Apríl 2019

Príbalový leták k testu QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA

Σ 2 x 96 (622120)

Σ 20 x 96 (622822)

Verzia 1

IVD

Na diagnostické použitie in vitro

Test IFN-γ v celej krvi s meraním reakcií na peptidové antigény ESAT-6 a CFP-10

CE

REF 622120, 622822

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Nemecko

R6 MAT 1083163SK

Obsah

Účel použitia 5

Súhrnné informácie o teste a jeho objasnenie 5

Princípy testu 7

Čas potrebný na vykonanie analýzy 9

Súčasti a skladovanie 10

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú 12

Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi 13

Skúmavky na odber krvi 13

Činidlá súpravy 13

Zriedené a nepoužívané činidlá 13

Varovania a preventívne opatrenia 14

Varovania 14

Preventívne opatrenia 15

Odber vzoriek a manipulácia s nimi 18

Pokyny na použitie 25

Fáza 1 – inkubácia krvi a odber plazmy 25

Fáza 2 – IFN-γ ELISA 26

Výpočty a interpretácia testu 31

Generovanie krivky štandardu 31

Kontrola kvality testu 32

Interpretácia výsledkov 32
Obmedzenia 35
Výkonnostné charakteristiky 36
Klinické štúdie 36
Charakteristiky účinnosti testu 42
Technické informácie 47
Neurčité výsledky 47
Zrazené plazmové vzorky 47
Sprievodca riešením problémov 48
Referenčná literatúra 50
Symboly 59
Kontaktné informácie 60
Skrátený postup testu 61
Fáza 1 – inkubácia krvi 61
Fáza 2 – IFN-γ ELISA 61
Významné zmeny 63
História revízií príručky 63

Účel použitia

Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) je in vitro diagnostický test, v rámci ktorého sa používa zmes peptidov simulujúcich proteíny ESAT-6 a CFP-10 na stimuláciu buniek v heparinizovanej celej krvi. Detekcia interferónu-γ (IFN-γ) pomocou enzymatickej imunosorbenčnej analýzy (ELISA) sa používa na identifikáciu in vitro reakcií na tie peptidové antigény, ktoré súvisia s infekciou *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus je nepriamy test infekcie *M. tuberculosis* (vrátane súvisiaceho ochorenia) a tento test sa používa spolu s hodnotením rizika, rádiografiou a ďalšími zdravotníckymi a diagnostickými hodnoteniami.

Súhrnné informácie o teste a jeho objasnenie

Tuberkulóza je nákazlivá choroba, ktorú spôsobujú komplexné organizmy *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) a ktorá sa typicky šíri na nových hostiteľov prostredníctvom vzduchom prenášaných kvapôčkových jadier od pacientov s respiračnou tuberkulózou. Ochorenie u nových pacientov sa môže prejaviť v rozsahu týždňov až mesiacov, stav väčšiny infikovaných jednotlivcov však ostáva dobrý. Latentná infekcia tuberkulózy (Latent tuberculosis infection, LTBI), t. j. nenákazlivý asymptomatický stav, u niektorých pretrváva, a u takýchto jednotlivcov sa samotné ochorenie môže rozvinúť až o niekoľko mesiacov alebo rokov. Hlavným účelom diagnostiky LTBI je zváženie možnosti zdravotníckej liečby na zabránenie ochoreniu tuberkulózou. Až donedávna bol jedinou dostupnou metódou na diagnostiku LTBI tuberkulínový kožný test (Tuberculin Skin Test, TST). Kožná reakcia na tuberkulín sa vyvinie do 2 až 10 týždňov po infikovaní. Niektorí infikovaní jednotlivci vrátane osôb s rôznymi stavmi potláčajúcimi imunitné funkcie a osôb bez takýchto stavov však nereagovali na tuberkulín. Naopak niektorí jednotlivci bez predpokladu infekcie *M. tuberculosis* vykazovali citlivosť na tuberkulín a súčasne vykazovali

pozitívne výsledky TST po vakcinácii bacilom Calmette-Guérin (BCG), mykobakterickú infekciu (inú než komplex *M. tuberculosis*) alebo neurčité iné faktory.

LTBI je nevyhnutné odlíšiť od samotného tuberkulózneho ochorenia, t. j. stavu, ktorý obvykle zasahuje pľúca a dolný dýchací trakt, môže však zasiahnuť aj ďalšie orgány. Na diagnostiku tuberkulózneho ochorenia sa využívajú poznatky anamnézy, ako aj fyzické, rádiologické, histologické a mykobakteriologické nálezy.

QFT-Plus je test bunkami sprostredkovaných imunitných (cell-mediated immune – CMI) reakcií na peptidové antigény, ktoré simulujú mykobakteriálne proteíny. Tieto proteíny (ESAT-6 a CFP-10) sa nenachádzajú v žiadnych reťazcoch BCG a nenachádzajú sa vo väčšine netuberkulóznych mykobaktérií okrem *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* (1). Jednotlivci infikovaní komplexnými organizmami MTB spravidla majú v krvi lymfocyty, ktoré rozpoznávajú tieto a iné mykobakteriálne antigény. Proces rozpoznávania zahŕňa generovanie a vylučovanie cytokínu IFN-γ. Základ tohto testu tvorí detekcia a následná kvantifikácia IFN-γ.

Antigény používané v rámci QFT-Plus sú zmesou peptidov simulujúcich proteíny ESAT-6 a CFP-10. Na základe mnohých štúdií sa zistilo, že tieto peptidové antigény simulujú reakcie IFN-γ v bunkách T u jednotlivcov infikovaných baktériou *M. tuberculosis* – to však vo všeobecnosti neplatí u neinfikovaných osôb alebo u osôb s vakcináciou BCG bez samotného ochorenia alebo rizika LTBI (1 – 32). Zdravotnícka liečba alebo stavy, ktoré zhoršujú funkcie imunitného systému, však môžu potenciálne obmedzovať reakcie na IFN-γ. Pacienti s niektorými inými mykobakteriálnymi infekciami taktiež môžu reagovať na ESAT-6 a CFP-10, pretože gény kódujúce tieto proteíny sa nachádzajú v kmeňoch *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* (1, 23). Test QFT-Plus slúži na testovanie LTBI a predstavuje aj užitočnú pomôcku na diagnostiku komplexnej infekcie *M. tuberculosis* u chorých pacientov. Pozitívny výsledok predstavuje určitý dôkaz diagnostiky tuberkulózneho ochorenia, pozitívne výsledky však môžu byť spôsobené aj infekciami v dôsledku iných mykobaktérií (napr. *M. kansasii*). Na potvrdenie alebo vylúčenie tuberkulózneho ochorenia sa vyžadujú ďalšie zdravotnícke a diagnostické hodnotenia.

Test QFT-Plus využíva dve rôzne skúmavky s antigénom TB: TB Antigen Tube 1 (TB1) a TB Antigen Tube 2 (TB2). Obe skúmavky obsahujú peptidové antigény z príslušných antigénov ESAT-6 a CFP-10 špecifických pre organizmy komplexu MTB. Zatiaľ čo skúmavka TB1 obsahuje peptidy z proteínov ESAT-6 a CFP-10, ktorých účelom je vyvolať reakcie CMI od pomocných $CD4^+$ T-lymfocytov, skúmavka TB2 obsahuje ďalšiu skupinu peptidov, ktorých účelom je vyvolať reakcie CMI od $CD8^+$ cytotoxických T-lymfocytov. V priebehu infekcie MTB zohrávajú $CD4^+$ T-bunky kľúčovú úlohu v rámci imunologickej kontroly prostredníctvom ich vylučovania cytokínu IFN-γ. Získané dôkazy teraz prisudzujú dôležitú úlohu aj $CD8^+$ T-bunkám, ktoré sa zúčastňujú obrany jedinca voči infekcii MTB tvorbou IFN-γ a iných rozpustných faktorov, ktoré aktivujú makrofágy, aby sa zabránilo rastu MTB, zabili sa infikované bunky alebo sa priamo rozkladala intracelulárna MTB (33 – 35). V prípade pacientov s LTBI a s aktívnou formou ochorenia TB sa zistili $CD8^+$ bunky špecifické pre MTB, pričom sa často našli aj $CD8^+$ bunky vytvárajúce IFN-γ (36 – 38). Okrem toho sa uvádza, že $CD8^+$ T-lymfocyty špecifické pre ESAT-6 a CFP-10 sa častejšie detegujú u pacientov s aktívnou formou ochorenia TB v porovnaní s pacientmi s LTBI, čo môže súvisieť s nedávnou expozíciou voči MTB (39 – 41). $CD8^+$ T-bunky špecifické pre MTB a produkujúce IFN-γ boli tiež detegované u pacientov s aktívnou formou ochorenia TB so súbežnou infekciou HIV (42, 43) a u malých detí s ochorením TB (44).

Princípy testu

Test QFT-Plus využíva špecializované skúmavky na odber krvi, ktoré sa používajú na odber celej krvi. Inkubácia krvi sa vykonáva v skúmavkách po dobu 16 až 24 hodín. Po ukončení inkubácie sa odoberie plazma a plazma sa testuje na prítomnosť IFN-γ vytvoreného ako reakcia na peptidové antigény.

Test QFT-Plus sa vykonáva v dvoch etapách (fázach). Najskôr sa odoberie celá krv do každej zo skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi (ide o skúmavku Nil, skúmavku TB1, skúmavku TB2 a skúmavku Mitogen). Krv je alternatívne možné odobrať aj pomocou bežnej skúmavky na odber krvi s obsahom lítium-heparínu alebo heparínu sodného (antikoagulant). Následne krv preneste do skúmaviek QFT-Plus.

Skúmavka Mitogen sa v rámci testu QFT-Plus používa ako pozitívna kontrola. To môže byť dôležité najmä v prípadoch, kedy nastanú pochybnosti týkajúce sa stavu imunitného systému jednotlivca. Skúmavka Mitogen slúži aj ako kontrola správnej manipulácie s krvou a inkubácie.

Skúmavky QFT-Plus sa pretrepú, aby sa antigén mohol zmiešať s krvou, a je potrebné ich čo najskôr inkubovať pri teplote 37 °C, najneskôr však do 16 hodín od odberu. Po uplynutí inkubačnej doby 16 až 24 hodín sa skúmavky odstredia, plazma sa odoberie a pomocou testu ELISA sa odmeria množstvo IFN-γ (IU/ml). Test QFT-Plus ELISA používa rekombinantný ľudský IFN-γ štandard, ktorý bol testovaný voči referenčnému IFN-γ prípravku (Ref. NIH: Gxg01-902-535). Výsledky testovanej vzorky sa uvádzajú v medzinárodných jednotkách na ml (IU/ml) vo vzťahu ku krivke štandardu vytvorenej testovaním riedení štandardu, ktorý je súčasťou súpravy.

Je známe, že heterofilné protilátky (napríklad ľudské protilátky voči myším protilátkam, HAMA) v sére alebo plazme niektorých jednotlivcov môžu skresľovať výsledky imunologických testov. Efekt heterofilných protilátok v rámci testu QF-Plus ELISA je minimalizovaný pridaním normálneho myšieho séra do zeleného riedidla a použitím fragmentov monoklonálnej protilátky F(ab')2 ako protilátky na zachytávanie IFN-γ, ktorá je nanesená na mikrotitračnú doštičku.

Analýza QFT-Plus sa považuje za pozitívnu vzhľadom na reakciu IFN-γ vtedy, keď sú výsledky z ktorejkoľvek skúmavky s antigénom TB výrazne vyššie, než je hodnota Nil IFN-γ v IU/ml. Plazmová vzorka zo skúmavky Mitogen slúži ako pozitívna kontrola IFN-γ pre každú testovanú vzorku. Slabá reakcia na Mitogen (< 0,5 IU/ml) indikuje neurčitý výsledok v prípade, ak krvná vzorka taktiež vykazuje negatívnu reakciu na antigény TB. K takémuto správaniu môže dochádzať v prípade nedostatočného počtu lymfocytov, zníženej aktivity lymfocytov v dôsledku nesprávnej manipulácie so vzorkami, nesprávneho plnenia/miešania skúmavky Mitogen alebo neschopnosti lymfocytov pacienta generovať IFN-γ. Zvýšené úrovne IFN-γ vo vzorke Nil sa môžu vyskytnúť za prítomnosti heterofilných protilátok alebo v dôsledku vnútornej sekrécie IFN-γ. Skúmavka Nil slúži na úpravu pozadia (napr. vzhľadom na nadmernú cirkuláciu IFN-γ alebo prítomnosť heterofilných protilátok). Úroveň IFN-γ v skúmavke Nil sa odčíta od úrovne IFN-γ v skúmavkách s antigénom TB a v skúmavke Mitogen.

Čas potrebný na vykonanie analýzy

Odhad času potrebného na vykonanie analýzy QFT-Plus ELISA je uvedený nižšie – súčasťou týchto informácií je aj čas potrebný na testovanie viacerých vzoriek v dávke:

Inkubácia krvných skúmaviek pri teplote 37 °C:	16 až 24 hodín
ELISA:	Približne 3 hodiny na jednu doštičku ELISA (22 jednotlivcov) Práca < 1 hod. Pre každú ďalšiu doštičku pridajte 10 až 15 minút

Súčasti a skladovanie

Skúmavky na odber krvi*		**200 skúmaviek**	**Balenie pre jedného pacienta**	**Súprava dávkovača**	**Skúmavky HA 200**	**Balenie HA pre jedného pacienta**	**Súprava dávkovača HA**
Katalógové číslo		**622526**	**622222**	**622423**	**623526**	**623222**	**623423**
Počet testov/balenie		**50**	**10**	**25**	**50**	**10**	**25**
QuantiFERON Nil Tube (sivé viečko, biely prstenec)	Nil	50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek			
QuantiFERON TB1 Tube (zelené viečko, biely prstenec)	TB1	50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek			
QuantiFERON TB2 Tube (žlté viečko, biely prstenec)	TB2	50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek			
QuantiFERON Mitogen Tube (purpurové viečko, biely prstenec)	Mitogen	50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek			
QuantiFERON Nil HA Tube (sivé viečko, žltý prstenec)	Nil HA				50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek
QuantiFERON TB1 HA Tube (zelené viečko, žltý prstenec)	TB1 HA				50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek
QuantiFERON TB2 HA Tube (žlté viečko, žltý prstenec)	TB2 HA				50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek
QuantiFERON Mitogen HA Tube (purpurové viečko, žltý prstenec)	Mitogen HA				50 skúmaviek	10 skúmaviek	25 skúmaviek
Príbalový leták k skúmavkám QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi		1	1	1	1	1	1

* Všetky konfigurácie produktu nemusia byť dostupné v každej krajine. Ďalšie informácie o možnosti objednania jednotlivých konfigurácií nájdete na stránke starostlivosti o zákazníkov spoločnosti QIAGEN (podrobné informácie nájdete na stránke **www.qiagen.com**).

Súčasti testu ELISA[†] **Katalógové číslo**	**Súprava ELISA s 2 doštičkami** **622120**	**Referenčná laboratórna súprava** **622822**
Microplate Strips (Mikrotitračné prúžky) (12 × 8 kalíškov) s myšacou antihumánnou monoklonálnou protilátkou IFN-γ	2 mikrotitračné prúžky x 96 kalíškov	20 mikrotitračných prúžkov x 96 kalíškov
IFN-γ Standard (Štandard IFN-γ), lyofilizovaný (obsahuje rekombinantný ľudský IFN-γ, hovädzí kazeín, Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 liekovka (8 IU/ml po zriedení)	10 liekoviek (8 IU/ml po zriedení)
Green Diluent (Zelené riedidlo) (obsahuje hovädzí kazeín, štandardné myšacie sérum, Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 × 30 ml	10 × 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Konjugát s koncentráciou 100x), lyofilizovaný (myšacie antihumánne IFN-γ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01 % obj. hm.)	1 × 0,3 ml (po zriedení)	10 × 0,3 ml (po zriedení)
Wash Buffer 20x Concentrate (Premývací roztok s koncentráciou 20x) (pH 7,2, obsahuje ProClin® 300 – 0,05 % obj. hm.)	1 × 100 ml	10 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymatický substrátový roztok) (obsahuje H_2O_2, 3,3', 5,5'-tetrametylbenzidín)	1 × 30 ml	10 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymatický tlmiaci roztok) (obsahuje 0,5 M H_2SO_4)	1 × 15 ml	10 × 15 ml
Príbalový leták k testu QFT-Plus ELISA	1	1

[†] Preventívne opatrenia a vyhlásenia o rizikách nájdete na strane 15.

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

- Inkubátor 37 °C ±1 °C*. CO_2 sa nevyžaduje.
- Kalibrované pipety* s variabilným objemom na aplikáciu 10 µl až 1 000 µl s jednorazovými hrotmi
- Kalibrované multikanálové pipety* s možnosťou aplikácie objemu 50 µl a 100 µl s jednorazovými hrotmi
- Veko doštičky
- Trepačka mikrotitračných doštičiek*
- Deionizovaná alebo destilovaná voda, 2 litre
- Umývačka mikrotitračných doštičiek (odporúčame používať automatickú umývačku)
- Čítačka mikrotitračných doštičiek* s filtrom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 nm až 650 nm

* Overte, či boli zariadenia skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

Skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi

Skúmavky na odber krvi

- Skúmavky na odber krvi skladujte pri teplote 4 °C až 25 °C.

Činidlá súpravy

- Činidlá súpravy skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C.
- Enzymatický substrátový roztok vždy chráňte pred priamym slnečným svetlom.

Zriedené a nepoužívané činidlá

Pokyny na prípravu (riedenie) činidiel nájdete na strane 27.

- Zriedený štandard zo súpravy je možné uchovávať po dobu 3 mesiacov pri teplote 2 až 8 °C.

  Zaznamenajte si dátum zriedenia štandardu súpravy.
- Nepoužitý konjugát s koncentráciou 100x je po zriedení potrebné uchovávať pri teplote 2 až 8 °C a spotrebovať do 3 mesiacov.

  Zaznamenajte si dátum zriedenia konjugátu.
- Konjugát s požadovanou koncentráciou je potrebné spotrebovať do 6 hodín od prípravy.
- Premývací roztok s požadovanou koncentráciou môžete uchovávať pri izbovej teplote maximálne 2 týždne.

Varovania a preventívne opatrenia

Iba na diagnostické použitie in vitro.

Varovania

- Negatívny výsledok QFT-Plus nevylučuje možnosť infekcie *M. tuberculosis* alebo tuberkulózneho ochorenia: falošne negatívne výsledky môžu byť spôsobené fázou infekcie (napríklad získanie vzorky pred rozvojom bunkovej imunitnej reakcie), stavmi komorbidity ovplyvňujúcimi imunitné funkcie, nesprávnou manipuláciou so skúmavkami na odber krvi po venepunkcii, nesprávnym vykonaním analýzy alebo inými imunologickými faktormi.
- Pozitívny výsledok QFT-Plus nesmie byť jediným a definitívnym základom stanovenia infekcie *M. tuberculosis*. Nesprávne vykonanie analýzy môže viesť k falošne pozitívnym výsledkom.
- Pozitívny výsledok QFT-Plus je potrebné overiť pomocou ďalšieho zdravotníckeho a diagnostického hodnotenia tuberkulózneho ochorenia (napríklad výter a kultúra AFB, hrudný RTG).
- Aj keď nie sú organizmy ESAT-6 a CFP-10 prítomné vo všetkých reťazcoch BCG a vo väčšine známych netuberkulóznych mykobaktérií, je možné, že pozitívny výsledok QFT-Plus môže byť spôsobený infekciou *M. kansasii*, *M. szulgai* alebo *M. marinum*. V prípade podozrení na tieto infekcie je potrebné vykonať alternatívne testy.

Preventívne opatrenia

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii online v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese **www.qiagen.com/safety**. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobraziť a vytlačiť kartu bezpečnostných údajov (KBÚ) pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

UPOZORNENIE: S ľudskou krvou a plazmou manipulujte ako s potenciálne infekčným materiálom. Dodržiavajte príslušné pokyny na manipuláciu s krvou a krvnými produktmi. Všetky vzorky a materiály, ktoré prišli do styku s krvou alebo krvnými produktmi, zlikvidujte v súlade s platnými federálnymi, štátnymi a miestnymi predpismi.

Na používanie súčastí súpravy QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA sa vzťahujú nasledujúce bezpečnostné vyhlásenia a preventívne opatrenia.

Bezpečnostné vyhlásenia

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Obsahuje: kyselina sírová. Pozor! Môže byť korozívna pre kovy. Spôsobuje podráždenie pokožky. Spôsobuje závažné podráždenie očí. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Pozor! Spôsobuje mierne podráždenie pokožky. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

QuantiFERON Green Diluent

Obsahuje: 5-hydroxy-1-(4-sulfofenyl)-4-(4-sulfofenylazo)pyrazol-3-karboxylát trisodný. Obsahuje: tartrazín. Pozor! Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate

Obsahuje: zmes 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ónu a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ónu (v pomere 3 : 1). Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia.

Preventívne opatrenia

Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. **PRI KONTAKTE S POKOŽKOU** (alebo vlasmi): Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte. Pokožku opláchnite vodou/sprchou. **PO ZASIAHNUTÍ OČÍ**: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Po expozícii alebo podozrení z nej: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára. Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte. Uchovávajte uzamknuté. Obsah/obal zlikvidujte v schválenom zariadení na zber a likvidáciu odpadov.

Ďalšie informácie

Karty bezpečnostných údajov: **www.qiagen.com/safety**

- Odchýlky od postupov uvádzaných v *príbalovom letáku k analýze QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* môžu viesť k chybným výsledkom. Pred začatím si dôkladne prečítajte príslušné pokyny.
- Súpravu nepoužívajte, ak niektorá z fliaš s činidlami pred použitím vykazuje znaky poškodenia alebo únikov.
- **Dôležité:** Pred použitím skontrolujte liekovky. Nepoužívajte liekovky konjugátu alebo štandardu IFN-γ, ktoré vykazujú známky poškodenia alebo poškodenie gumového tesnenia. Nepracujte s poškodenými liekovkami. Liekovky bezpečne zlikvidujte v súlade s príslušnými bezpečnostnými opatreniami. **Odporúčania**: Na otváranie liekoviek konjugátu alebo štandardu IFN-γ použite nástroj na odpájanie stlačených spojov, čím znížite riziko zranenia spôsobeného kovovým stlačeným vekom.
- Nemiešajte ani spolu nepoužívajte mikrotitračné prúžky , štandard IFN-γ, zelené riedidlo alebo konjugát s koncentráciou 100x z rôznych dávok súprav QFT-Plus. Ďalšie činidlá (premývací roztok s koncentráciou 20x, enzymatický substrátový roztok a enzymatický tlmiaci roztok) je možné zamieňať medzi jednotlivými súpravami za predpokladu, že neuplynul dátum exspirácie činidiel a sú zaznamenané podrobné informácie o šarži.
- Nepoužité činidlá a biologické vzorky zlikvidujte v súlade s miestnymi, štátnymi a federálnymi nariadeniami.
- Nepoužívajte skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi ani súpravu ELISA po uplynutí dátumu exspirácie.
- Vždy dodržiavajte správne laboratórne postupy.
- Overte, či sú laboratórne zariadenia kalibrované a schválené na používanie.

Odber vzoriek a manipulácia s nimi

V rámci analýzy QFT Plus sa používajú nasledujúce odberové skúmavky:

1. Skúmavky Quantiferon Nil Tube (sivé viečko s bielym prstencom)
2. Skúmavky QuantiFERON TB1 Tube (zelené viečko s bielym prstencom)
3. Skúmavky QuantiFERON TB2 Tube (žlté viečko s bielym prstencom)
4. Skúmavky QuantiFERON Mitogen Tube (purpurové viečko s bielym prstencom)
5. Skúmavky QuantiFERON HA Nil Tube (sivé viečko so žltým prstencom)
6. Skúmavky QuantiFERON HA TB1 Tube (sivé viečko so žltým prstencom)
7. Skúmavky QuantiFERON HA TB2 Tube (žlté viečko so žltým prstencom)
8. Skúmavky QuantiFERON HA Mitogen Tube (purpurové viečko so žltým prstencom)

Antigény sú na vnútornej stene skúmaviek na odber vzoriek, preto je dôležité, aby ste obsah skúmaviek riadne premiešali s krvou. Ak odoberáte krv priamo do skúmaviek QFT-Plus, tieto skúmavky sa musia uchovávať a prepravovať pri izbovej teplote (22 °C ±5 °C) a čo najskôr preniesť do inkubátora s teplotou 37 °C, najneskôr však do 16 hodín od odberu. Krv sa môže na účely uchovávania alternatívne odobrať do jednej lítium-heparínovej skúmavky alebo do skúmavky s heparínom sodným a následne preniesť do skúmaviek QFT-Plus a inkubovať. Vzorky krvi odobraté do lítium-heparínových skúmaviek alebo skúmaviek s heparínom sodným sa môžu skladovať pri izbovej teplote (17 – 25 °C) až 16 hodín a následne preniesť do skúmaviek QFT-Plus. Vzorky krvi v lítium-heparínových skúmavkách alebo v skúmavkách s heparínom sodným sa môžu takisto skladovať pri teplote 2 – 8 °C až 48 hodín a následne preniesť do skúmaviek QFT-Plus. Pozrite si časť „Odber krvi do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným a následný prenos do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi“.

Priamy odber krvi do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi

1. Skúmavky správnym spôsobom označte.

   Dbajte na to, aby bolo po odstránení viečok možné každú skúmavku (Nil, TB1, TB2 a Mitogen) identifikovať podľa štítka alebo iného atribútu.

   Odporúčame zaznamenať čas a dátum odberu krvi.

2. Každému pacientovi odoberte 1 ml krvi formou venepunkcie priamo do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi. Tento postup má vykonávať vyškolený flebotomista.

   Dôležitá poznámka: V čase plnenia krvou má byť teplota skúmaviek 17 – 25 °C.

   Štandardné skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi sa môžu používať v nadmorskej výške do 810 m. Skúmavky High Altitude QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi (skúmavky na použitie vo vysokej nadmorskej výške) sa môžu používať v nadmorskej výške od 1 020 m do 1 875 m.

   Keďže do skúmaviek s objemom 1 ml sa krv odoberá relatívne pomaly, ponechajte skúmavku pripojenú k ihle približne 2 – 3 sekundy po dokončení odberu. Tým sa zabezpečí odber správneho objemu.

   - Čierna značka na bočnej strane skúmaviek označuje schválený objem plnenia 0,8 – 1,2 ml. Ak je hladina krvi v ktorejkoľvek skúmavke mimo rozsahu vyznačenom značkou, je nutné získať novú vzorku krvi. Nedostatočné naplnenie alebo preplnenie skúmaviek mimo rozsahu 0,8 až 1,2 ml môže viesť k chybným výsledkom.
   - Ak sa na odber krvi používa ihla s krídelkami, je potrebné použiť „odvzdušňovaciu“ skúmavku na zabezpečenie naplnenia hadičky krvou pred tým, než použijete skúmavky QFT-Plus.
   - Ak sa budú skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi používať v nadmorskej výške nad 810 metrov alebo ak bude odobratý malý objem krvi, používatelia môžu vykonať odber krvi pomocou striekačky a okamžite preniesť 1 ml krvi do každej zo 4 skúmaviek. Z bezpečnostných dôvodov sa tento postup najlepšie vykonáva tak, že odpojíte ihlu striekačky

(s prihliadnutím na príslušné bezpečnostné pokyny), odpojíte viečka zo 4 skúmaviek QFT-Plus a pridáte do každej z nich 1 ml krvi (až po stred čiernej značky na bočnej strane štítka skúmavky). Skúmavky riadne uzavrite viečkami a podľa pokynov uvádzaných nižšie riadne premiešajte ich obsah. Dbajte na to, aby bolo po odstránení viečok možné každú skúmavku (Nil, TB1, TB2 a Mitogen) identifikovať podľa štítka alebo iného atribútu.

3. Ihneď po naplnení skúmaviek riadne pretrepte ich obsah desaťkrát (10x), čo postačuje na to, aby sa celý vnútorný povrch skúmavky pokryl krvou. Antigény sa tak rozpustia na stenách skúmavky.

   Dôležitá poznámka: V čase trepania má byť teplota skúmaviek 17 – 25 °C. Nadmerne silné trepanie môže viesť k rozkladu gélu a k abnormálnym výsledkom.
4. Po označení, naplnení a pretrepaní je skúmavky potrebné čo najskôr preniesť do inkubátora s teplotou 37 °C ±1 °C, najneskôr však do 16 hodín od odberu. Pred začatím inkubácie uchovávajte a prenášajte skúmavky pri izbovej teplote (22 °C ±5 °C). Ak sa skúmavky QFT-Plus neinkubujú pri teplote 37 °C ihneď po odbere krvi a pretrepaní, 10-krát ich prevráťte, aby sa ich obsah zmiešal, a následne inkubujte pri teplote 37 °C.
5. Skúmavky QFT-Plus inkubujte vo VZPRIAMENEJ polohe pri teplote 37 °C ±1 °C po dobu 16 až 24 hodín. Inkubátor nevyžaduje použitie CO_2 ani zvlhčovanie.

Odber krvi do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným a následný prenos do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi

1. Krv je možné odobrať aj pomocou skúmavky na odber krvi s obsahom lítium-heparínu alebo heparínu sodného (antikoagulant). Následne krv preneste do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi. Lítium-heparín alebo heparín sodný používajte ako výlučný krvný antikoagulant, pretože iné antikoagulanty rušia priebeh testu. Skúmavky správnym spôsobom označte.

   Odporúčame označiť skúmavku štítkom, na ktorom bude uvedený dátum a čas odberu krvi.

   Dôležité: V čase odberu krvi majú mať skúmavky QFT-Plus na odber krvi izbovú teplotu (17 – 25 °C).

2. Naplňte lítium-heparínovú skúmavku alebo skúmavku s heparínom sodným na odber krvi (minimálny objem 5 ml) a opatrným miešaním formou preklápania skúmavky rozpusťte heparín. Tento postup má vykonávať vyškolený flebotomista.
3. Čas skladovania a rozsah teplôt pre lítium-heparínové skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným pred prenesením a inkubáciou v skúmavkách QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi (pozrite si obrázky 1 až 3 – Možnosti odberu krvi).

   Možnosť 1 – Skladovanie lítium-heparínových skúmaviek alebo skúmaviek s heparínom sodným pri izbovej teplote a manipulácia s nimi Krv odobratá do lítium-heparínových skúmaviek alebo skúmaviek s heparínom sodným sa musí udržiavať pri izbovej teplote (22 °C ±5 °C) najviac 16 hodín od odberu krvi a následne preniesť do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi a inkubovať.

   Možnosť 2 – Skladovanie lítium-heparínových skúmaviek alebo skúmaviek s heparínom sodným v chladničke

   Dôležité: Kroky a – d pre daný postup sa musia vykonávať v poradí za sebou.

   a. Krv odobratá do lítium-heparínovej skúmavky alebo do skúmavky s heparínom sodným sa môže skladovať pri izbovej teplote (17 – 25 °C) až 3 hodiny po odobratí krvi.
   b. Krv odobratá do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným sa môže skladovať v chladničke (2 – 8 °C) až 48 hodín.
   c. Lítium-heparínová skúmavka alebo skúmavka s heparínom sodným sa po skladovaní v chladničke musí ekvilibrovať na izbovú teplotu (17 – 25 °C) a následne preniesť do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi.
   d. Skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi s alikvótnym objemom krvi sa musia do inkubátora s teplotou 37 °C uložiť do 2 hodín od odberu krvi.

   Ak nebudete skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi ihneď po prenesení krvi do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi a ich pretrepaní inkubovať pri teplote 37 °C, pred samotnou inkubáciou pri teplote 37 °C je potrebné premiešať obsah skúmaviek preklopením 10-krát. Celkový čas od odberu krvi do inkubácie v skúmavkách QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi nesmie presiahnuť 53 hodín.

4. Prenos vzorky krvi z lítium-heparínovej skúmavky alebo zo skúmavky s heparínom sodným do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi:

   a. Každú skúmavku QFT-Plus Blood Collection Tube na odber krvi náležite označte štítkom.

      Dbajte na to, aby bolo po odstránení viečok možné každú skúmavku (Nil, TB1, TB2 a Mitogen) identifikovať podľa štítka alebo iného atribútu. Zaznamenaný dátum a čas odberu krvi z lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným odporúčame prepísať na skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi.

   b. Obsah skúmaviek sa pred rozdelením do skúmaviek QFT Plus Blood Collection Tubes na odber krvi musí rovnomerne premiešať ich opatrným preklopením.

   c. Rozdelenie krvi do skúmaviek treba vykonávať asepticky so zabezpečením vhodných bezpečných postupov formou odpojenia viečok zo 4 skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi a pridania 1 ml krvi do každej z nich. Riadne uzavrite skúmavky viečkami a podľa pokynov uvádzaných nižšie premiešajte ich obsah. Dbajte na to, aby bolo po odstránení viečok možné každú skúmavku (Nil, TB1, TB2 a Mitogen) identifikovať podľa štítka alebo iného atribútu.

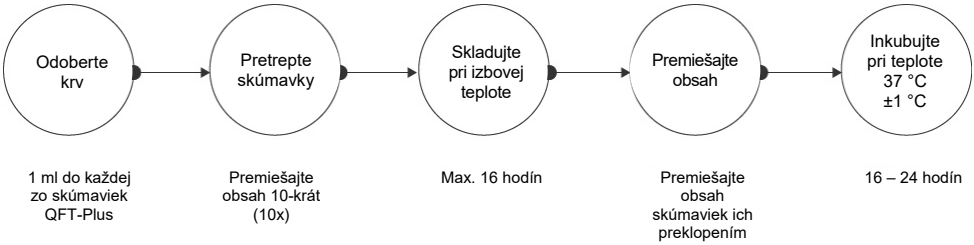
5. Obsah skúmaviek premiešajte. Ihneď po naplnení skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi riadne pretrepte ich obsah desaťkrát (10x), čo postačuje na to, aby sa celý vnútorný povrch skúmavky pokryl krvou. Antigény sa tak rozpustia na stenách skúmavky.

   Nadmerne silné trepanie môže viesť k rozkladu gélu a k abnormálnym výsledkom.

6. Po označení, naplnení a pretrepaní sa musia skúmavky do 2 hodín preniesť do inkubátora s teplotou 37 °C ±1 °C. Ak nebudete skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi ihneď po odbere krvi a pretrepaní inkubovať pri teplote 37 °C, pred samotnou inkubáciou pri teplote 37 °C je potrebné premiešať obsah skúmaviek preklopením 10-krát (10x). (Pozrite si obrázky 1 – 3 s možnosťami odberu krvi na ďalšej strane.)

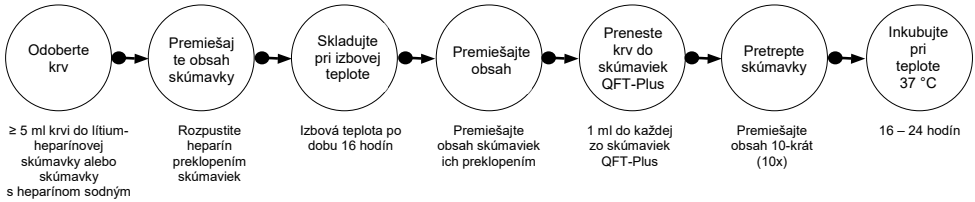
7. Skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi inkubujte vo VZPRIAMENEJ polohe pri teplote 37 °C ±1 °C po dobu 16 až 24 hodín. Inkubátor nevyžaduje použitie CO_2 ani zvlhčovanie.

Odoberte krv do skúmaviek QFT Plus Blood Collection Tubes na odber krvi a skladujte ich pri izbovej teplote.



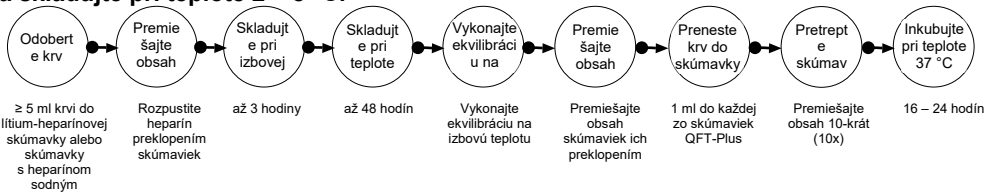
Obrázok 1. Možnosť odberu krvi: Odoberte krv priamo do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi a skladujte ich pri izbovej teplote.
Celkový čas od odberu krvi do skúmaviek QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi do inkubácie pri teplote 37 °C nesmie presiahnuť 16 hodín.

Odoberte krv do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným a skladujte ju pri izbovej teplote.



Obrázok 2. Možnosť odberu krvi: Odoberte krv do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným a skladujte ju pri izbovej teplote.
Celkový čas od odberu krvi do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným do inkubácie pri teplote 37 °C nesmie presiahnuť 16 hodín.

Odoberte krv do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným a skladujte pri teplote 2 – 8 °C.



Obrázok 3. Možnosť odberu krvi: Odoberte krv do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným a skladujte ju pri teplote 2 – 8 °C.
Celkový čas od odberu krvi do lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným do inkubácie pri teplote 37 °C nesmie presiahnuť 53 hodín.

Pokyny na použitie

Fáza 1 – inkubácia krvi a odber plazmy

Dodávané materiály

- Skúmavky QFT-Plus Blood Collection Tubes na odber krvi (pozrite si časť 3).

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

- Pozrite si časť 3.

Postup

1. **Ak krv neinkubujete ihneď po odbere, bezprostredne pred samotnou inkubáciou je potrebné premiešať obsah skúmaviek preklopením 10-krát.**
2. **Skúmavky inkubujte vo VZPRIAMENEJ polohe pri teplote 37 °C ±1 °C po dobu 16 – 24 hodín. Inkubátor nevyžaduje použitie CO_2 ani zvlhčovanie.**
3. **Po inkubácii pri teplote 37 °C je možné uchovávať skúmavky na odber krvi pri teplote od 4 °C do 27 °C po dobu max. 3 dní pred odstreďovaním.**
4. **Po dokončení inkubácie skúmaviek pri teplote 37 °C sa odber plazmy vykonáva odstreďovaním skúmaviek po dobu 15 minút s otáčkami 2 000 až 3 000 RCF (*g*). Gélová zátka oddelí bunky od plazmy. Ak k tomu nedôjde, skúmavky je potrebné znova odstrediť.**

   Plazmu je možné odobrať bez odstreďovania, ale na odstránenie plazmy bez poškodenia buniek sa vyžaduje väčšia pozornosť.
5. **Plazmové vzorky je potrebné odoberať iba pomocou pipety.**

   Dôležitá poznámka: Po dokončení odstreďovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.

Plazmové vzorky je možné preniesť priamo z odstredených skúmaviek na odber krvi na doštičky QFT-Plus ELISA aj vtedy, keď sa používajú automatizované pracovné stanice ELISA.

Plazmové vzorky je možné uchovávať po dobu 28 dní pri teplote 2 °C až 8 °C. Po odbere je možné ich dlhodobo uchovávať pri teplote nižšej než –20 °C.

Na dosiahnutie požadovaných testovacích vzoriek odoberte najmenej 150 µl plazmy.

Fáza 2 – IFN-γ ELISA

Dodávané materiály

- Súprava QFT-Plus ELISA (pozrite si časť 3)

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

- Pozrite si časť 3.

Postup

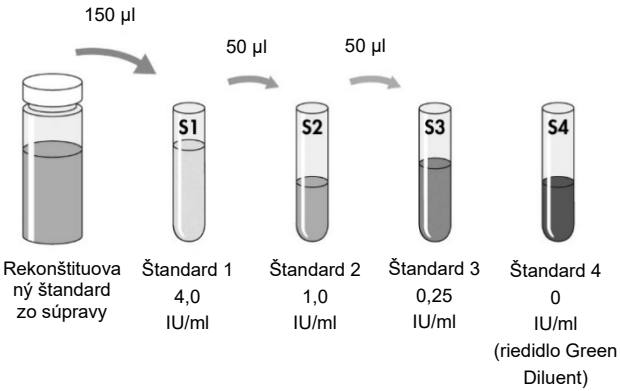
1. **Je potrebné, aby všetky plazmové vzorky a činidlá (okrem konjugátu s koncentráciou 100x) pred použitím nadobudli izbovú teplotu (22 ±5 °C). Ekvilibrácia má trvať najmenej 60 minút.**
2. **Odstráňte z rámu nepotrebné prúžky, uzavrite fóliové vrecko a vráťte ho do chladničky až do okamihu potreby.**

   Vykonajte test najmenej 1 prúžka so štandardmi QFT-Plus a dostatočného počtu prúžkov vzhľadom na počet testovaných pacientov (pozrite si Obrázok 5). Po dokončení si ponechajte rám na použitie s ďalšími prúžkami.
3. **Zrieďte štandard IFN-γ s deionizovanou alebo destilovanou vodou s objemom vyznačeným na štítku liekovky. Jemne obsah premiešajte, aby sa nezačala tvoriť pena, a zabezpečte úplné rozpustenie. Zriedením štandardu na uvedený objem získate roztok s koncentráciou 8,0 IU/ml.**

Dôležitá poznámka: Objem riedenia štandardu súpravy sa bude medzi jednotlivými dávkami odlišovať.

Pomocou zriedeného štandardu súpravy vytvorte riedenie 1 v 2 nasledované sériou riedenia 1 v 4 IFN-γ v zelenom riedidle (GD) (pozrite si Obrázok 4). S1 (štandard 1) obsahuje 4,0 IU/ml, S2 (štandard 2) obsahuje 1,0 IU/ml, S3 (štandard 3) obsahuje 0,25 IU/ml a S4 (štandard 4) obsahuje 0 IU/ml (iba GD). Štandardy sa musia analyzovať prinajmenšom duplicitne. Pripravte si čerstvé zriedené roztoky štandardu súpravy na každú analytickú reláciu ELISA.

Odporúčaný postup pre duplicitné štandardy
Označte 4 skúmavky štítkom „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
Pridajte 150 µl GD do S1, S2, S3, S4.
Pridajte 150 µl štandardu súpravy do S1 a zmes riadne premiešajte.
Preneste 50 µl zo S1 do S2 a zmes riadne premiešajte.
Preneste 50 µl zo S2 do S3 a zmes riadne premiešajte.
Samotné GD slúži ako nulový štandard (S4).



Obrázok 4. Príprava krivky štandardu.

4. **Zrieďte lyofilizovaný konjugát s koncentráciou 100× s 0,3 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Jemne obsah premiešajte, aby sa minimalizovala tvorba peny, a zabezpečte úplné rozpustenie konjugátu.**

   Konjugát s požadovanou (pracovnou) koncentráciou sa pripravuje zriedením požadovaného objemu rekonštituovaného konjugátu s koncentráciou 100x v zelenom riedidle (Tabuľka 1. Príprava konjugátu). Nepoužitý konjugát s koncentráciou 100x ihneď po použití vráťte do skladovacieho priestoru s teplotou 2 až 8 °C. Používajte iba zelené riedidlo.

Tabuľka 1. Príprava konjugátu

Počet prúžkov	Objem konjugátu s koncentráciou 100x	Objem zeleného riedidla
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. **V prípade plazmových vzoriek odobratých zo skúmaviek na odber krvi a následne skladovaných (v chladničke alebo mrazničke) tieto vzorky riadne premiešajte pred tým, než ich pridáte do kalíška ELISA.**

   Dôležitá poznámka: Ak chcete pridať plazmové vzorky priamo z odstredených skúmaviek QFT-Plus, plazma sa nesmie miešať. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.

6. **Pomocou multikanálovej pipety pridajte 50 µl čerstvo pripraveného konjugátu s požadovanou koncentráciou do príslušných kalíškov ELISA.**

7. **Pomocou multikanálovej pipety pridajte 50 µl testovacích plazmových vzoriek do príslušných kalíškov (odporúčané rozloženie doštičky uvádza Obrázok 5). Nakoniec pridajte 50 µl štandardov 1 až 4.**

	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

Obrázok 5. Odporúčané usporiadanie vzoriek (22 testov na doštičku)

S1 (Štandard 1), S2 (Štandard 2), S3 (Štandard 3), S4 (Štandard 4)

1 N (vzorka 1. plazma Nil), 1 TB1 (vzorka 1. plazma TB1), 1 TB2 (vzorka 1. plazma TB2), 1 M (vzorka 1. plazma Mitogen)

8. **Zakryte každú doštičku a pomocou trepačky mikrotitračných doštičiek dôkladne premiešajte konjugát a plazmové vzorky/štandardy (1 minútu). Dávajte pozor, aby ste nerozliali obsah.**
9. **Zakryte každú doštičku a inkubujte pri izbovej teplote (22 °C ±5 °C) po dobu 120 ±5 minút.**

   Doštičky počas inkubácie nesmú byť vystavené priamemu slnečnému žiareniu.
10. **Počas inkubácie zrieďte jeden diel premývacieho roztoku s koncentráciou 20× s 19 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody a zmes riadne premiešajte. K dispozícii je dostatok premývacieho roztoku s koncentráciou 20x Concentrate na prípravu 2 litrov premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou.**

    Prepláchnite kalíšky 400 µl premývacieho roztoku s požadovanou koncentráciou (najmenej 6 cyklov). Odporúčame používať automatizovanú umývačku doštičiek.

Dôkladné prepláchnutie je veľmi dôležité z hľadiska účinnosti testu. Dbajte na **úplné naplnenie** každého kalíška premývacím roztokom (až po vrch kalíška) v každom premývacom cykle. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.

Do odpadovej nádoby je vhodné pridať štandardný laboratórny dezinfekčný prostriedok a v prípade dekontaminácie potenciálne infekčného materiálu je potrebné postupovať podľa stanovených procedúr.

11. **Vyklepaním doštičiek na absorpčnú utierku nezanechávajúcu vlákna odstráňte zvyškový premývací roztok. Do každého kalíška pridajte 100 µl enzymatického substrátového roztoku, zakryte každú doštičku a premiešajte ich pomocou trepačky mikrotitračných doštičiek.**
12. **Zakryte každú doštičku a inkubujte pri izbovej teplote (22 °C ±5 °C) po dobu 30 minút.**

    Doštičky počas inkubácie nesmú byť vystavené priamemu slnečnému žiareniu.
13. **Po dokončení 30-minútovej inkubácie pridajte do každého kalíška 50 µl enzymatického tlmiaceho roztoku a riadne ho premiešajte.**

    Enzymatický tlmiaci roztok je potrebné pridávať do kalíškov v rovnakom poradí a približne rovnako rýchlo ako substrát v kroku 11.
14. **Odmerajte optickú hustotu (Optical Density – OD) každého kalíška do 5 minút od zastavenia reakcie pomocou čítačky mikrotitračných doštičiek vybavenej filtrom s filtračným rozsahom 450 nm a referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 až 650 nm. Hodnoty OD sa používajú na výpočet výsledkov.**

Výpočty a interpretácia testu

Na analýzu nespracovaných údajov a na výpočet výsledkov možno použiť analytický softvér QFT Plus Analysis Software. Je k dispozícii na stránke **www.QuantiFERON.com**. Vždy overte, či používate najnovšiu verziu analytického softvéru QFT-Plus Analysis Software.

Tento softvér slúži na hodnotenie kontroly kvality testu, generovanie krivky štandardu a poskytuje výsledok testu každého pacienta v súlade s informáciami uvádzanými v časti Interpretácia výsledkov.

Okrem použitia analytického softvéru QFT-Plus Analysis Software je možné výsledky stanoviť aj pomocou nasledovnej metódy.

Generovanie krivky štandardu

(Ak sa nepoužíva analytický softvér QFT-Plus Analysis Software.)

Stanovte stredné hodnoty OD replikátov štandardu súpravy na každej doštičke.

Vytvorte logaritmickú ($log_{(e)}$–$log_{(e)}$) krivku štandardu zakreslením hodnoty $log_{(e)}$ priemeru OD (os y) voči hodnote $log_{(e)}$ koncentrácie IFN-γ štandardov v IU/ml (os x) a z týchto výpočtov vynechajte nulový štandard. Pomocou regresnej analýzy vypočítajte čiaru najlepšieho umiestnenia (prispôsobenia) krivky štandardu.

Pomocou krivky štandardu stanovte koncentráciu IFN-γ (IU/ml) každej z testovaných plazmových vzoriek a použite hodnotu OD každej vzorky.

Tieto výpočty je možné vykonávať pomocou softvérových balíkov dostupných spolu s čítačkami mikrotitračných doštičiek a štandardného tabuľkového alebo štatistického softvéru (napríklad Microsoft® Excel®). Tieto balíky odporúčame používať na výpočet regresnej analýzy, koeficientu variácie (coefficient of variation, %CV) štandardov a koeficientu korelácie (*r*) krivky štandardu.

Kontrola kvality testu

Správnosť výsledkov testu závisí od generovania správnej krivky štandardu. Z tohto dôvodu je výsledky odvodené od štandardov potrebné preskúmať pred tým, než budete môcť interpretovať výsledky testovacej vzorky.

Zabezpečenie platnosti analýzy ELISA:

- Stredná hodnota OD štandardu 1 musí byť ≥ 0,600.
- %CV hodnôt OD replikátu štandardu 1 a štandardu 2 musí byť ≤ 15 %.
- Hodnoty OD replikátu štandardov 3 a 4 sa nesmú odlišovať o viac než 0,040 jednotky optickej hustoty od ich strednej hodnoty.
- Koeficient korelácie (*r*) vypočítaný zo stredných hodnôt absorbancie štandardov musí byť ≥ 0,98.

Analytický softvér QFT-Plus Analysis Software počíta a vykazuje tieto parametre kontroly kvality.

Ak vyššie uvedené kritériá nie sú splnené, cyklus testovania je neplatný a je potrebné ho zopakovať.

Stredná hodnota OD nulového štandardu (zelené riedidlo) má byť ≤ 0,150. Ak je stredná hodnota OD > 0,150, je potrebné preskúmať postup premývania doštičky.

Interpretácia výsledkov

Výsledky QFT-Plus sa interpretujú pomocou nasledovných kritérií (Tabuľka 2):

Dôležitá poznámka: Diagnostika alebo vylúčenie tuberkulózneho ochorenia a hodnotenie pravdepodobnosti LTBI vyžadujú použiť kombináciu epidemiologických, historických, zdravotníckych a diagnostických nálezov, na ktoré je potrebné prihliadať počas interpretácie výsledkov QFT-Plus.

Tabuľka 2. Interpretácia výsledkov QFT-Plus

Nil (IU/ml)	TB1 mínus Nil (IU/ml)	TB2 mínus Nil (IU/ml)	Mitogen mínus Nil (IU/ml)*	Výsledok QFT-Plus	Správa/interpretácia
≤ 8,0	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Akákoľvek hodnota	Akákoľvek hodnota	Pozitívny†	Infekcia *M. tuberculosis* je pravdepodobná.
	Akákoľvek hodnota	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil			
	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	≥ 0,5	Negatívny	Infekcia *M. tuberculosis* je NEPRAVDEPODOBNÁ.
	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,35 alebo ≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,5	Neurčitý‡	Pravdepodobnosť infekcie *M. tuberculosis* nemožno stanoviť.
> 8,0§		Akákoľvek hodnota		Neurčitý‡	Pravdepodobnosť infekcie *M. tuberculosis* nemožno stanoviť.

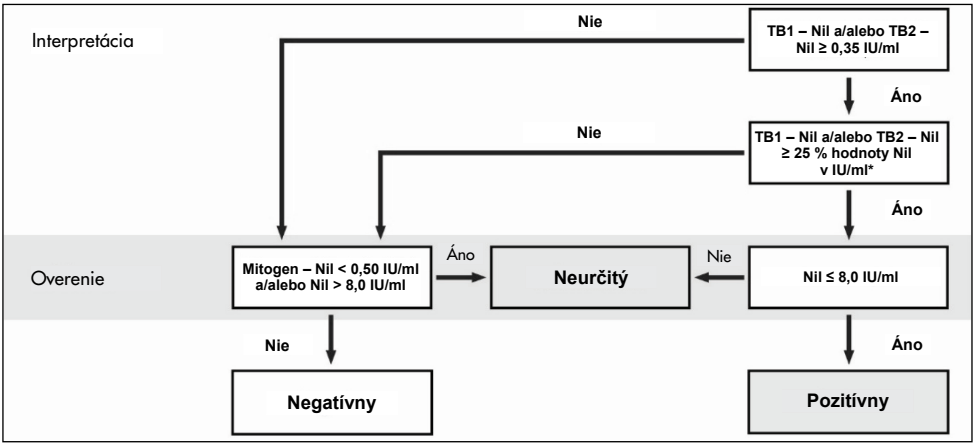
* Reakcie na pozitívnu kontrolu Mitogen (a niekedy aj na antigény TB) sa môžu bežne nachádzať mimo rozsahu čítačky mikrotitračných doštičiek. Nemá to však žiadny vplyv na výsledky. Hodnoty > 10 ml označuje softvér QFT-Plus ako > 10 IU/ml.

† V prípadoch, kedy nie je podozrenie na infekciu *M. tuberculosis*, je možné úvodné pozitívne výsledky overiť opätovným testovaním pôvodných plazmových vzoriek (duplicitne) v QFT-Plus ELISA. Ak je opakované testovanie jedného alebo obidvoch replikátov pozitívne, jednotlivca je potrebné považovať za pozitívneho na test.

‡ Možné príčiny nájdete v časti „Riešenie problémov“.

§ V rámci klinických štúdií malo menej než 0,25 % pacientov hodnoty IFN-γ > 8,0 IU/ml (vzhľadom na hodnotu Nil).

Magnitúdu nameranej úrovne IFN-γ nie je možné korelovať s fázou alebo stupňom infekcie, úrovne imunitnej reakcie ani pravdepodobnosťou prechodu do aktívneho štádia ochorenia. Pozitívna reakcia na TB u osôb s negatívnou reakciou na Mitogen je zriedkavá, bola však pozorovaná u pacientov s ochorením TB. To indikuje, že reakcia IFN-γ na antigén TB je výraznejšia než reakcia na Mitogen. Je to možné, keďže úroveň Mitogen nestimuluje v maximálnej miere tvorbu IFN-γ lymfocytmi.



* Aby bolo možné považovať hodnoty TB1 mínus Nil alebo TB2 mínus Nil za platné, hodnota ≥ 25 % Nil v IU/ml musí byť z rovnakej skúmavky ako pôvodný výsledok ≥ 0,35 IU/ml.

Obrázok 6. Schéma interpretácie výsledkov testu QFT-Plus

Obmedzenia

Výsledky testovania QFT-Plus sa musia používať spolu s epidemiologickou anamnézou, aktuálnym zdravotným stavom a ďalšími diagnostickými hodnoteniami každého pacienta.

Jednotlivci s hodnotami Nil vyššími než 8,0 IU/ml sú zaradení do kategórie „neurčitý“, pretože miera reakcie na antigény TB 25 % alebo vyššia môže spadať mimo rozsahu merania analýzy.

Nespoľahlivé alebo neurčité výsledky môžu byť výsledkom:

- Nedodržania postupov uvádzaných v tomto príbalovom letáku
- Nadmernej cirkulácie IFNγ alebo prítomnosti heterofilných protilátok
- Uplynutia viac než 16 hodín od odberu krvi do inkubácie pri teplote 37 °C. Toto neplatí pri používaní pracovného postupu lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným pri teplote 2 – 8 °C.

Výkonnostné charakteristiky

Klinické štúdie

Keďže k dispozícii nie je žiadny štandardný test týkajúci sa latentnej tuberkulóznej infekcie (LTBI), odhad citlivosti a špecificity týkajúcej sa testu QFT-Plus nie je možné prakticky zhodnotiť. Špecificita QFT-Plus bola odhadnutá formou hodnotenia miery falošne pozitívnych výsledkov u osôb s nízkym rizikom (žiadne známe rizikové faktory) tuberkulóznej infekcie. Citlivosť bola odhadnutá formou hodnotenia skupín pacientov s kultivačne potvrdeným ochorením TB.

Špecificita

Bola uskutočnená štúdia na hodnotenie špecificity QFT-Plus u 409 subjektov. Demografické informácie a rizikové faktory expozície voči TB boli stanovené pomocou štandardizovaného prieskumu počas testovania.

Na základe súhrnu nálezov v rámci 2 skupín pacientov s nízkym rizikom (bez známych rizikových faktorov) tuberkulóznej infekcie bola preukázaná celková špecificita testu QFT-Plus na úrovni 97,6 % (399/409) (Tabuľka 3 a Tabuľka 4).

Tabuľka 3. Výsledky štúdie týkajúce sa špecificity QFT-Plus podľa centra štúdie

Štúdia	Pozitívny	Negatívny	Neurčitý	Špecificita (95 % CI)
Japonsko	4	203	0	98 % (95 – 100 %)
Austrália	6	196	0	97 % (94 – 99 %)

Tabuľka 4. Výsledky štúdie týkajúce sa špecificity QFT-Plus podľa skúmavky s antigénom TB

Štúdia	TB1	TB2	QFT-Plus
Pozitívny	5	10	10
Negatívny	404	399	399
Neurčitý	0	0	0
Špecificita (95 % CI)	98,8 % (97,2 – 99,6)	97,6 % (95,6 – 98,8)	97,6 % (95,6 – 98,8)

Citlivosť vzhľadom na aktívnu TB

Aj keď neexistuje žiadny definitívny štandardný test latentnej infekcie LTBI, vhodnou náhradou je mikrobiologická kultúra *M. tuberculosis*, pretože pacienti s týmto ochorením sú podľa zaužívanej definície infikovaní. Vykonané boli testy osôb s podozrením na TB v rámci 4 centier konania štúdie v Austrálii a Japonsku, u ktorých bola následne kultivačne potvrdená infekcia *M. tuberculosis*. Účelom týchto testov bolo hodnotenie citlivosti testu QFT-Plus (Tabuľka 5 a Tabuľka 6). Pred odberom krvi na testovanie QFT-Plus pacienti absolvovali max. 14-dňovú liečbu.

Na základe súhrnu nálezov v rámci 4 skupín pacientov pozitívnych na kultúru *M. tuberculosis* bola preukázaná celková citlivosť testu QFT-Plus na aktívnu formu ochorenia TB na úrovni 95,3 % (164/172). Z týchto 4 skupín bolo 159 pacientov pozitívnych na základe výsledkov zo skúmaviek TB1 a TB2, 1 pacient bol pozitívny len na základe výsledku zo skúmavky TB1 a 4 pacienti boli pozitívni len na základe výsledku zo skúmavky TB2. Celkom bolo neurčitých 1,1 % (2/174) výsledkov. Pomocou výsledku skúmavky TB2 sa podarilo správne identifikovať 1 pacienta s kultivačne potvrdenou infekciou, ktorý by bol len na základe výsledku zo skúmavky TB1 označený za neurčitého (nízka hodnota Mitogeén) (pozrite si Tabuľka 5 a Tabuľka 6).

Tabuľka 5. Výsledky štúdie týkajúce sa citlivosti QFT-Plus podľa centra štúdie

Miesta konania štúdie	Pozitívny	Negatívny	Neurčitý	Citlivosť QFT-Plus* (95 % CI)
Centrum štúdie v Japonsku 1	36	7	0	84 % (69 – 93)
Centrum štúdie v Japonsku 2	53	1	2	98 % (90 – 100)
Centrum štúdie v Japonsku 3	54	0	0	100% (93 – 100)
Centrum štúdie v Austrálii	21	0	0	100% (84 – 100)

* Citlivosť je stanovená na základe celkového počtu platných testov okrem testov s neurčitými výsledkami.

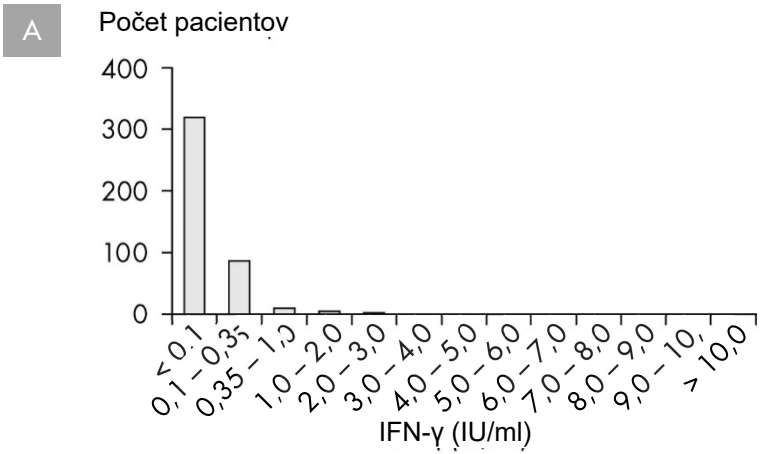
Tabuľka 6. Výsledky štúdie týkajúce sa citlivosti QFT-Plus podľa skúmavky s antigénom TB

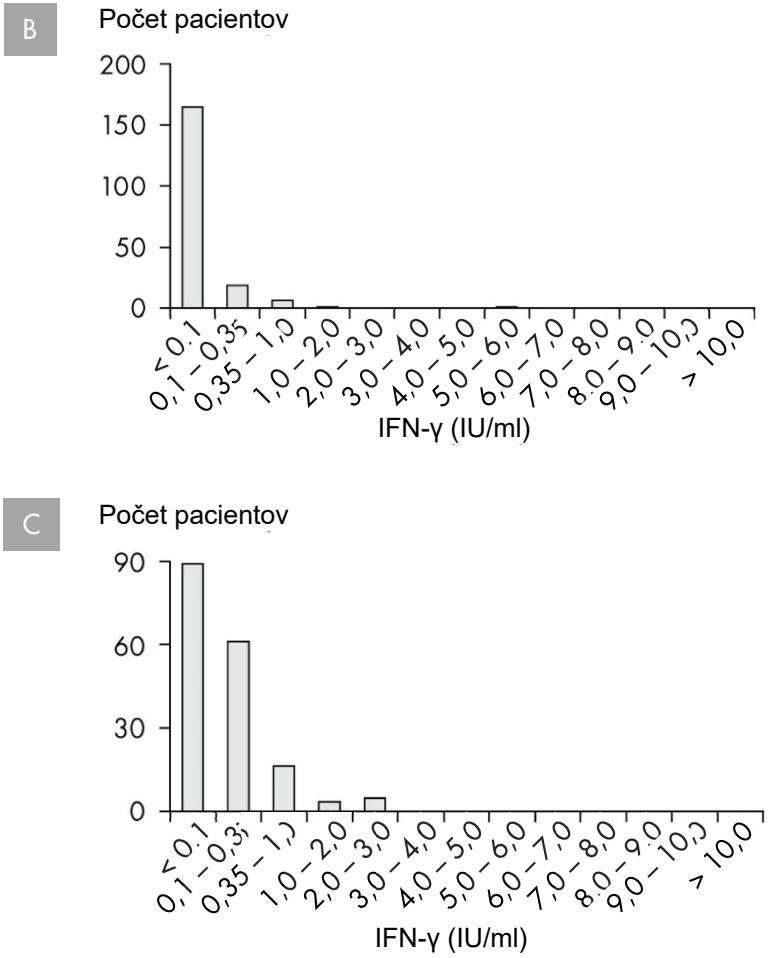
	TB1	TB2	QFT-Plus
Pozitívny	160	163	164
Negatívny	11	9	8
Neurčitý	3	2	2
Citlivosť† (95 % CI)	93,6 % (88,8 – 96,7)	94,8 % (90,3 – 97,6)	95,3 % (90,9 – 97,9)

***** Citlivosť je stanovená na základe celkového počtu platných testov okrem testov s neurčitými výsledkami.

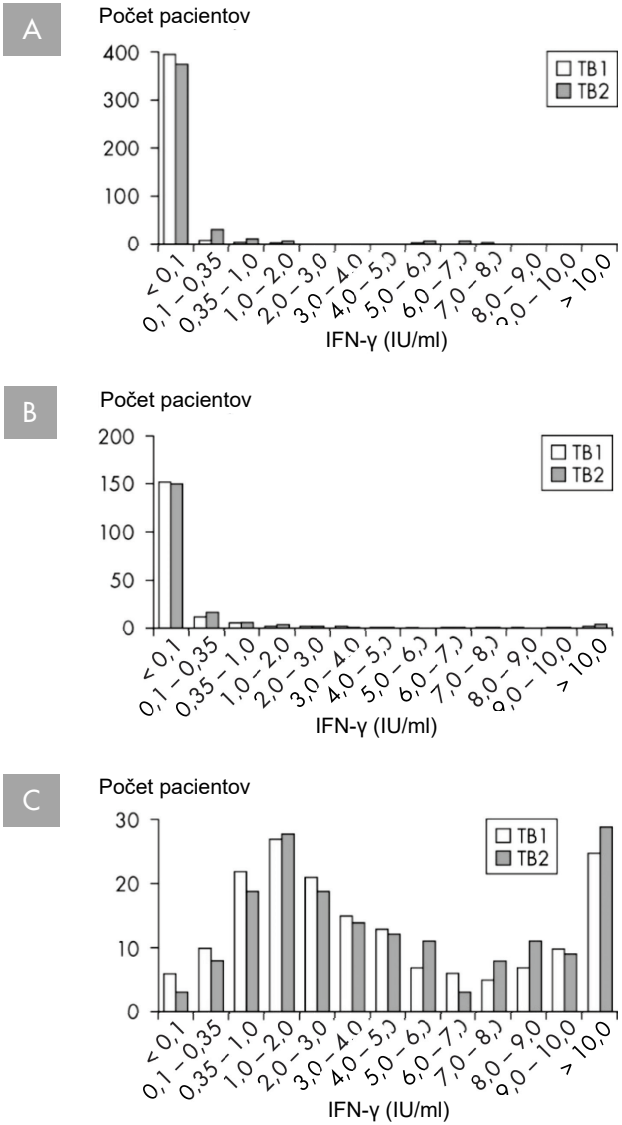
Zaznamenaná distribúcia reakcií – s rozptylom rizika

Počas klinických štúdií bol zaznamenaný rozsah reakcií IFNγ na antigény TB1, TB2 a kontrolné skúmavky. Tieto reakcie boli následne rozdelené podľa rizika infekcie *M. tuberculosis* (obrázky 7 – 9). Skupinu so zmiešaným rizikom tvorili pacienti, ktorých bolo možné v rámci testovania považovať za všeobecnú populáciu. Zahrnutí boli pacienti s rizikovými faktormi expozície voči TB a bez nich a tiež pacienti, u ktorých bola aktívna forma TB nepravdepodobná (t. j. pacienti s LTBI).

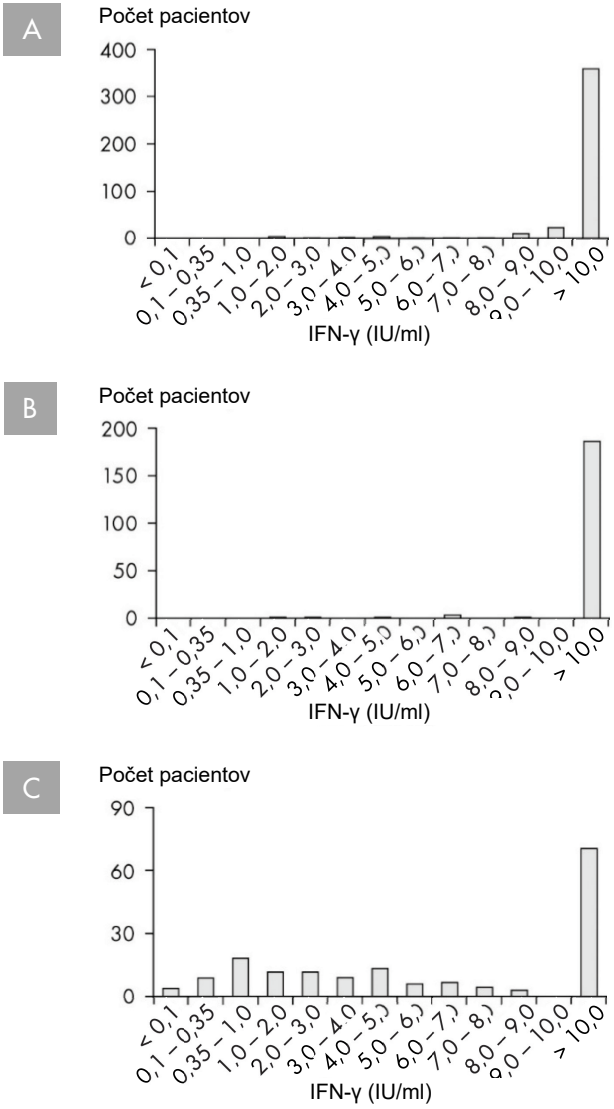




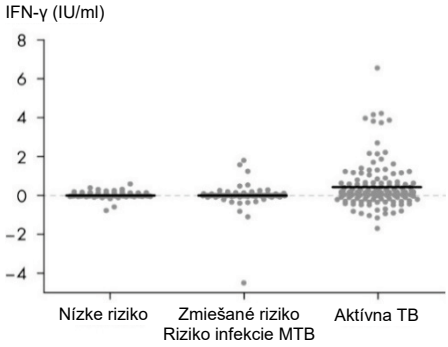
Obrázok 7. Distribúcia hodnôt Nil. **A**. Distribúcia hodnôt Nil u populácie s nízkym rizikom (n = 409). **B**. Distribúcia hodnôt Nil u populácie so zmiešaným rizikom (n = 194). **C.** Distribúcia hodnôt Nil u populácie s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* (n = 174).



Obrázok 8. Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil). A. Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s nízkym rizikom (n = 409). **B.** Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie so zmiešaným rizikom (n = 194). **C.** Distribúcia hodnôt TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* (n = 174).



Obrázok 9. Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil). **A**. Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s nízkym rizikom (n = 409). **B.** Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie so zmiešaným rizikom (n = 194). **C**. Distribúcia hodnôt Mitogen (po odpočítaní hodnôt Nil) u populácie s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* (n = 169).

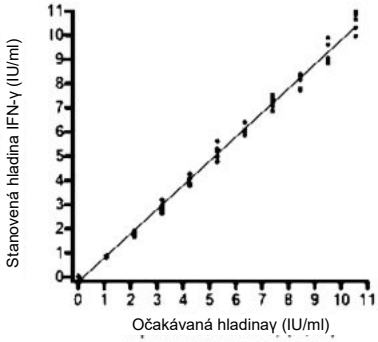


Obrázok 10. Zaznamenaný rozdiel medzi hodnotami TB1 a TB2 (po odpočítaní hodnôt Nil) – rozptyl podľa rizika. Populácia s nízkym rizikom (n = 409), populácia so zmiešaným rizikom (n = 189) a populácia s kultivačne potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* (n = 141). Hodnoty TB1 boli odpočítané od hodnôt TB2. Pacienti s hodnotami TB1 alebo TB2 > 10,0 IU/ml boli zo štúdie vylúčení, pretože nespadali do lineárneho rozsahu tejto analýzy.

Charakteristiky účinnosti testu

Uskutočnila sa štúdia lineárnosti, v rámci ktorej bolo náhodným spôsobom umiestnených 5 replikátov z 11 skupín plazmových vzoriek so známou koncentráciou IFN-γ na doštičku ELISA a bolo dokázané, že analýza QFT-Plus ELISA je lineárna. Čiara lineárnej regresie má strmosť 1,002 ±0,011 a koeficient korelácie s hodnotou 0,99 (Obrázok 11).

Limit detekcie analýzy QFT-Plus ELISA je 0,065 IU/ml a neuvádza sa žiadny výskyt hákového efektu vysokej dávky (prozónový efekt) pri koncentráciách IFN-γ do 10 000 IU/ml.



Obrázok 11. Profil lineárnosti analýzy QFT-Plus ELISA

Vnútroanalytická a medzianalytická nepresnosť (%CV) analýzy QFTPlus ELISA bola odhadnutá formou testovania 20 plazmových vzoriek s premenlivými koncentráciami IFN-γ s 3 replikátmi v 3 rôznych laboratóriách v priebehu 3 po sebe nenasledujúcich dní a 3 rôznymi operátormi. To znamená, že každá vzorka bola testovaná 27-krát v rámci 9 nezávislých analytických cyklov. Jedna vzorka bola nulová kontrola (Nil) s vypočítanou koncentráciou IFN-γ 0,08 IU/ml (95 % CI: 0,07 – 0,09). V rámci zvyšných 19 plazmových vzoriek bol rozsah koncentrácií od 0,33 (95 % CI: 0,31 – 0,34) do 7,7 IU/ml (95 % CI: 7,48 – 7,92).

Nepresnosť v rámci cyklu (vnútroanalytická nepresnosť) bola odhadnutá formou výpočtu priemeru hodnôt %CV pre každú testovanú plazmu obsahujúcu IFN-γ z každého cyklu spracovania doštičky (n = 9). Rozsah nepresnosti bol 4,1 až 9,1 % CV. Priemerná hodnota kovariancie v rámci cyklu (±95 % CI) bola 6,6 % ±0,6 %. Priemerná hodnota %CV v plazme bez obsahu IFN-γ bola 14,1.

Celková alebo medzianalytická nepresnosť bola stanovená formou porovnania 27 vypočítaných koncentrácií IFN-γ pre každú testovanú plazmovú vzorku. Rozsah medzianalytickej nepresnosti bol 6,6 až 12,3 %CV. Celková priemerná hodnota %CV (±95 % CI) bola 8,7 % ±0,7 %. Hodnota %CV v plazme bez obsahu IFN-γ bola 26,1. Túto úroveň variability je potrebné predpokladať, pretože vypočítaná koncentrácia IFN-γ je nízka a nízky predpoklad koncentrácie bude vyšší než v prípade vyšších koncentrácií.

Uskutočnila sa štúdia zameraná na stanovenie reprodukovateľnosti testu QFT-Plus s použitím vzoriek krvi od 102 pacientov so zmiešanými rizikovými faktormi pre infekciu *M. tuberculosis*. V rámci štúdie sa hodnotili traja rôzni operátori a rôzne laboratórne podmienky.

Pre každého pacienta sa vykonali 3 diagnostické stanovenia a celkovo sa pre všetkých pacientov vykonalo 306 diagnostických stanovení. Diagnostická reprodukovateľnosť vo všeobecnosti dosiahla hodnotu 99 % (95 % CI: 97,2 – 99,7), pričom zhodný diagnostický výsledok sa dosiahol v 303 z 306 stanovení. Celú odchýlku spôsobili výsledky 3 pacientov, ktoré boli blízko hraničnej hodnoty.

Diagnostika LTBI

Bolo publikovaných množstvo štúdií, ktoré demonštrujú účinnosť testu QFT, predchodcu QFT-Plus, u rôznych populácií s rizikom infekcie MTB. Základné poznatky niektorých vybratých štúdií uvádza Tabuľka 7.

Tabuľka 7. Vybraté publikované štúdie o QFT

Populácia/stav	Výstupy a zistenia	Celkový počet publikovaných štúdií
Pediatria	Potvrdená účinnosť u detí vrátane detí mladších než 5 rokov (45 – 46), vyššia presnosť než v prípade testu ELISpot IGRA (8). Výsledky doteraz najväčšej realizovanej štúdie, ktorá porovnávala testovanie QFT a TST u detí z Vietnamu, Filipín a Mexika, podporujú preferenčné používanie testu QFT namiesto TST na testovanie detí narodených v cudzine na latentnú infekciu LTBI (46). Štúdia s obmedzeným kontaktom preukazuje u detí lepšiu prediktívnu hodnotu ako TST (47) a 8-násobne vyššie riziko prechodu do ochorenia TB do dvoch rokov u pacientovi s konverziou QFT v porovnaní s pacientmi bez konverzie (48). U detí, ktoré boli očkované BCG, je prítomný vysoký výskyt nesúhlasných QFT negatívnych/TST pozitívnych výsledkov (46, 49), nebol však pozorovaný žiaden vplyv na reakciu na Mitogen u detí vo veku do 5 rokov (49) a počet neurčitých výsledkov v rámci bežného skríningu detí imigrantov je nízky (46).	152
Tehotenstvo	V podmienkach nízkeho rizika infekcie je test QFT rovnako efektívny v každom trimestri tehotenstva a dosahuje porovnateľné výsledky ako u netehotných žien. Je oveľa viac špecifický, minimálne rovnako citlivý ako TST a môže byť lepším prediktorom progresie ochorenia než TST (50). V podmienkach vysokého rizika infekcie bol test QFT počas tehotenstva stabilnejší a presnejšie odhadoval výskyt LTBI v porovnaní s TST, i keď autori uvádzajú, že tehotenstvo ovplyvňuje oba testy, QFT aj TST (51).	6

Tabuľka pokračuje na ďalšej strane

Tabuľka 7. Vybraté publikované štúdie o QFT (pokračovanie)

Populácia/stav	Výstupy a zistenia	Celkový počet publikovaných štúdií
HIV/AIDS	Testy IGRA aj TST sú ovplyvnené infekciou HIV. Dôkazy naznačujú, že pri interpretácii výsledkov, pri ktorých je počet CD4+ < 200, je potrebné postupovať veľmi uvážene (52). Bolo preukázané, že test QFT bol ovplyvnený menej než testy ELISpot IGRA a TST (53 – 55). Keďže v prípade testu IGRA stačí len jedna návšteva pacienta, je v danom prípade výhodnejší než test TST, pretože pacienti v sledovanej populácii nespolupracujú a neradi sa opätovne vracajú na vyšetrenie. (53).	101
Imunosupresívne terapie	Test QFT je menej ovplyvnený imunosupresívnymi terapiami ako TST a lepšie koreluje s rizikovými faktormi TB (23, 27). QFT má vysokú citlivosť u pacientov s reumatickým ochorením (23, 56, 57) a vyššiu špecificitu než TST, čím sa minimalizujú falošne pozitívne výsledky a znižuje sa počet prípadov následnej nepotrebnej liečby, ktorá by inak bola predpísaná na základe výsledkov testov TST (23, 57, 58).	112
Pracovníci v oblasti zdravotníctva	Bolo preukázané, že tento test je viac špecifický a generuje menej falošne pozitívnych výsledkov ako TST, pričom je zároveň cenovo výhodnejší než test TST (59 – 62). Variabilita v okolí prahovej hodnoty je v prípade sériového testovania očakávaná, a to v dôsledku dichotomickej hraničnej hodnoty a vnútornej variability samotného biologického testu (63). Štúdie preukázali v prípade sériového testovania pracovníkov v oblasti zdravotníctva s nízkym rizikom infekcie vyššie úrovne konverzie/reverzie ako v prípade testu TST (64, 65). Americké centrum US CDC potvrdzuje, že benevolentné kritérium definovania konverzie IGRA môže mať za následok vyšší počet konverzií než v prípade prísnejších kvantitatívnych kritérií testu TST. Pri správe fenoménu konverzie/reverzie sa ukázali byť účinné stratégie opakovaného testovania (65 – 68).	111
Kontakt s TB	Vyššie PPV a NPV ako v prípade testu TST (47), stačí len jedna návšteva, čo je výhodnejšie pre pacientov, ktorí majú problém prísť znova na ďalšie vyšetrenie (63), lepšia korelácia v prípade kontaktu s ochorením (69), čo je špecificky zrejmé v prípade osôb očkovaných BCG a populácií krajín, kde sa očkuje BCG (70, 71).	89
Transplantácia	Bolo preukázané, že tento test je minimálne rovnako efektívny ako TST, je však menej ovplyvnený ochorením orgánov v konečnom štádiu než test TST (22).	23

Tabuľka pokračuje na ďalšej strane

Tabuľka 7. Vybraté publikované štúdie o QFT (pokračovanie)

Populácia/stav	Výstupy a zistenia	Celkový počet publikovaných štúdií
Diabetes	Odporujúce si dôkazy z malého počtu publikácií s obmedzeným počtom pacientov. Štúdia z oblasti s nízkym rizikom infekcie zistila, že citlivosť testu QFT nie je u pacientov s TB ovplyvnená diabetom (72). Štúdia z Tanzánie, realizovaná v podmienkach vysokého rizika infekcie, ktorá naznačuje negatívny vplyv diabetu na vytváranie IFN-γ, nebrala do úvahy možný vplyv iných infekcií, ako je napr. HIV, alebo vplyv cudzopasných organizmov (73). Vo vietnamských štúdiách, ktorých sa zúčastnilo 838 diabetikov (na základe vlastného vyhlásenia) s podozrením na TB v dôsledku abnormálnych výsledkov RTG snímky hrudníka alebo s kultivačne potvrdenou aktívnou formou TB (n = 128), bola pozitivita testu QFT rovná alebo vyššia, než sú hraničné body 10 a 15 mm testu TST (74).	9
Ochorenie obličiek v konečnom štádiu	Pozitívne výsledky testu QFT lepšie korelujú s rizikovými faktormi pre TB ako v prípade testu TST a menej súvisia s očkovaním BCG (75).	45
Imigranti	Štúdie preukazujú, že test QFT na rozdiel od testu TST nie je ovplyvnený očkovaním BCG ani vekom (74). Je preukázané, že test QFT predstavuje cenovo najefektívnejšiu metódu testovania (76). V prípade podmienok s nízkym rizikom infekcie je väčšina infekcií TB detegovaná u osôb narodených v cudzine alebo po reaktivácii latentnej TB po príchode do novej krajiny (77). Výsledky doteraz najväčšej realizovanej štúdie, ktorá porovnávala testovanie QFT a TST u detí imigrantov, podporujú používanie testu QFT namiesto TST na testovanie detí narodených v cudzine na latentnú infekciu TB (46).	29

Technické informácie

Neurčité výsledky

Neurčité výsledky sú neobvyklé a môžu súvisieť s imunitným stavom testovaného jedinca. Súvisieť však môžu aj s mnohými technickými faktormi, ak sa nepostupuje podľa pokynov uvedených vyššie.

Ak predpokladáte, že počas skladovania činidiel, odberu krvi alebo manipulácie s krvnými vzorkami došlo k technickým problémom, zopakujte celý test QFT-Plus s novými vzorkami krvi. Opakovanie testovania stimulovanej plazmy pomocou analýzy ELISA je možné vykonať v prípade, ak predpokladáte nedostatočné premývanie alebo akúkoľvek procedurálnu odchýlku od testu ELISA. Zmena neurčitých výsledkov spôsobených nízkymi hodnotami Mitogen alebo vysokými hodnotami Nil počas opakovania sa nepredpokladá, ak sa v rámci testovania ELISA nevyskytne žiadna chyba. Neurčité výsledky je potrebné interpretovať výlučne ako neurčité. Lekári sa môžu rozhodnúť opakovať odber vzorky alebo vykonať iný postup.

Zrazené plazmové vzorky

Ak v prípade dlhodobého uchovávania plazmových vzoriek dôjde k vytvoreniu fibrínových zrazenín, odstredením vzoriek oddelíte zrazený materiál a zjednodušíte prenos plazmy pipetou.

Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Ďalšie informácie nájdete aj v technických informáciách na stránke **www.QuantiFERON.com**. Kontaktné informácie nájdete na zadnej strane.

Riešenie problémov s analýzou ELISA

Vytvorenie nešpecifickej farby	
Možná príčina	Riešenie
a) Neúplné prepláchnutie doštičky	Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
b) Krížová kontaminácia kalíškov ELISA	Počas pipetovania a miešania vzorky postupujte opatrne, aby ste minimalizovali riziko.
c) Uplynul dátum exspirácie súpravy/komponentov	Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu exspirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do troch mesiacov od dátumu riedenia.
d) Overte, či enzymatický substrátový roztok nie je kontaminovaný	Ak sa vytvorí modré sfarbenie, substrát zlikvidujte. Používajte výlučne čisté nádoby na činidlá.
e) Miešanie plazmy v skúmavkách QFT-Plus pred jej odberom	Po dokončení odstreďovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.
Nízke hodnoty optickej hustoty štandardov	
Možná príčina	Riešenie
a) Chyba riedenia štandardu	Dbajte na to, aby ste pripravovali roztoky štandardu súpravy v súlade s informáciami v tomto príbalovom letáku.
b) Chyba pipetovania	Pipety musia byť kalibrované a je potrebné ich používať v súlade s pokynmi výrobcu.
c) Príliš nízka teplota inkubácie	Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote (22 ±5 °C).
d) Príliš krátka doba inkubácie	Inkubácia doštičky s konjugátom, štandardmi a vzorkami má trvať 120 ±5 minút. Enzymatický substrátový roztok sa inkubuje na doske 30 minút.

e) Použitý nesprávny filter na čítačku doštičiek	Doštička sa má načítať pri vlnovej dĺžke 450 nm s referenčným filtrom s filtračným rozsahom 620 až 650 nm.
f) Činidlá sú príliš studené	Než začnete s analýzou, musia všetky činidlá s konjugátu s koncentráciou 100x nadobudnúť izbovú teplotu. Trvá to približne jednu hodinu.
g) Uplynul dátum exspirácie súpravy/komponentov	Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu exspirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do 3 mesiacov od dátumu zriedenia.

Vysoké hodnoty na pozadí

Možná príčina	Riešenie
a) Neúplné premytie doštičky	Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
b) Príliš vysoká teplota inkubácie	Inkubácia ELISA sa musí vykonávať pri izbovej teplote (22 ±5 °C).
c) Uplynul dátum exspirácie súpravy/komponentov	Dbajte na použitie súpravy pred uplynutím dátumu exspirácie. Dbajte na použitie zriedeného štandardu a konjugátu s koncentráciou 100× do 3 mesiacov od dátumu zriedenia.
d) Overte, či enzymatický substrátový roztok nie je kontaminovaný	Ak sa vytvorí modré sfarbenie, substrát zlikvidujte. Používajte výlučne čisté nádoby na činidlá.

Nelineárna krivka štandardu a variabilita duplikátu

Možná príčina	Riešenie
a) Neúplné premytie doštičky	Doštičku prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok. V závislosti od používanej umývačky sa môže vyžadovať aj viac než 6 premývacích cyklov. Medzi jednotlivými cyklami odporúčame dodržať najmenej 5-sekundovú dobu namočenia.
b) Chyba riedenia štandardu	Dbajte na to, aby ste roztoky štandardu pripravovali v súlade s informáciami v tomto príbalovom letáku.
c) Nedostatočné premiešanie	Činidlá treba pred pridaním na doštičku riadne premiešať preklápaním alebo jemným premiešaním.
d) Nekonzistentný postup pipetovania alebo prerušenie počas realizácie (prípravy) analýzy	Pridávanie vzoriek a štandardov treba vykonávať kontinuálne. Všetky činidlá je potrebné pripraviť pred začatím analýzy.

Bezplatné informácie o produkte a technické príručky získate od spoločnosti QIAGEN alebo od svojho distribútora, prípadne navštívte stránku www.QuantiFERON.com.

Referenčná literatúra

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. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. Eur. Respir. J. 33, 586.

4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 27,907.

5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. Respir. Res. 7, 56.

6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 62, 389.

7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. PLoS ONE 3, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.

8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. Clin. Infect. Dis. 45, 322.

9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot. TB test in contact investigations for tuberculosis. Chest 135, 1010.

10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN-γ assay for the development of active TB disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177, 1164.

11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. Respir. Res. 7, 77.

12. Dogra, S. et al. (2007) Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. J. Infect. 54, 267.

13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. PLoS Med. 4, e55.

14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. Respirology 13, 270.

15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. J. Infect. 56, 348.

16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. Med. Microbiol. Immunol. 198, 33.

17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. JAMA 293, 2756.

18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 12, 1146.

19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. Swiss. Med. Wkly. 138, 267.

20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 175, 737.

21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. Am. J. Ophthalmol. 146, 761.

22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. Am. J. Transplant. 7, 2797.

23. 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.

24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 12, 513.

25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. Emerging Infect. Dis. 12, 1383.

26. Pai, M. et al. (2005) Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. JAMA 293, 2746.

27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. J Rheumatol. 35, 776.

28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. Eur. Respir. J. 32, 524.

29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? Expert Rev. Anti Infect. Ther. 3, 981.

30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol. 103, 2799.

31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. Clin. Biochem. 40, 913.

32. 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.

33. Turner, J. et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. Immunology 87, 339.

34. Brookes, R.H. et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human microphages. Eur. J. Immunol. 33, 3293.

35. Stenger, S. et al. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 282, 121.

36. Lalvani, A. et al. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 270.

37. 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.

38. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. PLoS Pathol. 3, 1240.

39. 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.

40. 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.

41. Nikolova, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75, 277.

42. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.009. Epub.

43. Ongaya, A. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis 93, S60.

44. 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.

45. Long, G., Ji-Chun, M., Min, Jin-Long, L., Jin-Hui, T. (2014) Interferon-γ release assay for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis. Clin. Pediatr. 53, 1255.

46. Howley, M.M. et al. (2015) Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and tuberculin skin tests among immigrant children being screened for latent tuberculosis infection. Ped. Infect. Dis. 34, 35.

47. Diel, R., Loddenkember, R., Niemann, S., Meywald-Walter, K., and Nienhaus, A. (2011) Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon-γ release assay for developing active tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 183, 88.

48. Machingadaize, S. et al. (2012) Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 186, 1051.

49. Riazi, S. et al. (2012) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children using interferon-gamma release assays (IGRAs). Allergy Asthma Proc. 33, 217.

50. Lighter-Fisher, J. and Surette, A-M. (2012) Performance of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection during pregnancy. Obstet. Gynecol. 119, 1088.

51. Mathud, J.S. et al. (2014) Pregnancy differentially impacts performance of latent tuberculosis diagnostics in a high-burden setting. PLoS ONE 9, e92308.

52. Hoffman, M. and Ravn, P. (2010) The use of interferon-gamma release assays in HIV-positive individuals. Eur. Infect. Dis. 4, 23.

53. Cheallaigh, C.N. et al. (2013) Interferon gamma release assays for the diagnosis of latent TB infection in HIV-infected individuals in a low TB burden country. PLoS ONE 8, e53330.

54. Ramos, J. M. et al. (2012) Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB gold in tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. BMC Infect. Dis. 12, 169.

55. Wolf, T. et al. (2013) Tuberculosis skin test, but not interferon-γ releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. J. Infect. 66, 376.

56. Hsia, E.C. et al. (2012) Interferon-γ release assay versus tuberculin skin test prior to treatment with golimumab, a human anti-tumor necrosis factor antibody, in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 64, 2068.

57. Garcovich, S. et al. (2012) Clinical applicability of QuantiFERON-TB-Gold testing in psoriasis patients during long-term anti-TNF-alpha treatment: a prospective, observational study. J. Eur. Acad. Dermatol. Ven. 26, 1572.

58. Kwakernaak, A.J. et al. (2011) A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor α inhibitor. Clin. Rheumatol. 30, 505.

59. Vinton, P. et al. (2009) Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthcare staff and association between positive test results and known risk factors for infection. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 30, 215.

60. de Perio, M.A., Tsevat, J., Roselle, G.A., Kralovic, S.M., and Eckman, M.H. (2009) Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. Arch. Intern. Med. 169, 179.

61. Nienhaus, A. et al. (2008) Evaluation of the interferon-γ release assay in healthcare workers. Int. Arch. Occup. Environ. Health 81, 295.

62. Nienhaus, A. et al. (2011) Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. BMC Health Serv. Res. 11, 247.

63. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Updated guidelines for using interferon-gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection — United States, 2010. MMWR Recomm. Rep. 59 (RR-5), 1.

64. Dorman, S.E. et al. (2014) Interferon-γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 189, 77.

65. Fong, K.S. et al. (2012) Challenges of interferon-gamma release assay conversions in serial testing of health care workers in a tuberculosis control program. Chest 142, 55.

66. Thanassi, W. et al. (2012) Delineating a retesting zone using receiver operating characteristic analysis on serial QuantiFERON tuberculosis test results in US healthcare workers. Pulm. Med. doi: 10.1155/2012/291294. Epub.

67. Behrman, A. et al. (2013) Protecting Health Care Workers from Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Hatlh Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers. J. Occup. Environ. Med. 55, 985.

68. Nienhaus, A., Ringshausen, F.C., Costa, J.T, Schablon, A., and Tripodi, D. (2013) IFN-γ release assay versus tuberculin skin test for monitoring TB infection in healthcare workers. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 11, 37.

69. Arend, S.M. et al. (2007) Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contact. Amer. J. Respir. Crit. Care Med. 175, 618.

70. Mandalakas, A.M., Detjen, A.K., Hesseling, A.C., Benedetti, A., and Menzies, D. (2011) Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 15, 1018.

71. Grinsdale, J.A., Ho, C.S., Banouvong, H., Kwamura, L.M. (2011) Programmatic impact of using QuantiFERON-TB Gold in routine contact investigation activities. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 15, 1614.

72. Walsh, M.C. et al. (2011) Sensitivity of interferon-γ release assays is not compromised in tuberculosis patients with diabetes. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 15, 179.

73. Faurholt-Jespen, D. et al. (2014) Diabetes is associated with lower tuberculosis antigen-specific interferon gamma release in Tanzanian tuberculosis patients and non-tuberculosis controls. Scand. J. Infect. Dis. 46, 384.

74. Painter, J.A. et al. (2013) Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination. PLoS ONE 8, e82727.

75. Rogerson, T.E. et al. (2012) Tests for latent tuberculosis in people with ESRD: a systematic review. Amer. J. Kidney Dis. 61, 33.

76. Pareek, M. et al. (2013) Community-based evaluation of immigrant tuberculosis screening using interferon γ release assays and tuberculin skin testing: observational study and economic analysis. Thorax. 68, 230.

77. CDC, Tuberculosis — United States, 2018. https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6811a2.htm?s_cid=mm6811a2_w Accessed 22 March 2019.

Symboly

Nasledujúce symboly sa môžu objaviť na balení a štítkoch:

Symbol	Definícia symbolu
2 × 96	Postačuje na prípravu 2 × 96 vzoriek
	Výrobca
	Symbol CE-IVD
	Na diagnostické použitie in vitro
	Číslo šarže
	Katalógové číslo
	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
	Dátum použiteľnosti
	Teplotné obmedzenia
	Prečítajte si návod na použitie
	Nepoužívať opakovane
	Chráňte pred slnečným svetlom
	Číslo materiálu
Rn	R označuje revíziu návodu na použitie a n je číslo revízie

Kontaktné informácie

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate na bezplatnom telefónnom čísle 00800 22 44 6000. Môžete tiež navštíviť naše centrum technickej podpory na stránke **www.qiagen.com/contact** alebo kontaktovať niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite si zadnú stranu alebo navštívte stránku **www.qiagen.com**).

Skrátený postup testu

Fáza 1 – inkubácia krvi

1. Odoberte krv do skúmaviek na odber krvi a pretrepte ich obsah desaťkrát (10x), čo postačuje na to, aby sa celý vnútorný povrch skúmavky pokryl krvou. Antigény sa tak rozpustia na stenách skúmavky.

2. Skúmavky inkubujte vo vzpriamenej polohe pri teplote 37 °C ±1 °C po dobu 16 až 24 hodín.

3. Po dokončení inkubácie odstreďujte skúmavky 15 minút pri otáčkach 2 000 až 3 000 × *g* RCF (*g*), aby sa oddelila plazma a červené krvinky.

4. Po dokončení odstreďovania a pred odobratím plazmy plazmu nepipetujte nahor a nadol ani ju žiadnym spôsobom nemiešajte. Neustále dávajte pozor, aby ste nenarušili materiál na gélovom povrchu.

Fáza 2 – IFN-γ ELISA

1. Vykonajte ekvilibráciu komponentov ELISA s výnimkou konjugátu s koncentráciou 100x na izbovú teplotu (22 °C ±5 °C) po dobu najmenej 60 minút.

2. Zrieďte štandard súpravy na 8,0 IU/ml s destilovanou alebo deionizovanou vodou. Pripravte si štyri (4) roztoky štandardu.

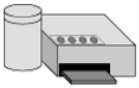
3. Mrazom vysušený konjugát s koncentráciou 100x zrieďte destilovanou alebo deionizovanou vodou.

4. Pripravte si konjugát požadovanej koncentrácie v zelenom riedidle a pridajte 50 µl do všetkých kalíškov.

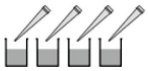
5. Pridajte 50 µl testovaných plazmových vzoriek a 50 µl štandardov do príslušných kalíškov. Obsah premiešajte pomocou trepačky.

6. Inkubujte 120 ±5 minút pri izbovej teplote.

7. Kalíšky prepláchnite najmenej 6-krát pomocou 400 µl premývacieho roztoku na jeden kalíšok.

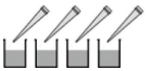


8. Do kalíškov pridajte 100 µl enzymatického substrátového roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



9. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote.

10. Do všetkých kalíškov pridajte 50 µl enzymatického tlmiaceho roztoku. Obsah premiešajte pomocou trepačky.



11. Načítajte výsledky pri vlnovej dĺžke 450 nm s použitím referenčného filtra s filtračným výkonom 620 až 650 nm.

12. Analyzujte výsledky.

Významné zmeny

Časť	Strana	Zmeny
Rôzne	Rôzne	Pridané pokyny týkajúce sa použitia lítium-heparínovej skúmavky alebo skúmavky s heparínom sodným
Rôzne	Rôzne	Pridané pokyny týkajúce sa pracovného postupu odberu krvi pri teplote 2 – 8 °C
Rôzne	Rôzne	Viečko doštičky sa v tejto verzii vyžaduje, aj keď nie je súčasťou balenia.

História revízií príručky

Dokument	Zmeny
R6 04/2019	Zmeny týkajúce sa lítium-heparínovej skúmavky a skúmavky s heparínom sodným Nové pracovné pokyny k pracovnému postupu odberu krvi pri teplote 2 – 8 °C Viečka doštičiek odstránené z doštičiek QF

Ochranné známky: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (skupina QIAGEN), Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Obmedzená licenčná zmluva na používanie analýzy QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa tohto produktu s nasledovnými podmienkami:

1. Produkt sa môže používať výlučne v súlade s protokolmi poskytovanými spolu s produktom a týmto príbalovým letákom a môže sa používať výlučne s komponentmi obsiahnutými v súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tohto panela s akýmikoľvek komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v protokoloch dodávaných spolu s produktom a v tomto príbalovom letáku.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že tento panel a/alebo jeho použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, obnovovať ani predávať, ak spoločnosť QIAGEN neuvádza inak.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k ním napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese **www.qiagen.com**.

© 2019 QIAGEN. Všetky práva vyhradené.

www.QuantiFERON.com

Ázia a oblasť Tichomoria | techservice-ap@qiagen.com

Európa | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Stredný Východ a Afrika | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Latinská Amerika (okrem Brazílie a Mexika) | techservice-latam@qiagen.com

Poznámky

Poznámky