

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



2 x 96 (kataloški br. 0594-0201)



20 x 96 (kataloški br. 0594-0501)

IFN- γ test pune krvi za mjerenje reakcije na peptidne
antigene ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4)



Za in vitro dijagnostičku namjenu



0594-0201, 0594-0501



Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australija

Telefon: (Australija) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, NJEMAČKA

1075115HR ver. 01



www.QuantiFERON.com



Sadržaj

1. Namjena	4
2. Sažetak i objašnjenje testa	4
Načela testa	5
Vrijeme potrebno za testiranje	5
3. Sastojci i pohranjivanje	6
Potrebni materijali koji nisu isporučeni	7
Pohranjivanje i rukovanje	7
4. Upozorenja i mjere opreza	8
Za in vitro dijagnostičku namjenu	8
Upozorenja	8
Mjere opreza	9
5. Uzimanje uzoraka i rukovanje	10
6. Upute za upotrebu	12
Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme	12
Faza 2 — Humani IFN- γ ELISA	13
7. Izračunavanje i interpretacija rezultata	17
Formiranje standardne krivulje	17
Kontrola kvalitete testa	17
8. Ograničenja	19
9. Radne značajke	20
Klinička istraživanja	20
10. Tehnički podaci	22
Nejasni rezultati	22
Zgrušani uzorci plazme	22
Vodič za rješavanje problema	23
11. Bibliografija	25
12. Tehnička služba	27
13. Skraćeni testni postupak	28
Faza 1 – inkubacija krvi	28
Faza 2 – IFN- γ ELISA	28
Značajne promjene	30

1. Namjena

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) je in vitro dijagnostički test koji pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4) stimulira stanice u hepariniziranoj punoj krvi. Otkrivanje interferona- γ (IFN- γ) enzimski vezanim imunosorbent testom (ELISA) upotrebljava se za mjerenje in vitro reakcija na te peptidne antigene koji su povezani s infekcijom bakterijom kompleksa *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT je indirektan test za dokazivanje infekcije bakterijom kompleksa *M. tuberculosis* (uključujući aktivno oboljenje) i treba ga upotrebljavati zajedno s ocjenom rizika, rendgenskim pregledom i ostalim medicinskim i dijagnostičkim pretragama.

2. Sažetak i objašnjenje testa

Tuberkuloza je zarazna bolest prouzročena infekcijom mikroorganizmima *M. tuberculosis* kompleksa (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), koja se obično prenosi kapljičnim putem s osoba oboljelih od tuberkuloze dišnog sustava. Kod novoinficiranih bolesnika tuberkuloza se može razviti u roku od nekoliko tjedana ili mjeseci, ali kod većine inficiranih osoba ne nastupaju tegobe. Kod nekih od njih perzistira latentna tuberkulozna infekcija (LTBI), kao nesimptomatično oboljenje koje nije zarazno, a do izbijanja tuberkuloze može doći tek nekoliko mjeseci ili godina poslije infekcije. Glavna je svrha dijagnosticiranja LTBI-ja primjena preventivne terapije kako bi se spriječilo izbijanje oboljenja od tuberkuloze. Sve donedavno tuberkulinski kožni test (TST) bio je jedina dostupna metoda za dijagnosticiranje LTBI-ja. Osjetljivost kože na tuberkulin pojavljuje se od 2 do 10 tjedana poslije infekcije. Međutim, neke inficirane osobe ne reagiraju na tuberkulin, na primjer bolesnici s oslabljenom imunološkom reakcijom, ali i osobe bez takvih poremećaja. Obrnuto, neke osobe koje najvjerojatnije ne boluju od infekcije bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*, poslije cijepljenja bacilom Calmette-Guérin (BCG), infekcije drugim mikobakterijama izvan kompleksa *M. tuberculosis* ili zbog drugih nepoznatih čimbenika, pokazuju osjetljivost na tuberkulin i pozitivan rezultat na TST test.

LTBI moramo razlikovati od bolesti tuberkuloze, za koju je obveza prijave propisana zakonom. Od tuberkuloze obično obolijevaju pluća i donji dišni putovi, ali mogu biti zahvaćeni i drugi organski sustavi. Tuberkuloza se dijagnosticira na temelju rezultata anamneze, tjelesnog, radiološkog, histološkog i mikobakteriološkog pregleda.

QFT mjeri stanicama posredovane imunološke (CMI) reakcije na peptidne antigene koji simuliraju mikobakterijske proteine. Ti proteini, ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4), nisu prisutni ni u jednom BCG soju, kao ni u većini netuberkuloznih bakterija, osim *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*.(1) U krvi osoba koje su inficirane kompleksom bakterija *M. tuberculosis* obično se nalaze limfociti koji prepoznaju te i druge mikobakterijske antigene. U tom postupku prepoznavanja stvara se i otpušta IFN- γ citokin. Glavna je svrha testa dokaz i nakon toga utvrđivanje količine IFN- γ citokina.

Antigeni primijenjeni u QFT testu koktel su peptida koji simuliraju proteine ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4). Brojne su studije pokazale da ti peptidni antigeni stimuliraju IFN- γ reakciju u T stanicama osoba zaraženih bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*, ali općenito ne stimuliraju T stanice neinficiranih osoba ili onih cijepljenih BCG-om koje nisu oboljele ili ne pripadaju u grupu s LTBI rizikom.(1–32) Međutim, medicinske terapije ili oboljenja koja oštećuju funkcije imunološkog sustava potencijalno smanjuju i IFN- γ reakciju. Bolesnici koji pate od nekih drugih mikobakterijskih infekcija mogu reagirati i na ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4) jer su geni koji nose upute za stvaranje tih proteina prisutni i u mikobakterijama *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*.(1, 23) QFT je stoga koristan i kao test za LTBI i kao pomoć kod dijagnoze bolesnika inficiranih bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*. Pozitivan rezultat testa podupire dijagnozu tuberkuloze, no pozitivne rezultate mogu uzrokovati i infekcije drugim mikobakterijama (npr. *M. kansasii*). Da bi se potvrdilo ili isključilo oboljenje od tuberkuloze, potrebni su daljnji medicinski i dijagnostički pregledi.

Načela testa

Sustav QFT sadrži specijalne epruvete za uzimanje krvi u koje se uzimaju uzorci pune krvi. Inkubacija uzoraka u epruvetama traje od 16 do 24 sata, a potom se prikupi plazma i ispita prisutnost IFN- γ , koji je eventualno nastao kao reakcija na peptidne antigene.

QFT test provodi se u dvije faze. Najprije se uzimaju uzorci pune krvi u različite QFT epruvete za uzimanje krvi – epruvetu Nulta kontrola, epruvetu TB Antigen i epruvetu Mitogen kontrola.

Epruveta Mitogen kontrola može se u QFT testu upotrebljavati kao pozitivna kontrola. To može biti od posebne važnosti ako je imunološki status bolesnika nejasan. Epruveta Mitogen kontrola može poslužiti i kao kontrola pravilnog postupanja s uzorkom krvi i pravilne inkubacije.

Epruvete treba inkubirati što prije, a svakako u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi, na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije u trajanju od 16 do 24 sata epruvete se centrifugiraju, a potom se oduzima plazma i utvrđuje se količina IFN- γ (u IJ/ml) metodom ELISA.

Test se smatra pozitivnim u pogledu IFN- γ reakcije u TB Antigen epruveti ako je ta vrijednost znatno viša od vrijednosti Nulte kontrole IFN- γ IJ/ml. Ako se upotrebljava epruveta Mitogen kontrola, uzorak plazme u njoj služi kao IFN- γ pozitivna kontrola za svaki testirani uzorak. Neznatna reakcija na mitogen (<0,5 IJ/ml) smatra se nejasnim rezultatom ako uzorak krvi pokazuje negativnu reakciju na TB antigene. Takav rezultat može nastati u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita zbog nepravilnog postupanja s uzorkom, nepravilnog uzimanja krvi u epruvetu ili miješanja epruvete Mitogen kontrola ili ako limfociti bolesnika nisu u stanju proizvesti IFN- γ . Nulti uzorak obuhvaća korekturu pozadine, heterofilnih efekata antitijela ili nespecifičnog IFN- γ u uzorcima krvi. IFN- γ vrijednost epruvete Nulta kontrola odbija se od IFN- γ vrijednosti epruvete TB Antigen i epruvete Mitogen kontrola (ako se upotrebljava).

Vrijeme potrebno za testiranje

U nastavku se navode podaci o približnom trajanju QFT testa, kao i vrijeme potrebno za testiranje većeg broja uzoraka metodom skupne obrade:

Inkubacija epruveta s uzorcima krvi pri 37 °C: od 16 do 24 sati

ELISA: oko 3 sata za svaku ELISA ploču

(od 28 do 44 osobe)

<1 sata rada

dodajte od 10 do 15 minuta za svaku dodatnu ploču

3. Sastojci i pohranjivanje

Blood Collection Tubes (Epruvete za uzimanje krvi)*	300 epruveta	200 epruveta	100 epruveta
Kataloški br.	T0590-0301	0590-0201	T0593-0201
Broj preparata	100	100	100
QuantiFERON Nil Tube (Nulta kontrola) (sivi čep s bijelim prstenom)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON TB Antigen Tube (TB Antigen epruveta) (crveni čep s bijelim prstenom)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON Mitogen Tube (epruveta Mitogen kontrola) (ljubičasti čep s bijelim prstenom)	100 epruveta		100 epruveta
Uputa za upotrebu QFT epruveta za uzimanje krvi	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (Epruvete za uzimanje krvi na velikim nadmorskim visinama) (za visine od 1020 do 1875 metara)*	300 epruveta	100 epruveta	100 epruveta
Kataloški br.	T0590-0505	0590-0501	T0593-0501
QuantiFERON HA Nil Tube (Nulta kontrola) (sivi čep sa žutim prstenom)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON TB Antigen Tube (TB Antigen epruveta) (crveni čep sa žutim prstenom)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (epruveta Mitogen kontrola) (ljubičasti čep sa žutim prstenom)	100 epruveta		100 epruveta
Uputa za upotrebu QFT epruveta za uzimanje krvi	1	1	1

* Sve konfiguracije proizvoda nisu dostupne u svim državama. Potražite u podacima službe za korisnike QIAGEN (pojednosto na web-adresi www.qiagen.com) više informacija o tome koje su konfiguracije na raspolaganju za narudžbu.

Komponente ELISA	Komplet ELISA s 2 ploče	Referentno laboratorijsko pakiranje
Kataloški br.	0594-0201	0594-0501
Mikrotitar trake (12 x 8 udubljenja) obložene anti-humanim mišjim IFN- γ monoklonalnim antitijelom	2 kompleta mikrotitar traka s 12 x 8 udubljenja	20 kompleta mikrotitar traka s 12 x 8 udubljenja
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Humani IFN- γ standard, liofiliziran) (sadrži rekombinantni humani IFN- γ , goveđi kazein, 0,01% w/v Thimerosal)	1 x bočica (8 IJ/ml kada se rekonstituira)	10 x bočica (8 IJ/ml kada se rekonstituira)
Green Diluent (Zeleni diluens) (sadrži goveđi kazein, normalni serum miša, 0,01% w/v Thimerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (100X koncentrirani konjugat, liofiliziran) (anti-humani mišji IFN- γ HRP, sadrži 0,01% w/v Thimerosal)	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, sadrži 0,05% v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Otopina enzimskog supstrata) (sadrži H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimaska otopina za zaustavljanje reakcije) (sadrži 0,5M H ₂ SO ₄) [†]	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Uputa za upotrebu proizvoda QFT ELISA	1	1

[†] Sadrži sumpornu kiselinu. O mjerama opreza pogledajte na str. 9.

Potrebni materijali koji nisu isporučeni

- Inkubator temperature 37 °C. CO₂ nije potreban
- Kalibrirane pipete s varijabilnim volumenom za doziranje 10 μ l do 1000 μ l, s jednokratnim vrhovima
- Kalibrirane višekanalne pipete za doziranje 50 μ l i 100 μ l, s jednokratnim vrhovima
- Tresilica za mikrotitar ploče
- Deionizirana ili destilirana voda, 2 litre
- Uređaj za ispiranje mikrotitar ploča (po mogućnosti automatiziran)
- Čitač mikrotitar ploča s filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm

Pohranjivanje i rukovanje

Epruvete za uzimanje krvi

- Epruvete za uzimanje krvi čuvajte na temperaturama 4 °C do 25 °C.

Reagensi kompleta

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

Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi

Upute o rekonstituiranju reagensa pogledajte u 6. poglavlju (str. 13)

- Rekonstituirani standard iz kompleta može se održati do 3 mjeseca na temperaturi od 2 °C do 8 °C.
Zabilježite datum rekonstitucije standarda iz kompleta.
- Nakon rekonstitucije nepotrebni 100X koncentrirani konjugat mora se i dalje čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C i treba ga potrošiti u roku od 3 mjeseca.
Zabilježite datum rekonstitucije konjugata.
- Rekonstituirani konjugat mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
- Pufer za ispiranje koji je pripremljen za upotrebu održiv je na sobnoj temperaturi do 2 tjedna.

4. Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku namjenu

Upozorenja

- Negativan rezultat QFT testa ne isključuje mogućnost infekcije bakterijom kompleksa *M. tuberculosis* ili oboljenje od tuberkuloze. Uzrok negativnog lažnog rezultata može biti faza infekcije (npr. ako je uzorak uzet prije razvitka celularne imunološke reakcije), poremećaj funkcije imunološkog sustava zbog drugih oboljenja, nepravilno postupanje s epruvetama nakon uzimanja krvi, nepravilno provođenje testa ili drugi imunološki čimbenici.
- Pozitivan rezultat QFT testa ne može biti jedina osnova za ocjenjivanje infekcije bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*. Nepravilno provođenje testa može uzrokovati lažno pozitivne rezultate.
- Pozitivan rezultat QFT testa potrebno je razjasniti daljnjim medicinskim i dijagnostičkim pretragama da bi se utvrdilo postoji li aktivno oboljenje od tuberkuloze (npr. AFB brisom i kulturom, kao i rendgenskim pregledom toraksa).
- Iako BCG sojevi i najveći dio poznatih netuberkuloznih mikobakterija ne sadrže ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4), pozitivan rezultat QFT testa može biti posljedica infekcije mikobakterijom *M. kansasii*, *M. szulgai* ili *M. marinum*. Ako postoji sumnja na takve infekcije, potrebno je provesti druga testiranja.

Mjere opreza

Samo za in vitro dijagnostičku namjenu.

Prilikom rada s kemikalijama uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku zaštitnu odjeću, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa sigurnosnim podacima. One su dostupne na mreži, u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi www.qiagen.com/safety. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati list sa sigurnosnim podacima za svaki komplet i komponentu kompleta QIAGEN.



OPREZ: S ljudskom krvlju postupajte kao s potencijalno infektivnom.

Pridržavajte se odgovarajućih smjernica o postupanju s krvlju.

Sljedeće izjave o riziku i sigurnosti odnose se na komponente kompleta QuantiFERON-TB Gold ELISA.

Enzimska otopina za zaustavljanje reakcije QuantiFERON



Xi

Sadrži sumpornu kiselinu: Nadražujuće. Izjave o riziku i sigurnosti: * R36/38, S26-36/37/39

- **Zeleni diluens** sadrži normalni mišji serum i kazein koji mogu prouzrokovati alergijske reakcije. Stoga izbjegavajte kontakt s kožom.

U slučaju nužde

Prolijevanje, curenje, izlaganje ili nezgode

Nazovite CHEMTRECK u svako doba dana

Unutar SAD-a i Kanade: 1-800-424-9300

Izvan SAD-a i Kanade: +1-703-527-3887 (prihvaćaju se pozivi na račun primatelja)

Dodatne informacije

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

- Odstupanja od postupka opisanog u *Uputi za upotrebu proizvoda QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* mogu dovesti do pogrešnih rezultata. Prije upotrebe pažljivo pročitajte upute.
- Komplet nemojte upotrebljavati ako bilo koja bočica reagensa pokazuje znakove oštećenja ili curenja prije upotrebe.
- Nemojte upotrebljavati ili miješati Mikrotitar trake, Humani IFN- γ standard, Zeleni diluens ili 100X koncentrirani konjugat iz drugih serija kompleta QFT. Ostali reagensi (20X koncentrirani pufer za ispiranje, Otopina enzimskog supstrata i Enzimska otopina za zaustavljanje reakcije) iz drugih kompleta mogu se mijenjati, pod uvjetom da ne prekoračuju datum isteka i da odgovaraju zabilježenim podacima o seriji. Odložite neupotrijebljene reagense i biološke uzorke u skladu s lokalnim i državnim propisima.
- Nemojte upotrebljavati epruvete za uzimanje krvi ili komplet ELISA nakon datuma isteka.
- Provjerite je li laboratorijska oprema kao što su uređaji za pranje i čitači ploča kalibrirana/ovjerena za upotrebu.

* R36/38: Nadražujuće za oči i kožu, S26: U slučaju kontakta s očima, odmah isperite oči s puno vode i potražite savjet liječnika; S36/37/39: Nosite odgovarajuću zaštitnu odjeću, rukavice i zaštitu za oči/lice.

5. Uzimanje uzoraka i rukovanje

QFT test sadrži sljedeće epruvete za uzimanje krvi:

1. Epruvete QuantiFERON Nulta kontrola (sivi čep sa žutim prstenom; za visine do 810 m)
2. Epruvete TB Antigen (crveni čep s bijelim prstenom; za visine do 810 m)
3. Epruvete QuantiFERON Mitogen kontrola (ljubičasti čep s bijelim prstenom; za visine do 810 m)

Epruvete za upotrebu na velikim nadmorskim visinama (HA):

4. Epruvete QuantiFERON HA Nulta kontrola (sivi čep sa žutim prstenom; za visine od 1020 m do 1875 m)
5. Epruvete HA TB Antigen (crveni čep s bijelim prstenom; za visine od 1020 m do 1875 m)
6. Epruvete QuantiFERON HA Mitogen kontrola (ljubičasti čep sa žutim prstenom; za visine od 1020 m do 1875 m)

Antigeni se nalaze u sušenom obliku u prevlaci unutarnje stijenke epruvete za uzimanje krvi. Stoga se sadržaj epruveta mora dobro promiješati s krvi. Epruvete zatim treba što prije, ali najkasnije u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi, staviti u inkubator pri temperaturi od 37 °C.

Optimalni rezultati postižu se pridržavanjem sljedećih uputa:

1. Uzmite od svakog pacijenta 1 ml venske krvi u svaku QFT epruvetu za uzimanje krvi. Taj bi postupak trebao provoditi tehničar osposobljen za vađenje krvi.

- Do nadmorske visine od 810 metara treba upotrebljavati standardne QFT epruvete za uzimanje krvi. QFT epruvete za uzimanje krvi za upotrebu na velikim nadmorskim visinama (HA) treba upotrebljavati za visine od 1020 do 1875 metara.
- Ako se QFT epruvete za uzimanje krvi upotrebljavaju na nadmorskim visinama izvan naznačenog raspona ili za uzimanje malih uzoraka krvi, može se upotrijebiti i štrcaljka. U tom slučaju u sve tri epruvete treba odmah staviti po 1 ml krvi. Iz sigurnosnih razloga, najbolje je ukloniti iglu iz štrcaljke, pridržavajući se odgovarajućih sigurnosnih mjera, ukloniti čepove s 3 QFT epruvete i dodati po 1 ml krvi u svaku (do crne oznake s bočne strane naljepnice na epruveti). Nakon toga epruvete treba dobro začepiti i promiješati, kao što je opisano u nastavku.

- Budući da se epruvete od 1 ml relativno polako pune krvlju, ostavite epruvetu, nakon što se čini da je puna, još 2 – 3 sekunde na igli. Tako ćete osigurati uzimanje potrebne količine.

Crna oznaka s bočne strane epruveta označava razinu punjenja od 1 ml. QFT epruvete za uzimanje krvi ovjerene su za razine punjenja od 0,8 do 1,2 ml. Ako razina krvi u bilo kojoj epruveti nije blizu crte, preporučuje se uzimanje drugog uzorka.

- Ako za uzimanje krvi upotrebljavate leptirastu iglu, najprije upotrijebite praznu epruvetu kako bi se vod napunio krvlju prije nego što postavite QFT epruvetu.
- Ili, krv možete izvaditi u jednu zajedničku epruvetu koja sadrži litij-heparin kao antikoagulans, a zatim je prenijeti u QFT epruvete. **Upotrebljavajte samo litij-heparin** kao krvni anti-koagulans jer ostali antikoagulansi mogu utjecati na rezultate testa. Napunite epruvetu za uzimanje krvi (s najmanje 5 ml krvi) i blago promiješajte nekoliko je puta preokrećući da bi se heparin otopio. Prije stavljanja epruveta QFT u inkubator, što se **mora** učiniti u roku od 16 sati od vađenja krvi, krv treba držati na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C).

2. **Odmah nakon punjenja epruveta, protresite ih deset (10) puta, onoliko snažno koliko je potrebno da bi se cijela unutarnja površina epruvete obložila krvlju, odnosno da bi se rastvorili antigeni na stijenkama epruvete.**
 - U vrijeme punjenja krvlju epruvete moraju biti na temperaturi 17 °C – 25 °C.
 - Prejako protresanje može poremetiti gel i dovesti do pogrešnih rezultata.
 - Ako je krv izvađena u epruvetu koja sadrži heparin, uzorci krvi moraju se ravnomjerno izmiješati prije pretakanja u epruvete QFT. Pazite da se krv dobro izmiješa tako što ćete lagano okrenuti epruvetu **neposredno prije pretakanja**. Rasporedite 1,0 ml alikvota (1 po QFT epruveti) u odgovarajuću epruvetu Nulta kontrola, TB Antigen i Mitogen kontrola. To je najbolje obaviti sterilno, **uz pridržavanje odgovarajućih sigurnosnih mjera**, uklanjanjem čepova s tri QFT epruvete i dodavanjem 1 ml krvi u svaku (do crne oznake s bočne strane naljepnice na epruveti). Nakon toga epruvete treba dobro začepiti i promiješati, kao što je ranije opisano.
3. **Označite epruvete na odgovarajući način.**
 - Pazite da se nakon uklanjanja čepa svaka epruveta (Nulta kontrola, TB Antigen, Mitogen kontrola) može identificirati pomoću svoje naljepnice ili na druge načine.
4. **Nakon punjenja, protresanja i označavanja, epruvete se moraju što prije prenijeti u inkubator temperature 37 °C ± 1 °C, i to u roku od 16 sati od uzimanja uzoraka. Prije inkubacije epruvete držite na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C). Uzorke krvi nemojte stavljati u hladnjak ili zamrzavati.**

6. Upute za upotrebu

Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme

Materijali koje komplet sadrži

- Epruvete za uzimanje krvi (pogledajte 3. poglavlje).

Potrebni materijali (koji nisu isporučeni)

- Pogledajte 3. poglavlje.

Postupak

1. **Ako krv nije inkubirana odmah nakon prikupljanja, potrebno je ponovno promiješati epruvete tako da ih se preokrene 10 puta neposredno prije inkubacije.**
2. **Epruvete inkubirajte u USPRAVNOM položaju na temperaturi od $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, u trajanju od 16 do 24 sati. Za inkubator nisu potrebni CO_2 ili ovlaživanje.**
3. **Nakon inkubacije na 37 °C epruvete se mogu držati na temperaturama od 4 °C do 27 °C , najduže 3 dana do početka centrifugiranja.**
4. **Nakon inkubacije na 37 °C , epruvete treba radi lakšeg oduzimanja plazme centrifugirati 15 minuta na 2000 do 3000 RCF (g). Čep od gela odvojiti će stanice od plazme. Ako se to ne dogodi, epruvete treba ponovno centrifugirati pri većoj brzini.**
 - Plazma se može uzeti i bez centrifugiranja, ali treba pažljivo ukloniti plazmu bez poremećaja stanica.
5. **Uzorke plazme uzimajte samo pipetom.**
 - **Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati ili miješati plazmu prije uzimanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.**
 - Uzorci plazme mogu se prenijeti izravno iz centrifugiranih epruveta na QFT ELISA ploču, uključujući i situacije kada se upotrebljavaju ELISA automati.
 - Uzorci plazme mogu se čuvati do najviše 28 dana na temperaturama od 2 °C do 8 °C ili, ako se uzimaju na temperaturama nižim od -20 °C , duže vrijeme.
 - Radi postizanja odgovarajućih testnih uzoraka, prikupite najmanje $150\text{ }\mu\text{l}$ plazme.

Faza 2 — Humani IFN- γ ELISA

Materijali koje komplet sadrži

- Komplet QFT ELISA (pogledajte 3. poglavlje).

Potrebni materijali, koji nisu isporučeni

- Pogledajte 3. poglavlje.

Postupak

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

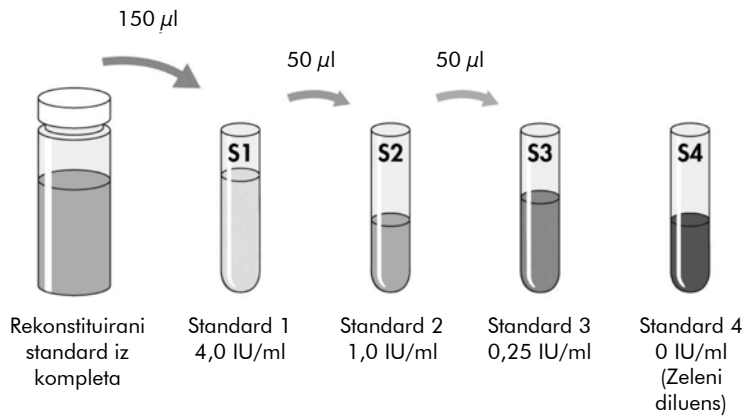
Pripremite najmanje 1 traku za QFT standarde i dovoljan broj traka za pacijente koji će se testirati (pogledajte slike 2A i 2B za upotrebu 3, odnosno 2 epruvete). Nakon upotrebe sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.

3. Rekonstituirajte liofilizirani standard iz kompleta količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na etiketi standardne bočice. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice, minimizirajući stvaranje pjene, i provjerite je li se sadržaj potpuno rastopio. Rekonstitucijom standarda na naznačeni volumen dobivamo otopinu s koncentracijom od 8,0 IJ/ml.

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

Upotrijebite rekonstituirani standard iz kompleta za pripremanje serije otopine od 1:4 IFN- γ u Zelenom diluensu (GD) (pogledajte sliku 1). S1 (Standard 1) sadrži 4 IJ/ml, S2 (Standard 2) sadrži 1 IJ/ml, S3 (Standard 3) sadrži 0,25 IJ/ml i S4 (Standard 4) sadrži 0 IJ/ml (samo GD). Standarde treba testirati najmanje u duplikatu.

Preporučeni postupak za udvostručene standarde	Preporučeni postupak za utrostručene standarde
a. Označite 4 epruvete sa "S1", "S2", "S3", "S4".	a. Označite 4 epruvete sa "S1", "S2", "S3", "S4".
b. Dodajte 150 μl GD-a u S1, S2, S3, S4.	b. Dodajte 150 μl GD-a u S1.
c. Dodajte 150 μl standarda iz kompleta u S1 i dobro promiješajte.	c. Dodajte 210 μl GD-a u S2, S3, S4.
d. Prenesite 50 μl iz S1 u S2 i dobro promiješajte.	d. Dodajte 150 μl standarda iz kompleta u S1 i dobro promiješajte.
e. Prenesite 50 μl iz S2 u S3 i dobro promiješajte.	e. Prenesite 70 μl iz S1 u S2 i dobro promiješajte.
f. "Samo GD" služi kao nulti standard (S4).	f. Prenesite 70 μl iz S2 u S3 i dobro promiješajte.
	g. "Samo GD" služi kao nulti standard (S4).



Slika 1. Pripremanje standardne krivulje. Za svaki ELISA postupak pripremite novu otopinu standarda iz kompleta.

4. Rekonstituirajte liofilizirani 100X koncentrirani konjugat s 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice, minimizirajući stvaranje pjene, i provjerite je li se sadržaj potpuno rastopio.

Konjugat spreman za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100X koncentriranog konjugata razrijedi Zelenim diluensom, kao što je prikazano u Tablici 1 – Pripremanje konjugata.

Tablica 1. Pripremanje konjugata

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

- Dobro promiješajte, ali pazite da ne dođe do stvaranja pjene.
- Neupotrijebljeni 100X koncentrirani konjugat odmah nakon upotrebe vratite na temperaturu od 2 °C do 8 °C.
- Upotrebljavajte samo zeleni diluens.

5. U slučaju uzoraka plazme koji su odvojeni iz epruveta za uzimanje krvi i potom smrznuti ili pohranjenih na duže od 24 sata prije testiranja, dobro promiješajte prije dodavanja u ELISA udubljenje.
- Ako se uzorci plazme planiraju dodati neposredno iz centrifugiranih QFT epruveta, potrebno je izbjegavati bilo kakvo miješanje plazme.
6. Višekanalnom pipetom dodajte 50 µl svježe pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuće ELISA udubljenje.
7. Višekanalnom pipetom dodajte 50 µl testnih uzoraka plazme u odgovarajuća udubljenja (pogledajte preporučeni raspored ploča na str. 15, slike 2A i 2B). Na kraju dodajte po 50 µl Standarda 1 do 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

Slika 2A. Preporučeni raspored uzoraka za epruvete Nulta kontrola, TB Antigen i Mitogen kontrola (28 testova po ploči).

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (Uzorak 1. Nulta plazma), 1A (Uzorak 1. TB Antigen plazma), 1M (Uzorak 1. Mitogen plazma)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	5N	9N	13N	17N	S1	S1	25N	29N	33N	37N	41N
B	1A	5A	9A	13A	17A	S2	S2	25A	29A	33A	37A	41A
C	2N	6N	10N	14N	18N	S3	S3	26N	30N	34N	38N	42N
D	2A	6A	10A	14A	18A	S4	S4	26A	30A	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	31N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	31A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	32N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	32A	36A	40A	44A

Slika 2B. Preporučeni raspored uzoraka za epruvete Nulta kontrola i TB Antigen (44 testa po ploči).

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (Uzorak 1. Nulta plazma), 1A (Uzorak 1. TB Antigen plazma)

8. Dobro izmiješajte uzorke/standarde konjugata i plazme u tresilici za mikrotitar ploče u trajanju od 1 minute.

- 9. Svaku ploču prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), u trajanju od 120 ± 5 minuta.**
- Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.
- 10. Za vrijeme inkubacije razrijedite jedan dio 20X koncentriranog pufera za ispiranje s 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro promiješajte. U kompletu se nalazi dovoljno 20X koncentriranog pufera za ispiranje da bi se dobilo 2 litre pufera za ispiranje spremnog za upotrebu.**
- Ispirite udubljenja s **400 μl** pufera za ispiranje spremnog za upotrebu najmanje u 6 ciklusa. Preporučujemo upotrebu automatskog uređaja za pranje mikrotitar ploča.
- Pažljivo ispiranje veoma je važno za učinak testa. Pazite da pri svakom ispiranju sva udubljenja budu do vrha **potpuno napunjena** puferom za ispiranje. Preporučujemo da između svakog ciklusa ispiranja ostavite najmanje 5 sekundi za namakanje.
 - U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati dezinfekcijsko sredstvo koje se upotrebljava u laboratorijima. Pridržavajte se propisanih uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.
- 11. Lupkanjem istresite ploče prema dolje na upijajući ručnik bez dlačica kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100 μl otopine enzimskog supstrata u svako udubljenje i dobro promiješajte pomoću tresilice za mikrotitar ploče.**
- 12. Svaku ploču prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) 30 minuta.**
- Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.
- 13. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta dodajte 50 μl Enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje i promiješajte.**
- Enzimsku otopinu za zaustavljanje reakcije dodajte u udubljenja po istom redoslijedu i približno istom brzinom kao što ste učinili s enzimskim supstratom u koraku 11.
- 14. Izmjerite optičku gustoću (OD) svakog udubljenja u roku od 5 minuta nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije pomoću čitača za mikrotitar ploče, primjenom 450 nm filtra i 620 nm do 650 nm referentnog filtra. Izračunavanje rezultata izvodi se pomoću očitane vrijednosti optičke gustoće.**

7. Izračunavanje i interpretacija rezultata

Softver za analizu QFT služi za analizu sirovih podataka i izračun rezultata. Dostupan je na web-adresi www.QuantiFERON.com. Obavezno upotrijebite najnoviju verziju softvera.

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

Kao alternativa Softveru za analizu QFT, rezultati se mogu utvrditi i na osnovi sljedeće metode.

Formiranje standardne krivulje

(ako se ne upotrebljava Softver za analizu QFT)

Utvrđite srednju vrijednost optičke gustoće replikata standarda iz kompleta na svakoj ploči.

Izradite $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardnu krivulju grafičkim prikazom $\log_{(e)}$ srednje vrijednosti optičke gustoće (y-os) u usporedbi s $\log_{(e)}$ IFN- γ krivuljom koncentracije standarda u IJ/ml (x-os), izostavivši nulti standard. Izračunajte liniju najboljeg oblika standardne krivulje regresijskom analizom.

Upotrebljavajte standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- γ koncentracije (IJ/ml) za svaki testirani uzorak plazme pomoću vrijednosti optičke gustoće za svaki uzorak.

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

Kontrola kvalitete testa

Točnost rezultata testa ovisi od pravilnog formiranja standardne krivulje. Stoga se rezultati izvedeni iz standarda moraju preispitati prije interpretacije rezultata testa.

ELISA je valjan ako su ispunjeni sljedeći kriteriji:

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

Softver za analizu QFT izračunava i izvješćuje o tim parametrima za kontrolu kvalitete.

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

Srednja vrijednost optičke gustoće Nultog standarda (zeleni diluens) trebala bi biti $\leq 0,150$. Ako je srednja vrijednost optičke gustoće $> 0,150$, preporučuje se kontrola postupka ispiranja ploča.

Interpretacija rezultata

Rezultate QFT testa treba interpretirati po sljedećim kriterijima:

Napomena: Dijagnoza odnosno isključenje oboljenja od tuberkuloze, kao i procjena vjerojatnosti LTBI-ja iziskuje zajedničku ocjenu epidemioloških, anamnestičkih, medicinskih i dijagnostičkih rezultata koje treba uzeti u obzir pri interpretaciji QFT rezultata (Tablica 2 i 3).

Tablica 2. Kada se upotrebljavaju epruvete Nulta kontrola, TB Antigen i Mitogen kontrola

Nulta kontrola (IJ/ml)	TB Antigen minus Nulta kontrola (IJ/ml)	Mitogen kontrola minus Nulta kontrola (IJ/ml)*	Rezultat QFT testa	Izvešće/interpretacija
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE vjerojatna
	≥ 0,35 i < 25% vrijednosti Nulte kontrole	≥ 0,5	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE vjerojatna
	≥ 0,35 i ≥ 25% vrijednosti Nulte kontrole	Svejedno koliko	Pozitivno [†]	<i>M. tuberculosis</i> infekcija vjerojatna
	< 0,35	< 0,5	Nejasno [‡]	Rezultati TB Antigen reakcije nejasni
	≥ 0,35 i < 25% vrijednosti Nulte kontrole	< 0,5	Nejasno [‡]	Rezultati TB Antigen reakcije nejasni
> 8,0 [§]	Svejedno koliko	Svejedno koliko	Nejasno [‡]	Rezultati TB Antigen reakcije nejasni

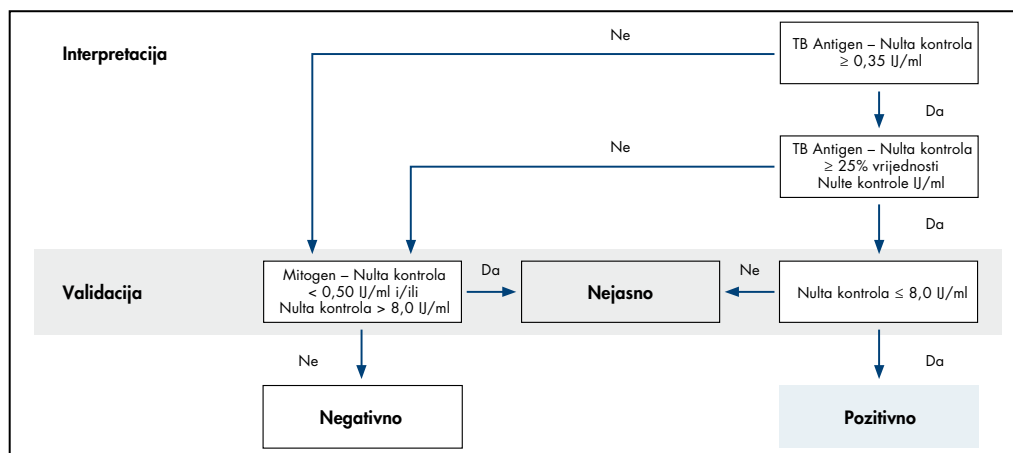
* Reakcija na pozitivnu Mitogen kontrolu (a povremeno i na TB Antigen) često je izvan mjernog opsega čitača za mikrotitar ploče. To se ne odražava na rezultate testa.

[†] U slučajevima kada se ne sumnja na infekciju bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*, početni pozitivni rezultati mogu se potvrditi ponovnim dupliranim testiranjem prvobitnih uzoraka plazme metodom QFT ELISA. Ako se u ponovljenom testu prvog ili drugog uzorka pokaže pozitivan rezultat, rezultat testa treba interpretirati kao pozitivan.

[‡] Moguće uzroke potražite u odjeljku Rješavanje problema.

[§] U kliničkim istraživanjima u manje od 0,25% ispitanika Nulta kontrola pokazala je IFN- γ koncentraciju > 8,0 IJ/ml.

Iz mjerne visine IFN- γ koncentracije ne može se izvesti zaključak o stadiju ili stupnju infekcije, mjeri imunološke reaktivnosti ili o vjerojatnosti progresije kod aktivnog oboljenja.



Slika 3. Interpretacijski dijagram pri upotrebi epruveta Nulta kontrola, TB Antigen i Mitogen kontrola.

Tablica 3. Kada se upotrebljavaju samo epruvete QuantiFERON Nulta kontrola i TB Antigen

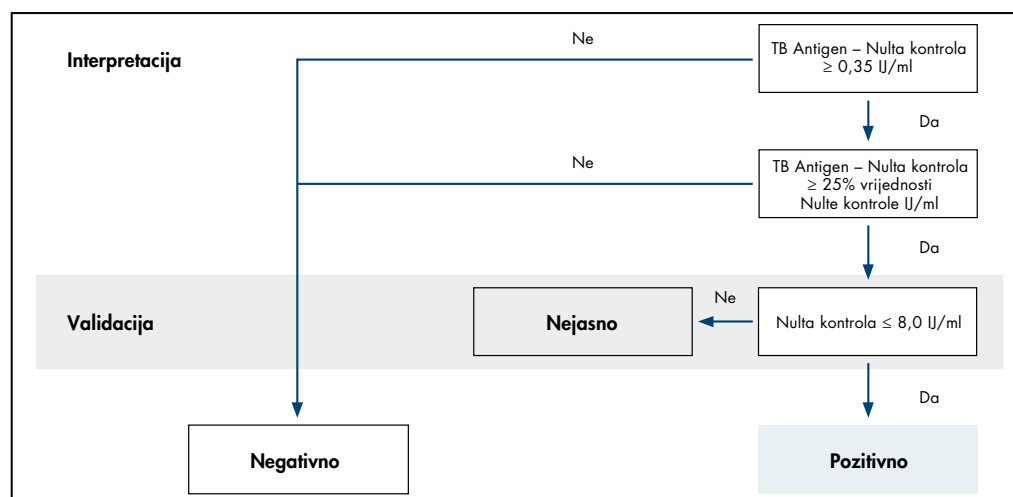
Nulta kontrola (IJ/ml)	TB Antigen minus Nulta kontrola (IJ/ml)	Rezultat QFT testa	Izješće/interpretacija
≤ 8,0	< 0,35	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE vjerojatna
	≥ 0,35 i < 25% vrijednosti Nulte kontrole	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE vjerojatna
	≥ 0,35 i ≥ 25% vrijednosti Nulte kontrole	Pozitivno*	<i>M. tuberculosis</i> infekcija vjerojatna
> 8,0 [†]	Svejedno koliko	Nejasno [‡]	Rezultati TB-Antigen reakcije nejasni

* U slučajevima kada se ne sumnja na infekciju bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*, početni pozitivni rezultati mogu se potvrditi ponovnim dupliciranim testiranjem prvobitnih uzoraka plazme metodom QFT ELISA. Ako se u ponovljenom testu prvog ili drugog uzorka pokaže pozitivan rezultat, rezultat testa treba interpretirati kao pozitivan.

[†] U kliničkim istraživanjima u manje od 0,25% ispitanika Nulta kontrola pokazala je IFN- γ koncentraciju > 8,0 IJ/ml.

[‡] Moguće uzroke potražite u odjeljku Rješavanje problema.

Iz mjerne visine IFN- γ koncentracije ne može se izvesti zaključak o stadiju ili stupnju infekcije, mjeri imunološke reaktivnosti ili o vjerojatnosti progresije kod aktivnog oboljenja.



Slika 4. Interpretacijski dijagram pri upotrebi epruveta QuantiFERON Nulta kontrola i TB Antigen.

8. Ograničenja

Rezultate QFT testa treba promatrati u kombinaciji s epidemiološkom anamnezom svakog pojedinačnog pacijenta, njegovim trenutnim zdravstvenim stanjem i rezultatima drugih dijagnostičkih pretraga.

Rezultate osoba u kojih je kontrola Nulte vrijednosti veća od 8 IJ/ml treba interpretirati kao "nejasne" jer za 25% viša reakcija na TB antigene može biti izvan mjernog opsega testa.

Do nepouzdanih ili nejasnih rezultata može doći iz sljedećih razloga:

- Odstupanje od postupka opisanog u priloženoj *Uputi za upotrebu proizvoda QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*
- Prevelika koncentracija cirkulirajućeg IFN- γ ili prisutnost heterofilnih antitijela
- Prekoračenje roka od 16 sati između uzimanja uzorka krvi i inkubacije na temperaturi od 37 °C

9. Radne značajke

Klinička istraživanja

Budući da za dokaz latentne TB infekcije (LTBI) ne postoji općeprihvaćeni standard, praktički nije moguće dati točnu ocjenu senzitivnosti i specifičnosti za QFT test. Približna vrijednost specifičnosti QFT testa određena je utvrđivanjem stope lažno pozitivnih rezultata osoba s niskom razinom rizika od TB infekcije (bez poznatih rizičnih čimbenika). Približna vrijednost senzitivnosti određena je pregledima skupina bolesnika u kojih je kulturom dokazana prisutnost aktivnog TB oboljenja.

Specifičnost

U istraživanju provedenom u Sjedinjenim Američkim Državama u kojemu je sudjelovalo 866 dobrovoljaca pri obavljanju TST testa ispitanicima je uzeta krv za QFT test. Demografski podaci i rizični čimbenici za TB utvrđeni su standardnim upitnikom za vrijeme testiranja. Od 432 dobrovoljaca kod kojih nije bilo poznatih rizičnih čimbenika za infekciju bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*, dobiveni su rezultati QFT i TST testa za 391 osobu. Nijedan dobrovoljac nije primio BCG cjepivo. Jedno drugo istraživanje radi utvrđivanja specifičnosti QFT testa provedeno je u Japanu na osobama s malim rizikom od oboljenja. Približno 90% njih primilo je cjepivo BCG. Rezultati ta 2 istraživanja namijenjena ispitivanju specifičnosti prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Ispitivanje specifičnosti QFT testa: Rezultati za osobe bez rizičnih čimbenika za infekciju bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*

Istraživanje	BCG status (% cijepljenih)	Ukupno testiranih	Br. nejasnih rezultata QFT testa	Br. pozitivnih rezultata QFT testa / br. valjanih testova	Specifičnost QFT testa (95% CI)	Br. pozitivnih rezultata TST testa / br. testiranih	Specifičnost TST* testa (95% CI)
SAD (nije objavljeno)	0%	391	1	3/390	99,2% (98–100)	6/391	98,5% (97–99)
Japan (15)	~90%	168	6	2/162	98,8% (95 – 100)	–	–
Ukupno	–	559	7/559 (1,3%)	5/552	99,1% (98–100)	–	–

* Uz graničnu vrijednost TST testa od 10 mm u osoba koje nisu bile cijepljene BCG-om. Približna vrijednost specifičnosti TST testa pri graničnoj vrijednosti od 15 mm iznosi 99,1%.

Senzitivnost kod aktivne tuberkuloze

Za procjenu senzitivnosti QFT testa ispitane su osobe iz SAD-a, Australije i Japana za koje je postojala sumnja na TB i u kojih je poslije kulturom dokazana infekcija *M. tuberculosis*. Iako za dokaz latentne infekcije tuberkulozom (LTB) ne postoji općenito priznat test, mikrobiološka kultura *M. tuberculosis* odgovarajuća je zamjena jer su oboljeli pacijenti bez sumnje inficirani. Prije vađenja krvi za QFT test pacijenti su liječeni najviše 8 dana.

Tablica 5 prikazuje rezultate 3 skupina pacijenata s pozitivnom kulturom na *M. tuberculosis*. QFT test pokazao je ukupnu senzitivnost za aktivnu tuberkulozu od 89% (157/177).

Tablica 5. QFT: Ispitanici kod kojih je kulturom utvrđena infekcija bakterijom kompleksa *M. tuberculosis*

Istraživanje	Br. pozitivnih rezultata QFT testa / br. valjanih testova	Senzitivnost za QFT test (95% CI)
Japanski TB bolesnici (15)	86/92	93% (86 – 97%)
Australski	24/27	89% (70 – 97%)
SAD	47/58	81% (68 – 90%)
Ukupno	157/177	89% (83 – 93%)

Dijagnoza LTB-ja

Objavljeno je niz istraživanja koja dokazuju uspješnost QFT testa u raznih populacija s LTBI rizikom. Najvažniji rezultati nekih odabranih istraživanja prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Odabrana objavljena istraživanja o QFT testu u populacijama s LTB rizikom

Istraživanje	Ukupno testiranih	Rezultati i nalazi
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Vrlo visok udio TB-a. 40% QFT pozitivnih i 41% TST pozitivnih pri graničnoj vrijednosti od 10 mm. Visoko podudaranje s TST-om, BCG cjepivo ne pokazuje utjecaj ni u jednom testu. U oba su testa rizični čimbenici životna dob i vrijeme provedeno u zdravstvu.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Ukupna prisutnost LTBI-ja po QFT testu bila je 4,6% (27/590) u HIV+ osoba. Pozitivni rezultati povezani su s TB rizicima. Kod dva ispitanika pozitivna na QFT test aktivna tuberkuloza razvila se u roku od 1 godine. Nejasne reakcije (n=20, 3,4%) bile su u znatnoj mjeri povezane s malim CD4 brojem (< 100/μl).
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Na djeci kod koje je postojala sumnja na TB ili su imala anamnezu kontakata s TB i TST bolesnicima provedena su ispitivanja QFT i TST testom. U QFT testu bilo je 10,5%, a u TST testu 9,5% pozitivnih (pri 10 mm). Podudaranje između testova bilo je 95,2% ukupno, a u ispitanika koji nisu bili cijepljeni BCG-om 100%.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	U 15 različitih slučajeva ispitivane su osobe u bliskom kontaktu s bolesnicima: Njih 51% primilo je BCG cjepivo, 27% bilo je rođeno u inozemstvu; 70% osoba koje su primile BCG cjepivo i 18% onih koji nisu primili BCG cjepivo bili su TST pozitivni (5 mm), dok je 9% odnosno 11% bilo QFT pozitivno. Rezultat QFT testa bio je povezan s TB rizikom. Rezultat TST testa bio je povezan samo s BCG cjepivom.

Mnoge druge publikacije opisuju rezultate manje osjetljive verzije tekućeg antigena testa QuantiFERON-TB Gold (prethodnik QFT testa) i QFT testa. Ta su istraživanja ispitivala primjenu testa(ova) kod osoba koje su bile u kontaktu s aktivno tuberkuloznim pacijentima (9, 11, 19, 25), djece (6 – 10, 25, 28), HIV-pozitivnih pacijenata (2, 5, 20), zdravstvenih radnika (13, 26, 32), osoba s oslabljenim imunološkim sustavom (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), kao i osoba kod kojih je postojala sumnja na TB (7, 8, 10, 18) te osoba s niskim rizikom (15).

Mogućnost ponavljanja TST testa i djelovanje na kasniji rezultat QFT testa

U sklopu istraživanja specifičnosti provedenog u SAD-u jedna podskupina dobrovoljaca ponovno je testirana između 4. i 5. tjedna nakon prvobitnog testiranja QFT i TST testom. Na raspolaganju su bili rezultati QFT testa za 260 ispitanih u oba vremenska trenutka, a razina podudaranja bila je 99,6% (259/260). Prije provedeni TST test nije izazvao pozitivne reakcije na QFT test.

10. Tehnički podaci

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati mogu biti povezani sa statusom imuniteta testiranog pojedinca, a mogu biti uzrokovani i sljedećim tehničkim čimbenicima:

- Prekoračenje roka od 16 sati između uzimanja uzorka krvi i inkubacije na temperaturi od 37 °C
- Pohrana uzoraka krvi izvan preporučenog temperaturnog raspona (od 17 °C do 27 °C)
- Nedovoljno miješanje epruveta za uzimanje krvi
- Nepotpuno oprana ELISA ploča

Ako se sumnja na tehnički problem prilikom uzimanja krvi ili rukovanja uzorcima, treba ponoviti cijeli QFT test s novim uzorkom krvi. Ponavljanje testiranja stimuliranih uzoraka metodom ELISA može se provesti ako se sumnja da je došlo do odstupanja od propisane testne metode ELISA. Nejasni rezultati uzrokovani niskim vrijednostima Mitogen kontrole ili visokim vrijednostima Nulte kontrole ponavljanjem testa neće se promijeniti, osim ako je došlo do pogreške u provođenju ELISA testa. Nejasne rezultate treba prijaviti takve kakvi jesu. Liječnik po potrebi može uzeti novi uzorak krvi ili provesti druge vrste pretrage.

Zgrušani uzorci plazme

Ako pri dužem pohranjivanju plazme nastanu ugrušci fibrina, uzorke treba centrifugirati 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. Za podatke o kontaktima pogledajte stražnje korice.

ELISA rješavanje problema

Nespecifična boja reakcije

Mogući uzrok

a) Nepotpuno oprana ploča

Rješenje

Ploču operite najmanje 6 puta s 400 μ l pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za pranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja.

b) Unakrsna kontaminacija ELISA udubljenja

Pažljivo pipetiranje i miješanje uzoraka smanjuje rizik.

c) Istekao je vijek trajanja kompleta/komponenti

Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Vodite računa o tome da se rekonstituirani standard i 100X koncentrirani konjugat potroše u roku od tri mjeseca nakon rekonstitucije.

d) Otopina enzimskog supstrata je kontaminirana

Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.

e) Miješanje plazme u epruvetama za centrifugiranje prije prikupljanja

Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati ili miješati plazmu prije uzimanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

Niska očitavanja optičke gustoće za standarde

Mogući uzrok

a) Greška pri razrjeđivanju Standarda

Rješenje

Razrjeđivanje Standarda iz kompleta provodite točno prema priloženoj uputi za upotrebu proizvoda QFT ELISA.

b) Pogrešno pipetiranje

Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača.

c) Temperatura inkubacije je preniska

Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)

d) Prekratko vrijeme inkubacije

Inkubacija ploče s konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati 120 ± 5 minuta. Otopina enzimskog supstrata inkubira se na ploči 30 minuta.

e) Upotrijebljen je pogrešan filter za ploču

Ploču treba čitati pri 450 nm referentnim filtrom od 620 i 650 nm.

f) Reagensi su prehladni

Svi reagensi (osim 100x koncentrirani konjugat) moraju postići sobnu temperaturu prije početka testa. To traje otprilike jedan sat.

g) Istekao je vijek trajanja kompleta/komponenti

Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Pobrinite se da rekonstituirani standard i 100X koncentrirani konjugat budu potrošeni u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.

ELISA rješavanje problema

Jaka obojenost pozadine

Mogući uzrok

- a) Nepotpuno oprana ploča
- b) Temperatura inkubacije je previsoka
- c) Istekao je vijek trajanja kompleta/komponenti
- d) Otopina enzimskog supstrata je kontaminirana

Rješenje

Ploču operite najmanje 6 puta s 400 μ l pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za pranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja.

Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Provjerite je li vijek trajanja kompleta istekao. Pobrinite se da rekonstituirani standard i 100X koncentrirani konjugat budu potrošeni u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.

Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici.

Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između duplikata

Mogući uzrok

- a) Nepotpuno oprana ploča
- b) Pogreška pri razrjeđivanju Standarda
- c) Nedovoljno miješanje
- d) Nedosljedna tehnika pipetiranja ili prekid tijekom pripremanja testa

Rješenje

Ploču operite najmanje 6 puta s 400 μ l pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za pranje, može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja.

Razrjeđivanje standarda provodite točno prema priloženoj Uputi za upotrebu proizvoda QFT ELISA.

Prije nego što ih dodate na ploču, dobro promiješajte reagense okretanjem ili laganim mućkanjem.

Uzorke i standarde treba dodavati kontinuirano. Svi reagensi trebaju biti pripremljeni prije početka testiranja.

Videozapis s prikazom postupka testiranja i rješenjima za većinu tehničkih problema možete pronaći na portalu Gnowee™ registrirajući se na web-adresi www.gnowee.net. Informacije o proizvodu i tehničke priručnike možete dobiti besplatno od tvrtke QIAGEN, od svoga distributera ili na web-adresi www.QuantiFERON.com.

11. Bibliografija

Opsežan popis referenci za QFT test nalazi se na portalu Gnowee — bazi podataka za QuantiFERON, dostupnoj na web-adresi www.gnowee.net.

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.

12. Tehnička služba

Za tehničke usluge obratite se:

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ■ techservice-ap@qiagen.com

Europe ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

USA/Canada ■ techservice-na@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) ■ techservice-latam@qiagen.com

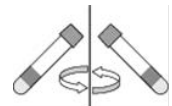
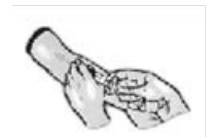
Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

13. Skraćeni testni postupak

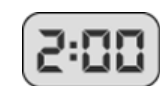
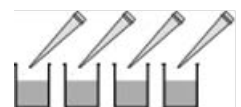
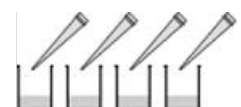
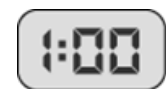
Faza 1 – inkubacija krvi

1. Uzmite krv od pacijenta u epruvete i dobro promiješajte uzorke deset (10) puta kako bi se cijela unutarnja površina epruveta prekrila krvlju i kako bi se rastopili antigeni na stijenkama epruvete.
2. Epruvete inkubirajte u uspravnom položaju na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ u trajanju od 16 do 24 sati.
3. Poslije inkubacije centrifugirajte epruvete 15 minuta pri obrtaju od 2000 do 3000 g RCF (g) da biste odvojili plazmu od crvenih krvnih stanica.
4. Nakon centrifugiranja nipošto nemojte pipetirati ili miješati plazmu prije prikupljanja plazme. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

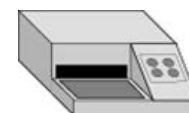
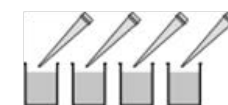
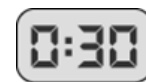
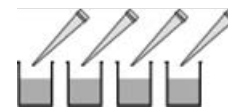


Faza 2 – IFN- γ ELISA

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 IJ/ml. Pripremite četiri (4) standardne otopine.
3. Rekonstituirajte liofilizirani, 100X koncentrirani konjugat destiliranom ili deioniziranom vodom.
4. Pripremite konjugat pomoću Zelenog diluensa i dodajte 50 μ l u svako udubljenje.
5. Dodajte 50 μ l uzorka plazme i 50 μ l standarda u odgovarajuća udubljenja. Promiješajte tresilicom.
6. Inkubirajte 120 ± 5 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Isperite udubljenja najmanje 6 puta s 400 μ l pufera za ispiranje po udubljenju.



8. Dodajte 100 μ l otopine enzimskog supstrata u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.
10. Dodajte 50 μ l enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.
11. Očitajte rezultate na 450 nm s referentnim filtrom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



Značajne promjene

Značajne promjene u ovom Izdanju (1075115HR ver. 01) Upute za upotrebu proizvoda QFT ELISA sažete su u tablici u nastavku:

Odjeljak	Stranica	Promjena(e)
4. Upozorenja i mjere opreza	8–9	Izmjena u postupku upotrebe određenih ELISA komponenti iz različitih serija kompleta.
12. Tehnička služba	27	Nova adresa e-pošte Tehničke službe.

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

Limited License Agreement for QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

Upotrebom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik obvezuje se na pridržavanje uvjeta iz ovog ugovora:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i u ovoj uputi za upotrebu proizvoda i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne odobrava licence u okviru svoga intelektualnog vlasništva za ugrađivanje ili upotrebu komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kao što je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom i koji se nalaze u ovoj uputi za upotrebu proizvoda.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova 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 ili preprodavati osim ako QIAGEN odredi drukčije.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi. QIAGEN može ishoditi zabranu ovog Ograničenog licencnog ugovora na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove za odvjetnika, za svako postupanje koje nije u skladu s ovim Ograničenim licencnim ugovorom ili intelektualnim pravima koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Za ažurirane uvjete licence pogledajte www.qiagen.com.

© 2013 Cellestis, a QIAGEN Company, all rights reserved.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

