554	92,2%
Lečen je zbog aktivne ili latentne tuberkuloze	Da	35	5,8%
	Ne	566	94,2%
Živeo je, radio ili volontirao u zatvoru ili kaznenoj ustanovi (> 1 mesec)	Da	373	62,1%
	Ne	228	37,9%
Živeo je, radio ili volontirao u prihvatilištu za beskućnike (> 1 mesec)	Da	525	87,4%
	Ne	76	12,6%
Zdravstveni radnik	Da	8	1,3%
	Ne	593	98,7%
Imao je blizak kontakt sa nekim ko je imao aktivni oblik bolesti tuberkuloze	Da	9	1,5%
	Ne	592	98,5%

Tabela 11. Zbirni pregled podataka o učinku testa QFT-Plus u odnosu na učinak testa QFT kod ispitanika sa poznatim faktorima rizika od latentne infekcije tuberkulozom

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

*Kod svih 6 nepodudarajućih uzoraka zabeleženi su nivoi proteina IFN- γ u epruvetama TB Antigen Tube koji su bili nadomak granične vrednosti ispitivanja.

Procenat pozitivnog slaganja (Positive Percent Agreement, PPA) i procenat negativnog slaganja (Negative Percent Agreement, NPA) među rezultatima testa QFT i QFT-Plus bili su sledeći:

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

U Tabeli 12 u nastavku predstavljen je učinak testa QFT-Plus u poređenju sa testom QFT kod studijskih ispitanika koji su vakcinisani BCG vakcinom.

Tabela 12. Učinak testa QFT-Plus u poređenju sa testom QFT kod studijskih ispitanika koji su vakcinisani BCG vakcinom (kombinovani podaci ispitanika iz studija osetljivosti, specifičnosti i latentne infekcije tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI))

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

* Dva ispitanika iz studije osetljivosti bila su isključena iz analize zbog nejasnih rezultata

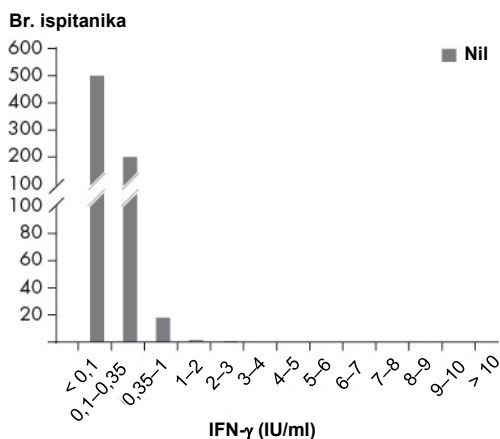
- PPA = 95,6% (66/69), 95%CI (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2% (268/273), 95%CI (95,79, 99,22)

Očekivane vrednosti

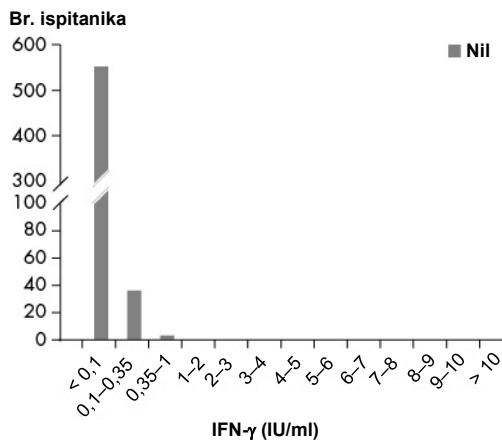
Primećena raspodela odgovora – stratifikacija rizika

Opseg IFN- γ odgovora na TB1, TB2 i kontrolne epruvete posmatran je u kliničkim ispitivanjima i stratifikovan prema riziku od infekcije bakterijom *M. tuberculosis* (od Slike 4 do Slike 7). Grupa sa mešovitim rizikom sastoji se od ispitanika opšte populacije za testiranje, uključujući ispitanika sa ili bez faktora rizika za izloženost tuberkulozi i gde je izloženost tuberkulozi malo verovatna (npr. latentna infekcija tuberkulozom (Latent Tuberculosis Infection, LTBI)).

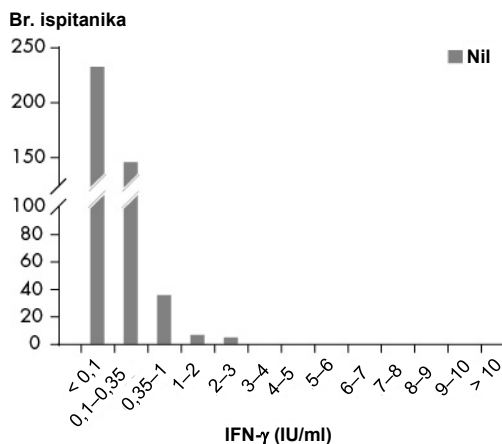
A



B

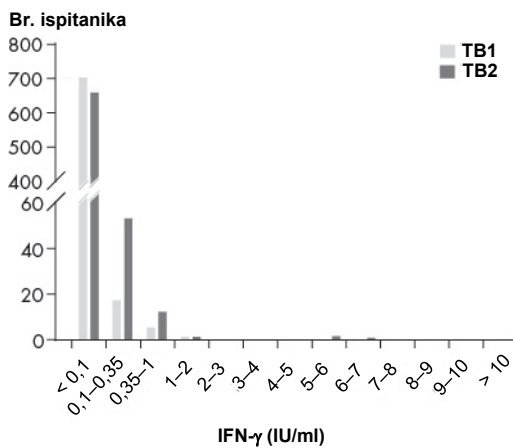


C

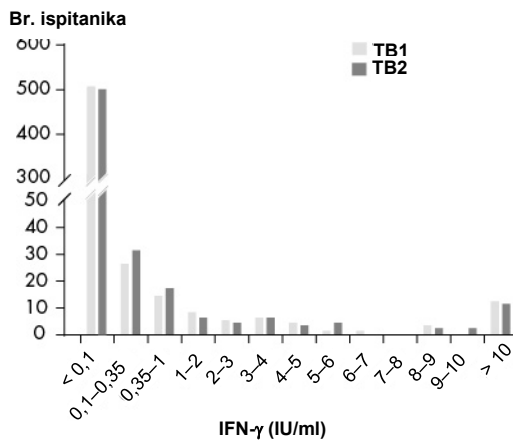


Slika 4. Raspodela vrednosti Nil. A Raspodela vrednosti Nil kod populacije niskog rizika (n = 744). B Raspodela vrednosti Nil kod populacije mešovitog rizika (n = 601). C Raspodela vrednosti Nil kod populacije sa pozitivnom kulturom *M. tuberculosis* (n = 416).

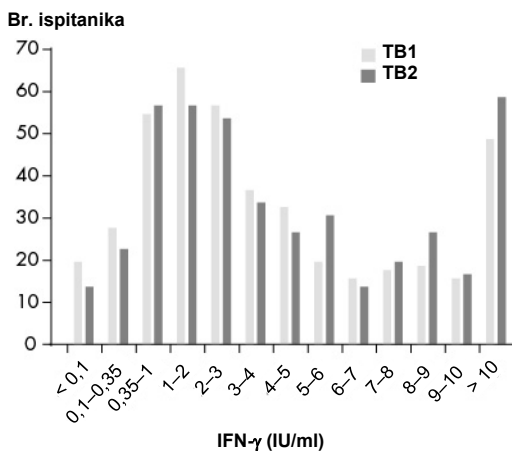
A



B

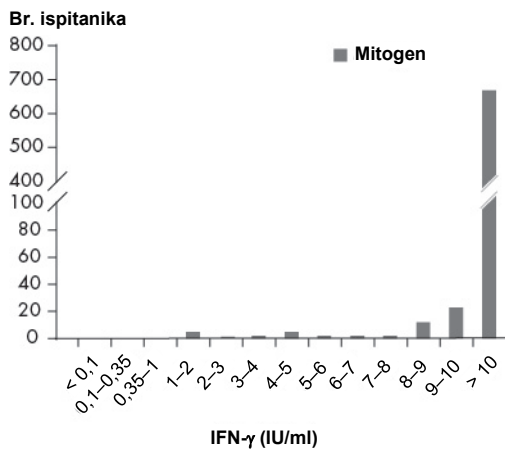


C

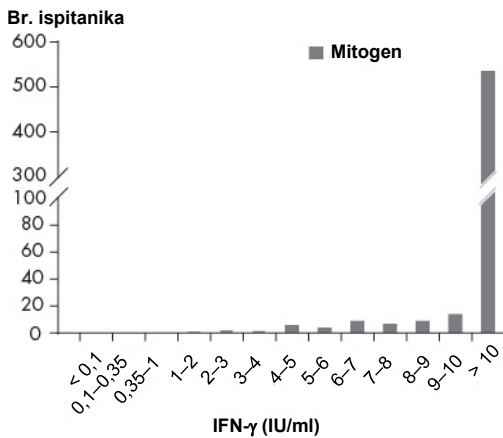


Slika 5. Raspodela za TB1 i TB2 (vrednost Nil je oduzeta). **A** Raspodela vrednosti TB1 i TB2 (vrednost Nil je oduzeta) kod populacije niskog rizika (n = 744). **B** Raspodela vrednosti TB1 i TB2 (vrednost Nil je oduzeta) kod populacije mešovitog rizika (n = 601). **C** Raspodela vrednosti TB1 i TB2 (vrednost Nil je oduzeta) kod populacije sa pozitivnom kulturom *M. tuberculosis* (n = 416).

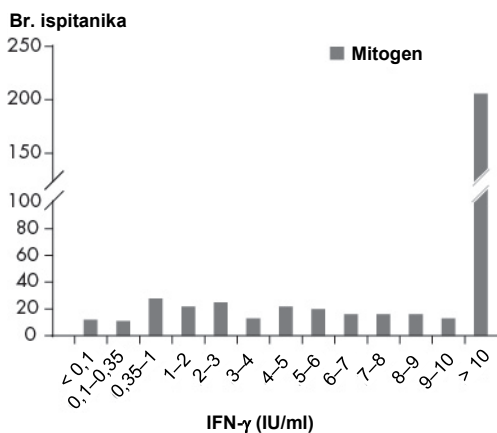
A



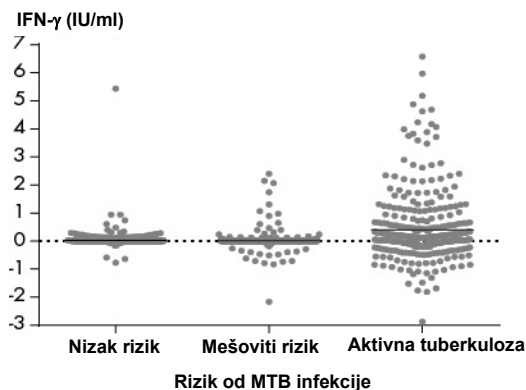
B



C



Slika 6. Raspodela za Mitogen (vrednost Nil je oduzeta). **A** Raspodela vrednosti Mitogen (vrednost Nil je oduzeta) kod populacije niskog rizika (n = 744). **B** Raspodela vrednosti Mitogen (vrednost Nil je oduzeta) kod populacije mešovito rizika (n = 601). **C.** Raspodela vrednosti Mitogen (vrednost Nil je oduzeta) kod populacije sa pozitivnom kulturom *M. tuberculosis* (n = 415).



Slika 7. Primećena razlika između vrednosti TB1 i TB2 (vrednost Nil je oduzeta), stratifikovana prema riziku. Obuhvata podatke iz studije sa kohortom mešovitog rizika kako bi se ukazalo na razlike između kohorte niskog rizika, kohorte sa aktivnom tuberkulozom i kohorte mešovitog rizika. Ova analiza podataka obuhvata kohortu mešovitog rizika sa poznatim faktorima rizika. Dakle, iz kohorte niskog rizika $n = 733$, iz kohorte mešovitog rizika $n = 588$ i iz kohorte sa aktivnom tuberkulozom $n = 357$. Kvantitativna razlika u IU/ml za svakog ispitanika prikupljena je oduzimanjem vrednosti TB1 od vrednosti TB2.

Zbirni pregled bezbednosti i učinka

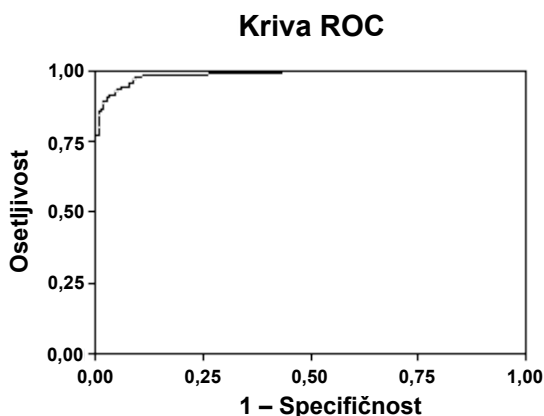
Zbirni pregled bezbednosti i učinka možete naći na veb lokaciji EUDAMED.

Karakteristike učinka ispitivanja

Analitički učinak

Granična vrednost ispitivanja

Granična vrednost ispitivanja za QFT-Plus utvrđena je na osnovu podataka od 216 ispitanika kod kojih nisu identifikovani faktori rizika u pogledu izloženosti tuberkulozi, koji su vakcinisani BCG vakcinom i kod kojih se pretpostavlja da nisu inficirani i od 118 ispitanika zaraženih bakterijom *M. tuberculosis* sa potvrđenom kulturom. Podaci o osetljivosti i specifičnosti bili su kombinovani i analizirani pomoću analize operativne karakteristične krive (Receiver Operator Characteristic, ROC). Podaci o osetljivosti i specifičnosti koji su analizirani analizom operativne karakteristične krive (Receiver Operator Characteristic, ROC) ukazali su na to da je optimalna granična vrednost za ELISA iznosila 0,35 IU/mL (pogledajte Sliku 8).



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

Tabela 13. Vrednosti osetljivosti i specifičnosti za test ELISA pri različitim graničnim vrednostima

Granična vrednost IU/ml IFN- γ	Osetljivost u %	95% CI	Specifičnost u %	95% CI	Osetljivost + 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

Nastavak tabele na sledećoj strani

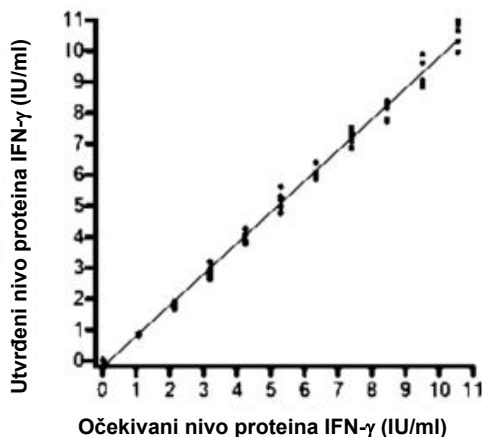
Tabela se nastavlja sa prethodne strane

Tabela 13. Vrednosti osetljivosti i specifičnosti za test ELISA pri različitim graničnim vrednostima

Granična vrednost IU/ml IFN- γ	Osetljivost u %	95% CI	Specifičnost u %	95% CI	Osetljivost + 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

QFT-Plus ELISA test se pokazao kao linearan jer postavlja 5 replikata od 11 uzoraka plazme sa poznatom koncentracijom IFN- γ nasumično postavljenih na ELISA ploči. Prava linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99 (Slika 9).



Slika 9. Ilustracija regresione analize u okviru studije linearnosti – visoka srednja vrednost u pulu = $-0,24 + 0,9964 \cdot \text{Očekivano}$.

Reproducibilnost

Multicentrična studija reproducibilnosti sprovedena je u cilju procene učinka testa QFT-Plus na različitim lokacijama studije sa više korisnika. Ova prospektivna studija je sprovedena na tri eksterne lokacije za testiranje i jednoj lokaciji za prikupljanje uzoraka. U studiju su uključena ukupno 32 studijska ispitanika sa pozitivnim nalazom i 34 studijska ispitanika sa negativnim nalazom (utvrđenim QFT testom). Studijski ispitanici obuhvatali su zdravstvene radnike u SAD. U grupi studijskih ispitanika bio je prisutan mešoviti rizik od izloženosti tuberkulozi usled profesije ispitanika ili zbog toga što su ispitanici zdravstveni radnici poreklom iz područja gde stopa tuberkuloze prekoračuje 50/100.000.

Od svakog studijskog ispitanika dobijene su tri epruvete za prikupljanje uzoraka krvi sa litijum heparinom na lokaciji za prikupljanje uzoraka. Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi sa litijum heparinom zatim su prenete na svaku od tri lokacije za testiranje, gde su alikvotirane u dva skupa epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen i Nil) i testirane u skladu sa procedurom ispitivanja QFT-Plus. Najmanje dva korisnika na svakoj lokaciji nezavisno su sprovela dva testa po studijskom ispitaniku. Nijedan korisnik nije bio upućen u rezultate dobijene od strane drugih korisnika, niti u rezultate testa QFT studijskog ispitanika.

Dobijeno je šest rezultata za svakog od 66 studijskih ispitanika na sve tri lokacije testiranja, što predstavlja ukupno 396 tačaka podataka. Zbirni pregled rezultata ispitivanja reproducibilnosti naveden je u Tabeli 14.

Tabela 14. Zbirni pregled rezultata ispitivanja reproducibilnosti – u okviru % slaganja kvalitativnih rezultata na određenom mestu među korisnicima; N = 66 uzoraka pacijenata

Lokacija 1 – 2 korisnika	Lokacija 2 – 2 korisnika	Lokacija 3 – 3 korisnika
64/66 = 96,97%	64/66 = 96,97%	59/66 = 89,39%
Slaganje kvalitativnih rezultata za Tube Set 1 i Tube Set 2	Slaganje kvalitativnih rezultata za Tube Set 1 i Tube Set 2	Slaganje kvalitativnih rezultata za Tube Set 1 i Tube Set 2

Kvalitativni procenat slaganja na svim lokacijama studije iznosio je 94,7% (375/396). Prema ovom proračunu ukupan broj rezultata testova kod kojih postoji slaganje (375) obuhvata kombinaciju instanci u kojima postoji slaganje svih 6 rezultata, slaganje 5 od 6 rezultata, slaganje 4 od 6 rezultata i slaganje 3 od 6 rezultata.

Ponovljivost između serija

Studija je sprovedena da bi se odredila promenljivost između serija za epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes u poređenju sa QFT epruvetama. Testirano je ukupno 30 studijskih ispitanika (15 sa potvrđenim pozitivnim nalazom na tuberkulozu i 15 sa potvrđenim negativnim nalazom na tuberkulozu, što je utvrđeno QFT testom). U studiju su bile uključene tri zasebne serije svake epruvete QFT-Plus TB1, TB2 i QFT TB Blood Collection Tubes. Testirana su tri replikata po davaocu krvi po seriji epruvete za prikupljanje uzorka krvi. Nil i Mitogen epruvete su testirane u po jednom replikatu.

Krv od svakog ispitanika je prikupljena u epruvete za prikupljanje uzoraka krvi sa litijum heparinom, nakon čega je 1 ml krvi prenet u svaku od epruveta QFT-Plus i QFT Blood Collection Tubes i testiran u skladu sa procedurom ispitivanja. U svakoj grupi sa pozitivnim i negativnim uzorcima, ukupno neslaganje rezultata iz epruvete QFT-Plus nije smelo da bude značajno veće od ukupnog neslaganja rezultata iz epruvete QFT. Ovo je utvrđeno na osnovu p vrednosti koja je dobijena u Levenovom testu homogenosti neslaganja (Homogeneity of Variance, HOV). Ako p vrednost nije bila značajna ($p > 0,05$) i/ili ako je neslaganje epruveta QFT-Plus TB bilo niže nego kod epruveta QFT TB, onda je postojalo neslaganje između epruveta QFT-Plus i QFT TB.

Tabela 15. Upoređivanje neslaganja između epruveta QFT-Plus i QFT TB Blood Collection Tubes pomoću Levenovog testa homogenosti neslaganja (Homogeneity of Variance, HOV)

Tip uzorka	Razlika	Efekat	Zavisni element	P vrednost	Značajno
Pozitivno	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Preostalo	0,0378	Da
Pozitivno	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Preostalo	0,0540	Ne
Negativno	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Preostalo	0,1025	Ne
Negativno	TB2 u odnosu na QFT	Sub_Type	Preostalo	0,6344	Ne

Neslaganje između epruveta QFT-Plus i QFT TB Blood Collection Tubes nije bilo značajno, s izuzetkom epruvete QFT-Plus TB2 pri testiranju pozitivnih ispitanika. Kada je analizirana procena standardnog odstupanja, neslaganje zapaženo kod epruvete QFT-Plus TB2 bilo je niže (0,06089) nego kod epruvete QFT TB (0,07641), što je vidljivo u Tabeli 16. Dakle, neslaganje između epruveta QFT-Plus TB1 i TB2 Blood Collection Tubes nije bilo veće nego kod epruveta QFT TB Blood Collection Tube.

Tabela 16. Standardno odstupanje kod preostalog intervala pouzdanosti i intervala pouzdanosti od 95% kod pozitivnih ispitanika

Tip uzorka	Podtip	Procena standardnog odstupanja	95% LCL	95% UCL
Pozitivno	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Pozitivno	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Pozitivno	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

Ponovljivost unutar serije

Sprovedena je studija kako bi se procenila ponovljivost unutar serije za epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes upoređivanjem koncentracije proteina IFN- γ iz replikata epruveta QFT-Plus TB Blood Collection Tubes sa krvlju.

Šest alikvota jednog uzorka krvi istih ispitanika sa potvrđenom infekcijom tuberkulozom izvršeno je u 6 ponavljanja epruveta za prikupljanje uzoraka krvi iz po jedne serije obe vrste epruveta QFT-Plus Tubes (TB1 i TB2). Testiranje je sprovedeno sa 13 ispitanika. %CV je izračunat za svakog davaoca i među svim davaocima kako bi se dobila srednja vrednost %CV, što je prikazano u Tabeli 17.

Tabela 17. %CV za srednju vrednost, standardno odstupanje, minimalnu vrednost, medijanu i maksimalnu vrednost u svakoj epruveti QFT-Plus TB Blood Collection Tube kod ispitivanja pozitivnih na tuberkulozu

QFT-Plus Tube	Veličina uzorka	Srednja vrednost (%CV)	Standardno odstupanje	Minimum	Medijana	Maksimum
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Rezultati su pokazali da je srednja vrednost %CV za TB1 i TB2 iznosila ~13%, čime su zadovoljeni kriterijumi prihvatljivosti od $\leq 30\%$ i čime je dokazana ponovljivost unutar serije.

Najveća očekivana koncentracija analize praznog uzorka (Limit of Blank, LoB)

Za ispitivanje QFT-Plus procenjena je najveća očekivana koncentracija analize praznog uzorka (Limit of Blank, LoB). Testirano je po dva replikata 14 pojedinačnih normalnih humanih uzoraka plazme (kao prazni uzorci) sa 2 serije testa QFT-Plus ELISA od strane 3 korisnika za 3 dana testiranja, odnosno, jedan korisnik u jednom danu testiranja za ukupno 84 replikata iz svake serije kompleta ELISA.

Vrednosti najveće očekivane koncentracije analize praznog uzorka (Limit of Blank, LoB) (IU/ml) za 2 serije kompleta ELISA izračunate su zasebno i navedene u Tabeli 18.

Tabela 18. Vrednosti najveće očekivane koncentracije analize praznog uzorka (Limit of Blank, LoB) (IU/ml) za 2 serije kompleta QFT-Plus ELISA Kit

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

Viša vrednost najveće očekivane koncentracije analize praznog uzorka (Limit of Blank, LoB), 0,040 IU/ml, u obe serije kompleta QFT-Plus ELISA Kit, izdata je kao konačna vrednost LoB.

Ograničenje detekcije (Limit of Detection, LoD)

Za ispitivanje QFT-Plus procenjeno je ograničenje detekcije (Limit of Detection, LoD). Kombinacijom 14 pojedinačnih uzoraka plazme dobijen je pul humane plazme negativne na tuberkulozu. Svaki od 3 korisnika pripremio je zalihi IFN- γ referentnog standarda od 1,0 IU/ml razblaženog u puferu. Napravljene su serije razblaživanja od 8 koncentracija. Studija je sprovedena u periodu od 3 dana od strane 3 korisnika koja su se smenjivala i korišćenjem 2 serije kompleta QFT-Plus ELISA Kit. Svakog dana testiranja testirano je 5 replikata svake koncentracije u okviru svakog kompleta serije razblaživanja, što je ukupno 45 replikata za svako razblaživanje koncentracije proteina IFN- γ za svaku seriju kompleta QFT-Plus ELISA Kit.

Vrednost ograničenja detekcije (Limit of Detection, LoD) za svaku testiranu seriju kompleta QFT-Plus ELISA Kit izračunata je zasebno i navedena u Tabeli 19.

Tabela 19. Procenjene vrednosti ograničenja detekcije (Limit of Detection, LoD) (IU/ml) za 2 serije kompleta QFT-Plus ELISA Kit

QFT-Plus ELISA Kit	Verovatnoća	Procenjena koncentracija (IU/ml)	Donja granica pouzdanosti od 95% za procenu	Gornja granica pouzdanosti od 95% za procenu
Kit 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Kit 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Viša vrednost ograničenja detekcije (Limit of Detection, LoD) izračunata u obe serije kompleta QFT-Plus ELISA Kit, 0,065 IU/ml, izdata je kao konačna vrednost LoD.

Ometajuće supstance

Sprovedena je studija da bi se odredilo dejstvo ometajućih supstanci na učinak otkrivanja proteina IFN- γ . okviru testa QFT-Plus ELISA. Ometajuće supstance obuhvaćene ovim testiranjem bile su: trigliceridi (ukupni), hemoglobin, protein (ukupni serum), bilirubin (konjugovani), bilirubin (nekonjugovani), abakavir sulfat, ciklosporin i prednizolon. Pripremljeno je pet pulova plazme poznatih koncentracija proteina IFN- γ korišćenjem različitih koncentracija ometajućih supstanci. Nivo osnovnog pula proteina IFN- γ prethodno je pripremljen sa unapred određenom količinom prisutnog proteina IFN- γ (približno 0,21, 0,45 i 1,4 IU/ml). Pul se zatim koristio za pripremu pulova ometajućih supstanci. Testirane koncentracije ometajućih supstanci iznosile su 0 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl i 20 mg/dl. Ciljne koncentracije ometajućih supstanci zasnivale su se na referentnim intervalima, patološkim vrednostima, terapijskim opsezima i toksičnim opsezima ili su preporučene na osnovu nivoa koncentracije dobavljača ili opštih kliničkih nivoa. Testirano je šest replikata za svaki nivo koncentracije uzorka ometajuće supstance.

Za svaku koncentraciju uzorka izveden je T test sa dva uzorka, kojim je upoređena razlika u srednjoj vrednosti log₁₀ (IU/ml) primarnog nivoa ometajuće supstance u odnosu na kontrolu (tj. nivo bez ometajuće supstance), kako je navedeno u Tabeli 20 i Tabeli 21. Takođe je izdata procenjena razlika u srednjoj vrednosti odgovora zajedno sa odgovarajućim dvostranim granicama pouzdanosti od 95% i p vrednošću.

Tabela 20. Log10 IU/ml: Zbirna tabela T testa za razlike u srednjim vrednostima kontrole i primarnog nivoa ometajuće supstance za svaku ometajuću supstancu i nivo koncentracije proteina IFN- γ

Ometajuća supstanca	Nivo ometajuće supstance	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Neslaganje	Razlika u srednjoj vrednosti	Niži 95% CI	Viši 95% CI	P vrednost	Uspešnost
Trigliceridi	Visok	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	Visok	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	Visok	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
Konjugovani bilirubin	Visok	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
Nekonjugovani bilirubin	Visok	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	Visok	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

Nastavak table na sledećoj strani

Tabela se nastavlja sa prethodne strane

Tabela 20. Log₁₀ IU/ml: Zbirna tabela T testa za razlike u srednjim vrednostima kontrole i primarnog nivoa ometajuće supstance za svaku ometajuću supstancu i nivo koncentracije proteina IFN- γ

Ometajuća supstanca	Nivo ometajuće supstance	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Neslaganje	Razlika u srednjoj vrednosti	Niži 95% CI	Viši 95% CI	P vrednost	Uspešnost
Ciklosporin	Visok	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	Visok	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

Tabela 21. Log10 IU/ml: Zbirna tabela T testa za razlike u srednjim vrednostima između kontrole i visokog nivoa ometajuće supstance za svaku ometajuću supstancu i nivo koncentracije proteina IFN- γ

Ometajuća supstanca	Nivo ometajuće supstance	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Neslaganje	Razlika u srednjoj vrednosti	Niži 95% CI	Viši 95% CI	P vrednost	Uspešnost
Trigliceridi	Visok	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	Visok	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	Visok	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
Konjugovani bilirubin	Visok	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
Nekonjugovani bilirubin	Visok	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	Visok	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

Nastavak tabele na sledećoj strani

Tabela se nastavlja sa prethodne strane

Tabela 21. Log₁₀ IU/ml: Zbirna tabela T testa za razlike u srednjim vrednostima između kontrole i visokog nivoa ometajuće supstance za svaku ometajuću supstancu i nivo koncentracije proteina IFN- γ

Ometajuća supstanca	Nivo ometajuće supstance	Koncentracija uzorka (IU/ml)	Neslaganje	Razlika u srednjoj vrednosti	Niži 95% CI	Viši 95% CI	P vrednost	Uspešnost
Ciklosporin	Visok	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	Visok	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

Rezultati nisu značajne pokazali razlike između primarnog nivoa ometajuće supstance i kontrole (nivoa bez ometajuće supstance) i za visok nivo ometajuće supstance, osim za nivo koncentracije triglicerida od 0,45 IU/ml. Utvrđena razlika u srednjoj vrednosti iznosila je +/- 2 od opsega standardnog odstupanja. Ovo ukazuje na to da je razlika u okviru očekivane varijabilnosti ispitivanja i da triglicerid nije izazvao smetnje po test QFT-Plus ELISA.

Odlaganje u otpad

Sledite relevantne smernice za rukovanje krvlju. Odlazite uzorke i materijale koji su došli u kontakt sa krvlju ili krvnim proizvodima u skladu sa saveznim, državnim i lokalnim zakonskim 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 rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može da bude koristan pri rešavanju svih problema do kojih može doći. Za tehničku pomoć i više informacija, posetite naš Centar za tehničku podršku na stranici www.qiagen.com/Support (za kontakt informacije, posetite www.qiagen.com).

Komentari i sugestije

Rešavanje problema sa ELISA testom

Pojavljivanje nespecifične boje

- | | |
|---|---|
| a) Nedovršeno ispiranje ploče | Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 µl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme potapanja od najmanje 5 sekundi između ciklusa. |
| b) Unakrsna kontaminacija ELISA udubljenja | Budite pažljivi kada koristite pipetu i mešate uzorke da biste rizik sveli na najmanju meru. |
| c) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti | Proverite da li je kompletu koji se koristi istekao rok upotrebe. Uverite da su rekonstituisani standard i koncentrovani konjugat od 100x upotrebljeni u roku od tri meseca od datuma rekonstituisanja. |
| d) Rastvor enzimskog supstrata je kontaminiran | Bacite supstrat ako se pojavi plava boja. Obavezno koristite čiste rezervoare za reagense. |
| e) Mešanje plazme u epruvetama QFT-Plus Blood Collection Tubes pre prikupljanja | Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela. |

Komentari i sugestije

Očitavanje niske optičke gustine za standarde

- | | |
|--|---|
| a) Greška pri razblaživanju standarda | Uverite se da su razblaživanja standarda iz kompleta pravilno pripremljena u skladu sa ovim uputstvom za upotrebu. |
| b) Greška pri pipetiranju | Uverite se da su pipete kalibrisane i da se koriste u skladu sa uputstvima proizvođača. |
| c) Temperatura inkubacije je suviše niska | Inkubacija testova ELISA treba da se obavlja na sobnoj temperaturi (22 ± 5 °C). |
| d) Vreme inkubacije je prekratko | Inkubacija ploče sa konjugatom, standardima i uzorcima trebalo bi da traje 120 ± 5 minuta. Rastvor enzimskog supstrata trebalo bi da se inkubira na ploči u trajanju od 30 minuta. |
| e) Korišćen je pogrešan filter čitača ploče | Ploča se očitava pri 450 nm sa referentnim filterom između 620 i 650 nm. |
| f) Reagensi su suviše hladni | Svi reagensi, osim koncentrovanog konjugata od 100x, moraju da se dovedu na sobnu temperaturu pre započinjanja ispitivanja. Za to je potreban približno 1 sat. |
| g) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti | Uverite se da se komplet upotrebljava pre isteka roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani standard i koncentrovani konjugat od 100x upotrebljeni u roku od 3 meseca od datuma rekonstituisanja. |

Visoka pozadina

- | | |
|--|---|
| a) Nedovršeno ispiranje ploče | Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 µl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se vreme potapanja od najmanje 5 sekundi između ciklusa. |
| b) Temperatura inkubacije je suviše visoka | Inkubacija testova ELISA treba da se obavlja na sobnoj temperaturi (22 ± 5 °C). |

Komentari i sugestije




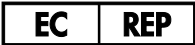









- | | |
|--|--|
| c) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti | Uverite se da se komplet koristi pre isteka roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani standard i koncentrovani konjugat od 100x upotrebljeni u roku od tri meseca od datuma rekonstituisanja. |
| d) Rastvor enzimskog supstrata je kontaminiran | Bacite supstrat ako se pojavi plava boja. Obavezno koristite čiste rezervoare za reagense. |

Nelinearna kriva standarda i promenljivost duplikata

- | | |
|--|---|
| a) Nedovršeno ispiranje ploče | Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 µl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se vreme potapanja od najmanje 5 sekundi između ciklusa. |
| b) Greška pri razblaživanju standarda | Uverite se da su razblaživanja standarda pravilno pripremljena u skladu sa ovim uputstvom za upotrebu. |
| c) Nedovoljno mešanje | Dobro promešajte reagense tako što ćete ih okretati ili lagano promešati pre postavljanja na ploču. |
| d) Nedosledna upotreba pipete ili prekid tokom podešavanja ispitivanja | Dodavanje uzorka i standarda trebalo bi da se obavlja bez prekida. Svi reagensi bi trebalo da se pripreme pre započinjanja ispitivanja. |

Simboli

Sledeći simboli se nalaze u uputstvu za upotrebu ili na pakovanju i oznakama:

Simbol	Definicija simbola
 <N>	Sadrži reagense koji su dovoljni za <N> reakcija
	Upotrebiti do
 0197	Ovaj proizvod ispunjava zahteve Evropske uredbe o medicinskim uređajima za in vitro dijagnostiku 2017/746.
	Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Evropskoj uniji
	Medicinsko sredstvo za in vitro dijagnostiku
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala (tj. oznaka komponente)
	Komponente
	Sadrži
	Broj
	Globalni broj trgovinske jedinice
Rn	„R“ označava reviziju uputstva za upotrebu, a „n“ je broj revizije
	Temperaturno ograničenje

Simbol

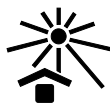
Definicija simbola



Proizvođač



Pogledajte uputstvo za upotrebu



Zaštitite od svetlosti



Upozorenje/oprez ili oprezi, konsultovati prateću dokumentaciju

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 stimulira ćelije u hepariniziranoj punoj krvi pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine ESAT-6 i CFP-10



Sadrži biološki materijal životinjskog porekla



Sadrži biološki materijal humanog porekla



Jedinstveni identifikator uređaja

Simbol**Definicija simbola**

tartrazine

Sadrži tartrazin

sulfuric acid

Sadrži sumpornu kiselinu

Dodatak A: Tehničke informacije

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati nisu česti i mogu da budu povezani sa imunskim statusom testiranog pojedinca (5) i sa nekim tehničkim faktorima (npr. nepravilnim rukovanjem epruveta za prikupljanje uzoraka krvi ili njihovim čuvanjem i nepotpunim ispiranjem ploče za test ELISA) ako se ne poštuju navedena uputstva za upotrebu.

Ako sumnjate da je došlo do tehničkih problema prilikom skladištenja reagenasa, prikupljanja uzoraka krvi ili prilikom rukovanja njima, ponovite ceo QFT-Plus test na novim uzorcima krvi. Ispitivanja stimulisanih plazmi u okviru testa ELISA može da se ponovi ako se sumnja na neodgovarajuće ispiranje ili na odstupanje od procedure za test ELISA. Lekari mogu da odluče da ponovo uzmu uzorak krvi ili da obave druge odgovarajuće procedure.

Zgrušani uzorci plazme

Ako dođe do zgrušavanja uzoraka plazme fibrinskim vlaknima tokom njenog dugotrajnog skladištenja, centrifugirajte uzorke da biste sedimentirali zgrušani materijal i da biste olakšali prikupljanje plazme pipetom.

Lipemični uzorci plazme

Vodite računa prilikom pipetiranja lipemičnih uzoraka s obzirom na to da masne naslage mogu začepiti vrhove pipeta.

Dodatak B: Skraćena procedura za test ELISA

1. Kalibrišite komponente testa ELISA, sa izuzetkom koncentrovanog konjugata od 100x, na sobnu temperaturu u trajanju od najmanje 60 minuta.

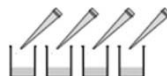


2. Rekonstituišite standard iz kompleta na 8,0 IU/ml sa destilovanom ili dejonizovanom vodom. Pripremite četiri (4) razblaživanja standarda.

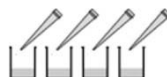


3. Rekonstituišite zamrznuti koncentrovani konjugat od 100x pomoću destilovane ili dejonizovane vode.

4. Pripremite konjugat spreman za upotrebu u zelenom razblaživaču i dodajte 50 µl u sva udubljenja.



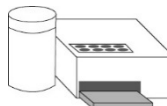
5. Dodajte 50 µl uzoraka plazme za testiranje i 50 µl standarda u odgovarajuća udubljenja. Promešajte na šejkeru.



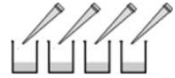
6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.



7. Udubljenja operite najmanje 6 puta sa 400 µl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje.



8. Dodajte 100 μ l rastvora enzimskog supstrata u udubljenja.
Promešajte na šejkeru.



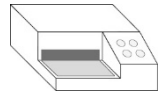
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.



10. Dodajte 50 μ l enzimskog rastvora za zaustavljanje reakcije u sva
udubljenja. Promešajte na šejkeru.



11. Pročitajte rezultate na 450 nm sa referentnim filterom 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 sa 2 ploče	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Komplet ELISA sa 20 ploče	622822
Related products		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 epruveta (po 50 epruveta Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 epruveta (po 25 epruveta Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 epruveta (po 1 epruveta Nil, TB1, TB2 i Mitogen po pakovanju), pakovanje od 10 jedinica	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 epruveta (po 50 epruveta Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 epruveta (po 50 epruveta Nil, TB1, TB2 i Mitogen)	623423

QuantiFERON-TB Gold Plus
High Altitude Single Patient
Pack

40 epruveta (po 1
epruveta Nil, TB1, TB2 i
Mitogen po pakovanju),
pakovanje od 10
jedinica

623222

Najnovije informacije o licenciranju i odricanjima od odgovornosti specifičnim za proizvod potražite u odgovarajućem uputstvu za upotrebu za QIAGEN komplet. Uputstvo za upotrebu za QIAGEN komplet je dostupan na stranici www.qiagen.com, a možete da ga zatražite i od tehničke službe kompanije QIAGEN ili svog lokalnog dobavljača.

Istorija revizija dokumenta

Datum	Promene
R2, jun 2021.	Uključene su informacije o pakovanju za jednog pacijenta Revidirane su Tabele 10 i 11 kako bi se razlikovali podaci vezani za test QFT-GIT i za test QFT-Plus Ažuriran je odeljak „Opis i princip rada“ kako bi se dodale informacije o populaciji testiranja i mernom opsegu Dodata je Tabela 9 kako bi se uvrstili podaci o odnosu verovatnoće za QFT-Plus
R3, oktobar 2021.	Kataloški broj je vraćen na prvobitni kataloški broj Dodata je izjava o jednokratnoj upotrebi traka za mikroploču u odeljak „Sadržaj kompleta“
R4, mart 2023.	Ispravke formatiranja

Ova strana je namerno ostavljena prazna

Ugovor o ograničenom licenciranju za komplet QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

1. Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu za upotrebu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučениh komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu za upotrebu i dodatnim protokolima dostupnim na adresi www.qiagen.com. Neke od ovih dodatnih protokola su obezbedili korisnici QIAGEN proizvoda za korisnike QIAGEN proizvoda. Kompanija QIAGEN nije detaljno testirala niti optimizovala te protokole. Kompanija QIAGEN ne daje garancije za njih niti tvrdi da oni ne krše prava nezavisnih proizvođača.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne garantuje da ovaj panel i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
3. Ovaj panel i njegove komponente su licencirani za jednokratnu upotrebu i ne smeju da se ponovo koriste, doraduju ili ponovo prodaju.
4. Kompanija QIAGEN posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u tekstu iznad. QIAGEN može da primeni zabrane ovog Sporazuma o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Sporazuma o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na panel i/ili njegove komponente.

Da biste videli ažurirane uslove licenciranja, posetite www.qiagen.com.

Zaštićeni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (grupa QIAGEN) Proclin®, Registrovani nazivi, zaštitni znakovi itd., koji se koriste u ovom dokumentu, čak iako nisu posebno naznačeni kao takvi, zaštićeni su zakonom.

03/2023 L1123669 1123669SR © 2023 QIAGEN, sva prava zadržana.

Porudžbine www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com |
Veb lokacija www.qiagen.com