



Kwiecień 2019

QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) ELISA — Ulotka informacyjna

 2 x 96 (622120)
 20 x 96 (622822)

Wersja 1

IVD

Do diagnostyki in vitro

Test wydzielania interferonu gamma (IFN- γ) w krwi pełnej oparty na pomiarze odpowiedzi na antygeny peptydowe ESAT-6 i CFP-10

CE

REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Niemcy

R6 **MAT**

1083163PL

Sample to Insight



Spis treści

Przeznaczenie	5
Podsumowanie i objaśnienie testu	5
Zasady oznaczenia	7
Czas wymagany do przeprowadzenia oznaczenia.....	10
Składniki i przechowywanie	11
Materiały wymagane, ale niedostarczone.....	13
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami.....	14
Probówki do pobierania krwi	14
Odczynniki zestawu	14
Zrekonstruowane i nieużyte odczynniki	14
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	15
Ostrzeżenia	15
Środki ostrożności.....	16
Pobranie próbek i postępowanie z próbkami.....	19
Sposób użycia	26
Etap 1 — inkubacja krwi i zebranie osocza	26
Etap 2 — test ELISA w kierunku IFN- γ	27
Obliczenia i interpretacja wyników testu	33
Generowanie krzywej wzorcowej	33
Kontrola jakości testu	34

Interpretacja wyników.....	34
Ograniczenia	37
Parametry skuteczności	38
Badania kliniczne	38
Parametry skuteczności oznaczenia	44
Informacje techniczne.....	49
Wyniki nieokreślone	49
Skrzepnięte próbki osocza	49
Rozwiązywanie problemów	50
Literatura	52
Symbole	61
Informacje kontaktowe.....	62
Skrócony opis procedury testowej.....	63
Etap 1 — inkubacja krwi.....	63
Etap 2 — test ELISA w kierunku IFN- γ	63
Znaczące zmiany	65
Historia zmian w instrukcji	65

Przeznaczenie

Oznaczenie QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) to test diagnostyczny *in vitro* wykorzystujący koktajl peptydowy naśladujący działanie białek ESAT-6 i CFP-10 w celu stymulacji komórek w heparynizowanej krwi pełnej. Wykrywanie interferonu- γ (IFN- γ) przez oznaczenie immunoenzymatyczne (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) jest wykorzystywane do określenia w warunkach *in vitro* odpowiedzi na antygeny peptydowe powiązane z zakażeniem prątkiem gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus jest testem pośrednim w kierunku zakażenia *M. tuberculosis* (w tym choroby). Jest on przeznaczony do stosowania w połączeniu z oceną ryzyka, radiografią oraz innymi ocenami medycznymi i diagnostycznymi.

Podsumowanie i objaśnienie testu

Gruźlica jest chorobą zakaźną powodowaną przez zakażenie grupą prątków *M. tuberculosis complex* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), które zwykle przenoszą się na nowych gospodarzy przez unoszące się w powietrzu jądra kropelkowe z plwociny pacjentów cierpiących na gruźlicę dróg oddechowych. Nowo zakażone osoby mogą zachorować na gruźlicę w ciągu kilku tygodni lub miesięcy, ale większość nie wykazuje objawów choroby. Utajone zakażenie prątkami gruźlicy (latent tuberculosis infection, LTBI) jest stanem niezakaźnym i bezobjawowym, utrzymującym się u niektórych osób. Takie osoby mogą zapaść na chorobę gruźliczą w ciągu kolejnych miesięcy lub lat. Głównym celem diagnozowania LTBI jest rozważenie terapii mającej na celu zapobieganie rozwojowi choroby gruźliczej. Dotychczas jedyną dostępną metodą diagnozowania LTBI była skórna próba tuberkulinowa (Tuberculin Skin Test, TST). Reakcja skórna na tuberkulinę rozwija się w okresie od 2 do 10 tygodni po zakażeniu. Jednakże część zakażonych pacjentów nie wykazuje reakcji na tuberkulinę — w tym ci, u których różne schorzenia upośledzają funkcjonowanie układu odpornościowego, ale również osoby bez takich schorzeń. z drugiej

strony niektórzy pacjenci, u których zakażenie *M. tuberculosis* jest mało prawdopodobne, wykazują wrażliwość na tuberkulinę, co przekłada się na pozytywny wynik TST po szczepieniu BCG (Bacille Calmette-Guérin), infekcji mykobakteryjnej spowodowanej czynnikiem innym niż bakterie z grupy *M. tuberculosis* complex lub z powodu innych nieokreślonych czynników.

LTBI należy odróżnić od właściwej choroby gruźliczej, która podlega zgłoszeniu i atakuje zwykle płuca oraz dolne drogi oddechowe, chociaż może również obejmować inne układy. Gruźlica jest rozpoznawana na podstawie wywiadu oraz wyników badań fizykalnych, radiologicznych, histologicznych i mykobakteriologicznych.

QFT-Plus to test odpornościowej odpowiedzi komórkowej (Cell-Mediated Immune, CMI) na antygeny peptydowe imitujące białka prątków. Białka te, ESAT-6 i CFP-10, są nieobecne w przypadku wszystkich szczepów bakteryjnych BCG i większości prątków niegruźliczych, oprócz *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1). We krwi osób zakażonych mikroorganizmami z grupy MTB complex zazwyczaj obecne są limfocyty rozpoznające te i inne antygeny mykobakteryjne. Proces rozpoznawania wiąże się z produkcją i wydzielaniem cytokiny IFN- γ . Istotą tego testu jest wykrycie, a następnie ilościowe oznaczenie IFN- γ .

Antygenami używanymi w teście QFT-Plus jest koktajl peptydów naśladujących białka ESAT-6 i CFP-10. W licznych badaniach wykazano, że te antygeny peptydowe stymulują reakcję biosyntezy IFN- γ w limfocytach T pacjentów zakażonych *M. tuberculosis*, lecz zwykle nie wywołują takiej reakcji u osób niezakażonych lub zaszczepionych szczepionką BCG, które nie są chore ani nie należą do grup ryzyka w odniesieniu do LTBI (1–32). Jednakże leczenie lub schorzenia upośledzające funkcjonowanie układu odpornościowego mogą osłabić odpowiedź w postaci IFN- γ . Pacjenci z niektórymi innymi zakażeniami mykobakteryjnymi mogą również reagować na ESAT-6 i CFP-10, ponieważ geny kodujące te białka są obecne w *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1, 23). Test QFT-Plus zarówno wykrywa LTBI, jak i jest pomocny w rozpoznawaniu zakażenia grupą prątków *M. tuberculosis* complex u chorych pacjentów. Pozytywny wynik testu potwierdza rozpoznanie choroby gruźliczej, ale może on być również efektem zakażenia innymi

mykobakteriami (np. *M. kansasii*). W celu potwierdzenia lub wykluczenia choroby gruźliczej niezbędne są inne badania medyczne i diagnostyczne.

W teście QFT-Plus wykorzystywane są dwie różne probówki z antygenami gruźliczymi (TB): probówka TB Antigen Tube 1 (TB1) i probówka TB Antigen Tube 2 (TB2). Obie probówki zawierają antygeny peptydowe z antygenów skojarzonych z grupą MTB complex, ESAT-6 i CFP-10. Podczas gdy probówka TB1 zawiera peptydy z kompleksów ESAT-6 i CFP-10, które mają wywoływać odpowiedź CMI limfocytów pomocniczych T CD4⁺, probówka TB2 zawiera dodatkowy zestaw peptydów, które są ukierunkowane na wywoływanie odpowiedzi CMI cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺. W przebiegu nieleczzonego zakażenia MTB limfocyty T CD4⁺ odgrywają kluczową rolę w kontroli immunologicznej za pośrednictwem wydzielania cytokiny IFN- γ . Udowodniono, że limfocyty T CD8⁺ pełnią ważną rolę w odpowiedzi obronnej gospodarza na MTB poprzez wytwarzanie IFN- γ oraz innych rozpuszczalnych czynników, które aktywują makrofagi, tłumiąc rozwój MTB, zabijając zainfekowane komórki lub bezpośrednio lizując śródkomórkowe bakterie MTB (33–35). Limfocyty CD8⁺ swoiste względem MTB zostały wykryte u pacjentów z LTBI i aktywną gruźlicą w sytuacji, kiedy często wykrywano limfocyty CD8⁺ wytwarzające IFN- γ (36–38). Co więcej, limfocyty T CD8⁺ swoiste dla ESAT-6 i CFP-10 opisuje się jako wykrywane częściej w przypadku aktywnej gruźlicy w porównaniu z LTBI i mogą być kojarzone z niedawnym narażeniem na MTB (39–41). Ponadto u pacjentów z koinfekcją wirusem HIV i aktywną gruźlicą (42, 43) oraz u małych dzieci z gruźlicą (44) wykryto swoiste dla MTB limfocyty T CD8⁺ produkujące IFN- γ .

Zasady oznaczenia

W oznaczeniu QFT-Plus używane są specjalne probówki do pobierania krwi, wykorzystywane do gromadzenia krwi pełnej. Inkubacja krwi w probówkach trwa od 16 do 24 godzin, po upływie których osocze jest zbierane, a następnie testowane na obecność IFN- γ wytwarzanego w odpowiedzi na antygeny peptydowe.

Test QFT-Plus jest wykonywany w dwóch etapach. W pierwszym etapie krew pełna jest pobierana do każdej z probówek QFT-Plus Blood Collection Tube — do probówki Nil, probówki TB1, probówki TB2 oraz probówki Mitogen. Alternatywnym sposobem postępowania jest pobranie krwi do jednej standardowej probówki do pobierania krwi zawierającej heparynę litową lub heparynę sodową jako antykoagulant, a następnie przeniesienie jej do probówek QFT-Plus.

Probówka Mitogen jest wykorzystywana w teście QFT-Plus jako kontrola pozytywna. Może mieć to znaczenie w przypadku, gdy nie ma pewności co do stanu układu odpornościowego badanej osoby. Probówka Mitogen służy również do kontrolowania prawidłowości inkubacji i obchodzenia się z krwią.

Zawartość probówek QFT-Plus jest wstrząsana w celu wymieszania antygeny z krwią, a następnie jak najszybciej powinna zostać poddana inkubacji w temperaturze 37°C (maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania). Po upływie okresu inkubacji trwającego od 16 do 24 godzin probówki należy odwirować, zebrać osocze i zmierzyć stężenie IFN- γ (IU/ml) za pomocą testu ELISA. W teście QFT-Plus ELISA wykorzystywany jest wzorzec rekombinowanego ludzkiego IFN- γ , który oznaczono w odniesieniu do referencyjnego preparatu IFN- γ (nr ref. NIH: Gxg01-902-535). Wyniki próbek testowych są podawane w jednostkach międzynarodowych (International Unit, IU) na ml (IU/ml) w odniesieniu do krzywej wzorcowej przygotowanej poprzez przetestowanie rozcieńczeń wzorca dostarczonego razem z zestawem.

Znany jest zakłócający wpływ na oznaczenia immunologiczne przeciwciał heterofilnych (np. ludzkich przeciwciał anty-mysich), które występują w surowicy lub osoczu niektórych osób. Wpływ przeciwciał heterofilnych na test QFT-Plus ELISA jest minimalizowany poprzez dodatek prawidłowej surowicy mysiej do zielonego rozcieńczalnika i wykorzystanie fragmentów F(ab')₂ przeciwciała monoklonalnego jako przeciwciała wychwytyjącego IFN- γ , którym opłaszczona jest mikropłytką.

Uznaje się, że wynik oznaczenia QFT-Plus jest pozytywny pod kątem odpowiedzi z udziałem IFN- γ na antygeny gruźlicze z dowolnej próbki, jeśli odczyt znacznie przekracza wyrażoną w IU/ml wartość IFN- γ dla próbki zerowej. Próbka osocza z próbki Mitogen służy jako kontrola pozytywna IFN- γ uzyskaną dla próbki Nil. Słaba reakcja na mitogen (<0,5 IU/ml) wskazuje na nieokreślony wynik, gdy próbka krwi także wykazuje negatywną reakcję na antygeny gruźlicze. Taka sytuacja może wystąpić w przypadku niewystarczającej liczby limfocytów, zmniejszonej aktywności limfocytów spowodowanej nieprawidłowym postępowaniem z próbką, nieprawidłowego napełnienia/mieszania zawartości próbki Mitogen lub niezdolności do produkcji IFN- γ przez limfocyty pacjenta. Przy obecności przeciwciał heterofilnych lub wewnętrznego wydzielania IFN- γ w próbce Nil mogą wystąpić podwyższone poziomy IFN- γ . Probówka Nil służy do skorygowania wyników o wartość tła (np. uwzględnienie podwyższonych poziomów krążącego we krwi IFN- γ lub obecności przeciwciał heterofilnych). Poziom IFN- γ w próbce Nil odejmuje się od stężenia IFN- γ w próbkach z antygenami gruźliczymi i próbce Mitogen.

Czas wymagany do przeprowadzenia oznaczenia

Poniżej przedstawiono szacunkowy czas wymagany do przeprowadzenia oznaczenia QFT-Plus ELISA; przedstawiono również czas testowania wielu próbek podzielonych na partie:

Inkubacja próbek z krwią
w temperaturze 37°C:

od 16 do 24 godz.

Test ELISA:

około 3 godziny na jedną płytkę ELISA

(22 próbki)

<1 godzina pracy

Dodatkowy czas od 10 do 15 minut na każdą dodatkową
płytkę

Składniki i przechowywanie

Probówki do pobierania krwi*		200 próbek	Pakiet do stosowania u jednego pacjenta	Pakiet zbiorczy	200 próbek HA	Pakiet do stosowania na dużych wysokościach u jednego pacjenta	Pakiet zbiorczy do stosowania na dużych wysokościach
Nr katalogowy		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Liczba testów na opakowanie		50	10	25	50	10	25
QuantiFERON Nil Tube (szara zatyczka, biały pierścień)	Nil	50 próbek	10 próbek	25 próbek			
QuantiFERON TB1 Tube (zielona zatyczka, biały pierścień)	TB1	50 próbek	10 próbek	25 próbek			
QuantiFERON TB2 Tube (żółta zatyczka, biały pierścień)	TB2	50 próbek	10 próbek	25 próbek			
QuantiFERON Mitogen Tube (fioletowa zatyczka, biały pierścień)	Mitogen	50 próbek	10 próbek	25 próbek			
QuantiFERON Nil HA Tube (szara zatyczka, żółty pierścień)	Nil HA				50 próbek	10 próbek	25 próbek
QuantiFERON TB1 HA Tube (zielona zatyczka, żółty pierścień)	TB1 HA				50 próbek	10 próbek	25 próbek
QuantiFERON TB2 HA Tube (żółta zatyczka, żółty pierścień)	TB2 HA				50 próbek	10 próbek	25 próbek
QuantiFERON Mitogen HA Tube (fioletowa zatyczka, żółty pierścień)	Mitogen HA				50 próbek	10 próbek	25 próbek
Ulotka informacyjna dotycząca próbek QFT-Plus Blood Collection Tube		1	1	1	1	1	1

* W zależności od kraju mogą nie być dostępne wszystkie konfiguracje produktu. Aby uzyskać dodatkowe informacje na temat konfiguracji dostępnych do zamówienia, należy skontaktować się z obsługą klienta firmy QIAGEN (szczegóły na stronie www.qiagen.com).

Składniki zestawu ELISA[†]	2-płytkowy zestaw ELISA	Laboratoryjny pakiet referencyjny
Nr katalogowy	622120	622822
Microplate Strips (Paski mikroplytkowe) (12 x 8 dołków) opłaszczone mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko ludzkiemu IFN- γ	2 x 96-dołkowe paski mikroplytkowe	20 x 96-dołkowe paski mikroplytkowe
IFN- γ Standard (Wzorzec IFN- γ), liofilizowany (zawiera rekombinowany ludzki IFN- γ , kazeinę wołową, tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x fiolka (8 IU/ml po rekonstytucji)	10 x fiolka (8 IU/ml po rekonstytucji)
Green Diluent (Zielony rozcieńczalnik) (zawiera kazeinę wołową, prawidłową surowicę mysia, tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (100x stężony koncentrat koniugatu), liofilizowany (mysie przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu IFN- γ sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP), zawiera tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x 0,3 ml (po rekonstytucji)	10 x 0,3 ml (po rekonstytucji)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x stężony koncentrat buforu płuczącego) (pH 7,2, zawiera ProClin [®] 300 o stężeniu objętościowym 0,05%)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztwór substratu enzymu) (zawiera H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametylobenzodynę)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Roztwór zatrzymujący działanie enzymu) (zawiera 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
QFT-Plus ELISA — Ulotka informacyjna	1	1

[†] Zwroty dotyczące zagrożeń i środki ostrożności podano na stronie 16.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Inkubator z możliwością nastawienia temperatury $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}^*$. Nie jest wymagana atmosfera CO_2
- Skalibrowane pipety o zmiennej objętości*, przeznaczone do dozowania obj. od 10 μl do 1000 μl , z jednorazowymi końcówkami
- Skalibrowane pipety wielokanałowe* umożliwiające dozowanie obj. 50 μl i 100 μl , z jednorazowymi końcówkami
- Wieczko płytki
- Wyrząsarka do mikroplitek*
- Woda dejonizowana lub destylowana, 2 litry
- Płuczka mikroplitek (zalecana płuczka automatyczna)
- Czytnik mikroplitek* wyposażony w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm

* Należy upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Probówki do pobierania krwi

- Probówki do pobierania krwi należy przechowywać w temperaturze od 4°C do 25°C.

Odczynniki zestawu

- Odczynniki zestawu należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C.
- Należy zawsze chronić roztwór substratu enzymu przed bezpośrednim światłem słonecznym.

Zrekonstruowane i nieużyte odczynniki

Instrukcje na temat rekonstruowania odczynników — patrz strona 28.

- Zrekonstruowany wzorec dołączony do zestawu można przechowywać przez okres maksymalnie 3 miesięcy w przypadku przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C. Należy zapisać datę rekonstrukcji wzorca dołączonego do zestawu.
- Po rekonstrukcji nieużyty produkt 100x stężony koncentrat koniugatu należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Musi on zostać wykorzystany w ciągu 3 miesięcy. Należy zapisać datę rekonstrukcji koniugatu.
- Koniugat w stężeniu roboczym należy zużyć w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
- Bufor do płukania w stężeniu roboczym można przechowywać w temperaturze pokojowej przez okres maks. 2 tygodni.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Wyłącznie do celów diagnostyki in vitro.

Ostrzeżenia

- Negatywny wynik testu QFT-Plus nie wyklucza możliwości zakażenia *M. tuberculosis* ani choroby gruźliczej: fałszywe wyniki negatywne mogą wystąpić ze względu na stadium zakażenia (np. próbka została pobrana przed rozwinięciem się komórkowej odpowiedzi odpornościowej), współwystępowanie chorób wpływających na funkcjonowanie układu odpornościowego, nieprawidłowe postępowanie z próbkami do pobierania krwi po nakłuciu żyły, nieprawidłowe wykonanie oznaczenia lub inne zmienne immunologiczne.
- Pozytywny wynik testu QFT-Plus nie powinien stanowić jedynej lub rozstrzygającej podstawy rozpoznania zakażenia *M. tuberculosis*. Nieprawidłowe działanie oznaczenia może powodować uzyskanie fałszywych wyników pozytywnych.
- Pozytywny wynik testu QFT-Plus powinien pociągnąć za sobą dalsze badania medyczne i diagnostyczne pod kątem aktywnej postaci gruźlicy (np. rozmaz i posiew w kierunku prątków kwasoodpornych (AFB), badanie RTG klatki piersiowej).
- Chociaż białka ESAT-6 i CFP-10 są nieobecne w przypadku wszystkich szczepów bakteryjnych BCG i większości znanych prątków niegruźliczych, pozytywny wynik testu QFT-Plus może być wynikiem zakażenia *M. kansasii*, *M. szulgai* lub *M. marinum*. W przypadku podejrzenia takiego zakażenia należy przeprowadzić testy alternatywne.

Środki ostrożności

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.



PRZESTROGA: należy ostrożnie obchodzić się z ludzką krwią i osoczem oraz traktować je jako potencjalne źródło zakażenia. Należy przestrzegać odpowiednich wytycznych dotyczących postępowania z krwią i produktami krwiopochodnymi. Próbkę i materiały, które wejdą w kontakt z krwią lub produktami krwiopochodnymi, należy utylizować zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.

Do składników testu QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA mają zastosowanie następujące zwroty wskazujące na zagrożenia i określające środki ostrożności.

Zwroty dotyczące zagrożeń



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Zawiera: kwas siarkowy. Ostrzeżenie! Może powodować korozję metali. Działa drażniąco na skórę. Powoduje poważne podrażnienie oczu. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Ostrzeżenie! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.



QuantiFERON Green Diluent

Zawiera: 5-hydroksy-1-(4-sulfofenylo)-4-(4-sulfofenyloazo)pirazolo-3-karboksylan trisodu. Zawiera: tartrazynę. Ostrzeżenie! Może powodować reakcję alergiczną skóry. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Zawiera: mieszaninę 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu (3:1). Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. Unikać uwalniania do środowiska.

Zwroty dotyczące środków ostrożności

Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi instrukcjami. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. **W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ** (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Dokładnie opłukać skórę wodą/wziąć prysznic. **W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU:** Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są założone i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. W przypadku narażenia lub problemów: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. Zdjąć skażoną odzież i uprać ją przed ponownym użyciem. Przechowywać w zamkniętym miejscu. Zawartość/pojemnik należy utylizować w zatwierdzonym zakładzie przetwarzania odpadów.

Dodatkowe informacje

Karty charakterystyki: www.qiagen.com/safety

- Odstępstwa od procedur opisanych w dokumencie *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA — Ulotka informacyjna* mogą prowadzić do błędnych wyników. Przed użyciem należy dokładnie przeczytać instrukcję.
- Nie korzystać z zestawu, jeśli przed użyciem którakolwiek z butelek z odczynnikami nosi ślady uszkodzeń lub wycieka z niej płyn.
- **Ważne:** Przed użyciem sprawdzić fiołki. Nie używać fiołek zawierających koniugat lub wzorec IFN- γ Standard, jeśli widoczne są oznaki uszkodzenia lub jeśli doszło do naruszenia gumowej plombki. Nie używać pękniętych fiołek. Aby w bezpieczny sposób zutylizować fiołki, należy postępować zgodnie z odpowiednimi środkami ostrożności. Zalecenie: Aby ograniczyć do minimum ryzyko urazu spowodowanego przez metalowy kapsel, przy otwieraniu fiołek z koniugatem lub wzorcem IFN- γ Standard należy używać narzędzia do zdejmowania kapsli.
- Nie łączyć i nie używać pasków mikropłytkowych, wzorca IFN- γ , zielonego rozcieńczalnika lub produktu C 100x stężonego koncentratu koniugatuz różnych partii zestawów QFT-Plus. Inne odczynniki (20x stężony koncentrat buforu płuczącego, roztwór substratu enzymu i roztwór powstrzymujący działanie enzymu) można wymieniać między zestawami pod warunkiem, że nie upłynęła data ważności odczynników i zarejestrowane są szczegóły serii.
- Niezużyte odczynniki i próbki biologiczne należy zutylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi i krajowymi przepisami.
- Nie używać probówek QFT-Plus Blood Collection Tube ani zestawu ELISA po upływie ich daty ważności.
- Zawsze należy przestrzegać odpowiednich procedur laboratoryjnych.
- Upewnić się, że skalibrowano i zatwierdzono do użytku sprzęt laboratoryjny.

Pobranie próbek i postępowanie z próbkami

W teście QFT Plus wykorzystywane są następujące próbki do pobierania próbek:

1. Probówki Quantiferon Nil Tube (szara zatyczka, biały pierścień)
2. Probówki QuantiFERON TB1 Tube (zielona zatyczka, biały pierścień)
3. Probówki QuantiFERON TB2 Tube (żółta zatyczka, biały pierścień)
4. Probówki QuantiFERON Mitogen Tube (fioletowa zatyczka, biały pierścień)
5. Probówki QuantiFERON HA Nil Tube (szara zatyczka, żółty pierścień)
6. Probówki QuantiFERON HA TB 1 Tube (zielona zatyczka, żółty pierścień)
7. Probówki QuantiFERON HA TB2 Tube (żółta zatyczka, żółty pierścień)
8. Probówki QuantiFERON HA Mitogen Tube (zatyczka, żółty pierścień)

Antygeny zostały poddane liofilizacji na wewnętrznej stronie probówek do pobierania krwi, w związku z czym należy pamiętać o dokładnym wymieszaniu zawartości probówek z krwią. W przypadku pobierania krwi bezpośrednio do probówek QFT-Plus probówki QFT-Plus należy przechowywać i transportować w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), a po pobraniu krwi możliwie jak najszybciej przenieść do inkubatora nastawionego na temperaturę 37°C (maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania). Można również pobrać krew do jednej probówki do pobierania krwi zawierającej heparynę litową lub heparynę sodową jako antykoagulant w celu przechowywania krwi przed przeniesieniem jej do probówek QFT-Plus i inkubacją. Próbkę krwi pobrane do probówek z heparyną litową lub heparyną sodową można przechowywać przez maksymalnie 16 godzin w temperaturze pokojowej ($17\text{--}25^{\circ}\text{C}$), a następnie należy je przenieść do probówek QFT-Plus. Próbkę krwi pobrane do probówek z heparyną litową lub heparyną sodową można również przechowywać w temperaturze $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 48 godzin przed przeniesieniem ich do probówek QFT-Plus. Patrz sekcja „Pobranie krwi do pojedynczej probówki z heparyną litową lub heparyną sodową, a następnie przeniesienie do probówek QFT-Plus Blood Collection Tube”.

Pobranie krwi bezpośrednio do probówek QFT-Plus Blood Collection Tube

1. Odpowiednio oznaczyć probówki.

Sprawdzić, czy po zdjęciu zatyczki wszystkie probówki (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) można zidentyfikować na podstawie etykiety lub w inny sposób.

Zalecane jest zapisanie godziny i daty pobrania krwi.

2. Od każdego pacjenta należy pobrać po 1 ml krwi na probówkę, nakłuwając żyłę i pobierając krew bezpośrednio do poszczególnych probówek do pobierania krwi QFT-Plus Blood Collection Tube. Tę procedurę powinna wykonywać osoba przeszkolona w zakresie pobierania krwi z żył.

Ważna informacja: W czasie napełniania krwią probówki powinny mieć temperaturę pomiędzy 17–25°C.

Standardowych probówek QFT-Plus Blood Collection Tube można używać na wysokości do 810 metrów nad poziomem morza. Probówek do pobierania krwi na dużych wysokościach QFT-Plus Blood Collection Tube można używać na wysokości od 1020 m do 1875 m n.p.m.

Ponieważ probówki o pojemności 1 ml stosunkowo wolno napełniają się krwią, pozostawić probówkę na igle przez 2–3 sekundy od momentu, kiedy napełnianie probówki zdaje się być zakończone. Zagwarantuje to pobranie odpowiedniej objętości.

- Czarny znacznik umieszczony na bokach probówek wskazuje zwalidowaną objętość napełnienia wynoszącą 0,8–1,2 ml. Jeżeli poziom krwi w dowolnej probówce nie mieści się w zakresie wskazywanym znacznikiem, należy pobrać nową próbkę krwi. Niewystarczające lub nadmierne wypełnienie probówek poza zakresem od 0,8 do 1,2 ml może spowodować otrzymanie błędnych wyników.
- W przypadku wykorzystania igły motylkowej do pobrania krwi należy użyć probówki wstępnej, aby przed pobraniem krwi do probówek QFT-Plus upewnić się, że rurka jest wypełniona krwią.
- W przypadku używania probówek QFT-Plus Blood Collection Tube na wysokościach powyżej 810 metrów lub w przypadku pobrania zbyt małej objętości krwi, można ją pobrać strzykawką i natychmiast przenieść po 1 ml

do każdej z 4 próbek. z przyczyn bezpieczeństwa czynność tę najlepiej jest wykonać w następujący sposób: zdjąć igłę ze strzykawki i, przestrzegając odpowiednich procedur bezpieczeństwa, zdjąć zatyczki z 4 próbek QFT-Plus, a następnie przelać po 1 ml krwi do każdej z nich (do wysokości środka czarnego znacznika z boku etykiety). Zatkać starannie próbki za pomocą zatyczek i wymieszać zawartość w opisany poniżej sposób. Sprawdzić, czy po zdjęciu zatyczki wszystkie próbki (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) można zidentyfikować na podstawie etykiety lub w inny sposób.

3. Natychmiast po napełnieniu próbek należy nimi potrząsnąć dziesięć (10) razy, na tyle silnie, aby cała wewnętrzna powierzchnia była pokryta krwią. Umożliwia to rozpuszczenie antygenów, które znajdują się na ściankach próbek.

Ważna informacja: W czasie wytrząsania próbki powinny mieć temperaturę pomiędzy 17–25°C. Nadmierne żywiołowe wytrząsanie może uszkodzić żel i doprowadzić do zafałszowania wyników.

4. Po oznaczeniu, napełnieniu i wstrząśnięciu próbek należy możliwie jak najszybciej przenieść je do inkubatora ustawionego na temperaturę 37°C ± 1°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania krwi. Przed inkubacją próbki należy utrzymywać i transportować w temperaturze pokojowej (22°C ± 5°C). Jeśli zawartość próbek do pobierania krwi QFT-Plus nie będzie inkubowana w temperaturze 37°C od razu po pobraniu krwi i wstrząśnięciu, przed rozpoczęciem inkubacji w temperaturze 37°C należy odwrócić próbki 10 razy, aby wymieszać ich zawartość.
5. Inkubować próbki QFT-Plus w pozycji PIONOWEJ w temperaturze 37°C ± 1°C przez okres od 16 do 24 godzin. Inkubator nie musi być wyposażony w atmosferę CO₂ ani funkcję nawilżania.

Pobranie krwi do pojedynczej próbki z heparyną litową lub heparyną sodową, a następnie przeniesienie do próbek QFT-Plus Blood Collection Tube

1. Krew można pobrać do jednej próbki do pobierania krwi zawierającej heparynę litową lub heparynę sodową jako antykoagulant, a następnie przenieść ją do próbek

QFT-Plus Blood Collection Tube. Jako antykoagulantu krwi należy używać wyłącznie heparyny litowej lub heparyny sodowej, gdyż inne antykoagulanty zakłócają wyniki oznaczenia. Odpowiednio oznaczyć próbówki.

Zalecane jest oznaczanie próbówki godziną i datą pobrania krwi.

Ważne: Podczas pobierania krwi próbówki do pobierania krwi powinny mieć temperaturę pokojową (17–25°C).

2. Napełnić próbówkę do pobierania krwi z heparyną litową lub heparyną sodową (minimalna objętość 5 ml) i delikatnie wymieszać jej zawartość, odwracając próbówkę kilka razy, aby rozpuścić heparynę. Tę procedurę powinna wykonywać osoba przeszkolona w zakresie pobierania krwi z żył.
3. Dostępne opcje określające okresy przechowywania i warunki temperaturowe dla krwi w próbkach z heparyną litową lub heparyną sodową przed przeniesieniem i inkubacją krwi w próbkach QFT-Plus Blood Collection Tube (na Ryc. 1–3 przedstawiono dostępne opcje pobierania krwi).

Opcja 1 — przechowywanie i postępowanie z próbkami z heparyną litową lub heparyną sodową w temperaturze pokojowej Krew pobraną do próbówki z heparyną litową lub heparyną sodową należy przechowywać w temperaturze pokojowej (22°C ± 5°C) przez maksymalnie 16 godzin od momentu pobrania krwi do przeniesienia jej do próbek QFT Plus Blood Collection Tube i dalszej inkubacji.

Opcja 2 — przechowywanie i postępowanie z próbkami z heparyną litową lub heparyną sodową w warunkach chłodniczych

Ważne: Kroki a–d procedury należy wykonywać w określonej kolejności.

- a. Krew pobraną do próbówki z heparyną litową lub heparyną sodową można przechowywać w temperaturze pokojowej (17–25°C) przez maksymalnie 3 godziny po pobraniu krwi.
- b. Krew pobraną do próbówki z heparyną litową lub heparyną sodową można przechowywać w warunkach chłodniczych (2–8°C) przez maksymalnie 48 godzin.

- c. Przed przeniesieniem krwi do probówek QFT-Plus Blood Collection Tube należy wyciągnąć probówkę z heparyną litową lub heparyną sodową z chłodziarki i doprowadzić ją do temperatury pokojowej (17–25°C).
- d. W ciągu 2 godzin od przeniesienia porcji krwi do probówek QFT-Plus Blood Collection Tube należy umieścić je w inkubatorze nastawionym na temperaturę 37°C.

Jeśli zawartość probówek QFT-Plus Blood Collection Tube nie będzie inkubowana w temperaturze 37°C od razu po przeniesieniu jej do tych probówek i wytrząśnięciu, przed rozpoczęciem inkubacji w temperaturze 37°C należy odwrócić probówki 10 razy, aby wymieszać ich zawartość. Całkowity czas od pobrania krwi do inkubacji krwi w probówkach QFT-Plus Blood Collection Tube nie powinien przekraczać 53 godzin.

4. Przeniesienie próbki krwi z probówki z heparyną litową lub heparyną sodową do probówek QFT-Plus Blood Collection Tube:

- a. Odpowiednio oznaczyć każdą probówkę QFT-Plus Blood Collection Tube.
Sprawdzić, czy po zdjęciu zatyczki wszystkie probówki (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) można zidentyfikować na podstawie etykiety lub w inny sposób. Zalecane jest przepisanie zarejestrowanej godziny i daty pobrania krwi z probówek z heparyną litową lub heparyną sodową na probówki QFT-Plus Blood Collection Tube.
- b. Przed rozdzielaniem próbek do probówek QFT Plus Blood Collection Tube należy je dokładnie wymieszać, delikatnie odwracając probówkę.
- c. Rozdzielanie próbek należy wykonać w sposób aseptyczny, przestrzegając odpowiednich procedur bezpieczeństwa. Należy zdjąć zatyczki z 4 probówek QFT-Plus Blood Collection Tube, a następnie dodać po 1 ml krwi do każdej probówki. Szczelnie zamknąć probówki zatyczkami i wymieszać ich zawartość w opisany poniżej sposób. Sprawdzić, czy po zdjęciu zatyczki wszystkie probówki (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) można zidentyfikować na podstawie etykiety lub w inny sposób.

5. Wymieszać zawartość probówek. Natychmiast po napełnieniu probówek QFT-Plus Blood Collection Tube należy nimi potrząsnąć dziesięć (10) razy, na tyle silnie, aby cała wewnętrzna powierzchnia probówek była pokryta krwią. Umożliwia to rozpuszczenie antygenów, które znajdują się na ściankach probówek.

Nadmiernie żywiolowe wytrząsanie może uszkodzić żel i doprowadzić do zafałszowania wyników.

6. Po oznaczeniu, napełnieniu i wstrząśnięciu probówek należy możliwie jak najszybciej przenieść je do inkubatora ustawionego na temperaturę $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, maksymalnie w ciągu 2 godzin. Jeśli zawartość probówek QFT-Plus Blood Collection Tube nie będzie inkubowana w temperaturze 37°C od razu po pobraniu krwi i wstrząśnięciu, przed rozpoczęciem inkubacji w temperaturze 37°C należy odwrócić probówki 10 razy (10x), aby wymieszać ich zawartość. (Na Ryc. 1–3, na kolejnej stronie, przedstawiono dostępne opcje pobierania krwi).
7. Inkubować probówki QFT-Plus Blood Collection Tube w pozycji PIONOWEJ w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez okres od 16 do 24 godzin. Inkubator nie musi być wyposażony w atmosferę CO_2 ani funkcję nawilżania.

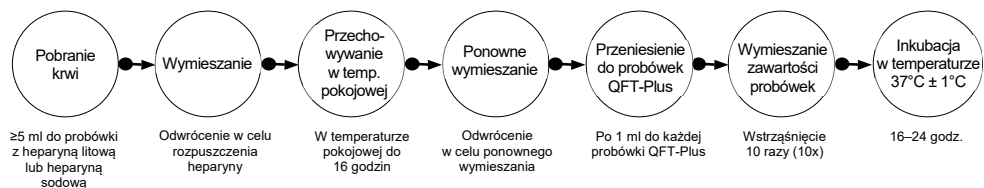
Pobranie krwi do probówek QFT Plus Blood Collection Tube i przechowywanie w temperaturze pokojowej.



Ryc. 1. Opcja pobierania krwi: Bezpośrednie pobranie krwi do probówek QFT-Plus Blood Collection Tube i przechowywanie w temperaturze pokojowej.

Całkowity czas od pobrania krwi do probówek QFT-Plus Blood Collection Tube do inkubacji w temperaturze 37°C nie może przekroczyć 16 godzin.

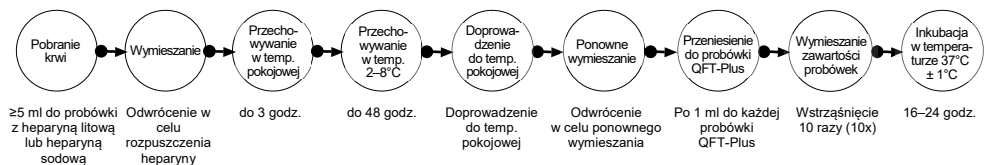
Pobranie krwi do probówki z heparyną litową lub heparyną sodową i przechowywanie w temperaturze pokojowej.



Ryc. 2. Opcja pobierania krwi: Pobranie krwi do probówki z heparyną litową lub heparyną sodową i przechowywanie w temperaturze pokojowej.

Całkowity czas od pobrania krwi do probówki z heparyną litową lub heparyną sodową do inkubacji w temperaturze 37°C nie może przekroczyć 16 godzin.

Pobranie krwi do probówek z heparyną litową lub heparyną sodową i przechowywanie w temperaturze 2–8°C.



Ryc. 3. Opcja pobierania krwi: Pobranie krwi do probówki z heparyną litową lub heparyną sodową i przechowywanie w temperaturze 2–8°C.

Całkowity czas od pobrania krwi do probówki z heparyną litową lub heparyną sodową do inkubacji w temperaturze 37°C nie może przekroczyć 53 godzin.

Sposób użycia

Etap 1 — inkubacja krwi i zebranie osocza

Dostarczone materiały

- Probówki QFT-Plus Blood Collection Tube (patrz sekcja 3)

Materiały wymagane (ale niedostarczone)

- Patrz sekcja 3

Procedura

1. **Jeśli krew nie zostanie poddana inkubacji niezwłocznie po pobraniu, bezpośrednio przed inkubacją należy ponownie wymieszać zawartość probówek, odwracając probówki 10 razy.**
2. **Inkubować probówki w pozycji PIONOWEJ w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez okres od 16 do 24 godzin. Inkubator nie musi być wyposażony w atmosferę CO_2 ani funkcję nawilżania.**
3. **Po zakończeniu inkubacji w temperaturze 37°C probówki do pobierania krwi można przechowywać przed odwirowaniem przez maksymalnie 3 dni w temperaturze od 4°C do 27°C .**
4. **Po inkubacji probówek w temperaturze 37°C próbki są należy odwirować przez 15 minut przy od 2000 do 3000 RCF (g), aby ułatwić zebranie osocza. Czop żelowy oddzieli komórki od osocza. Jeśli tak się nie stanie, probówki należy ponownie odwirować.**

Możliwe jest zebranie osocza bez uprzedniego odwirowania probówek, jednak w takim przypadku należy zachować szczególną ostrożność, aby nie naruszyć komórek.

5. **Próbki osocza należy pobierać jedynie za pomocą pipety.**

Ważna informacja: Po odwirowaniu i przed zebraniem osocza należy unikać pipetowania w górę i w dół i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.

Próbki osocza można przenieść bezpośrednio z probówek z odwirowaną krwią na płytkę testu QFT-Plus ELISA, także w przypadku korzystania z automatycznych stacji roboczych ELISA.

Próbki osocza można przechowywać przez maksymalnie 28 dni w temperaturze od 2°C do 8°C lub, w przypadku zebranego osocza, w temperaturze poniżej -20°C przez dłuższy czas.

W celu zapewnienia odpowiedniej objętości próbek badanych należy zebrać co najmniej 150 µl osocza.

Etap 2 — test ELISA w kierunku IFN- γ

Dostarczone materiały

- Zestaw QFT-Plus ELISA (patrz sekcja 3)

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Patrz sekcja 3

Procedura

1. **Przed użyciem wszystkie próbki osocza i odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową (22°C \pm 5°C). W tym celu należy odczekać co najmniej 60 minut.**
2. **Usunąć z ramki niepotrzebne paski, zamknąć w foliowej saszetce i włożyć z powrotem do chłodziarki w celu przechowywania do momentu, gdy ponownie będą potrzebne.**

Pozostawić co najmniej jeden pasek dla wzorców QFT-Plus oraz liczbę pasków odpowiednią do liczby badanych pacjentów (patrz Ryc. 5). Po użyciu należy zachować ramkę do ponownego użycia z pozostałymi paskami.

- 3. Zrekonstruować wzorzec IFN- γ , dodając objętość wody dejonizowanej lub destylowanej określonej na etykiecie fiołki. Delikatnie wymieszać zawartość fiołki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie odczynnika. Zrekonstruowanie wzorca odpowiednią objętością wody spowoduje otrzymanie roztworu o stężeniu 8,0 IU/ml.**

Ważna informacja: Objętość rekonstrukcji wzorca dołączonego do zestawu będzie różna dla różnych partii.

Użyć zrekonstruowanego wzorca dołączonego do zestawu w celu wykonania rozcieńczenia w stosunku 1 do 2, a następnie serii rozcieńczeń IFN- γ w stosunku 1 do 4 w zielonym rozcieńczalniku (Green Diluent, GD) (patrz Ryc. 4). S1 (wzorzec 1) ma stężenie 4,0 IU/ml, S2 (wzorzec 2) ma stężenie 1,0 IU/ml, S3 (wzorzec 3) ma stężenie 0,25 IU/ml, a S4 (wzorzec 4) ma stężenie 0 IU/ml (sam GD). Wzorce należy oznaczać przynajmniej w dwóch powtórzeniach. Dla każdej sesji testu ELISA należy przygotowywać świeże rozcieńczenia wzorca dołączonego do zestawu.

Zalecana procedura dla wzorców oznaczanych w dwóch powtórzeniach

Oznaczyć 4 probówki „S1”, „S2”, „S3”, „S4.”

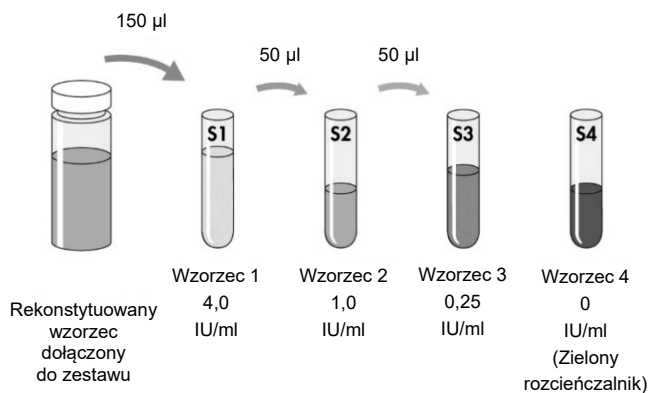
Dodać po 150 μ l GD do probówek S1, S2, S3, S4.

Dodać 150 μ l wzorca dołączonego do zestawu do probówki S1 i dokładnie wymieszać.

Przenieść 50 μ l roztworu z probówki S1 do probówki S2 i dokładnie wymieszać.

Przenieść 50 μ l roztworu z probówki S2 do probówki S3 i dokładnie wymieszać.

Sam GD służy jako wzorzec zerowy (S4).



Ryc. 4. Przygotowanie krzywej wzorcowej.

4. **Zrekonstruować liofilizowany produkt 100x stężony koncentrat koniugatu za pomocą 0,3 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. za pomocą 0,3 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Delikatnie wymieszać zawartość fiolki, aby zminimalizować spienianie i zapewnić całkowite rozpuszczenie koniugatu.**

Stężenie robocze koniugatu jest przygotowywane poprzez rozcieńczenie zielonym rozcieńczalnikiem wymaganej ilości zrekonstruowanego 100x stężonego koncentratu koniugatu (Tabela 1. Przygotowywanie koniugatu). Natychmiast po użyciu niewykorzystaną część 100x stężonego koncentratu koniugatu należy z powrotem umieścić w temperaturze od 2°C do 8°C. Używać wyłącznie zielonego rozcieńczalnika.

Tabela 1. Przygotowywanie koniugatu

Liczba pasków	Objętość 100x stężonego koncentratu koniugatu	Objętość zielonego rozcieńczalnika
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. W przypadku próbek osocza zebranych z probówek do pobierania krwi, a następnie przechowywanych (w chłodziarce lub zamrażarce) przed przeprowadzeniem testu należy je wymieszać przed dodaniem do dołków płytki ELISA.

Ważna informacja: W przypadku dodawania próbek osocza bezpośrednio z odwirowanych probówek QFT-Plus należy unikać mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.

6. Za pomocą pipety wielokanałowej dodać po 50 µl świeżo przygotowanego koniugatu w stężeniu roboczym do odpowiednich dołków płytki ELISA.

7. Za pomocą pipety wielokanałowej dodać po 50 µl badanych próbek osocza do odpowiednich dołków (patrz zalecany układ płytki na Ryc. 5). Na końcu dodać po 50 µl wzorców od 1 do 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

Ryc. 5. Zalecany układ próbek (22 testy na płytkę)

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

1 N (próbka 1., osocze Nil), 1 TB1 (próbka 1. osocza dla TB1), 1 TB2 (próbka 1. osocza dla TB2), 1 M (próbka 1. osocze Mitogen)

8. Przykryć wszystkie płytki wieczkiem i dokładnie wymieszać koniugat i próbki osocza/wzorce, korzystając z wstrząsarki mikroplytkowej, przez 1 minutę. Unikać rozbryzgiwania.

9. Przykryć wszystkie płytki i inkubować w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) przez 120 ± 5 minut.

Podczas inkubacji nie należy narażać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

10. W czasie inkubacji rozcieńczyć jedną obj. 20x stężonego koncentratu buforu płuczącego, dodając 19 obj. dejonizowanej lub destylowanej wody, a następnie dokładnie wymieszać. Dostarczona objętość 20x stężonego koncentratu buforu płuczącego wystarcza do przygotowania 2 litrów buforu do płukania w stężeniu roboczym.

Wykonać co najmniej 6 cykli przemywania dołków za pomocą **400 μl** buforu do płukania w stężeniu roboczym. Zalecane jest używanie płuczki automatycznej.

Dokładne przepłukanie studzienek ma bardzo duży wpływ na skuteczność oznaczenia. Podczas każdego cyklu przemywania wszystkie dołki powinny być **całkowicie wypełnione** buforem do płukania. Między cyklami zalecane jest pozostawienie roztworu w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund.

Do zbiornika na wodę zużytą do mycia należy dodać standardowy laboratoryjny środek dezynfekujący. Należy też przestrzegać obowiązujących procedur w zakresie odkażania potencjalnie zakaźnego materiału.

- 11. Położyć płytki skierowane górną częścią w dół na papierowym ręczniku niepozostawiającym kłaczków, aby usunąć resztki buforu do płukania. Dodać po 100 µl roztworu substratu enzymu do każdego dołka, przykryć wszystkie płytki wieczkiem i dokładnie wymieszać za pomocą wstrząsarki mikroplytkowej.**
- 12. Przykryć wszystkie płytki i inkubować w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) przez 30 minut.**

Podczas inkubacji nie należy narażać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

- 13. Po zakończeniu 30-minutowej inkubacji dodać po 50 µl roztworu powstrzymującego działanie enzymu do każdego dołka i wymieszać.**

Roztwór powstrzymujący działanie enzymu należy dodawać do poszczególnych dołków zgodnie z kolejnością i szybkością zastosowaną w przypadku substratu w kroku 11.

- 14. W ciągu 5 minut od zatrzymania reakcji zmierzyć gęstość optyczną (Optical Density, OD) roztworu w każdej studziencie, używając czytnika mikroplytek wyposażonego w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm. Wartości OD są używane do obliczenia wyników.**

Obliczenia i interpretacja wyników testu

Do analizy danych surowych i obliczania wyników można użyć oprogramowania QFT Plus Analysis Software. Jest ono dostępne na stronie www.QuantiFERON.com. Należy upewnić się, że używana jest najnowsza wersja oprogramowania QFT-Plus Analysis Software.

Oprogramowanie przeprowadza kontrolę jakości oznaczenia, tworzy krzywą wzorcową i generuje wyniki testów dla poszczególnych pacjentów w sposób opisany w sekcji Interpretacja wyników.

Zamiast korzystania z oprogramowania QFT-Plus Analysis Software wyniki można również uzyskać następującą metodą.

Generowanie krzywej wzorcowej

(Jeśli nie jest używane oprogramowanie QFT-Plus Analysis Software)

Określić średnie wartości OD dla powtórzeń wzorca dołączonego do zestawu znajdujących się na każdej płytce.

Wyznaczyć krzywą wzorcową $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$, wykreślając $\log_{(e)}$ ze średniej wartości OD (oś y) względem $\log_{(e)}$ ze stężenia wzorców IFN- γ wyrażonego w IU/ml (oś x), pomijając w tych obliczeniach wzorzec zerowy. Obliczyć linię najlepszego dopasowania dla krzywej wzorcowej, wykonując analizę regresji.

Na podstawie krzywej wzorcowej określić stężenie IFN- γ (IU/ml) dla każdej badanej próbki osocza, korzystając z wartości OD każdej z próbek.

Obliczenia te można wykonać za pomocą pakietów oprogramowania dostępnych z czynnikami do mikropłytek oraz standardowych arkuszy kalkulacyjnych lub oprogramowania statystycznego (np. Microsoft® Excel®). Zaleca się korzystanie z tych

pakietów do wyznaczenia parametrów regresji, współczynnika zmienności (coefficient of variation, %CV) dla wzorców oraz współczynnika korelacji (r) krzywej wzorcowej.

Kontrola jakości testu

Dokładność wyników testu zależy od utworzenia dokładnej krzywej wzorcowej. W związku z tym przed interpretacją wyników próbek badanych należy sprawdzić wyniki otrzymane dla próbek wzorcowych.

Aby test ELISA był ważny:

- Średnia wartość OD wzorca 1 musi być $\geq 0,600$.
- %CV wartości OD uzyskanych dla powtórzeń wzorca 1 i 2 musi być $\leq 15\%$.
- Wartości OD uzyskane dla powtórzeń wzorca 3 i 4 nie mogą różnić się od ich średniej o więcej niż 0,040 jednostki gęstości optycznej.
- Współczynnik korelacji (r) obliczony na podstawie średnich wartości absorbancji wzorców musi być $\geq 0,98$.

Oprogramowanie QFT-Plus Analysis Software oblicza i raportuje te parametry kontroli jakości.

Jeśli nie są spełnione powyższe kryteria, test nie jest ważny i należy go powtórzyć.

Średnia wartość OD dla wzorca zerowego (zielony rozcieńczalnik) powinna być $\leq 0,150$.

Jeśli średnia wartość OD jest $> 0,150$, należy sprawdzić, czy procedura płukania płytki została wykonana poprawnie.

Interpretacja wyników

Wyniki testu QFT-Plus są interpretowane z wykorzystaniem następujących kryteriów (Tabela 2):

Ważna informacja: Stawianie rozpoznania lub wykluczanie choroby gruźliczej oraz ocena prawdopodobieństwa wystąpienia LTBI wymaga przeanalizowania wyników badań epidemiologicznych, medycznych i diagnostycznych oraz historii medycznej pacjenta, które należy uwzględnić, interpretując wyniki testu QFT-Plus.

Tabela 2. Interpretacja wyników testu QFT-Plus

Wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki TB1 minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki TB2 minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)	Wynik dla próbki Mitogen minus wynik dla próbki Nil (IU/ml)*	Wyniki testu QFT-Plus	Raport/interpretacja
	≥0,35 i ≥25% wartości próbki Nil	Dowolny			
	Dowolny	≥0,35 i ≥25% wartości próbki Nil	Dowolny	Pozytywny†	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> jest prawdopodobne
≤8,0	<0,35 lub ≥0,35 i <25% wartości próbki Nil	<0,35 lub ≥0,35 i <25% wartości próbki Nil	≥0,5	Negatywny	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> NIE jest prawdopodobne
	<0,35 lub ≥0,35 i <25% wartości próbki Nil	<0,35 lub ≥0,35 i <25% wartości próbki Nil	<0,5	Nieokreślony‡	Nie można określić prawdopodobieństwa zakażenia <i>M. tuberculosis</i>
>8,0§		Dowolny		Nieokreślony‡	Nie można określić prawdopodobieństwa zakażenia <i>M. tuberculosis</i>

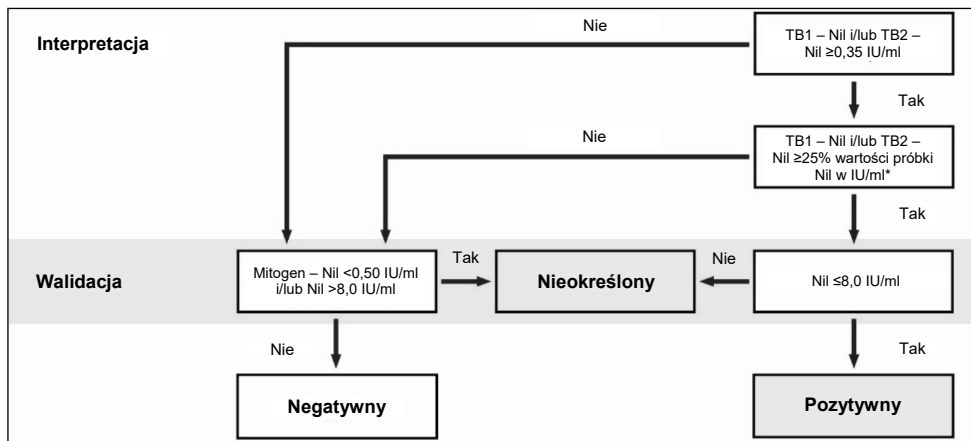
* Wyniki odpowiedzi na kontrolę pozytywną zawierającą Mitogen (i czasem na próbkę z antygenami TB) mogą wykraczać poza zakres odczytu czynnika mikroplątek. Nie ma to wpływu na wyniki testu. Wartości >10 ml są zgłaszane przez oprogramowanie QFT-Plus jako >10 IU/ml.

† Jeśli zakażenie *M. tuberculosis* nie jest podejrzewane, a uzyskano wstępne wyniki pozytywne, można je potwierdzić, ponownie badając oryginalne próbki osocza w dwóch powtórzeniach za pomocą testu QFT-Plus ELISA. Jeśli wynik jednego lub obu powtórzonych testów jest pozytywny, wynik dla pacjenta należy uznawać za pozytywny.

‡ Informacje na temat możliwych przyczyn zostały zamieszczone w sekcji „Rozwiązywanie problemów”.

§ W badaniach klinicznych u mniej niż 0,25% pacjentów zareportowano stężenie IFN-γ >8,0 IU/ml dla próbki Nil.

Wielkości zmierzonego poziomu IFN-γ nie można skorelować z etapem (stadium) infekcji, poziomem odpowiedzi odpornościowej ani prawdopodobieństwem rozwoju aktywnej postaci choroby. Dodatnia odpowiedź gruźlicza u osób z ujemnym wynikiem na mitogen jest rzadka, lecz była odnotowywana u pacjentów z gruźlicą. Wskazuje to na fakt większego nasilenia odpowiedzi IFN-γ na antygen gruźliczy niż odpowiedzi na mitogen, co może mieć miejsce, ponieważ poziom mitogenu nie powoduje maksymalnego stymulowania produkcji IFN-γ przez limfocyty.



* Aby wartość TB1 minus wynik próbki Nil lub TB2 minus wynik próbki Nil była ważna, wartość $\geq 25\%$ wartości próbki Nil (IU/ml) musi pochodzić z tej samej próbki, co oryginalny wynik $\geq 0,35$ IU/ml.

Ryc. 6. Schemat interpretacji wyników testu QFT-Plus

Ograniczenia

Z wyników testów QFT-Plus należy korzystać w kontekście historii epidemiologicznej, obecnego stanu klinicznego oraz wyników innych badań diagnostycznych pacjenta.

Pacjentom, u których wartości dla próbki Nil przekraczają 8,0 IU/ml, przypisuje się wynik testu „nieokreślony”, ponieważ wyższa o 25% reaktywność w odpowiedzi na antygeny gruźlicze może wykraczać poza zakres pomiarowy oznaczenia.

Niepewne lub nieokreślone wyniki mogą być spowodowane:

- odstępstwem od procedury opisanej w tej ulotce informacyjnej dołączonej do opakowania;
- zbyt wysokimi poziomami krążącego we krwi IFN- γ lub obecnością przeciwciał heterofilnych;
- przekroczeniem 16 godzin między pobraniem próbki krwi a inkubacją w temperaturze 37°C. Nie dotyczy procedury wykonywanej w temperaturze 2–8°C, w której stosowana jest probówka z heparyną litową lub heparyną sodową.

Parametry skuteczności

Badania kliniczne

Z powodu braku rozstrzygającego testu wzorcowego w zakresie LTBI nie można praktycznie ocenić czułości i swoistości testu QFT-Plus. Swoistość testu QFT-Plus oszacowano w przybliżeniu, oceniając liczbę fałszywych wyników pozytywnych u osób o niskim ryzyku zakażenia gruźlicą (brak znanych czynników ryzyka). Czułość oszacowano w przybliżeniu, oceniając grupy pacjentów z potwierdzoną przez posiew aktywną postacią gruźlicy.

Swoistość

W celu oceny swoistości testu QFT-Plus przeprowadzono badanie, do którego włączono 409 pacjentów. Informacje demograficzne i czynniki ryzyka dotyczące narażenia na gruźlicę określono przy użyciu standaryzowanej ankiety przeprowadzanej podczas badania.

W podsumowaniu wyników pochodzących z 2 grup pacjentów z niskim ryzykiem (brak znanych czynników ryzyka) zakażenia gruźlicą ogólna swoistość testu QFT-Plus wyniosła 97,6% (399/409) (Tabela 3 i Tabela 4).

Tabela 3. Wyniki badania swoistości testu QFT-Plus według ośrodka badawczego

Badanie	Pozytywny	Negatywny	Nieokreślony	Swoistość (95-procentowy przedział ufności)
Japonia	4	203	0	98% (95–100%)
Australia	6	196	0	97% (94–99%)

Tabela 4. Wyniki badania swoistości testu QFT-Plus według próbówki z antygenem TB

Badanie	TB1	TB2	QFT-Plus
Pozytywny	5	10	10
Negatywny	404	399	399
Nieokreślony	0	0	0
Swoistość (95-procentowy przedział ufności)	98,8% (97,2–99,6)	97,6% (95,6–98,8)	97,6% (95,6–98,8)

Czułość wykrywania aktywnej postaci gruźlicy

W związku z brakiem rozstrzygającego testu na zakażenie LTBI, odpowiednim narzędziem zastępczym jest posiew mikrobiologiczny *M. tuberculosis*, ponieważ pacjenci chorzy są z definicji zakażeni. Pacjenci z podejrzeniem gruźlicy z 4 ośrodków badawczych na terenie Australii i Japonii, u których następnie przez posiew potwierdzono zakażenie *M. tuberculosis*, zostali przebadani w celu oceny czułości testu QFT-Plus (Tabela 5 i Tabela 6). Pacjenci przed pobraniem krwi do testów QFT-Plus zostali poddani leczeniu trwającemu krócej niż 14 dni.

W podsumowaniu wyników pochodzących z 4 grup pacjentów z dodatnim wynikiem posiewu *M. tuberculosis* łączna czułość testu QFT-Plus dla aktywnej gruźlicy wyniosła 95,3% (164/172). W 4 grupach dodatni wynik zarówno w próbówce TB1, jak i TB2 uzyskano u 159 pacjentów, 1 pacjent uzyskał dodatni wynik wyłącznie w próbówce TB1, a 4 wyłącznie w próbówce TB2. Łącznie 1,1% (2/174) wyników było nieokreślonych. Wynik próbówki TB2 poprawnie zidentyfikował 1 pacjenta z dodatnim wynikiem gruźlicy potwierdzonym przez posiew, którego wynik w samym badaniu przy użyciu próbówki TB1 był nieokreślony (niski poziom mitogenu) (Tabela 5 i Tabela 6).

Tabela 5. Badanie czułości testu QFT-Plus według ośrodka

Ośrodki badawcze	Pozytywny	Negatywny	Nieokreślony	Czułość testu QFT-Plus* (95-procentowy przedział ufności)
1. ośrodek w Japonii	36	7	0	84% (69–93)
2. ośrodek w Japonii	53	1	2	98% (90–100)
3. ośrodek w Japonii	54	0	0	100% (93–100)
Ośrodek w Australii	21	0	0	100% (84–100)

* Czułość została opracowana na podstawie łącznej liczby ważnych testów z wyłączeniem wyników nieokreślonych.

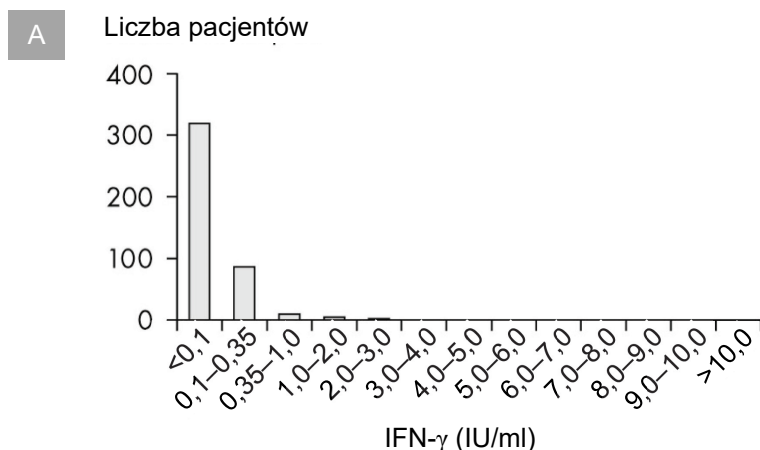
Tabela 6. Badanie czułości testu QFT-Plus według próbki z antygenem TB

	TB1	TB2	QFT-Plus
Pozytywny	160	163	164
Negatywny	11	9	8
Nieokreślony	3	2	2
Czułość [†] (95-procentowy przedział ufności)	93,6% (88,8–96,7)	94,8% (90,3–97,6)	95,3% (90,9–97,9)

* Czułość została opracowana na podstawie łącznej liczby ważnych testów z wyłączeniem wyników nieokreślonych.

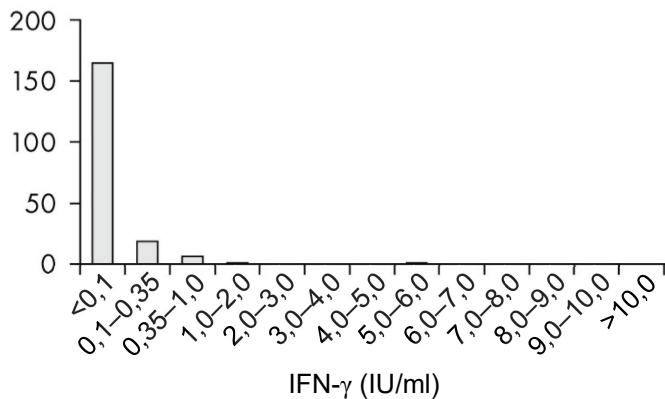
Zaobserwowany rozkład odpowiedzi — ze stratyfikacją według ryzyka

W badaniach klinicznych zaobserwowano zakres związanych z IFN- γ odpowiedzi na próbkę TB1, TB2 i próbkę kontrolną, które to wyniki poddano stratyfikacji według ryzyka zakażenia *M. tuberculosis* (Ryc. 7–9). Grupa mieszanego ryzyka składała się z pacjentów reprezentatywnych dla ogólnej populacji podlegającej badaniu, łącznie z pacjentami obciążonymi i nieobciążonymi czynnikami ryzyka narażenia na gruźlicę oraz pacjentami, w przypadku których aktywne zakażenie gruźlicą jest mało prawdopodobne (tj. LTBI).



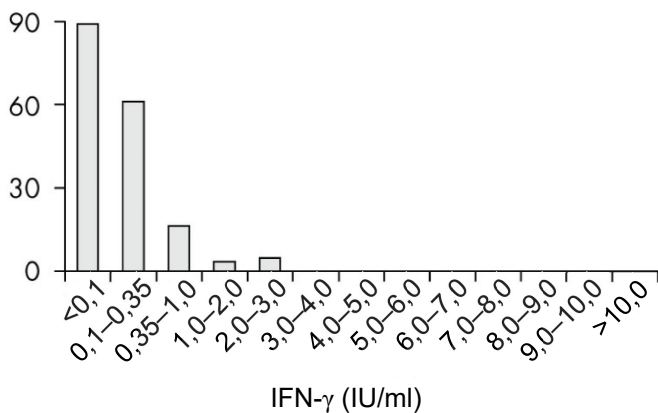
B

Liczba pacjentów

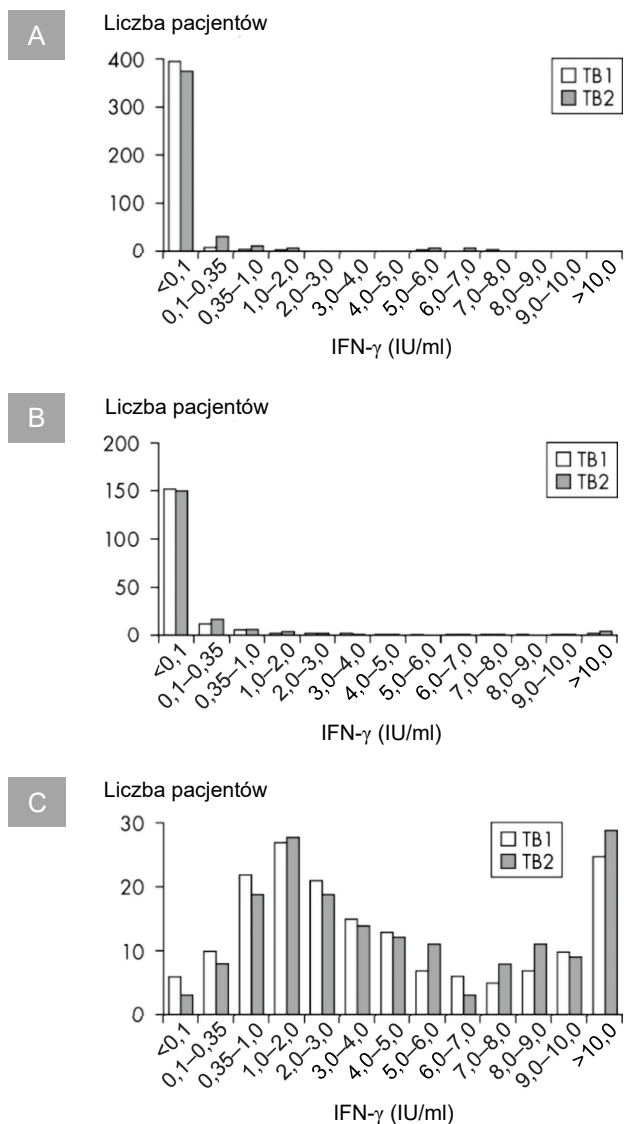


C

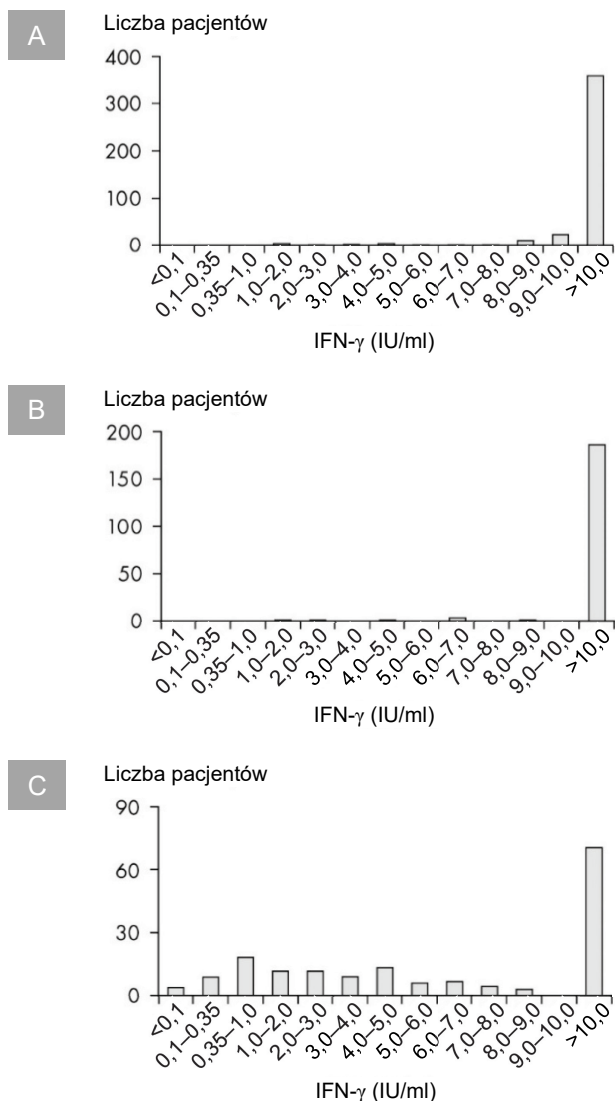
Liczba pacjentów



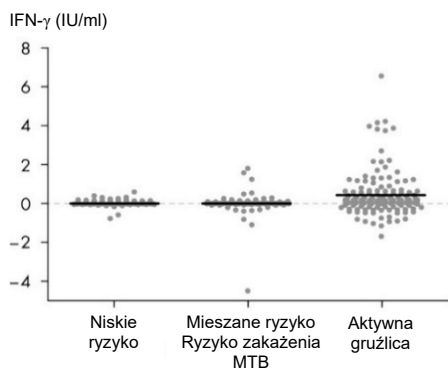
Ryc. 7. Rozkład wartości próbówki Nil. **A.** Rozkład wartości próbówki Nil w populacji niskiego ryzyka (n=409). **B.** Rozkład wartości próbówki Nil w populacji mieszanego ryzyka (n=194). **C.** Rozkład wartości próbówki Nil w populacji z potwierdzonym przez posiew zakażeniem *M. tuberculosis* (n=174).



Ryc. 8. Rozkład wartości próbki TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbki zerowej). **A.** Rozkład wartości próbki TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbki zerowej) w populacji niskiego ryzyka (n=409). **B.** Rozkład wartości próbki TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbki zerowej) w populacji mieszanego ryzyka (n=194). **C.** Rozkład wartości próbki TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbki zerowej) z potwierdzonym przez posiew zakażeniem *M. tuberculosis* (n=174).



Ryc. 9. Rozkład wartości próbki Mitogen (po odjęciu wartości próbki zerowej). **A.** Rozkład wartości próbki Mitogen (po odjęciu wartości próbki zerowej) w populacji niskiego ryzyka (n=409). **B.** Rozkład wartości próbki Mitogen (po odjęciu wartości próbki zerowej) w populacji mieszanego ryzyka (n=194). **C.** Rozkład wartości próbki Mitogen (po odjęciu wartości próbki zerowej) w populacji z potwierdzonym przez posiew zakażeniem *M. tuberculosis* (n=169).

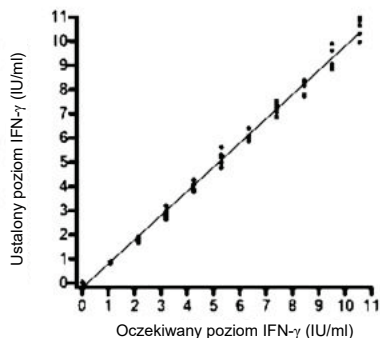


Ryc. 10. Zaobserwowana różnica pomiędzy wartościami próbki TB1 i TB2 (po odjęciu wartości próbki zerowej), stratyfikacja według ryzyka. Populacja niskiego ryzyka (n=409), populacja mieszanego ryzyka (n=189) i populacja, w której przez posiew potwierdzono infekcję *M. tuberculosis* (n=141). Wartości próbki TB1 odjęto od wartości próbki TB2. Wykluczono pacjentów z wartością dla próbki TB1 lub TB2 >10,0 IU/ml, ponieważ taka wartość wykracza poza zakres liniowości oznaczenia.

Parametry skuteczności oznaczenia

Liniowość testu QFT-Plus ELISA wykazano poprzez losowe naniesienie na płytkę ELISA 5 powtórzeń 11 pul osocza o znanym stężeniu IFN- γ . Prosta regresji liniowej ma nachylenie równe $1,002 \pm 0,011$ i współczynnik korelacji wynoszący 0,99 (Ryc. 11).

Próg wykrywalności testu QFT-Plus ELISA wynosi 0,065 IU/ml. Nie wykazano występowania efektu haka przy wysokiej dawce (zjawiska prozony) przy stężeniu IFN- γ do 10 000 IU/ml.



Ryc. 11. Profil liniowości testu QFT-Plus ELISA

Niedokładność wewnątrz oznaczenia i pomiędzy oznaczeniami (%CV) testu QFT-Plus ELISA oszacowano, badając 20 próbek osocza o różnym stężeniu IFN- γ . Każdy test został przeprowadzony w 3 powtórzeniach, w 3 różnych laboratoriach, w 3 nienastępujących po sobie dniach, przez 3 różnych operatorów. W ten sposób każda próbka została przetestowana 27 razy w ramach 9 niezależnych testów. Jedna próbka stanowiła kontrolną próbkę zerową o obliczonym stężeniu IFN- γ wynoszącym 0,08 IU/ml (95-procentowy przedział ufności: 0,07–0,09). Wśród pozostałych 19 próbek osocza stężenie wahało się od 0,33 (95-procentowy przedział ufności: 0,31–0,34) do 7,7 IU/ml (95-procentowy przedział ufności: 7,48–7,92).

Niedokładność wewnątrz serii lub wewnątrz oznaczenia oszacowano poprzez wyznaczenie średniego współczynnika zmienności wyrażonego w % (%CV) dla każdego badanego osocza zawierającego IFN- γ z każdej serii płytek (n=9). Poziom niedokładności wahał się od 4,1 do 9,1 %CV. Średni %CV wewnątrz serii (\pm 95-procentowy przedział ufności) wyniósł $6,6 \pm 0,6\%$. Średnia wartość dla próbki z zerowym stężeniem IFN- γ w osoczu wyniosła 14,1% CV.

Niedokładność całkowitą lub pomiędzy oznaczeniami określono, porównując 27 obliczonych stężeń IFN- γ dla każdej badanej próbki osocza. Współczynnik niedokładności pomiędzy oznaczeniami wahał się od 6,6% do 12,3% CV. Całkowity średni %CV (\pm 95-procentowy przedział ufności) wyniósł $8,7 \pm 0,7\%$. Współczynnik zmienności dla próbki z zerowym stężeniem IFN- γ w osoczu wyniósł 26,1 %CV. Oczekiwano takiego poziomu zmienności, ponieważ obliczone stężenie IFN- γ jest niskie i wahania wokół niskiej wartości szacunkowej są większe niż w przypadku wysokiego stężenia.

Odtwarzalność testu QFT-Plus ustalono za pomocą próbek krwi pobranych od 102 pacjentów z mieszanymi czynnikami ryzyka zakażenia *M. tuberculosis*. Oceniano trzech różnych operatorów i warunki w trzech laboratoriach.

Dla każdego pacjenta wykonano łącznie 3 oznaczenia diagnostyczne (306 oznaczeń łącznie dla wszystkich pacjentów). Ogółem odtwarzalność diagnostyczna wyniosła 99% (95-procentowy przedział ufności: 97,2–99,7), gdzie wynik testu diagnostycznego był zgodny dla 303 z 306 oznaczeń. Zmienność ograniczała się do wyników 3 pacjentów, które były bliskie wartości odcięcia.

Rozpoznanie LTBI

Opublikowano wyniki wielu badań wykazujących skuteczność testu QFT, poprzednika testu QFT-Plus, w różnych populacjach obarczonych ryzykiem zakażenia MTB. Kluczowe wyniki wybranych badań przedstawia Tabela 7.

Tabela 7. Wybrane opublikowane badania dotyczące testu QFT

Populacja/warunki	Wyniki i wnioski	Całkowita liczba opublikowanych badań
Pediatrya	Udowodniona skuteczność testu u dzieci, w tym dzieci w wieku poniżej 5 lat (45–46), z wyższą dokładnością niż test IGRa działający na zasadzie ELISpot (8). Wyniki największego przeprowadzonego do tej pory badania porównującego test QFT i TST u dzieci z Wietnamu, Filipin i Meksyku potwierdzają zasadność preferencyjnego stosowania testu QFT w stosunku do TST przy badaniu dzieci urodzonych za granicą pod kątem LTBI (46). Badanie z ograniczoną liczbą kontaktów wykazało u dzieci lepszą wartość predykcyjną testu QFT niż testu TST (47) oraz 8-krotnie wyższe ryzyko progresji do gruźlicy w ciągu dwóch lat wśród osób przechodzących konwersję w teście QFT w porównaniu do osób jej nieprzechodzących (48). Niezgodność pomiędzy wynikami negatywnymi w teście QFT i pozytywnymi w teście TST jest na wysokim poziomie w grupie dzieci zaszczepionych szczepionką BCG (46, 49), lecz nie miało to wpływu na odpowiedź w przypadku mitogenu u dzieci w wieku poniżej 5 lat (49). Ponadto występował niski odsetek wyników nieokreślonych podczas rutynowych badań przesiewowych dzieci imigrantów (46).	152
Ciąża	W środowisku o niskim obciążeniu test QFT ma taką samą skuteczność we wszystkich trymestrach ciąży, z wynikami porównywalnymi do wyników uzyskiwanych u kobiet, które nie są w ciąży, ze znacznie wyższą swoistością i przynajmniej taką samą czułością w porównaniu do testu TST. Istnieje możliwość, że test QFT może być lepszym czynnikiem prognostycznym progresji choroby niż test TST (50). W środowisku o wysokim obciążeniu test QFT wykazywał się większą stabilnością w trakcie ciąży i pozwalał dokładniej określać częstotliwość występowania LTBI w porównaniu do testu TST, chociaż autorzy badania postawili tezę, że ciąża wpływa zarówno na test QFT, jak i TST (51).	6

ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Tabela 7. Wybrane opublikowane badania dotyczące testu QFT (ciąg dalszy)

Populacja/warunki	Wyniki i wnioski	Całkowita liczba opublikowanych badań
HIV/AIDS	Zakażenie wirusem HIV wpływa zarówno na testy IGRA, jak i TST, a zebrane dowody wskazują, że należy zachować ostrożność przy interpretacji wyników tych testów w przypadku liczby limfocytów CD4+ <200 (52). Wykazano, że ten wpływ jest mniejszy w przypadku testu QFT niż w przypadku testów IGRA i TST opartych na zasadzie ELISpot (53–55). Tylko jedna wizyta wymagana w przypadku testów IGRA pozwala obejść występujący w tej populacji problem niskiego odsetka osób stawiających się na drugą wizytę w przypadku testów TST (53).	101
Terapie immunosupresyjne	Terapie immunosupresyjne mają mniejszy wpływ na test QFT niż TST, a test QFT jest lepiej skorelowany z czynnikami ryzyka gruźlicy (23, 27). Test QFT wykazuje wysoką czułość u pacjentów z chorobą reumatyczną (23, 56, 57) oraz wyższą swoistość niż test TST, co pozwala zminimalizować liczbę wyników fałszywie pozytywnych oraz ograniczyć niepotrzebne leczenie, jakie zostałyby wdrożone w przypadku stosowania testu TST (23, 57, 58).	112
Pracownicy służby zdrowia	Wykazano większą swoistość z mniejszą liczbą wyników fałszywie pozytywnych niż w przypadku testu TST, jak również niższy koszt testu QFT niż testu TST (59–62). Zmienność w okolicach wartości progowych to oczekiwany wynik testów seryjnych związany z dychotomicznym punktem granicznym oraz nieodłączną zmiennością testów biologicznych (63). Badania wykazały w badaniach prowadzonych na obciążonych niskim ryzykiem szeregowych pracownikach służby zdrowia wyższy odsetek konwersji/rewersji niż w przypadku testu TST (64, 65). Amerykańskie Centra Kontroli i Prewencji Chorób (CDC) potwierdzają, że łagodne kryteria definiowania konwersji w testach IGRA mogą generować większą liczbę konwersji niż obserwowana przy stosowaniu surowszych kryteriów ilościowych, jak w przypadku testu TST. Ponadto wykazano skuteczność strategii ponownych testów w kontrolowaniu zjawiska konwersji/rewersji (65–68).	111
Kontakty z gruźlicą	Wyższe PPV i NPV niż w przypadku testu TST (47); wygoda związana z jedną wizytą w przypadku osób, które prawdopodobnie nie wróciłyby na drugą wizytę (63), lepsza korelacja z narażeniem (69), co jest szczególnie widoczne w przypadku osób zaszczepionych szczepionką BCG oraz populacji z krajów stosujących szczepionkę BCG (70, 71).	89
Transplantacje	Wykazano skuteczność testu QFT przynajmniej na poziomie testu TST, lecz z mniejszym wpływem końcowego etapu choroby narządu niż w przypadku testu TST (22).	23

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Tabela 7. Wybrane opublikowane badania dotyczące testu QFT (ciąg dalszy)

Populacja/warunki	Wyniki i wnioski	Całkowita liczba opublikowanych badań
Cukrzyca	Dostępne są zaprzeczające sobie dowody z niewielkiej liczby publikacji z ograniczoną liczbą pacjentów. W badaniu przeprowadzonym na obszarze o niskim obciążeniu wykazano, że cukrzyca u pacjentów z gruźlicą nie wpływa na czułość testu QFT (72). Badanie przeprowadzone na terenie Tanzanii, w środowisku o wysokim obciążeniu, sugeruje negatywny wpływ cukrzycy na produkcję IFN- γ , aczkolwiek nie uwzględniono w nim głównych czynników zaburzających, takich jak infekcja wirusem HIV oraz robaczyce (73). W wietnamskich badaniach wzięło udział 838 osób z cukrzycą (zgłoszoną przez samych pacjentów) i podejrzeniem gruźlicy z powodu nieprawidłowego wyniku badania CXR lub z potwierdzeniem aktywnej gruźlicy za pomocą posiewu (n=128); dodatniość testu QFT była równa lub większa od wartości granicznych testu TST na poziomie 10 i 15 mm (74).	9
Schyłkowa niewydolność nerek	Pozytywne wyniki testu QFT są lepiej skorelowane z czynnikami ryzyka gruźlicy niż w przypadku testu TST i są mniej kojarzone z BCG (75).	45
Imigranci	Badania wykazują, że na test QFT nie wpływa szczepionka BCG oraz wiek, w przeciwieństwie do testu TST (74). Wykazano, że test QFT jest tańszą metodą (76). W środowisku o niskim obciążeniu większość infekcji gruźliczych występuje u osób urodzonych za granicą oraz w związku z reaktywacją utajonej gruźlicy po przybyciu do kraju (77). Wyniki największego przeprowadzonego do tej pory badania porównującego test QFT i TST u dzieci imigrantów potwierdzają zasadność preferencyjnego stosowania testu QFT w stosunku do TST przy badaniu dzieci urodzonych za granicą pod kątem utajonej infekcji gruźliczej (46).	29

Informacje techniczne

Wyniki nieokreślone

Wyniki nieokreślone są rzadkie i mogą być związane ze statusem immunologicznym badanych osób, lecz mogą być także związane z wieloma czynnikami technicznymi w razie nieprzestrzegania przedstawionej instrukcji stosowania.

W przypadku podejrzenia problemów technicznych z przechowywaniem odczynników, pobieraniem krwi lub postępowaniem z próbkami krwi należy powtórzyć cały test QFT-Plus z wykorzystaniem nowych próbek krwi. Powtórzenie testu ELISA osocza po stymulacji można wykonać w przypadku podejrzenia niedokładnego wymycia lub naruszenia procedur testu ELISA. Nieokreślone wyniki testów wynikające z niskich wartości uzyskanych dla próbek Mitogen lub wysokich wartości próbek Nil nie ulegną zmianie w przypadku powtórzenia testu, chyba że popełniono błąd podczas testu ELISA. Wyniki nieokreślone należy raportować jako takie. Lekarz może zdecydować o ponownym pobraniu próbki lub wykonaniu w odpowiedni sposób innych procedur.

Skrzepnięte próbki osocza

Jeśli przy długotrwałym przechowywaniu próbek osocza dojdzie do wytworzenia skrzepów fibryny, należy odwirować próbki, aby strącić skrzepły materiał i ułatwić pipetowanie osocza.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Więcej informacji zamieszczono w sekcji Informacje techniczne, dostępnej pod adresem **www.QuantiFERON.com**. Informacje kontaktowe znajdują się na tylnej stronie okładki.

Rozwiązywanie problemów z testem ELISA

Rozwój niespecyficzej barwy

Możliwa przyczyna	Rozwiązanie
a) Niedokładne przepłukanie płytki	Przeplukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu do płukania na jeden dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund.
b) Krzyżowe zanieczyszczenie dołków ELISA	Aby zminimalizować ryzyko, należy uważać podczas pipetowania i mieszania próbek.
c) Przeteterminowany zestaw/składniki	Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu zostaną zużyte w ciągu trzech miesięcy od daty zrekonstruowania.
d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu	W przypadku niebieskiego koloru substratu wyłączyć substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki z odczynnikami są czyste.
e) Wymieszanie osocza w probówkach QFT-Plus przed zebraniem osocza	Po odwirowaniu i przed zebraniem osocza należy unikać pipetowania w górę i w dół i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.

Niska gęstość optyczna odczytów wzorców

Możliwa przyczyna	Rozwiązanie
a) Błąd rozcieńczania wzorca	Upewnić się, że rozcieńczenia wzorca dołączonego do zestawu przygotowano zgodnie z ulotką informacyjną dołączoną do opakowania.
b) Błąd pipetowania	Pipety należy kalibrować i używać ich zgodnie z instrukcjami producenta.
c) Zbyt niska temperatura inkubacji	Inkubacja płytki ELISA powinna być przeprowadzana w temperaturze pokojowej (22°C ± 5°C).
d) Zbyt krótki czas inkubacji	Inkubacja płytki z koniugatem, wzorcami i próbkami powinna trwać 120 ± 5 minut. Inkubacja roztworu substratu enzymu na płytce trwa 30 minut.

Rozwiązywanie problemów z testem ELISA

- | | |
|--|--|
| e) Nieprawidłowy filtr czytnika płytek | Płytkę należy odczytać przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm. |
| f) Zbyt niska temperatura odczynników | Przed rozpoczęciem oznaczenia wszystkie odczynniki, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, muszą osiągnąć temperaturę pokojową. Zajmuje to około godziny. |
| g) Przetępiony zestaw/składniki | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu zostaną użyte w ciągu 3 miesięcy od daty zrekonstruowania. |

Duży szum tła

- | Możliwa przyczyna | Rozwiązanie |
|---|---|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu do płukania na jeden dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund. |
| b) Zbyt wysoka temperatura inkubacji | Inkubacja płytki ELISA powinna przebiegać w temperaturze pokojowej (22°C ± 5°C). |
| c) Przetępiony zestaw/składniki | Upewnić się, że nie upłynęła data ważności zestawu. Upewnić się, że zrekonstruowany wzorzec i 100x stężony koncentrat koniugatu zostaną użyte w ciągu 3 miesięcy od daty zrekonstruowania. |
| d) Zanieczyszczony roztwór substratu enzymu | W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Upewnić się, że wykorzystywane zbiorniki z odczynnikami są czyste. |

Nieliniowa krzywa wzorcowa i różnice między wynikami powtórzeń

- | Możliwa przyczyna | Rozwiązanie |
|--|---|
| a) Niedokładne przepłukanie płytki | Przepłukać płytkę co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu do płukania na jeden dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może być konieczne wykonanie więcej niż 6 cykli płukania. Między cyklami płukania należy pozostawić roztwór w dołkach płytki na co najmniej 5 sekund. |
| b) Błąd rozcieńczania wzorca | Sprawdzić, czy prawidłowo przygotowano rozcieńczenia wzorca, zgodnie z ulotką informacyjną dołączoną do opakowania. |
| c) Słabe wymieszanie | Dokładnie wymieszać odczynniki poprzez odwracanie fiolek lub łagodne wytrząsanie przed dodaniem ich na płytkę. |
| d) Niespójna technika pipetowania lub przerwa podczas przeprowadzania oznaczenia | Dodawanie próbki i wzorca powinno być wykonywane w sposób ciągły. Wszystkie odczynniki należy przygotować przed rozpoczęciem oznaczenia. |

Informacje na temat produktów i wytyczne techniczne można otrzymać bezpłatnie od firmy QIAGEN za pośrednictwem dystrybutora lub odwiedzając stronę www.QuantiFERON.com.

Literatura

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 645.
3. 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. Drobniowski, 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 macrophages. *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. Cheallagh, 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 Health 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., Hesselning, 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-Jespersen, 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.

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
 2 × 96	Ilość wystarczająca do przygotowania 2 × 96 próbek
	Oficjalny producent
	Oznaczono symbolem CE-IVD
	Do diagnostyki in vitro
	Kod partii
	Numer katalogowy
	Globalny numer jednostki handlowej
	Termin ważności
	Zakres temperatury
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Nie używać ponownie
	Chronić przed światłem słonecznym
	Numer materiału
Rn	R oznacza wydanie instrukcji użycia, a n to numer wydania

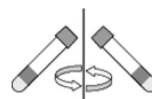
Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej oraz dalszych informacji prosimy o kontakt pod bezpłatnym numerem 00800-22-44-6000, odwiedzenie witryny Centrum pomocy technicznej pod adresem **www.qiagen.com/contact** lub skontaktowanie się z jednym z działów serwisu technicznego firmy QIAGEN (informacje znajdują się na tylnej okładce oraz na stronie **www.qiagen.com**).

Skrócony opis procedury testowej

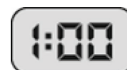
Etap 1 — inkubacja krwi

1. Pobrać krew pacjenta do probówek do pobierania krwi i potrząsnąć nimi dziesięć (10) razy w celu wymieszania zawartości, na tyle silnie, aby cała wewnętrzna powierzchnia probówek była pokryta krwią. Umożliwia to rozpuszczenie antygenów, które znajdują się na ściankach probówek.
2. Inkubować probówki w pozycji pionowej w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez okres od 16 do 24 godzin.
3. Po inkubacji wirować probówki przez 15 minut przy względnej sile odśrodkowej wynoszącej od 2000 do 3000 $\times g$ RCF (g) w celu oddzielenia osocza od czerwonych krwinek.
4. Po odwirowaniu i przed zebraniem osocza należy unikać pipetowania w górę i w dół oraz mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać, aby nie naruszyć materiału, który znajduje się na powierzchni żelu.



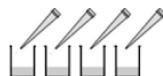
Etap 2 — test ELISA w kierunku IFN- γ

1. Pozostawić składniki testu ELISA, z wyjątkiem 100x stężonego koncentratu koniugatu, w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) na co najmniej 60 minut.
2. Zrekonstruować wzorzec dołączony do zestawu do stężenia 8,0 IU/ml, używając destylowanej lub dejonizowanej wody. Przygotować cztery (4) rozcieńczenia wzorca.



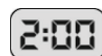
3. Zrekonstruować liofilizowany 100× stężony koncentrat koniugatu wodą destylowaną lub dejonizowaną.

4. Przygotować stężenie robocze koniugatu za pomocą zielonego rozcieńczalnika i dodać po 50 µl roztworu do każdego dołka.

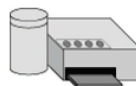


5. Dodać po 50 µl badanych próbek osocza i po 50 µl rozcieńczeń wzorca do odpowiednich dołków. Wymieszać na wytrząsarce.

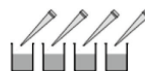
6. Inkubować przez 120 ± 5 minut w temperaturze pokojowej.



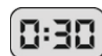
7. Przepłukać studzienki co najmniej 6 razy, używając po 400 µl buforu do płukania na dołek.



8. Dodać po 100 µl roztworu substratu enzymu do dołków. Wymieszać na wytrząsarce.



9. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.



10. Dodać po 50 µl roztworu powstrzymującego działanie enzymu do każdego dołka. Wymieszać na wytrząsarce.



11. Odczytać wyniki przy filtrze 450 nm z filtrem referencyjnym 620–650 nm.



12. Przeprowadzić analizę wyników.



Znaczące zmiany

Sekcja	Strona	Zmiany
Różne	Różne	Dodano instrukcje związane z użyciem próbówki z heparyną litową lub heparyną sodową
Różne	Różne	Dodano instrukcje związane ze sposobem postępowania w przypadku pobierania krwi w temperaturze 2–8°C
Różne	Różne	Wieczko płytki jest teraz materiałem wymaganym, ale niedostarczonym

Historia zmian w instrukcji

Dokument	Zmiany
R6 04/2019	Zmiany dotyczące informacji o heparynie litowej/heparynie sodowej Nowe instrukcje pracy dla sposobu postępowania w przypadku pobierania krwi w temperaturze 2–8°C Wieczka płytek usunięte z płytek QF Plate

Znaki towarowe: QIAGEN®, QFT®, QuantIFERON® (grupa QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Umowa ograniczonej licencji dla testu QuantIFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą ulotką informacyjną i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania składników zawartych w niniejszym zestawie ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu oraz w niniejszej ulotce informacyjnej.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. O ile firma QIAGEN nie podała inaczej, zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie są przeznaczone do ponownego użycia, regeneracji ani odsprzedaży.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.QuantiFERON.com

Azja i Pacyfik | techservice-ap@qiagen.com

Europa | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Bliski Wschód/Afryka | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Ameryka Łacińska (bez Brazylii i Meksyku) | techservice-latam@qiagen.com

Uwagi

Uwagi

