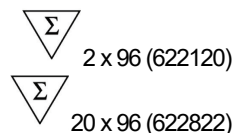


Travanj 2019.

Uputa za upotrebu proizvoda QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) ELISA



Verzija 1

IVD

Za in vitro dijagnostičku upotrebu

Test otpuštanja interferona gama (IFN- γ) iz pune krvi za mjerenje odgovora na peptidne antigene ESAT-6 i CFP-10



REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Njemačka

R6 **MAT**

1083163HR

Sadržaj

Namjena	5
Sažetak i objašnjenje testa	5
Načela ispitivanja	7
Vrijeme potrebno za provođenje ispitivanja	9
Komponente i skladištenje	10
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni	12
Pohrana i rukovanje ispitcima	13
Epruvete za uzimanje krvi	13
Reagensi iz kompleta	13
Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi	13
Upozorenja i mjere opreza	14
Upozorenja	14
Mjere opreza	15
Uzimanje ispitaka i rukovanje	18
Upute za upotrebu	25
Faza 1 – Inkubacija krvi i izdvajanje plazme	25
Faza 2 – IFN- γ ELISA	26
Izračunavanje i tumačenje testa	31
Formiranje standardne krivulje	31
Kontrola kvalitete testa	32
Tumačenje rezultata	32
Ograničenja	35

Radne značajke.....	36
Klinička ispitivanja	36
Radne značajke ispitivanja.....	42
Tehnički podaci	47
Neodređeni rezultati	47
Zgrušani uzorci plazme	47
Vodič za rješavanje problema	48
Reference.....	50
Simboli.....	59
Kontaktni podaci.....	60
Skraćeni testni postupak	61
Faza 1 – inkubacija krvi.....	61
Faza 2 – IFN- γ ELISA.....	61
Značajne izmjene	63
Povijest revizija priručnika	63

Namjena

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

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

Sažetak i objašnjenje testa

Tuberkuloza je zarazna bolest koju uzrokuje infekcija kompleksom organizama *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), a koji se tipično šire na nove domaćine kapljičnim putem s pacijenata oboljelih od respiratorne tuberkuloze. Novozaražena osoba može se razboljeti od tuberkuloze u roku od nekoliko tjedana ili mjeseci, ali većina zaraženih osoba ostane zdrava. U nekih osoba postoji latentna tuberkulozna infekcija (latent tuberculosis infection, LTBI), nezarazno asimptomatsko stanje, koje se nakon nekoliko mjeseci ili godina može razviti u tuberkulozu. Glavna svrha dijagnosticiranja LTBI je razmatranje liječenja u svrhu sprječavanja tuberkuloze. Sve do nedavno jedini dostupan način dijagnosticiranja LTBI bio je tuberkulinski kožni test (Tuberculin Skin Test, TST). Kožna osjetljivost na tuberkulin razvija se 2 do 10 tjedana nakon infekcije. Međutim, neke zaražene osobe, uključujući oboljele od brojnih stanja koja ometaju imunološke funkcije, ali i one bez takvih stanja, ne reagiraju na tuberkulin. Nasuprot tome, neke osobe za koje nije vjerojatno da su zaražene bakterijom *M. tuberculosis* pokazuju znakove osjetljivosti na tuberkulin i imaju pozitivne rezultate TST testa nakon cijepljenja

cjepivom Bacille Calmette-Guérin (BCG), zaraze drugim mikobakterijama, a ne kompleksom bakterija *M. tuberculosis* ili zbog drugih neodređenih čimbenika.

Valja razlikovati LTBI od tuberkuloze, bolesti koja se mora prijaviti, a koja obično zahvaća pluća i donji dišni sustav, ali može zahvatiti i druge organske sustave. Tuberkuloza se dijagnosticira na temelju povijesnih, fizičkih, radioloških, histoloških i mikobakterioloških nalaza.

QFT-Plus je test za stanicama posredovane imunološke odgovore (Cell-Mediated Immune, CMI) na peptidne antigene koji simuliraju proteine mikobakterija. Ti proteini, ESAT-6 i CFP-10, ne postoje ni u jednom BCG soju ni u većini netuberkuloznih mikobakterija, osim u *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1). Osobe zaražene kompleksom organizama MTB obično u krvi imaju limfocite koji prepoznaju te i druge mikobakterijske antigene. U tom postupku prepoznavanja stvara se i otpušta citokin IFN- γ . Glavna je svrha testa dokazivanje i nakon toga utvrđivanje količine IFN- γ .

Antigeni koji se upotrebljavaju u testu QFT-Plus su koktel peptida koji simuliraju proteine ESAT-6 i CFP-10. Brojna istraživanja pokazala su da ovi peptidni antigeni stimuliraju odgovore otpuštanja IFN- γ u T stanicama osoba zaraženih bakterijom *M. tuberculosis*, ali načelno ne u nezaraženih osoba i osoba cijepljenih BCG-om koje ne boluju od bolesti ili nemaju rizik od LTBI (1–32). Međutim, liječenja ili stanja koja narušavaju imunološke funkcije potencijalno mogu smanjiti odgovore otpuštanja IFN- γ . Pacijenti zaraženi određenim drugim mikobakterijskim infekcijama također mogu reagirati na ESAT-6 i CFP-10 jer geni koji kodiraju te proteine postoje u bakterijama *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum* (1, 23). QFT-Plus je i test za LTBI i korisna pomoć pri dijagnosticiranju infekcije kompleksom bakterija *M. tuberculosis* u bolesnih pacijenata. Pozitivan rezultat pomaže pri dijagnosticiranju tuberkuloze, no i infekcije ostalim mikobakterijama (npr. *M. kansasii*) mogu dovesti do pozitivnih rezultata. Za potvrdu ili isključivanje tuberkuloze potrebne su dodatne medicinske i dijagnostičke procjene.

QFT-Plus ima dvije različite epruvete s TB antigenom: TB Antigen Tube 1 (TB1) i TB Antigen Tube 2 (TB2). Obje epruvete sadržavaju peptidne antigene iz skupine antigena povezanih s

kompleksom bakterija MTB, ESAT-6 i CFP-10. Dok epruveta TB1 sadržava peptide iz ESAT-6 i CFP-10 koji su namijenjeni izazivanju stanicama posredovanih imunoloških odgovora CD4⁺ pomoćnih T limfocita, epruveta TB2 sadržava dodatni skup peptida čiji je cilj induciranje stanicama posredovanih imunoloških odgovora CD8⁺ citotoksičnih T limfocita. U prirodnom tijeku infekcije MTB-om, CD4⁺ T stanice imaju ključnu ulogu u imunološkoj kontroli zahvaljujući izlučivanju citokina IFN- γ . Sada postoje dokazi o tome da CD8⁺ T stanice sudjeluju u obrani domaćina od MTB-a proizvodeći IFN- γ i druge topive faktore koji aktiviraju makrofage u svrhu suzbijanja rasta MTB-a, uništavaju zaražene stanice ili izravno liziraju unutarstanični MTB (33–35). CD8⁺ stanice specifične za MTB otkrivene su u ispitanika s LTBI i aktivnom tuberkulozom kod kojih se često mogu pronaći CD8⁺ stanice koje proizvode IFN- γ (36–38). Osim toga, opisano je da se CD8⁺ T limfociti specifični za ESAT-6 i CFP-10 češće pronalaze u ispitanika s aktivnom tuberkulozom u odnosu na one s LTBI te ih se može dovesti u vezu s nedavnom izloženošću bakteriji MTB (39–41). K tome, CD8⁺ T stanice specifične za MTB koje proizvode IFN- γ otkrivene su i u ispitanika s aktivnom tuberkulozom uz koinfekciju virusom HIV (42, 43) te u male djece oboljele od tuberkuloze (44).

Načela ispitivanja

U QFT-Plus ispitivanju uzima se puna krv s pomoću specijaliziranih epruveta za uzimanje krvi. Krv se inkubira u epruветama od 16 do 24 sata, nakon čega se izdvaja plazma i testira na prisutnost IFN- γ proizvedenog kao odgovor na peptidne antigene.

QFT-Plus test provodi se u dvije faze. Najprije se puna krv prikuplja u svaku od epruveta za uzimanje krvi QFT-Plus Blood Collection Tubes, što uključuje Nil epruветu, epruветu TB1, epruветu TB2 i Mitogen epruветu. Druga je mogućnost prikupljanje krvi u jednu zajedničku epruветu za uzimanje krvi koja sadržava litij-heparin ili natrij-heparin kao antikoagulans, nakon čega se krv prenosi u QFT-Plus epruветe.

Mitogen epruветa u QFT-Plus testu upotrebljava se kao pozitivna kontrola. To može biti važno ako je imunološki status pojedinca nejasan. Mitogen epruветa služi i kao kontrola pravilnog postupanja s uzorkom krvi i pravilne inkubacije.

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

Heterofilna (npr. humana anti-mišja) protutijela u serumu ili plazmi određenih osoba mogu uzrokovati smetnje u imunoanalizama. Djelovanje heterofilnih protutijela u QFT-Plus ELISA testu umanjeno je dodavanjem običnog mišjeg seruma u zeleni diluens i upotrebom fragmenata F(ab')₂ monoklonalnog protutijela kao protutijela za hvatanje IFN- γ koje je naneseo na mikrotitar pločicu.

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

Vrijeme potrebno za provođenje ispitivanja

U nastavku se navodi procijenjeno vrijeme provođenja QFT-Plus ELISA testa; naznačeno je i vrijeme testiranja većeg broja uzoraka metodom skupne obrade:

Inkubacija epruveta s uzorcima

krvi na temperaturi od 37 °C: 16 – 24 sata

ELISA:

Pribl. 3 sata za jednu ELISA pločicu

(22 osobe)

< 1 sata rada

Dodajte 10 do 15 minuta za svaku dodatnu pločicu

Komponente i skladištenje

Epruvete za uzimanje krvi*		200 epruveta	Paket za jednog pacijenta	Paket dozatora	200 HA epruveta	HA pakiranje za jednog pacijenta	HA paket dozatora
Kataloški br.		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Broj testova/pakiranja		50	10	25	50	10	25
QuantiFERON Nil Tube (sivi čep s bijelim prstenom)	Nil	50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta			
QuantiFERON TB1 Tube (zeleni čep s bijelim prstenom)	TB1	50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta			
QuantiFERON TB2 Tube (žuti čep s bijelim prstenom)	TB2	50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta			
QuantiFERON Mitogen Tube (ljubičasti čep s bijelim prstenom)	Mitogen	50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta			
QuantiFERON Nil HA Tube (sivi čep sa žutim prstenom)	Nil HA				50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta
QuantiFERON TB1 HA Tube (zeleni čep sa žutim prstenom)	TB1 HA				50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta
QuantiFERON TB2 HA Tube (žuti čep sa žutim prstenom)	TB2 HA				50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta
QuantiFERON Mitogen HA Tube (ljubičasti čep sa žutim prstenom)	Mitogen HA				50 epruveta	10 epruveta	25 epruveta
Uputa za upotrebu QFT-Plus Blood Collection Tubes		1	1	1	1	1	1

* Sve konfiguracije proizvoda nisu dostupne u svim zemljama. Dodatne informacije o tome koje su konfiguracije dostupne za naručivanje zatražite od Službe za korisnike tvrtke QIAGEN (pojednosti na web-mjestu www.qiagen.com).

ELISA komponente [†] Kataloški br.	Komplet ELISA s 2 pločice 622120	Referentni laboratorijski paket 622822
Microplate Strips (Mikrotitar pločice) (12 x 8 jažica) obložene mišjim anti-humanim IFN- γ monoklonalnim protutijelom	2 mikrotitar pločice s po 96 jažica	20 mikrotitar pločica s po 96 jažica
IFN- γ Standard (IFN- γ standard), liofiliziran (sadržava rekombinantni humani IFN- γ , goveđi kazein, 0,01 % w/v timerosala)	1 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituira)	10 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituira)
Green Diluent (Zeleni diluens) (sadržava goveđi kazein, obični serum miša, 0,01 % w/v timerosala)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (100x koncentrirani konjugat), liofiliziran (mišji anti-humani IFN- γ HRP, sadržava 0,01 % w/v timerosala)	1 x 0,3 ml (kada se rekonstituira)	10 x 0,3 ml (kada se rekonstituira)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x koncentrirani pufer za ispiranje) (pH 7,2, sadržava 0,05 % v/v sredstva ProClin [®] 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Otopina enzimskog supstrata) (sadržava H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimaska otopina za zaustavljanje odgovora) (sadržava 0.5M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Uputa za upotrebu QFT-Plus ELISA testa	1	1

[†] Izjave o mjerama opreza i opasnostima pročitajte na stranici 15.

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

- Inkubator temperature $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}^*$; CO₂ nije potreban
- Kalibrirane pipete s varijabilnim volumenom* za doziranje od 10 µl do 1000 µl, s jednokratnim vrhovima
- Kalibrirane višekanalne pipete* za doziranje 50 µl i 100 µl s jednokratnim vrhovima
- Poklopac pločice
- Tresilica za mikrotitar pločice*
- Deionizirana ili destilirana voda, 2 litre
- Uređaj za ispiranje mikrotitar pločica (po mogućnosti automatiziran)
- Čitač mikrotitar pločica* s filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm.

* Provjerite jesu li instrumenti pregledavani i kalibrirani prema preporukama proizvođača.

Pohrana i rukovanje ispitcima

Epruvete za uzimanje krvi

- Epruvete za uzimanje krvi pohranite na temperaturi između 4 °C i 25 °C.

Reagensi iz kompleta

- Reagense iz kompleta pohranite na temperaturi između 2 °C i 8 °C.
- Otopinu enzimskog supstrata uvijek zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.

Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi

Upute o rekonstituiranju reagensa potražite na stranici 27.

- Rekonstituirani standard iz kompleta može se čuvati do 3 mjeseca ako je pohranjen na temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Zabilježite datum rekonstitucije standarda iz kompleta.

- Nakon rekonstitucije neupotrijebljeni 100x koncentrirani konjugat mora se i dalje čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C i potrošiti u roku od 3 mjeseca.

Zabilježite datum rekonstitucije konjugata.

- Konjugat spreman za upotrebu mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
- Pufer za ispiranje spreman za upotrebu može se čuvati na sobnoj temperaturi do 2 tjedna.

Upozorenja i mjere opreza

Samo za in vitro dijagnostičku upotrebu.

Upozorenja

- Negativan rezultat QFT-Plus testa ne isključuje mogućnost infekcije bakterijom *M. tuberculosis* ili tuberkuloze: uzrok lažno negativnih rezultata može biti stadij infekcije (npr. ispitak primljen prije nastupanja staničnog imunog odgovora), komorbidna stanja koja utječu na imunološke funkcije, neispravno rukovanje epruvetama za uzimanje krvi nakon venepunkcije, neispravno provođenje ispitivanja ili druge imunološke varijable.
- Pozitivan rezultat QFT-Plus testa ne bi trebao biti jedina ili definitivna osnova za utvrđivanje infekcije bakterijom *M. tuberculosis*. Neispravno provođenje ispitivanja može prouzročiti lažno pozitivne rezultate.
- Nakon pozitivnog rezultata QFT-Plus testa potrebno je provesti daljnju medicinsku i dijagnostičku procjenu za aktivnu tuberkulozu (npr. bris na acidorezistentne bacile i uzgoj kulture, rendgenska snimka pluća itd.).
- Iako ni u jednom BCG soju niti u većini poznatih netuberkuloznih mikobakterija nema ESAT-6 i CFP-10, postoji mogućnost da je uzrok pozitivnog QFT-Plus testa infekcija bakterijama *M. kansasii*, *M. szulgai* ili *M. marinum*. U slučaju sumnje na takve infekcije potrebno je provesti alternativne testove.

Mjere opreza

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



OPREZ: S ljudskom krvlju i plazmom postupajte kao s potencijalno infektivnim tvarima. Pridržavajte se relevantnih smjernica za rukovanje krvlju i krvnim proizvodima. Uzorke i materijale koji dolaze u kontakt s krvlju ili krvnim proizvodima zbrinite sukladno državnim i lokalnim propisima.

Sljedeće izjave o opasnostima i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA.

Izjave o opasnosti



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

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

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

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



QuantiFERON Green Diluent

Sadržava: trinitrij 5 hidroksi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo)pirazol-3-karboksilat. Sadržava: tartrazin. Upozorenje! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Sadržava: Mješavinu 5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on i 2-metil-2H-izotiazol-3-on (3:1). Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Izbjegavajte ispuštanje u okoliš.

Izjave o mjerama opreza

Prije upotrebe pročitajte posebne upute. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice. **U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM** (ili kosom): Odmah uklonite/skinite svu kontaminiranu odjeću. Isperite kožu vodom/tušem. **U SLUČAJU DODIRA S OČIMA**: Oprezno ispirite vodom nekoliko minuta. Uklonite kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastavite ispiranje. U slučaju izloženosti ili sumnje na izloženost: Zatražite savjet/pomoć liječnika. Odmah nazovite CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. U slučaju nadraživanja kože ili osipa: Zatražite savjet/pomoć liječnika. Skinite kontaminiranu odjeću i operite je prije ponovne upotrebe. Čuvajte na zaključanom mjestu. Sadržaj/spremnik odložite u službeno odobreno postrojenje za zbrinjavanje otpada.

Dodatne informacije

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

- Nepridržavanje *Uputa za upotrebu testa QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* može dovesti do netočnih rezultata. Prije upotrebe pažljivo pročitajte upute.
- Nemojte upotrebljavati komplet ako bilo koja bočica reagensa pokazuje znakove oštećenja ili curenja prije upotrebe.

-
- **Važno:** Pregledajte bočice prije upotrebe. Nemojte upotrebljavati bočice za konjugat ili IFN- γ standard ako bočice pokazuju znakove oštećenja ili ako je gumena brtva oštećena. Nemojte rukovati razbijenim bočicama. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza i odložite bočice na siguran način. **Preporuka:** S pomoću alata za skidanje osigurača na bočicama otvorite bočice za konjugat ili IFN- γ standard radi smanjenja opasnosti od ozljeda uzrokovanih poklopcem s metalnim osiguračem.
 - Nemojte miješati ili upotrebljavati proizvode mikrotitar pločice, IFN- γ standard, zeleni diluens ili 100x koncentrirani konjugat iz različitih serija kompleta QFT-Plus. Ostali reagensi (proizvodi 20x koncentrirani pufer za ispiranje, otopina enzimskog supstrata i enzimska otopina za zaustavljanje odgovora) iz drugih kompleta mogu se mijenjati, pod uvjetom da reagensi ne prekoračuju datum isteka valjanosti i da se podaci o seriji zabilježe.
 - Odložite neupotrijebljene reagense i biološke uzorke u skladu s lokalnim i državnim propisima.
 - Nemojte upotrebljavati epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes ili komplet ELISA nakon datuma isteka valjanosti.
 - Uvijek se morate pridržavati pravilnih laboratorijskih postupaka.
 - Provjerite je li laboratorijska oprema kalibrirana/potvrđena za upotrebu.

Uzimanje ispitaka i rukovanje

U QFT-Plus testu upotrebljavaju se sljedeće epruvete za uzimanje krvi:

1. Epruvete QuantiFERON Nil (sivi čep s bijelim prstenom)
2. Epruvete QuantiFERON TB1 (zeleni čep s bijelim prstenom)
3. Epruvete QuantiFERON TB2 (žuti čep s bijelim prstenom)
4. Epruvete QuantiFERON Mitogen (ljubičasti čep s bijelim prstenom)
5. Epruvete QuantiFERON HA Nil (sivi čep sa žutim prstenom)
6. Epruvete QuantiFERON HA TB 1 (zeleni čep sa žutim prstenom)
7. Epruvete QuantiFERON HA TB2 (žuti čep sa žutim prstenom)
8. Epruvete QuantiFERON HA Mitogen (ljubičasti čep sa žutim prstenom)

Antigeni su osušeni na unutarnjoj stijenci epruveta za uzimanje krvi, stoga se sadržaj epruveta mora dobro izmiješati s krvlju. Kad se krv vadi izravno u QFT-Plus epruvete, QFT-Plus epruvete se moraju držati i transportirati na sobnoj temperaturi ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) i prenijeti u inkubator temperature 37 °C što je prije moguće i u roku od 16 sati od prikupljanja. Kao druga mogućnost, krv se može prikupiti u jednu epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom radi pohrane prije prijenosa u QFT-Plus i inkubacije. Ispitci krvi prikupljeni u litij-heparin ili natrij-heparin mogu se čuvati do 16 sati na sobnoj temperaturi ($17 - 25\text{ °C}$), nakon čega se prenose u QFT-Plus epruvete. Ispitci krvi u epruvetama s litij-heparinom ili natrij-heparinom mogu se čuvati i na temperaturi od 2 do 8 °C do 48 sati prije prijenosa u QFT-Plus epruvete. Pogledajte odjeljak „Uzimanje krvi u jednu epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom nakon čega slijedi prijenos u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes”.

Izravno vađenje krvi u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Označite epruvete na odgovarajući način.

Pazite da se nakon uklanjanja čepa svaka epruveta (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) može identificirati na temelju njezine naljepnice ili na druge načine.

Preporučuje se bilježenje vremena i datuma prikupljanja krvi.

2. Uzmite od svakog pacijenta 1 ml venske krvi u svaku od epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes. Taj bi postupak trebao provoditi tehničar osposobljen za vađenje krvi.

Važna napomena: U vrijeme punjenja krvlju epruvete moraju biti na temperaturi od 17 °C do 25 °C.

Standardne epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes mogu se upotrebljavati do nadmorske visine od 810 metara. Epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes za velike nadmorske visine mogu se upotrebljavati na nadmorskoj visini između 1020 metara i 1875 metara.

S obzirom da se epruvete od 1 ml relativno polako pune krvlju, nakon postizanja razine punjenja epruvetu ostavite na igli još 2 do 3 sekunde. Tako ćete osigurati uzimanje potrebne količine.

- Crna oznaka s bočne strane epruveta označava valjani raspon od 0,8 do 1,2 ml. Ako je razina krvi u bilo kojoj epruveti izvan raspona naznačenog oznakom, mora se uzeti novi uzorak krvi. Punjenje epruveta količinom manjom ili većom od raspona između 0,8 i 1,2 ml može dovesti do pogrešnih rezultata.
- Ako za uzimanje krvi upotrebljavate „leptirastu iglu”, treba upotrijebiti praznu epruvetu kako bi se osiguralo da je napunjena krvlju prije upotrebe QFT-Plus epruveta.
- Ako se epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes upotrebljavaju na nadmorskoj visini većoj od 810 metara ili ako je izvađena mala količina krvi, korisnici mogu uzeti krv i štrcaljkom te odmah prenijeti 1 ml u svaku od 4 epruvete. Iz sigurnosnih razloga, najbolje je ukloniti iglu iz štrcaljke, pridržavajući se odgovarajućih sigurnosnih mjera, ukloniti čepove s 4 QFT-Plus epruvete i dodati po 1 ml krvi u svaku epruvetu (do sredine crne

oznake na bočnoj strani naljepnice na epruveti). Nakon toga epruvete treba dobro začeptiti i promiješati, kao što je opisano u nastavku. Pazite da se nakon uklanjanja čepa svaka epruveta (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) može identificirati na temelju njezine naljepnice ili na druge načine.

3. Neposredno nakon punjenja epruveta protresite ih deset (10) puta, dovoljno energično kako biste osigurali da je cijela unutarnja površina epruvete obložena krvlju. Na taj će se način otopiti antigeni na stijenkama epruvete.

Važna napomena: U vrijeme protresanja epruvete moraju biti na temperaturi od 17 °C do 25 °C. Prejako protresanje može poremetiti gel i dovesti do pogrešnih rezultata.

4. Nakon označavanja, punjenja i protresanja epruvete se moraju što prije prenijeti u inkubator temperature 37 °C ± 1 °C, u roku od 16 sati od uzimanja uzoraka. Prije inkubacije epruvete držite i transportirajte na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C). Ako se QFT-Plus epruvete ne inkubiraju na temperaturi od 37 °C odmah nakon uzimanja krvi i protresanja, prije inkubacije na temperaturi od 37 °C preokrenite epruvete 10 puta kako bi se sadržaj izmiješao.
5. QFT-Plus epruvete inkubirajte u USPRAVNOM položaju na temperaturi od 37 °C ± 1 °C u trajanju od 16 do 24 sata. Za inkubator nisu potrebni CO₂ ni ovlaživanje.

Uzimanje krvi u jednu epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom i prijenos u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Krv se može uzeti u jednu epruvetu za uzimanje krvi koja sadržava litij-heparin ili natrij-heparin kao antikoagulans, a zatim prenijeti u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes. Kao krvni antikoagulans upotrebljavajte samo litij-heparin ili natrij-heparin jer ostali antikoagulansi mogu utjecati na rezultate ispitivanja. Označite epruvete na odgovarajući način.

Preporučujemo da na epruvetu postavite naljepnicu s navedenim vremenom i datumom uzimanja krvi.

Važno: Epruvete za uzimanje krvi u trenutku uzimanja krvi trebaju biti na sobnoj temperaturi (17 – 25 °C).

2. Napunite epruvetu za uzimanje krvi koja sadržava litij-heparin ili natrij-heparin (minimalna količina 5 ml) i blago izmiješajte nekoliko je puta preokrećući da bi se heparin otopio. Taj bi postupak trebao provoditi tehničar osposobljen za vađenje krvi.
3. Opcije vremena čekanja i temperature za epruvete s litij-heparinom ili natrij-heparinom prije prijenosa i inkubacije u epruvetama QFT-Plus Blood Collection Tubes (pogledajte slike 1 – 3 Opcije uzimanja krvi).

Opcija 1 – Pohrana epruvete s litij-heparinom ili natrij-heparinom na sobnoj temperaturi i rukovanje Krv prikupljena u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom mora se čuvati na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C) ne duže od 16 sati od trenutka uzimanja krvi, a prije prijenosa u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes i inkubacije koja nakon toga slijedi.

Opcija 2 – Pohrana epruvete s litij-heparinom ili natrij-heparinom u hladnjaku i rukovanje

Važno: Koraci postupka a – d moraju se provoditi navedenim redoslijedom.

- a. Krv prikupljena u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom može se čuvati na sobnoj temperaturi (17 – 25 °C) do 3 sata nakon uzimanja krvi.
- b. Krv izvađena u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom može se čuvati u hladnjaku (2 – 8 °C) do 48 sati.
- c. Nakon hlađenja epruvete s litij-heparinom ili natrij-heparinom moraju se prije prijenosa u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes prilagoditi sobnoj temperaturi (17 – 25°C).
- d. Alikvotirane epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes treba staviti u inkubator temperature 37 °C u roku od 2 sata nakon prijenosa krvi.

Ako se epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes ne inkubiraju na 37 °C odmah nakon prijenosa u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes i protresanja, prije inkubacije na 37 °C preokrenite epruvete 10 puta da bi se sadržaj izmiješao. Ukupno vrijeme od

vađenja krvi do inkubacije u epruvetama QFT-Plus Blood Collection Tubes ne bi trebalo biti duže od 53 sata.

4. Prijenos ispitka krvi iz epruvete s litij-heparinom ili natrij-heparinom u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes:

a. Na odgovarajući način označite svaku od epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Pazite da se nakon uklanjanja čepa svaka epruveta (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) može identificirati na temelju njezine naljepnice ili na druge načine. Preporučuje se premještanje zabilježenog vremena i datuma uzimanja krvi s epruveta s litij-heparinom ili natrij-heparinom na epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes.

b. Uzorci se moraju ravnomjerno izmiješati nježnim preokretanjem prije doziranja u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes.

c. Doziranje bi trebalo obaviti aseptično, uz poštovanje odgovarajućih sigurnosnih postupaka, uklanjanjem čepova s 4 QFT-Plus Blood Collection Tubes i dodavanjem 1 ml krvi u svaku epruvetu. Ponovno postavite čepove epruveta, dobro zatvorite i izmiješajte prema uputama u nastavku. Pazite da se nakon uklanjanja čepa svaka epruveta (Nil, TB1, TB2 i Mitogen) može identificirati na temelju njezine naljepnice ili na druge načine.

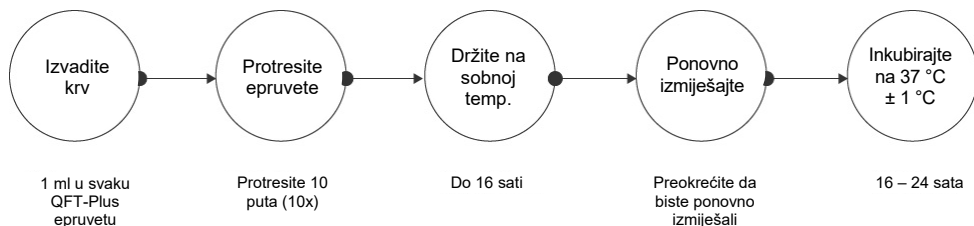
5. Izmiješajte sadržaj epruveta. Odmah nakon punjenja epruveta QFT-Plus Blood Collection Tubes protresite ih deset (10) puta, onoliko snažno koliko je potrebno da bi se cijela unutarnja površina epruvete obložila krvlju. Na taj će se način otopiti antigeni na stijenkama epruvete.

Prejako protresanje može poremetiti gel i dovesti do pogrešnih rezultata.

6. Nakon označavanja, punjenja i protresanja epruvete se u roku od 2 sata moraju prenijeti u inkubator temperature $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Ako se epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes ne inkubiraju na 37 °C odmah nakon uzimanja krvi i protresanja, prije inkubacije na 37 °C preokrenite epruvete 10 puta (10x) da bi se sadržaj izmiješao (opcije uzimanja krvi potražite na slikama 1 – 3 na sljedećoj stranici).

7. Epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes inkubirajte u USPRAVNOM položaju na temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, u trajanju od 16 do 24 sata. Za inkubator nisu potrebni CO_2 ni ovlaživanje.

Izvadite krv u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes i držite ih na sobnoj temperaturi.



Slika 1. Opcija uzimanja krvi: Izvadite krv izravno u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes i držite ih na sobnoj temperaturi.

Ukupno vrijeme od vađenja krvi u epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes do inkubacije na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ne smije biti duže od 16 sati.

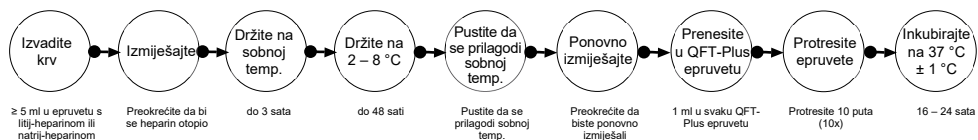
Izvadite krv u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom i držite je na sobnoj temperaturi.



Slika 2. Opcija uzimanja krvi: Izvadite krv u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom i držite je na sobnoj temperaturi.

Ukupno vrijeme od vađenja krvi u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom do inkubacije na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ne smije biti duže od 16 sati.

Izvadite krv u epruvete s litij-heparinom ili natrij-heparinom i držite na temperaturi između 2 i 8 °C.



Slika 3. Opcija uzimanja krvi: Izvadite krv u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom i držite na temperaturi između 2 i 8 °C.

Ukupno vrijeme od vađenja krvi u epruvetu s litij-heparinom ili natrij-heparinom do inkubacije na 37 °C ne smije biti duže od 53 sata.

Upute za upotrebu

Faza 1 – Inkubacija krvi i izdvajanje plazme

Isporučeni materijali

- Epruvete QFT-Plus Blood Collection Tubes (pogledajte odjeljak 3)

Materijali koji su potrebni (ali nisu isporučeni)

- Pogledajte odjeljak 3

Postupak

1. **Ako krv nije inkubirana odmah nakon uzimanja, netom prije inkubacije potrebno je ponovno promiješati epruvete tako da ih se preokrene 10 puta.**
2. **Epruvete inkubirajte u USPRAVNOM položaju na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, u trajanju od 16 do 24 sata. Za inkubator nisu potrebni CO_2 ni ovlaživanje.**
3. **Nakon inkubacije na 37 °C epruvete za uzimanje krvi mogu se držati na temperaturi između 4 °C i 27 °C , najduže 3 dana do početka centrifugiranja.**
4. **Nakon inkubacije epruveta na 37 °C epruvete se centrifugiraju 15 minuta na 2000 do 3000 x RCF (g) radi lakšeg izdvajanja plazme. Čep od gela odvojiti će stanice od plazme. Ako se to ne dogodi, epruvete treba ponovno centrifugirati.**

Plazma se može izdvojiti i bez centrifugiranja, ali potreban je dodatan oprez da bi se plazma uklonila bez poremećaja stanica.

5. **Uzorci plazme trebali bi se uzimati samo pipetom.**

Važna napomena: Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati prema gore ili prema dolje niti bilo kako miješati plazmu prije izdvajanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

Uzorci plazme mogu se prenijeti izravno iz centrifugiranih epruveta za uzimanje krvi u QFT-Plus ELISA pločicu, uključujući i situacije kada se upotrebljavaju automatske ELISA radne stanice.

Uzorci plazme mogu se čuvati do najviše 28 dana na temperaturama od 2 °C do 8 °C ili, ako su izdvojeni, na temperaturama nižim od -20 °C duže vrijeme.

Da biste dobili odgovarajuće testne uzorke, izdvojite najmanje 150 µl plazme.

Faza 2 – IFN- γ ELISA

Isporučeni materijali

- Komplet QFT-Plus ELISA (pogledajte odjeljak 3)

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

- Pogledajte odjeljak 3.

Postupak

- 1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata , prije upotrebe moraju postići sobnu temperaturu (22 °C \pm 5 °C). Ostavite najmanje 60 minuta za postizanje toplinske ravnoteže.**
- 2. S okvira skinite nepotrebne trake, vratite ih u foliju i pohranite u hladnjak sve dok vam ne budu potrebne.**

Pripremite najmanje 1 traku za QFT-Plus standarde i dovoljan broj traka za pacijente koji se testiraju (pogledajte Slika 5). Nakon upotrebe sačuvajte okvir radi upotrebe s preostalim trakama.
- 3. Rekonstituirajte IFN- γ Standard količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na naljepnici bočice. Pažljivo promiješajte kako biste sveli stvaranje pjene na najmanju moguću mjeru i uvjerite se da je sadržaj potpuno rastopljen.**

Rekonstitucijom standarda na točan volumen dobivamo otopinu koncentracije 8,0 IU/ml.

Važna napomena: Volumen standarda iz kompleta potreban za rekonstituciju nije isti za svaku seriju.

Upotrijebite rekonstituirani standard iz kompleta da biste dobili razrjeđenje od 1 naprema 2 nakon kojeg slijedi serija razrjeđivanja od 1 naprema 4 za IFN- γ u zelenom diluensu (Green Diluent, GD) (pogledajte Slika 4). S1 (Standard 1) sadržava 4,0 IU/ml, S2 (Standard 2) sadržava 1,0 IU/ml, S3 (Standard 3) sadržava 0,25 IU/ml i S4 (Standard 4) sadržava 0 IU/ml (samo GD). Standarde treba ispitati barem u duplikatu. Pripremite svježe razrijeđene otopine standarda iz kompleta za svaki postupak ELISA.

Preporučeni postupak za duplikate standarda

Označite 4 epruvete „S1“, „S2“, „S3“, „S4.“

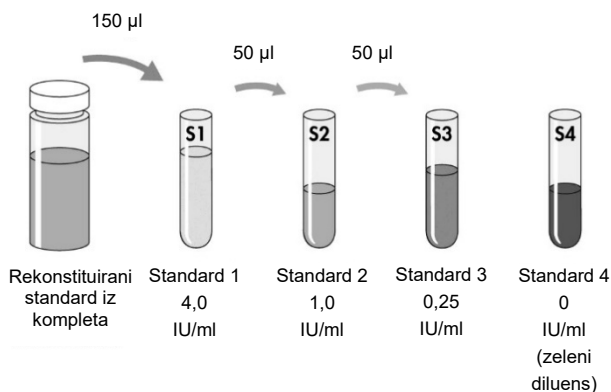
Dodajte **150 μ l** diluensa GD u S1, S2, S3, S4.

Dodajte **150 μ l** standarda iz kompleta u S1 i dobro izmiješajte.

Prenesite **50 μ l** iz S1 u S2 i dobro izmiješajte.

Prenesite **50 μ l** iz S2 u S3 i dobro izmiješajte.

Sami **GD** služi kao nulti standard (S4).



Slika 4. Priprema standardne krivulje.

4. Rekonstituirajte liofilizirani 100x koncentrirani konjugat s 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Nježno izmiješajte kako biste sveli stvaranje pjene na najmanju moguću mjeru i uvjerite se da je konjugat potpuno otopljen.

Konjugat spreman za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100x koncentriranog konjugata razrijedi zelenim diluensom (Tablica 1. Priprema konjugata). Neupotrijebljeni 100x koncentrirani konjugat odmah nakon upotrebe vratite na temperaturu od 2 °C do 8 °C. Upotrebljavajte samo zeleni diluens.

Tablica 1. Priprema konjugata

Broj traka	Količina 100x koncentriranog konjugata	Količina zelenog diluensa
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Kad je riječ o uzorcima plazme izdvojenima iz epruveta za uzimanje krvi i zatim spremljenima (u hladnjak ili zamrzivač), prije dodavanja u ELISA jažicu promiješajte uzorke.

Važna napomena: Ako se uzorci plazme planiraju dodati izravno iz centrifugiranih QFT-Plus epruveta, potrebno je izbjegavati bilo kakvo miješanje plazme. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

6. Višekanalnom pipetom dodajte 50 µl svježe pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuće ELISA jažice.

7. Višekanalnom pipetom dodajte 50 µl testnih uzoraka plazme u odgovarajuće jažice (pogledajte preporučeni raspored na pločici na Slika 5). Na kraju dodajte po 50 µl standarda 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

Slika 5. Preporučeni raspored uzoraka (22 testa po pločici)

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

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

8. Prekrijte svaku pločicu i dobro izmiješajte konjugat i uzorke plazme / standarde u tresilici za mikrotitar pločice u trajanju od 1 minute. Izbjegavajte prskanje.

9. Svaku pločicu prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C) u trajanju od 120 ± 5 minuta.

Za vrijeme inkubacije pločice se ne bi trebale izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti.

10. Tijekom inkubacije razrijedite jedan dio 20x puta koncentriranog pufera za ispiranje s 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro izmiješajte. U kompletu se nalazi dovoljno 20x puta koncentriranog pufera da bi se dobile 2 litre pufera za ispiranje spremnog za upotrebu.

Ispirite jažice s pomoću 400 µl pufera za ispiranje spremnog za upotrebu u trajanju od najmanje 6 ciklusa. Preporučujemo upotrebu automatskog uređaja za ispiranje mikrotitar pločica.

Pažljivo ispiranje veoma je važno za učinak ispitivanja. Pazite da pri svakom ciklusu ispiranja sve jažice budu do vrha potpuno napunjene puferom za ispiranje. Preporučujemo da između svakog ciklusa ispiranja ostavite najmanje 5 sekundi za namakanje.

U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati standardno dezinfekcijsko sredstvo koje se upotrebljava u laboratorijima. Pridržavajte se propisanih uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.

11. Lupkanjem istresite pločice okrenute prema dolje na ručnik koji ne ostavlja puno dlačica kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. U svaku jažicu dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata, prekrijte svaku pločicu i temeljito izmiješajte s pomoću tresilice za mikrotitar pločice.

12. Svaku pločicu prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 30 minuta.

Za vrijeme inkubacije pločice se ne bi trebale izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti.

13. Nakon 30-minutne inkubacije u svaku jažicu dodajte 50 µl enzimske otopine za zaustavljanje odgovora i izmiješajte.

Enzimska otopina za zaustavljanje odgovora treba se dodati u jažice istim redoslijedom i otprilike istom brzinom kao i supstrat u koraku 11.

14. Izmjerite optičku gustoću (Optical Density, OD) svake jažice u roku od 5 minuta nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije s pomoću čitača za mikrotitar pločice opremljenog filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm. Izračunavanje rezultata izvodi se s pomoću vrijednosti OD-a.

Izračunavanje i tumačenje testa

Za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata može se upotrijebiti QFT-Plus softver za analizu. Dostupan je na web-mjestu **www.QuantiFERON.com**. Pobrinite se da upotrebljavate najnoviju verziju QFT-Plus softvera za analizu.

Softver provodi kontrolu kvalitete ispitivanja, formira standardnu krivulju i daje rezultat za svakog testiranog pacijenta, kao što je objašnjeno u odjeljku Tumačenje rezultata.

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

Formiranje standardne krivulje

(Ako se ne upotrebljava QFT-Plus softver za analizu)

Utvdite srednje vrijednosti OD-a replika standarda iz kompleta na svakoj pločici.

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

Upotrebljavajte standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- γ koncentracije (IU/ml) za svaki testni uzorak plazme s pomoću vrijednosti OD-a svakog uzorka.

Za te izračune mogu se upotrijebiti softverski paketi koji su dostupni uz čitače mikrotitar pločica, kao i standardne proračunske tablice ili programi za statistiku (kao npr. Microsoft® Excel®). Preporučujemo primjenu tih softverskih paketa za izračunavanje regresijske analize, koeficijenta varijacije standarda (Coefficient of Variation, % CV), kao i koeficijenta korelacije (r) za standardnu krivulju.

Kontrola kvalitete testa

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

Test ELISA valjan je ako su ispunjeni sljedeći kriteriji:

- Srednja vrijednost OD-a Standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.
- % CV repliciranih vrijednosti OD-a Standarda 1 i Standarda 2 mora biti $\leq 15\%$.
- Replicirane vrijednosti OD-a Standarda 3 i Standarda 4 ne smiju odstupati od srednjih vrijednosti za više od 0,040 OD jedinica.
- Koeficijent korelacije (r) dobiven iz srednjih vrijednosti apsorpcije standarda mora biti $\geq 0,98$.

QFT-Plus softver za analizu izračunava i izvješćuje o tim parametrima za kontrolu kvalitete.

Ako ovi kriteriji nisu ispunjeni, test nije valjan i mora se ponoviti.

Srednja vrijednost OD-a nultog standarda (zeleni diluens) trebala bi biti $\leq 0,150$. Ako je srednja vrijednost OD-a $> 0,150$, preporučuje se kontrola postupka ispiranja pločica.

Tumačenje rezultata

Rezultati QFT-Plus testa tumače se na temelju sljedećih kriterija (Tablica 2):

Važna napomena: Za postavljanje dijagnoze odnosno isključivanje tuberkuloze i procjenu vjerojatnosti LTBI potrebna je kombinacija epidemioloških, povijesnih, medicinskih i dijagnostičkih nalaza koji se moraju uzeti u obzir pri tumačenju rezultata QFT-Plus testa.

Tablica 2. Tumačenje rezultata QFT-Plus testa

Nil (IU/ml)	TB1 minus Nil (IU/ml)	TB2 minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Rezultat QFT-Plus testa	Izvršće/tumačenje
≤ 8,0	≥ 0,35 i ≥ 25 % Nil vrijednosti	Svejedno koliko	Svejedno koliko	Pozitivan [†]	Vjerojatna infekcija bakterijom <i>M. tuberculosis</i>
	Svejedno koliko	≥ 0,35 i ≥ 25 % Nil vrijednosti	≥ 0,5	Negativan	Infekcija bakterijom <i>M. tuberculosis</i> NIJE vjerojatna
	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25 % Nil vrijednosti	< 0,35 ili ≥ 0,35 i < 25 % Nil vrijednosti	< 0,5	Neodređen [‡]	Vjerojatnost infekcije bakterijom <i>M. tuberculosis</i> ne može se utvrditi
> 8,0 [§]		Svejedno koliko		Neodređen [‡]	Vjerojatnost infekcije bakterijom <i>M. tuberculosis</i> ne može se utvrditi

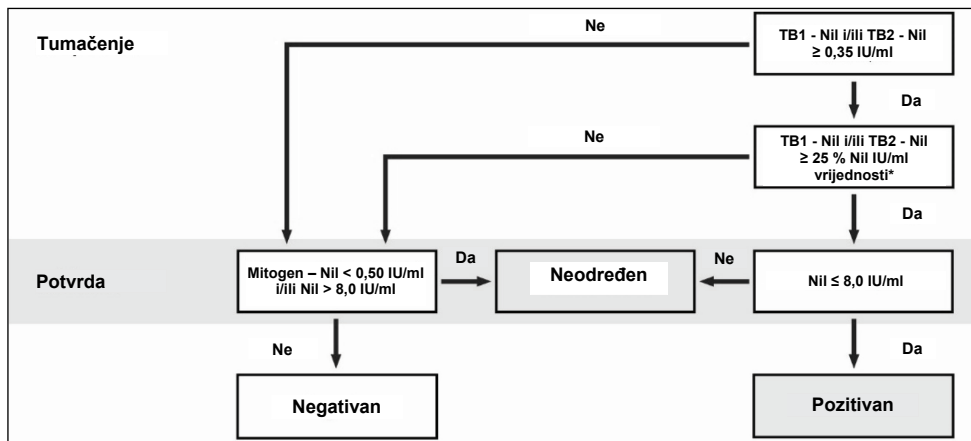
* Odgovori na Mitogen pozitivnu kontrolu (i povremeno na TB antigene) mogu biti izvan raspona čitača mikrotitar pločica. To ne utječe na rezultate testa. Softver QFT-Plus vrijednosti >10 ml navodi kao >10 IU/ml.

[†] Ako ne postoji sumnja na infekciju bakterijom *M. tuberculosis*, prvobitno pozitivni rezultati mogu se potvrditi ponovnim testiranjem izvornih uzoraka plazme u duplikatu s pomoću testa QFT-Plus ELISA. Ako je ponovno testiranje jedne ili dviju replika pozitivno, osoba bi se trebala smatrati pozitivnom na test.

[‡] Informacije o mogućim uzrocima potražite u odjeljku „Rješavanje problema”.

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

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



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

Slika 6. Dijagram tijeka za tumačenje rezultata QFT-Plus testa

Ograničenja

Rezultate QFT-Plus testiranja treba upotrebljavati u kombinaciji s epidemiologijom svake osobe, njezinim trenutačnim zdravstvenim statusom i drugim dijagnostičkim procjenama.

Osobe s Nil vrijednostima većim od 8,0 IU/ml klasificiraju se kao „Neodređeni” jer 25 % viši odgovor na TB antigene može biti izvan raspona mjerenja ispitivanja.

Do nepouzdanih ili neodređenih rezultata može doći iz sljedećih razloga:

- odstupanja od postupka opisanog u ovim uputama za upotrebu
- prekomjerna razina cirkulirajućeg IFN- γ ili prisutnost heterofilnih protutijela
- više od 16 sati između vađenja ispitka krvi i inkubacije na 37 °C; ovo nije primjenjivo ako se upotrebljava tijekom rada s epruvetom s litij-heparinom ili natrij-heparinom na temperaturi između 2 i 8 °C.

Radne značajke

Klinička ispitivanja

Budući da nema točnog standardnog testa za LTBI, procjena osjetljivosti i specifičnosti za QFT-Plus ne može se praktično procijeniti. Specifičnost QFT-Plus testa približno je utvrđena procjenom lažno pozitivnih rezultata u osoba s niskim rizikom (bez poznatih faktora rizika) za tuberkuloznu infekciju. Osjetljivost je približno utvrđena procjenom skupina pacijenata kod kojih je na temelju kulture potvrđena aktivna tuberkuloza.

Specifičnost

Provedeno je ispitivanje u kojem se procjenjivala specifičnost QFT-Plus testa u 409 ispitanika. Demografski podaci i faktori rizika za izloženost tuberkulozi utvrđeni su s pomoću standardizirane ankete u vrijeme testiranja.

U sažetku rezultata dviju skupina pacijenata s niskim rizikom (bez poznatih faktora rizika) za tuberkuloznu infekciju, ukupna specifičnost QFT-Plus testa bila je 97,6 % (399/409) (Tablica 3 i Tablica 4).

Tablica 3. Rezultati ispitivanja specifičnosti QFT-Plus testa prema lokaciji ispitivanja

Ispitivanje	Pozitivan	Negativan	Neodređen	Specifičnost (95 % CI)
Japan	4	203	0	98 % (95 – 100 %)
Australija	6	196	0	97 % (94 – 99 %)

Tablica 4. Rezultati ispitivanja specifičnosti QFT-Plus testa prema TB antigen epruveti

Ispitivanje	TB1	TB2	QFT-Plus
Pozitivan	5	10	10
Negativan	404	399	399
Neodređen	0	0	0
Specifičnost (95 % CI)	98,8 % (97,2 – 99,6)	97,6% (95,6 – 98,8)	97,6% (95,6 – 98,8)

Osjetljivost na aktivnu tuberkulozu

Definitivni standardni test za LTBI ne postoji, ali odgovarajuća je zamjena mikrobiološka kultura bakterije *M. tuberculosis* zbog toga što su oboljeli pacijenti po definiciji zaraženi njome. Osobe za koje se sumnjalo da su oboljele od tuberkuloze s četiriju lokacija ispitivanja u Australiji i Japanu i za koje je naknadno na temelju kulture potvrđeno da su zaraženi bakterijom *M. tuberculosis*, testirani su kako bi se procijenila osjetljivost QFT-Plus testa (Tablica 5 i Tablica 6). Prije uzimanja krvi za QFT-Plus testiranje pacijenti su liječeni kraće od 14 dana.

U sažetku nalaza iz četiriju skupina pacijenta čija je kultura na *M. tuberculosis* bila pozitivna, ukupna osjetljivost QFT-Plus testa na aktivnu tuberkulozu bila je 95,3 % (164/172). U 4 skupine, 159 pacijenata bilo je pozitivno prema epruvetama TB1 i TB2, 1 pacijent bio je pozitivan samo prema epruveti TB1, a 4 su bila pozitivna samo prema epruveti TB2. Ukupno 1,1 % (2/174) rezultata bilo je neodređeno. Rezultat epruvete TB2 ispravno je identificirao 1 pacijenta potvrđenog na temelju kulture koji bi prema rezultatu samo epruvete TB1 bio neodređen (niska vrijednost Mitogen) (pogledajte Tablica 5 i Tablica 6).

Tablica 5. Rezultati ispitivanja osjetljivosti QFT-Plus testa prema lokaciji ispitivanja

Lokacije ispitivanja	Pozitivan	Negativan	Neodređen	Osjetljivost QFT-Plus testa* (95 % CI)
Japan, lokacija 1	36	7	0	84 % (69 – 93)
Japan, lokacija 2	53	1	2	98% (90 – 100)
Japan, lokacija 3	54	0	0	100 % (93 – 100)
Lokacija Australija	21	0	0	100 % (84 – 100)

* Osjetljivost se temelji na ukupnom broju valjanih testova, ne uzimajući u obzir neodređene rezultate.

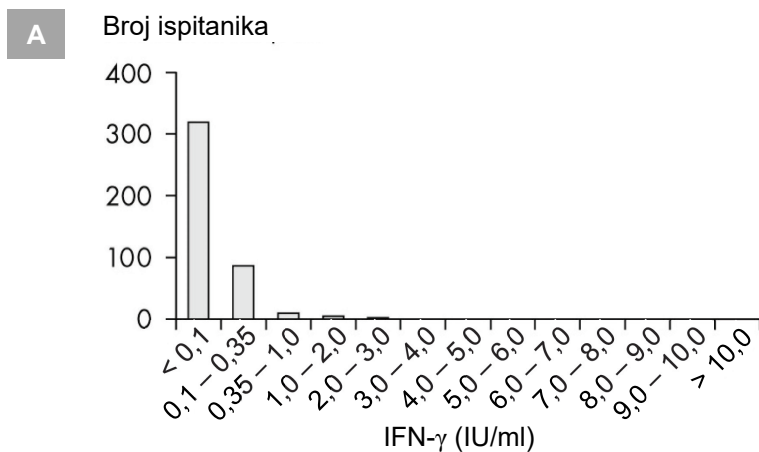
Tablica 6. Rezultati ispitivanja osjetljivosti QFT-Plus testa prema TB antigen epruveti

	TB1	TB2	QFT-Plus
Pozitivan	160	163	164
Negativan	11	9	8
Neodređen	3	2	2
Osjetljivost [†] (95 % CI)	93,6 % (88,8 – 96,7)	94,8% (90,3 – 97,6)	95,3% (90,9 – 97,9)

* Osjetljivost se temelji na ukupnom broju valjanih testova, ne uzimajući u obzir neodređene rezultate.

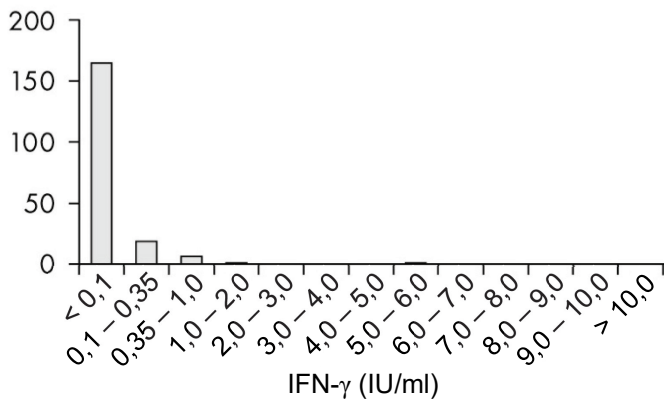
Uočene distribucije odgovora – stratificiran rizik

Brojni IFN- γ odgovori na TB1, TB2 i kontrolne epruvete uočeni su u kliničkim ispitivanjima i stratificirani prema riziku od infekcije bakterijom *M. tuberculosis* (slike 7 – 9). Mješovito rizična skupina sastoji se od ispitanika koji predstavljaju opću testnu populaciju, uključujući ispitanike s i bez faktora rizika za izloženost tuberkulozi i one kod kojih aktivna tuberkuloza nije vjerojatna (tj. LTBI).

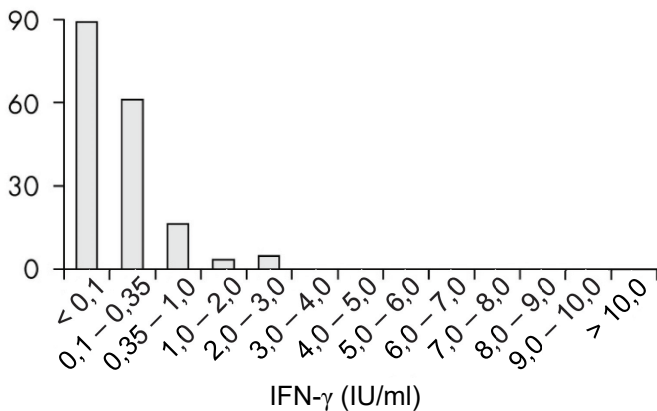


B

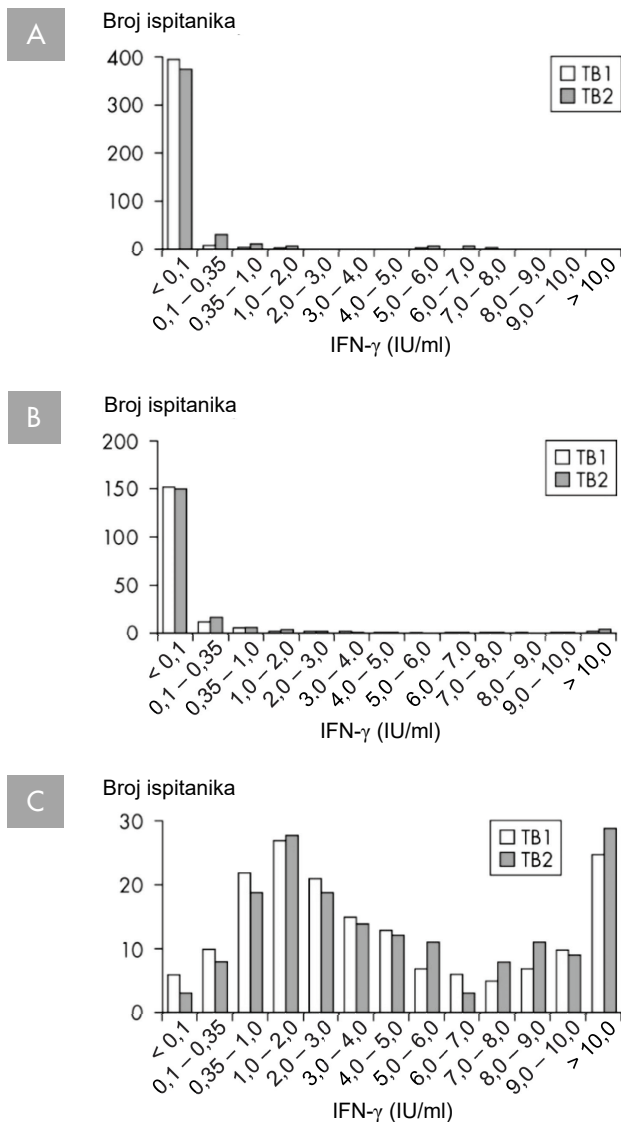
Broj ispitanika

**C**

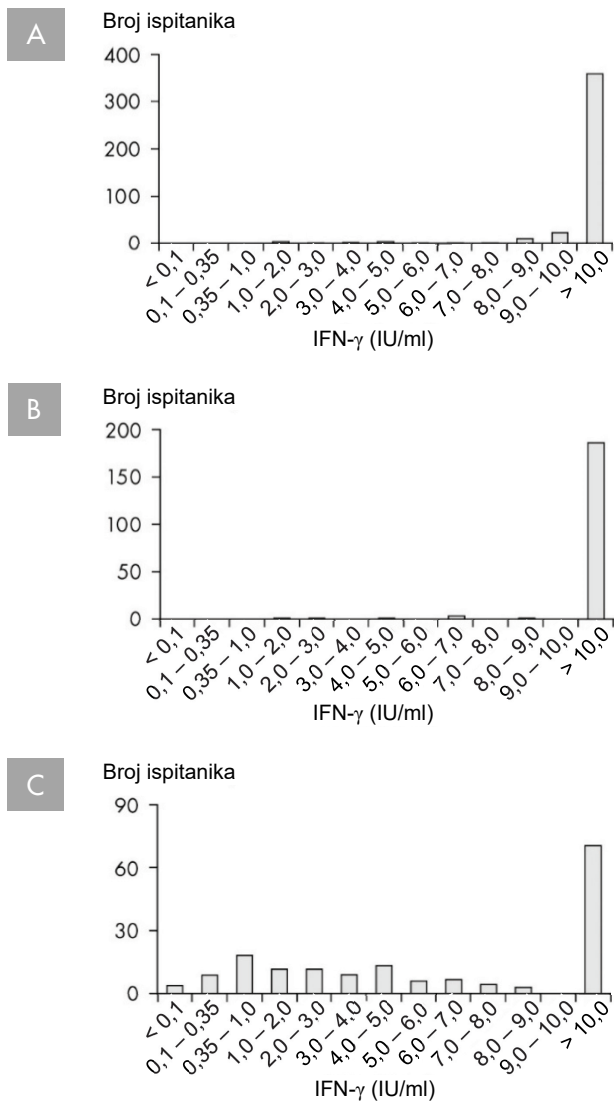
Broj ispitanika



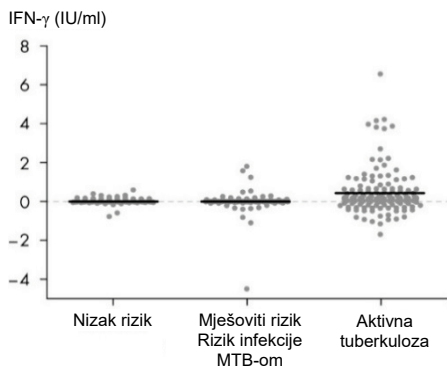
Slika 7. Distribucija Nil vrijednosti. A. Distribucija Nil vrijednosti u niskorizične populacije (n = 409). B. Distribucija Nil vrijednosti u mješovito rizične populacije (n = 194). C. Distribucija Nil vrijednosti u populacije kojoj je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture (n = 174).



Slika 8. Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (nulta vrijednost oduzeta). A. Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (nulta vrijednost oduzeta) u niskorizične populacije (n = 409). B. Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (nulta vrijednost oduzeta) u mješovito rizične populacije (n = 194). C. Distribucija vrijednosti TB1 i TB2 (nulta vrijednost oduzeta) u populacije kod koje je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture (n = 174).



Slika 9. Distribucija vrijednosti Mitogen (nulta vrijednost oduzeta). **A.** Distribucija vrijednosti Mitogen (nulta vrijednost oduzeta) u niskorizične populacije (n = 409). **B.** Distribucija vrijednosti Mitogen (nulta vrijednost oduzeta) u mješovito rizične populacije (n = 194). **C.** Distribucija vrijednosti Mitogen (nulta vrijednost oduzeta) u populacije kod koje je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture (n = 169).

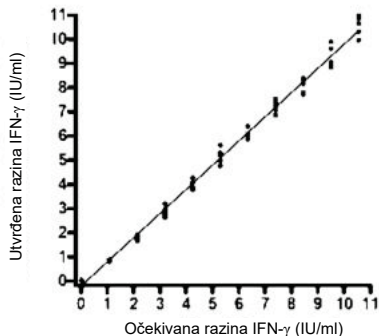


Slika 10. Uočena razlika između vrijednosti TB1 i TB2 (nulta vrijednost oduzeta), stratificirano prema riziku. Niskorizična populacija (n = 409), mješovito rizična populacija (n = 189) i populacija kod koje je infekcija bakterijom *M. tuberculosis* potvrđena na temelju kulture (n = 141). Vrijednosti TB1 oduzete su od vrijednosti TB2. Ispitanici s vrijednostima za TB1 ili TB2 >10,0 IU/ml isključeni su zbog toga što su bili izvan linearnog raspona ispitivanja.

Radne značajke ispitivanja

Linearnost testa QFT-Plus ELISA dokazana je nasumičnim postavljanjem pet replika iz 11 spremnika plazme poznatih IFN- γ koncentracija na pločici ELISA. Crta linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99 (Slika 11).

Granica detekcije testa QFT-Plus ELISA iznosi 0,065 IU/m i nema dokaza za prozonski učinak visoke razine izlaganja s koncentracijama za IFN- γ do 10 000 IU/ml.



Slika 11. Profil linearnosti QFT-Plus ELISA testa

Nepreciznost unutar i između ispitivanja (% CV) QFT-Plus ELISA procijenjena je testiranjem 20 uzoraka plazme s različitim koncentracijama IFN- γ u replikama po tri uzorka, u trima različitim laboratorijima, na tri nasumična dana, koje su testirala tri različita operatora. Tako je svaki uzorak testiran 27 puta, u 9 neovisnih ispitivanja. Jedan je uzorak bio nulta kontrola s izračunatom koncentracijom IFN- γ od 0,08 IU/ml (95 % CI: 0,07 – 0,09). Na preostalih 19 uzoraka plazme koncentracije su bile u rasponu od 0,33 (95 % CI: 0,31 – 0,34) do 7,7 IU/ml (95 % CI: 7,48 – 7,92).

Nepreciznost tijekom postupka ili unutar ispitivanja procijenjena je određivanjem prosjeka % CV-a za svaku testnu plazmu koja sadržava IFN- γ sa svake pločice (n = 9), a raspon nepreciznosti bio je od 4,1 do 9,1 % CV. Prosjek s kovarijancom tijekom rada (\pm 95 % CI) bio je 6,6 % \pm 0,6 %. Prosjek nulte IFN- γ plazme bio je 14,1 % CV.

Ukupna nepreciznost ili nepreciznost između testova utvrđena je usporedbom 27 izračunatih koncentracija IFN- γ za svaku testnu plazmu. Nepreciznost između testova bila je u rasponu od 6,6 do 12,3 % CV. Ukupni prosjek % CV (\pm 95 % CI) bio je 8,7 % \pm 0,7 %. Nulta IFN- γ plazma pokazala je 26,1 % CV. Ova se razina varijacije treba očekivati jer je izračunata koncentracija IFN- γ niska i varijacija za niske procjene koncentracije bit će veća nego za više koncentracije.

Obnovljivost QFT-Plus testa utvrđena je upotrebom uzoraka krvi 102 ispitanika mješovitih faktora rizika za infekciju bakterijom *M. tuberculosis*. Procijenjena su tri različita operatora u trima različitim laboratorijskim uvjetima.

Izvršene su ukupno tri dijagnostičke determinacije za svakog ispitanika, što znači ukupno 306 za sve ispitanike. Sveukupno, dijagnostička obnovljivost iznosila je 99 % (95 % CI: 97,2 – 99,7), pri čemu je dijagnostički rezultat bio podudaran za 303 od 306 determinacija. Sve varijacije odnose se na rezultate troje ispitanika koji su bili blizu granične vrijednosti.

Dijagnoza LTBI

Objavljena su mnoga istraživanja koja pokazuju učinkovitost QFT testa, preteče QFT-Plus testa, na različitim populacijama s rizikom od infekcije MTB-om. Glavni zaključci nekih odabranih istraživanja prikazani su u Tablica 7.

Tablica 7. Odabrana objavljena istraživanja QFT testa

Populacija/stanje	Rezultati i zaključci	Ukupan broj objavljenih istraživanja
Pedijatrija	Dokazana učinkovitost kod djece, uključujući djecu mlađu od 5 godina (45–46) s većim stupnjem točnosti u odnosu na IGRA test na temelju enzimiški vezanog imunospot testa (ELISpot) (8). Najveće istraživanje provedeno do danas u kojem su uspoređivani QFT i TST kod djece iz Vijetnama, s Filipina i iz Meksika daje prednost primjeni QFT testa u odnosu na TST test kad je u pitanju testiranje djece rođene u inozemstvu na LTBI (46). Istraživanje s ograničenim kontaktima pokazuje bolju prediktivnu vrijednost nego TST kod djece (47) i 8 puta veći rizik od napredovanja u tuberkulozu u roku od dvije godine među konverterima prema QFT testu u odnosu na osobe koje nisu konverteri (48). Proturječnost QFT negativan / TST pozitivan visoka je kod djece cijepljene BCG-om (46, 49), ali nije bilo utjecaja na odgovor na Mitogen kod djece mlađe od 5 godina (49) i niske neodređene rezultate tijekom rutinskog probira imigrantske djece (46).	152
Trudnoća	U okolini s niskom pojavnosti bolesti učinkovitost QFT testa jednako je dobra u svim tromjesečjima trudnoće s rezultatima koji se mogu usporediti s rezultatima žena koje nisu trudne, specifičnost mu je puno veća, barem je jednako osjetljiv i možda je bolji pretkazivač napredovanja bolesti nego TST (50). U okolini s visokom pojavnosti bolesti QFT je tijekom trudnoće bio stabilniji te je preciznije približno utvrdio pozadinsku prevalenciju LTBI u odnosu na TST, iako su autori zaključili da trudnoća utječe i na QFT i na TST (51).	6

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

Tablica 7. Odabrana objavljena istraživanja QFT testa (nastavak)

Populacija/stanje	Rezultati i zaključci	Ukupan broj objavljenih istraživanja
HIV/AIDS	Infekcija virusom HIV utječe i na IGRA testove i na TST test, a dokazi upućuju na to da je potreban oprez pri tumačenju rezultata kod osoba kod kojih je broj CD4+ stanica < 200 (52). Pokazalo se da je utjecaj na QFT test manji od utjecaja na IGRA test na temelju enzimski vezanog imunospot testa (ELISpot) i TST test (53–55). Jednim posjetom u svrhu provođenja IGRA testova rješava se problem niskih stopa povrata na TST testiranje u ovoj populaciji (53).	101
Imunosupresivne terapije	Imunosupresivne terapije manje utječu na QFT nego na TST te je QFT u boljoj uzajamnoj vezi s faktorima rizika za tuberkulozu (23, 27). QFT ima veliku osjetljivost kod pacijenata oboljelih od reumatske bolesti (23; 56, 57) i višu specifičnost u odnosu na TST te minimizira lažno pozitivne rezultate i smanjuje nepotrebno liječenje koje bi uslijedilo nakon TST testa (23, 57, 58).	112
Zdravstveni djelatnici	Pokazalo se da ima viši stupanj specifičnosti s manjim brojem lažno pozitivnih rezultata u odnosu na TST te da je isplativiji od TST testa (59–62). Varijabilnost oko praga očekivan je rezultat u serijskom testiranju zbog dihotomne granične vrijednosti i inherentne varijabilnosti biološkog testa (63). Istraživanja su pokazala više stope konverzije/reverzije u odnosu na TST u serijskom testiranju niskorizičnih zdravstvenih djelatnika (64, 65). Centar za kontrolu i prevenciju bolesti SAD-a potvrđuje da blagi kriterij za definiranje konverzije IGRA testa može rezultirati većom konverzijom nego što je uočeno u slučaju strožih kvantitativnih kriterija TST testa, a strategije ponovnog testiranja pokazale su se učinkovitima pri upravljanju fenomenom konverzije/reverzije (65–68).	111
Kontakti s TB	Više PPV i NPV vrijednosti u odnosu na TST (47); praktičnost jednog posjeta za one za koje je vjerojatno da se neće vratiti (63), bolja uzajamna veza s izloženošću (69), koja se naročito uočava kod osoba cijepljenih BCG-om i populacija iz zemalja u kojima se provodi cijepljenje BCG-om (70, 71).	89
Transplantacija	Pokazalo se da je barem jednako učinkovit kao TST, ali na njega manje utječe bolest organa u posljednjem stadiju u odnosu na TST (22).	23

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

Tablica 7. Odabrana objavljena istraživanja QFT testa (nastavak)

Populacija/stanje	Rezultati i zaključci	Ukupan broj objavljenih istraživanja
Dijabetes	Proturječni dokazi iz malog broja publikacija s ograničenim brojem ispitanika. Istraživanje provedeno u području s niskom pojavnosti bolesti pokazalo je da dijabetes kod pacijenata oboljelih od tuberkuloze ne umanjuje osjetljivost QFT testa (72). U istraživanju provedenom u Tanzaniji, području s visokom pojavnosti bolesti, koje upućuje na negativan utjecaj dijabetesa na proizvodnju IFN- γ , nisu uzeti u obzir ometajući uvjeti poput virusa HIV i infekcije helmintima (73). U istraživanjima provedenima u Vijetnamu, 838 osoba koje su izjavile da boluju od dijabetesa i za koje se sumnja da imaju tuberkulozu zbog abnormalnih nalaza rendgenskih snimki ili za koje je na temelju kulture potvrđeno da imaju aktivnu tuberkulozu (n = 128), pozitivnost QFT testa bila je jednaka ili veća u odnosu na granične vrijednosti TST testa od 10 i 15 mm (74).	9
Zadnji stadij bolesti bubrega	Pozitivni rezultati QFT testa u uzajamnoj su vezi s faktorima rizika za tuberkulozu bolje nego u slučaju TST testa te su manje povezani s BCG-om (75).	45
Migranti	Istraživanja su pokazala da BCG i dob ne utječu na QFT, što nije slučaj kod TST testa (74). Pokazalo se da je QFT najisplativija metoda (76). U područjima s niskom pojavnosti bolesti većina slučajeva tuberkuloze bilježi se kod imigranata, uslijed ponovne aktivacije latentne tuberkuloze nakon dolaska (77). Najveće istraživanje provedeno do danas u kojem su uspoređivani QFT i TST kod imigrantske djece daje prednost primjeni QFT testa u odnosu na TST kad je u pitanju testiranje imigrantske djece na latentnu tuberkuloznu infekciju (46).	29

Tehnički podaci

Neodređeni rezultati

Neodređeni su rezultati rijetki i mogu biti povezani sa statusom imuniteta testiranog pojedinca, a mogu biti uzrokovani brojnim tehničkim čimbenicima u slučaju nepridržavanja prethodno navedenih uputa za upotrebu.

Ako se sumnja na tehnički problem pri pohrani reagensa, uzimanju krvi ili rukovanju uzorcima krvi, treba ponoviti cijeli QFT-Plus test s novim ispitkom krvi. ELISA test sa stimuliranim uzorcima plazme može se ponoviti ako se sumnja u neodgovarajuće ispiranje ili druga odstupanja od propisane ELISA metode testiranja. Ne očekuje se da će se neodređeni rezultati uzrokovani niskim vrijednostima Mitogen ili visokim Nil vrijednostima ponavljanjem testa promijeniti, osim ako je došlo do pogreške pri provođenju ELISA testa. Nejasne rezultate treba prijaviti takve kakvi jesu. Liječnik po potrebi može uzeti novi ispitak krvi ili provesti druge postupke.

Zgrušani uzorci plazme

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

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i tehničke podatke na stranici: www.QuantiFERON.com. Informacije za kontakt potražite na poledini.

Rješavanje problema pri ELISA testu

Nespecifična boja reakcije

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

Niska očitavanja optičke gustoće za standarde

Mogući uzrok	Rješenje
a) Pogreška pri razrjeđivanju standarda	Razrjeđivanje standarda iz kompleta provodite točno prema ovoj uputi za upotrebu.
b) Pogrešno pipetiranje	Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača.
c) Temperatura inkubacije preniska	Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C).
d) Vrijeme inkubacije prekratko	Inkubacija pločice s konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati 120 ± 5 minuta. Otopina enzimskog supstrata inkubira se na pločici 30 minuta.

Rješavanje problema pri ELISA testu

- | | |
|---|---|
| e) Upotrijebljen pogrešan filtar za čitač pločice | Pločicu treba čitati na 450 nm s referentnim filtrom između 620 i 650 nm. |
| f) Reagensi su prehladni | Svi reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, moraju postići sobnu temperaturu prije početka ispitivanja. To traje otprilike jedan sat. |
| g) Vijek trajanja kompleta/komponenti je istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca od datuma rekonstitucije. |

Jaka obojenost pozadine

- | Mogući uzrok | Rješenje |
|--|--|
| a) Nepotpuno ispiranje pločice | Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. Ovisno o primijenjenom uređaju za ispiranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Temperatura inkubacije previsoka | Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C). |
| c) Vijek trajanja kompleta/komponenti je istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca od datuma rekonstitucije. |
| d) Otopina enzimskog supstrata je kontaminirana | Bacite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Pobrinite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici. |

Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između duplikata

- | Mogući uzrok | Rješenje |
|---|--|
| a) Nepotpuno ispiranje pločice | Pločicu isperite najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. Ovisno o primijenjenom uređaju za ispiranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa ispiranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Pogreška pri razrjeđivanju standarda | Razrjeđivanje standarda provodite točno prema ovoj uputi za upotrebu. |
| c) Nedovoljno miješanje | Prije nego što ih dodate na pločicu, dobro izmiješajte reagense okretanjem ili laganim kružnim mućkanjem. |
| d) Nedosljedna tehnika pipetiranja ili prekid tijekom pripremanja ispitivanja | Uzorke i standarde treba dodavati kontinuirano. Svi reagensi trebaju biti pripremljeni prije početka ispitivanja. |

Informacije o proizvodu i tehničke priručnike možete dobiti besplatno od tvrtke QIAGEN, putem svoga distributera ili na adresi www.QuantiFERON.com.

Reference

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

Simboli

Na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
 2 x 96	Dovoljno za pripremu 2 x 96 uzoraka
	Proizvođač
	Simbol s oznakom CE-IVD
	Za in vitro dijagnostičku upotrebu
	Kôd serije
	Kataloški broj
	Globalni broj trgovačke jedinice
	Upotrebljivo do
	Ograničenje temperature
	Prije upotrebe pročitajte upute
	Za jednu upotrebu
	Čuvajte podalje od sunčeve svjetlosti
	Broj materijala
Rn	R se odnosi na reviziju uputa za upotrebu, a n je broj revizije

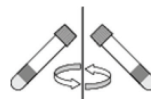
Kontaktni podaci

Za tehničku pomoć i više informacija nazovite broj 00800 22-44-6000 bez plaćanja pristojbe, posjetite naš Centar za tehničku podršku na web-mjestu **www.qiagen.com/contact** ili se obratite jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN (pogledajte poledinu ili posjetite web-mjesto **www.qiagen.com**).

Skraćeni testni postupak

Faza 1 – inkubacija krvi

1. Uzmite krv od pacijenta u epruvete za uzimanje krvi i izmiješajte tako da ih protresete deset (10) puta onoliko jako koliko je potrebno da bi se cijela unutarnja površina epruveta prekrila krvlju. Na taj će se način otopiti antigeni na stijenkama epruvete.
2. Epruvete inkubirajte u uspravnom položaju na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ u trajanju od 16 do 24 sata.
3. Nakon inkubacije centrifugirajte epruvete 15 minuta pri 2000 do 3000 x g RCF (g) da biste odvojili plazmu od crvenih krvnih stanica.
4. Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati prema gore ili prema dolje niti bilo kako miješati plazmu prije izdvajanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.



Faza 2 – IFN— γ ELISA

1. ELISA komponente, osim 100x koncentriranog konjugata, ostavite da se stabiliziraju na sobnoj temperaturi ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) najmanje 60 minuta.
2. Rekonstituirajte standard iz kompleta destiliranom ili deioniziranom vodom na 8,0 IU/ml. Pripremite četiri (4) razrijeđene otopine standarda.
3. Rekonstituirajte 100x koncentrirani konjugat osušen u smrznutom stanju s pomoću destilirane ili deionizirane vode.

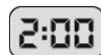


4. Pripremite konjugat spreman za upotrebu s pomoću zelenog diluensa i dodajte 50 µl u svaku jažicu.



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

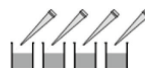
6. Inkubirajte 120 ± 5 minuta na sobnoj temperaturi.



7. Isperite jažice najmanje 6 puta s pomoću 400 µl pufera za ispiranje po jažici.



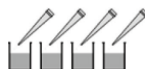
8. Dodajte 100 µl otopine enzimskog suptrata u svaku jažicu. Izmiješajte tresilicom.



9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.



10. Dodajte 50 µl enzimske otopine za zaustavljanje odgovora u svaku jažicu. Izmiješajte tresilicom.



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



12. Analizirajte rezultate.



Značajne izmjene

Odjeljak	Stranica	Izmjena(e)
Razno	Razno	Dodane upute vezane uz upotrebu epruveta s litij-heparinom ili natrij-heparinom
Razno	Razno	Dodane upute vezane uz tijek rada koji obuhvaća uzimanje krvi i pohranu na temperaturi 2 – 8°C
Razno	Razno	Poklopac pločice sada je materijal koji je nužan, ali nije isporučen

Povijest revizija priručnika

Dokument	Izmjene
R6 04/2019	Promjene vezane uz litij-heparin / natrij-heparin Nove upute za rad za tijek rada koji obuhvaća uzimanje krvi i pohranu na temperaturi od 2 do 8°C Poklopci pločica uklonjeni s QF pločica

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

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

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

1. Proizvod se smije upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim uputama za upotrebu i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za upotrebu ili ugrađivanje komponenata ove ploče s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim uputama za upotrebu.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ova ploča i/ili njezina upotreba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu upotrebu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati, osim ako je drugačije odredila tvrtka QIAGEN.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće poduzeti niti dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na web-mjestu www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, sva prava pridržana.

www.QuantiFERON.com

Azija i Pacifik | techservice-ap@qiagen.com

Europa | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Bliski istok / Afrika | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Latinska Amerika (ne uključujući Brazil i Meksiko) | techservice-latam@qiagen.com

Napomene

Napomene

