

Příbalový leták

QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]) ELISA



2 x 96 (katalog. č. 0594-0201)



20 x 96 (katalog. č. 0594-0501)

Test IFN- γ z plné krve měřící odpovědi na peptidové antigeny
ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4)



Pro účely diagnostiky in vitro



0594-0201, 0594-0501

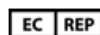


Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148 Austrálie

Telefon: (Austrálie) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, NĚMECKO

1075115CS Rev. 01



www.QuantiFERON.com



Obsah

1. Účel použití	4
2. Souhrn a princip testu	4
Princip testu	5
Čas potřebný k provedení testu	5
3. Komponenty a skladování	6
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	7
Skladování a manipulace	7
4. Upozornění a bezpečnostní opatření	8
Pro účely diagnostiky in vitro	8
Varování	8
Bezpečnostní opatření	9
5. Odběr vzorku a manipulace	10
6. Návod k použití	12
Fáze 1 – Inkubace krve a sběr plazmy	12
Fáze 2 – test ELISA pro lidský IFN- γ	13
7. Výpočty a interpretace testu	17
Vytvoření standardní křivky	17
Kontrola kvality testu	17
8. Omezení	19
9. Charakteristiky funkčních vlastností	20
Klinické studie	20
10. Technické údaje	22
Nejednoznačné výsledky	22
Sražení vzorků plazmy	22
Návod na řešení problémů	23
11. Literatura	25
12. Technická podpora	27
13. Zkrácený postup testu	28
Fáze 1 – inkubace krve	28
Fáze 2 – IFN- γ ELISA	28
Významné změny	30

1. Účel použití

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) je diagnostický test in vitro s použitím směsi peptidů simulující bílkoviny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4) ke stimulaci buněk v heparinované plné krvi. Detekce interferon- γ (IFN- γ) pomocí testu ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se používá ke zjištění in-vitro reakcí na tyto peptidové antigeny, které souvisí s infekcí *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT je nepřímý test infekce bacilem *M. tuberculosis* (včetně onemocnění) a je určen pro použití ve spojení s posouzením rizik, radiografií a dalšími zdravotními a diagnostickými hodnoceními.

2. Souhrn a princip testu

Tuberkulóza je nakažlivé onemocnění způsobené infekcí mikroorganismy *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), které se typicky přenáší na nové hostitele vzduchem v podobě kapének šířených od pacientů s tuberkulózou plic. Nově nakažený jedinec může onemocnět tuberkulózou v době od několika týdnů až po několik měsíců, ale stav většiny nakažených osob zůstává dobrý. Latentní tuberkulóza (LTBI) je nenakažlivý asymptomatický stav, který přetrvává u některých osob, u nichž se onemocnění tuberkulózou může rozvinout o několik měsíců nebo let později. Hlavním účelem diagnostikování LTBI je zvážit léčbu pro prevenci rozvoje tuberkulózy. Až do nedávné doby byl tuberkulinový kožní test (TST) jedinou dostupnou možností pro diagnostiku LTBI. Kožní reakce na tuberkulin se rozvine 2 až 10 týdnů po infekci. U některých infikovaných osob, včetně těch se širokou škálou zdravotních stavů, které narušují funkci imunitního systému, ale také bez těchto stavů, však nedochází k reakci na tuberkulin. Naopak některé osoby, u nichž je nepravděpodobné, že jsou infikováni *M. tuberculosis*, vykazují citlivost na tuberkulin a mají pozitivní výsledky TST po očkování bacilem Calmette-Guérin (BCG), infekci jinou mykobakterií než komplexem mikroorganismů *M. tuberculosis*, nebo u nich nejsou stanoveny jiné faktory.

LTBI musí být odlišena od aktivní tuberkulózy, což je zaznamenateľný stav, který obvykle zasahuje plíce a dolní cesty dýchací, i když postiženy mohou být i jiné orgány. Tuberkulóza je diagnostikována na základě anamnézy, fyzických, radiologických, histologických a mykobakteriologických nálezů.

QFT je test buněčné imunitní odpovědi (CMI) na peptidové antigeny, které simulují mykobakteriální bílkoviny. Tyto bílkoviny, ESAT-6, CFP-10, a TB7.7(p4), chybí u všech kmenů BCG a většiny netuberkulózních mykobakterií s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*.(1) Krev osob infikovaných komplexem *M. tuberculosis* obvykle obsahuje lymfocyty, které tyto a jiné mykobakteriální antigeny rozpoznají. Tento proces rozpoznání zahrnuje vytvoření a sekreci cytokinu, IFN- γ . Detekce a následná kvantifikace IFN- γ tvoří základ tohoto testu.

Antigeny použité v testu QFT jsou směsí peptidů simulující bílkoviny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4). V četných studiích se ukázalo, že tyto peptidové antigeny stimulují odpovědi IFN- γ u T-lymfocytů získaných od osob infikovaných *M. tuberculosis*, ale obecně nikoli od neinfikovaných osob nebo osob očkovaných BCG bez onemocnění nebo rizika LTBI.(1–32) Nicméně léčby či stavy, které narušují funkci imunitního systému, může potenciálně omezit odpovědi IFN- γ . U pacientů s některými dalšími mykobakteriálními infekcemi se také mohou vyskytnout reakce na ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4), protože geny těchto bílkovin se vyskytují u *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*.(1, 23) Test QFT je testem na LTBI a je také užitečným pomocníkem při diagnostice infekce komplexem *M. tuberculosis* u nemocných pacientů. Pozitivní výsledky slouží jako pomoc při diagnostice tuberkulózy, avšak k pozitivním výsledkům může vést také infekce jinými mykobakteriemi (např. *M. kansasii*). Pro potvrzení nebo vyloučení onemocnění tuberkulózou jsou nutná další lékařská a diagnostická hodnocení.

Princip testu

Systém QFT využívá speciální zkumavky na odběr krve, které se používají k odběru plné krve. Inkubace krve probíhá ve zkumavkách po dobu 16 až 24 hodin. Po této době se odebere plazma, která je testována na přítomnost IFN- γ vytvořeného v reakci na peptidové antigeny.

Test QFT se provádí ve dvou fázích. Nejprve se odebere plná krev do každé zkumavky QFT pro odběr krve, mezi které patří zkumavka Nil, zkumavka TB Antigen a zkumavka Mitogen.

Zkumavka Mitogen se používá při testu QFT jako pozitivní kontrola. Toho lze využít obzvláště v případech, kdy existují pochybnosti o stavu imunitního systému osoby. Zkumavka Mitogen může také sloužit jako kontrola pro správné zacházení s krví a inkubaci.

Zkumavky je nutné co nejdříve inkubovat při teplotě 37 °C (do 16 hodin od odběru). Po uplynutí 16 až 24 hodin inkubace se zkumavky odstředí, odstraní plazma a změří se množství IFN- γ (IU/ml) pomocí testu ELISA.

Test je považován za reaktivní na odezvu IFN- γ , pokud je hodnota zkumavky TB Antigen významně vyšší než hodnota Nil IFN- γ IU/ml. Vzorek plazmy ze zkumavky Mitogen, pokud je použit, slouží jako pozitivní kontrola IFN- γ pro každý testovaný vzorek. Nízká odezva na mitogen (< 0,5 IU/ml) označuje nejednoznačný výsledek, pokud má vzorek krve také negativní odezvu na antigeny TB. K této situaci může docházet při nedostatku lymfocytů, snížené aktivitě lymfocytů v důsledku nesprávného zacházení se vzorkem, nesprávného plnění/mísení zkumavky Mitogen nebo neschopnosti lymfocytů pacienta vytvářet IFN- γ . Vzorek Nil se upravuje pro pozadí, vliv heterofilní protilátky nebo nespecifický IFN- γ v krevních vzorcích. Hladina IFN- γ ze zkumavky Nil je odečtena od hladiny IFN- γ ze zkumavky TB Antigen a Mitogen (pokud jsou použity).

Čas potřebný k provedení testu

Odhadovaný čas potřebný k provedení testu QFT je uveden níže; čas potřebný k testování více vzorků v dávkovém zpracování je také uveden:

Inkubace zkumavek s krví při 37 °C:	16 až 24 hodin
ELISA:	Cca. 3 hodiny pro jednu destičku ELISA (28 až 44 osob) < 1 hodina práce Pro každou další destičku přidejte 10 až 15 minut

3. Komponenty a skladování

Blood Collection Tubes* (Zkumavky pro odběr krve*)	300 zkumavek	200 zkumavek	100 zkumavek
Katalogové č.	T0590-0301	0590-0201	T0593-0201
Počet prep.	100	100	100
Zkumavka QuantiFERON Nil Tube (šedý uzávěr, bílý kroužek)	100 zkumavek	100 zkumavek	
Zkumavka QuantiFERON TB Antigen Tube (červený uzávěr, bílý kroužek)	100 zkumavek	100 zkumavek	
Zkumavka QuantiFERON Mitogen Tube (fialový uzávěr, bílý kroužek)	100 zkumavek		100 zkumavek
Příbalový leták pro zkumavky pro odběr krve QFT	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (Zkumavky pro odběr krve ve vysokých nadmořských výškách) (pro použití v nadmořské výšce 1020 až 1875 metrů)*	300 zkumavek	100 zkumavek	100 zkumavek
Katalogové č.	T0590-0505	0590-0501	T0593-0501
Zkumavka QuantiFERON HA Nil Tube (šedý uzávěr, žlutý kroužek)	100 zkumavek	100 zkumavek	
Zkumavka QuantiFERON HA TB Antigen Tube (červený uzávěr, žlutý kroužek)	100 zkumavek	100 zkumavek	
Zkumavka QuantiFERON HA Mitogen Tube (fialový uzávěr, žlutý kroužek)	100 zkumavek		100 zkumavek
Příbalový leták pro zkumavky pro odběr krve QFT	1	1	1

* Ne všechny konfigurace výrobků jsou k dispozici ve všech zemích. Další informace o dostupných konfiguracích pro objednávku získáte na oddělení péče o zákazníky společnosti QIAGEN (podrobnosti na stránkách www.qiagen.com).

Součásti testu ELISA	Souprava ELISA se 2 destičkami	Referenční laboratorní balení
Katalogové č.	0594-0201	0594-0501
Stripy s mikrodestičkami (12 x 8 jamek) pokryté myší monoklonální protilátkou proti lidskému IFN- γ	2 sady stripů mikrodestiček s 12 x 8 jamkami	20 sad stripů mikrodestiček s 12 x 8 jamkami
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Lidský IFN- γ , standardní, lyofylizovaný) (obsahuje rekombinantní lidský IFN- γ , bovinní kasein, Thimerosal 0,01% hm.)	1 x lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)	10 x lahvička (8 IU/ml po rekonstituci)
Green Diluent (Zelený ředící roztok) (obsahuje bovinní kasein, normální myší sérum, Thimerosal 0,01% hm.)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (Konjugát 100X koncentrát, lyofylizovaný) (myší protilátkou proti lidskému IFN- γ HRP, obsahuje Thimerosal 0,01% hm.)	1 x 0,3 ml (po rekonstituci)	10 x 0,3 ml (po rekonstituci)
Wash Buffer 20X Concentrate (Koncentrát promývacího činidla (pH 7,2, obsahuje 0,05 % obj. ProClin [®] 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Roztok enzymového substrátu) (obsahuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Zastavovací roztok enzymů) (obsahuje 0,5M H ₂ SO ₄) [†]	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Příbalový leták QFT ELISA	1	1

[†] Obsahuje kyselinu sírovou. Bezpečnostní opatření viz strana 9.

Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

- Inkubátor, 37 °C. CO₂ není nutné.
- Kalibrované pipety s proměnným objemem pro výdej 10 μ l až 1000 μ l s jednorázovými špičkami.
- Kalibrované vícekanálové pipety pro výdej 50 μ l a 100 μ l s jednorázovými špičkami.
- Třepačka mikrodestiček.
- Deionizovaná nebo destilovaná voda, 2 litry.
- Promývačka mikrodestiček (doporučuje se automatizovaná promývačka).
- Čtečka mikrodestiček s filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm.

Skladování a manipulace

Zkumavky pro odběr krve

- Zkumavky pro odběr krve skladujte při teplotě 4 °C až 25 °C.

Činidla soupravy

- Soupravu skladujte v chladu při teplotě 2 °C až 8 °C.
- Roztok enzymového substrátu vždy chraňte před přímým slunečním světlem.

Rekonstituovaná a nepoužitá činidla

Pokyny ke způsobu rekonstituce činidel naleznete v části 6 (strana 13)

- Rekonstituovaný standard soupravy může být uchován až po dobu 3 měsíců, pokud je skladován při teplotě 2 °C až 8 °C.

Poznačte si datum, kdy byl standard soupravy rekonstituován.

- Po rekonstituci musí být nespotřebovaný konjugát 100X koncentrát vrácen do skladovací teploty 2 °C až 8 °C a musí být spotřebován do 3 měsíců.

Poznačte si datum, kdy byl konjugát rekonstituován.

- Pracovní roztok konjugátu musí být použit do 6 hodin od přípravy.
- Pracovní promývací pufr může být uchován při pokojové teplotě po dobu až 2 týdnů.

4. Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro účely diagnostiky in vitro

Varování

- Negativní výsledek QFT nevylučuje možnost infekce *M. tuberculosis* nebo onemocnění tuberkulózou: falešně negativní výsledky mohou být způsobeny stádiem infekce (např. vzorek získaný před rozvojem buněčné imunitní reakce), komorbidním stavem, který ovlivňuje funkce imunitního systému, nesprávná manipulace se zkumavkami na odběr krve po odběru ze žíly, nesprávné provedení testu nebo jiné imunologické proměnné.
- Pozitivní výsledek QFT by neměl být jediným nebo definitivním základem pro stanovení infekce mykobakterií *M. tuberculosis*. Nesprávné provedení testu může způsobit falešně pozitivní výsledky.
- Pozitivní výsledek QFT by měl být ověřen dalšími lékařskými hodnoceními a diagnostickými hodnoceními aktivní tuberkulózy (např. sěr a kultivace AFB, rtg hrudníku).
- Zatímco ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4) u všech kmenů BCG a u většiny známých netuberkulózních mykobakterií chybí, je možné, že pozitivní výsledek QFT může být způsoben v důsledku infekce *M. kansasii*, *M. szulgai* nebo *M. marinum*. Pokud existuje podezření na takové infekce, je nutné zajistit alternativní testy.

Bezpečnostní opatření

Pouze pro diagnostiku in vitro.

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.



UPOZORNĚNÍ: S lidskou krví zacházejte jako s potenciálně infekční.

Dodržujte příslušné postupy pro zacházení s krví.

Na komponenty soupravy QuantiFERON-TB Gold ELISA se vztahují následující bezpečnostní věty a upozornění na rizika.

Zastavovací roztok enzymů QuantiFERON



Xi

Obsahuje kyselinu sírovou: Dráždivý. Bezpečnostní věty a upozornění na rizika:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zelený ředící roztok** obsahuje normální myší sérum a kasein. Ty mohou spouštět alergické reakce; vyhněte se kontaktu s pokožkou.

Pro chemickou nouzovou situaci

Rozlití, únik, vystavení účinkům nebo nehoda

Volejte nonstop CHEMTREC

V rámci USA a Kanady: 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanady: +1-703-527-3887 (hovory na účet volaného jsou přijímány)

Další informace

Bezpečnostní listy: www.qiagen.com/safety

- Odchytky od informací uvedených v *příbalovém letáku QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* mohou způsobit chybné výsledky. Před použitím si prosím pečlivě přečtěte pokyny.
- Nepoužívejte soupravu, pokud jakákoliv láhev s činidlem vykazuje před použitím známky poškození nebo netěsnosti.
- Nepoužívejte společně stripy mikrodestiček, standardní lidský IFN- γ , zelený ředící roztok nebo konjugát 100X koncentrát z různých šarží souprav QFT. Ostatní činidla (promývací pufr 20X koncentrát, roztok enzymového substrátu a zastavovací roztok enzymů) mohou být používána z různých šarží souprav za předpokladu, že u činidel nevypršela doba použitelnosti a že jsou zaznamenány informace o dané šarži. Zlikvidujte nepoužitá činidla a biologické vzorky v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- Nepoužívejte zkumavky na odběr krve ani soupravu ELISA po vypršení doby použitelnosti.
- Ujistěte se, že laboratorní vybavení, například promývačky destiček a čtečky, byly kalibrovány/validovány pro použití.

* R36/38: Dráždí oči a kůži; S26: V případě kontaktu s očima okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc; S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít.

5. Odběr vzorku a manipulace

QFT využívá následující zkumavky na odběr krve:

1. Zkumavky QuantiFERON Nil (šedý uzávěr s bílým kroužkem; používejte od hladiny moře do nadmořské výšky 810 m)
2. Zkumavky TB Antigen (červený uzávěr s bílým kroužkem; používejte od hladiny moře do nadmořské výšky 810 m)
3. Zkumavky QuantiFERON Mitogen (fialový uzávěr s bílým kroužkem; používejte od hladiny moře do nadmořské výšky 810 m)

Zkumavky pro vysokou nadmořskou výšku (HA):

4. Zkumavky QuantiFERON HA Nil (šedý uzávěr se žlutým kroužkem; používejte v nadmořské výšce 1020 až 1875 m)
5. Zkumavky HA TB Antigen (červený uzávěr se žlutým kroužkem; používejte v nadmořské výšce 1020 až 1875 m)
6. Zkumavky QuantiFERON HA Mitogen (fialový uzávěr se žlutým kroužkem; používejte v nadmořské výšce 1020 až 1875 m)

Antigeny byly vysušeny na vnitřní stěně zkumavek na odběr krve, proto je nezbytné, aby byl obsah zkumavek důkladně promísen s krví. Zkumavky musí být co nejdříve přeneseny do inkubátoru při teplotě 37 °C (do 16 hodin od odběru).

Pro získání optimálních výsledků dodržujte následující postupy:

1. **Od každého pacienta odeberte 1 ml krve ze žíly přímo do každé ze zkumavek na odběr krve QFT. Tento postup musí provádět pracovník vyškolený ve flebotomii.**
 - Standardní zkumavky na odběr krve QFT mohou být používány do nadmořské výšky 810 metrů. Zkumavky QFT pro odběr krve ve vysokých nadmořských výškách (HA) jsou určeny pro použití v nadmořské výšce 1020 až 1875 metrů.
 - Pokud jsou zkumavky na odběr krve QFT použity mimo tato rozmezí nadmořské výšky nebo v případě nízkého objemu odebrané krve je možné odebrat krev pomocí stříkačky a 1 ml ihned přenést do každé ze tří zkumavek. Z bezpečnostních důvodů je nejvhodnější odstranit jehlu ze stříkačky, zajistit náležitě bezpečnostní postupy, odstranit víčka ze 3 zkumavek QFT a přidat 1 ml krve do každé z nich (po černou značku na boční straně štítku každé zkumavky). Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle níže uvedeného popisu.
 - Vzhledem k tomu, že krev do zkumavek o objemu 1 ml vtéká relativně pomalu, udržujte zkumavku na jehle po dobu 2–3 sekund. Jakmile se zdá, že zkumavka je plná, ujistěte se, že je získán správný objem.

Černá značka na boční straně zkumavek označuje objem plnění 1 ml. Zkumavky na odběr krve QFT byly validovány pro objemy od 0,8 do 1,2 ml. Jestliže hladina krve v jakékoliv zkumavce není v blízkosti rysky, doporučuje se získat jiný vzorek krve.
 - Jestliže se k odběru krve používá motýlková jehla, je nutné před použitím zkumavek na odběr krve QFT použít „odvzdušňovací“ zkumavku k zajištění, že je hadička naplněna krví.
 - Krev může být také odebrána do jedné běžné odběrové zkumavky obsahující heparin lithný jako antikoagulant a poté přenesena do zkumavek QFT. Jako antikoagulant **používejte pouze heparin lithný**, protože ostatní antikoagulanty mohou narušovat průběh testu. Naplňte zkumavku na odběr krve (minimální objem 5 ml) a jemně promíchejte tak, že zkumavku několikrát převrátíte dnem vzhůru, aby došlo k rozpuštění heparinu. Krev by měla být uchována při pokojové teplotě (22 °C ± 5 °C), než bude přenesena do zkumavek QFT k inkubaci, která **musí** být zahájena do 16 hodin od odběru krve.

2. **Ihned po naplnění desetkrát (10) dobře protřepejte zkumavky tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.**
 - Zkumavky by v době plnění krví měly mít teplotu 17–25 °C.
 - Příliš silné třepání může narušit gel a mohlo by vést k neplatným výsledkům.
 - Pokud byla krev odebrána do zkumavky s heparinem, musí být vzorky rovnoměrně promíchány před výdejem do zkumavek QFT. Ujistěte se, že je krev důkladně promíchána jemným obrácením zkumavky **těsně před dávkováním krve**. Rozdělte alikvotní podíly o objemu 1,0 ml (jeden do každé zkumavky QFT) do příslušných zkumavek Nil, TB Antigen a Mitogen. Je nejvhodnější toto provést asepticky, **zajistit náležitě bezpečnostní postupy**, odstranit víčka ze tří zkumavek QFT a přidat 1 ml krve do každé z nich (po černou značku na boční straně štítku každé zkumavky). Na zkumavky opět nasadte pevně víčka a promíchejte dle výše uvedeného popisu.
3. **Označte zkumavky příslušným způsobem.**
 - Ujistěte se, že je možné každou zkumavku (Nil, TB Antigen, Mitogen) po odstranění víčka identifikovat štítkem nebo jinými prostředky.
4. **Po naplnění, protřepání a označení štítkem musí být zkumavky co nejdříve přeneseny do inkubátoru při teplotě 37 °C ± 1 °C (do 16 hodin od odběru). Před inkubací uchovávejte zkumavky při pokojové teplotě (22 °C ± 5 °C). Krevní vzorky nechladěte ani nezmrazujte.**

6. Návod k použití

Fáze 1 – Inkubace krve a sběr plazmy

Dodávané materiály

- Zkumavky QFT na odběr krve (viz část 3).

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

- Viz část 3.

Postup

1. Jestliže krev brzy po odběru nebude inkubována, je nutné těsně před inkubací zkumavky opět promíchat tak, že je 10krát převrátíte.
2. Zkumavky inkubujte ve **VZPŘÍMENÉ** poloze při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 16 až 24 hodin. Inkubátor nevyžaduje CO_2 ani zvlhčování.
3. Po inkubaci při teplotě 37 °C mohou být zkumavky na odběr krve uchovány před odstředěním při teplotě od 4 °C do 27 °C po dobu až 3 dnů.
4. Po inkubaci zkumavek při teplotě 37 °C , usnadníte sběr plazmy tím, že zkumavky odstředíte po dobu 15 minut při 2000 až 3000 RCF (g). Gelová zátka oddělí buňky od plazmy. Pokud k tomu nedojde, zkumavky by měly být opětovně odstředěny při vyšší rychlosti.
 - Plazmu je možné sbírat bez odstředění, avšak je nutné věnovat větší péči při odstraňování plazmy, aniž by došlo k rozvíření buněk.
5. **Vzorky plazmy je možné odebírat pouze pomocí pipety.**
 - **Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.**
 - Vzorky plazmy je možné naplnit přímo z odstředěných zkumavek na odběr krve do destičky QFT ELISA, včetně případů, kdy jsou použity automatizované pracovní stanice ELISA.
 - Vzorky plazmy je možné uchovat až po dobu 28 dní při teplotě 2 až 8 °C nebo, pokud je sebrána, při teplotě nižší než -20 °C po delší dobu.
 - Pro dostatečný objem vzorků k testu shromážděte alespoň 150 μl plazmy.

Fáze 2 – test ELISA pro lidský IFN- γ

Dodávané materiály

- Souprava QFT ELISA (viz část 3).

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

- Viz část 3.

Postup

1. **Všechny vzorky plazmy a činidla, kromě konjugátu 100X koncentrátu, musí být před použitím ohřáty na pokojovou teplotu (22 °C \pm 5 °C). Ponechte teplotu vyrovnat alespoň 60 minut.**
2. **Z rámečku vyjměte stripy, které nejsou vyžadovány, opět zalepte fólií, a vraťte do chladničky do doby, kdy je budete potřebovat.**

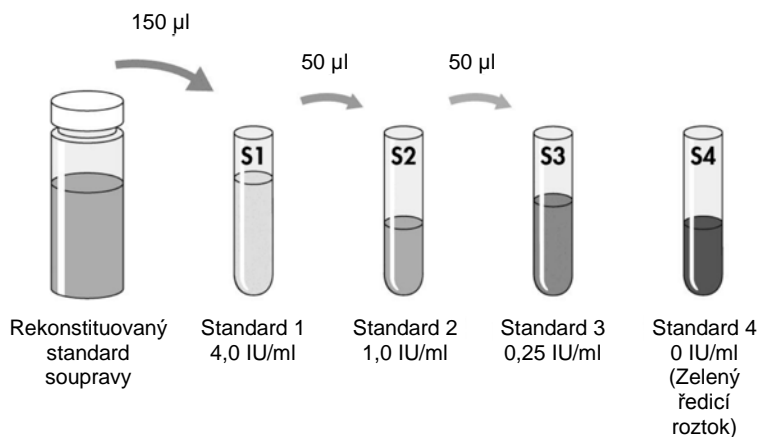
Ponechte alespoň 1 strip pro QFT standardy a dostatečný počet stripů pro počet testovaných pacientů (formáty pro 3 zkumavky nebo 2 zkumavky viz tabulky 2A a 2B). Po použití rámeček uchovejte a uzavřete pro použití se zbývajícími stripy.

3. **Rekonstituujte mrazem sušený standard soupravy pomocí objemu deionizované nebo destilované vody, který je uveden na štítku lahvičky standardu. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění. Rekonstitucí standardu na uvedený objem se získá roztok o koncentraci 8,0 IU/ml.**

Poznámka: Rekonstituční objem standardu soupravy se bude mezi jednotlivými dávkami lišit.

Použijte rekonstituovaný standard soupravy k vytvoření série 4 ředění IFN- γ se zeleným ředicím roztokem (GD) (viz obrázek 1). S1 (Standard 1) obsahuje 4 IU/ml, S2 (Standard 2) obsahuje 1 IU/ml, S3 (Standard 3) obsahuje 0,25 IU/ml, a S4 (Standard 4) obsahuje 0 IU/ml (samotný zelený ředicí roztok – GD). Standardy musí být otestovány alespoň v duplikátu.

Doporučený postup pro duplikát standardů	Doporučený postup pro triplikát standardů
a. Označte 4 zkumavky „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.	a. Označte 4 zkumavky „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
b. Přidejte 150 μl GD do zkumavek S1, S2, S3, S4.	b. Přidejte 150 μl GD do zkumavky S1.
c. Přidejte 150 μl standardu soupravy do zkumavky S1 a důkladně promíchejte.	c. Přidejte 210 μl GD do zkumavek S2, S3, S4.
d. Přeneste 50 μl ze zkumavky S1 do zkumavky S2 a důkladně promíchejte.	d. Přidejte 150 μl standardu soupravy do zkumavky S1 a důkladně promíchejte.
e. Přeneste 50 μl ze zkumavky S2 do zkumavky S3 a důkladně promíchejte.	e. Přeneste 70 μl ze zkumavky S1 do zkumavky S2 a důkladně promíchejte.
f. Zelený ředicí roztok (GD) samotný slouží jako nulový standard (S4).	f. Přeneste 70 μl ze zkumavky S2 do zkumavky S3 a důkladně promíchejte.
	g. Zelený ředicí roztok (GD) samotný slouží jako nulový standard (S4).



Obrázek 1. Příprava standardní křivky. Připravte čerstvá ředění standardu soupravy pro každou relaci testu ELISA.

4. Rekonstruuje mrazem sušený konjugát 100X koncentrát pomocí 0,3 ml deionizované nebo destilované vody. Opatrně promíchejte, aby nedošlo k napěnění a ujistěte se, že dojde k dokonalému rozpuštění konjugátu.

Pracovní konjugát se připravuje zředěním požadovaného množství rekonstituovaného konjugátu 100X koncentrátu v zeleném ředicím roztoku dle hodnot v tabulce 1 – Příprava konjugátu.

Tabulka 1. Příprava konjugátu

Počet stripů	Objem konjugátu 100X koncentrátu	Objem zeleného ředicího roztoku
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

- Důkladně avšak jemně promíchejte, aby nedošlo k napěnění.
- Ihned po použití vraťte případný nespoteřebovaný konjugát 100X koncentrát do skladovací teploty 2 až 8 °C.
- Použijte pouze zelený ředicí roztok.

5. **Vzorky plazmy shromážděné ze zkumavek na odběr krve, která byla následně zmrazena nebo uchována déle než 24 hodin před provedením testu, před přidáním do jamky testu ELISA důkladně promíchejte.**
 - Jestliže mají být vzorky plazmy přidány přímo z odstředěných zkumavek QFT, plazmu nepromíchejte.
6. **Přidejte 50 µl čerstvě připraveného pracovního konjugátu do požadovaných jamek ELISA pomocí vícekanálové pipety.**
7. **Přidejte 50 µl vzorků plazmy pro test do příslušných jamek pomocí vícekanálové pipety (viz doporučené rozvržení destičky na straně 15, tabulky 2A a 2B). Nakonec přidejte 50 µl každého ze standardů 1 až 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

Tabulka 2A. Doporučené rozvržení vzorků pro zkumavky Nil, TB Antigen a Mitogen (28 testů na jednu destičku).

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

	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

Tabulka 2B. Doporučené rozvržení vzorků pro zkumavky Nil a TB Antigen (44 testů na jednu destičku).

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

8. **Promíchejte důkladně konjugát a vzorky plazmy/standarty pomocí třepačky mikrodestiček po dobu 1 minuty.**
9. **Zakryjte každou destičku víčkem a inkubujte při pokojové teplotě (22 °C ± 5°C) po dobu 120 ± 5 minut.**
 - Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.
10. **Během inkubace zřed'te jednu část promývacího pufru 20X koncentrátu s 19 díly deionizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte. Je k dispozici dostatek promývacího pufru 20X koncentrátu k přípravě 2 litrů pracovního promývacího pufru.**

Promývejte jamky **400 µl** pracovního promývacího pufru alespoň 6 cyklů. Doporučuje se použít automatizovanou promývačku destiček.

 - Důkladné promytí je velmi důležité pro výkon testu. Ujistěte se, že je každá jamka při každém promývacím cyklu **úplně naplněna** promývacím pufrem až po okraj. Doporučuje se ponechat jamky mezi každým cyklem namočené alespoň po dobu 5 sekund.
 - Do odpadního zásobníku by měl být přidán standardní laboratorní dezinfekční prostředek a je nutné dodržovat zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.
11. **Poklepejte destičkami čelem dolů na absorpční utěrku nepouštějící vlas, abyste odstranili zbytky pufru. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku enzymového substrátu a důkladně promíchejte pomocí třepačky mikrodestiček.**
12. **Zakryjte každou destičku víčkem a inkubujte při pokojové teplotě (22 °C ± 5°C) po dobu 30 minut.**
 - Destičky by během inkubace neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.
13. **Po uplynutí 30 minut inkubace do každé jamky přidejte 50 µl zastavovacího roztoku enzymů a promíchejte.**
 - Zastavovací roztok enzymů by měl být přidán do jamek ve stejném pořadí a přibližně stejnou rychlostí jako substrát v kroku 11.
14. **Změřte optickou hustotu (OD) každé jamky během 5 minut od zastavení reakce pomocí čtečky mikrodestiček s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem 620 nm až 650 nm. Hodnoty OD budou použity k výpočtu výsledků.**

7. Výpočty a interpretace testu

Pro analýzu nezpracovaných dat a výpočet výsledků se používá analyzační software QFT. Je k dispozici na stránkách www.QuantiFERON.com. Ujistěte se prosím, že používáte nejnovější verzi softwaru.

Software provádí vyhodnocení kontroly kvality testu, vytváří standardní křivku a poskytuje výsledky testu pro každého pacienta, jak je uvedeno v části Interpretace výsledků.

Jako alternativa k použití analyzačního softwaru QFT je možné výsledky stanovit dle následující metody.

Vytvoření standardní křivky

(pokud není použit software pro analýzu QFT)

Určete střední hodnoty OD replikátů standardů soupravy na každé destičce.

Vytvořte standardní křivku $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ pomocí grafického znázornění $\log_{(e)}$ střední hodnoty OD (osy y) oproti koncentraci $\log_{(e)}$ IFN- γ standardů v IU/ml (osa x), s vynecháním nulového standardu z těchto výpočtů. Vypočtěte čáru nejlepšího výsledku pro standardní křivku pomocí regresní analýzy.

Použijte standardní křivku ke stanovení koncentrace IFN- γ (IU/ml) pro každý testovaný vzorek plazmy s použitím hodnoty OD pro každý vzorek.

Tyto výpočty je možné provádět pomocí softwarových balíčků, které jsou k dispozici se čtečkami mikrodestiček a standardního tabulkového procesoru nebo statistického softwaru (například Microsoft® Excel®). Doporučuje se, aby byly tyto balíčky použity k výpočtu regresní analýzy, variačního koeficientu (%CV) pro standardy a korelačního koeficientu (r) standardní křivky.

Kontrola kvality testu

Přesnost výsledků testu závisí na vytvoření přesné standardní křivky. Proto musí být výsledky odvozené od standardů před interpretací výsledky testů vzorků prošetřeny.

Aby byl test ELISA platný:

- Střední hodnota OD pro standard 1 musí být $\geq 0,600$.
- %CV pro OD hodnoty replikátu standardu 1 a standardu 2 musí být $\leq 15 \%$.
- OD hodnoty replikátu pro standardy 3 a 4 se nesmí lišit o více než 0,040 jednotek optické hustoty od jejich střední hodnoty.
- Korelační koeficient (r) vypočtený ze středních hodnot absorbance těchto standardů musí být $\geq 0,98$.

Software pro analýzu QFT vypočítá tyto parametry kontroly kvality a vytvoří zprávu.

Pokud výše uvedená kritéria nejsou splněna, bude cyklus testu neplatný a musí být zopakován.

Střední hodnota OD pro nulový standard (zelený ředící roztok) musí být $\leq 0,150$. Jestliže je střední hodnota OD $> 0,150$, je nutné prověřit postup promývání destiček.

Interpretace výsledků

Výsledky testu QFT jsou interpretovány pomocí následujících kritérií:

Pozn.: Diagnostika nebo vyloučení onemocnění tuberkulózou a posouzení pravděpodobnosti LTBI, vyžaduje použití kombinace epidemiologických, historických, zdravotních a diagnostických nálezů, které musí být vzaty v úvahu při interpretaci výsledků QFT (tabulky 2 a 3).

Tabulka 2. Při použití zkumavek Nil, TB Antigen a Mitogen

Nil (IU/ml)	TB Antigen mínus Nil (IU/ml)	Mitogen mínus Nil (IU/ml)*	Výsledek QFT	Zpráva/Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	≥ 0,5	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Jakýkoliv	Pozitivní†	Infekce <i>M. tuberculosis</i> je pravděpodobná
	< 0,35	< 0,5	Nejednoznačný‡	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu antigenu TB
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,5	Nejednoznačný‡	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu antigenu TB
> 8,0§	Jakýkoliv	Jakýkoliv	Nejednoznačný‡	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu antigenu TB

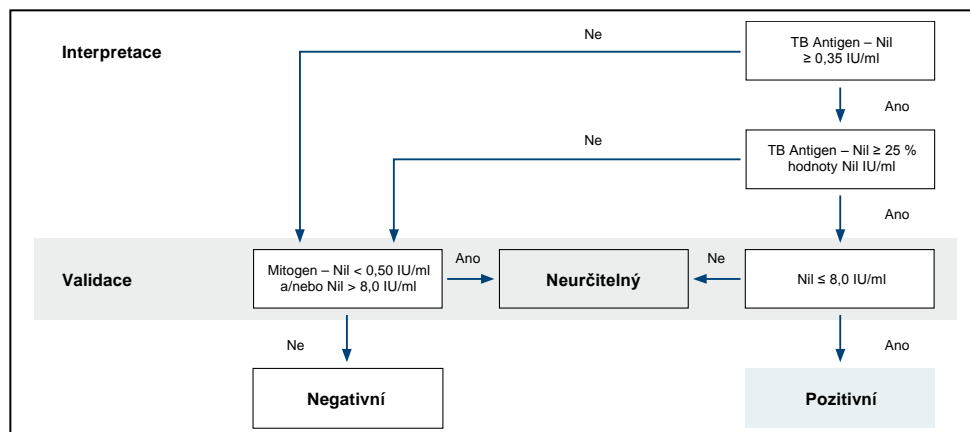
* Odezvy na pozitivní kontrolu Mitogen (a občas na TB Antigen) mohou být běžně mimo rozsah čtečky mikroděstiček. To nemá žádný dopad na výsledky testu.

† V případech, kdy neexistuje podezření na infekci *M. tuberculosis*, mohou být původně pozitivní výsledky ověřeny opakovaným testováním původních vzorků plazmy v duplikátu testem QFT ELISA. Pokud je opakované testování jednoho nebo obou replikátů pozitivní, musí být test dané osoby považován za pozitivní.

‡ Možné příčiny viz část Řešení problémů.

§ V klinických studiích mělo méně než 0,25 % subjektů hladiny IFN-γ > 8,0 IU/ml u hodnoty Nil.

Magnituda měřené hladiny IFN-γ nemůže korelovat se stádiem nebo stupněm infekce, úrovní imunitní odpovědi nebo pravděpodobností progresu do aktivního onemocnění.



Obrázek 3. Schématické znázornění interpretace při použití zkumavek Nil, TB Antigen a Mitogen.

Tabulka 3. Při použití pouze zkumavek QuantiFERON Nil a TB Antigen

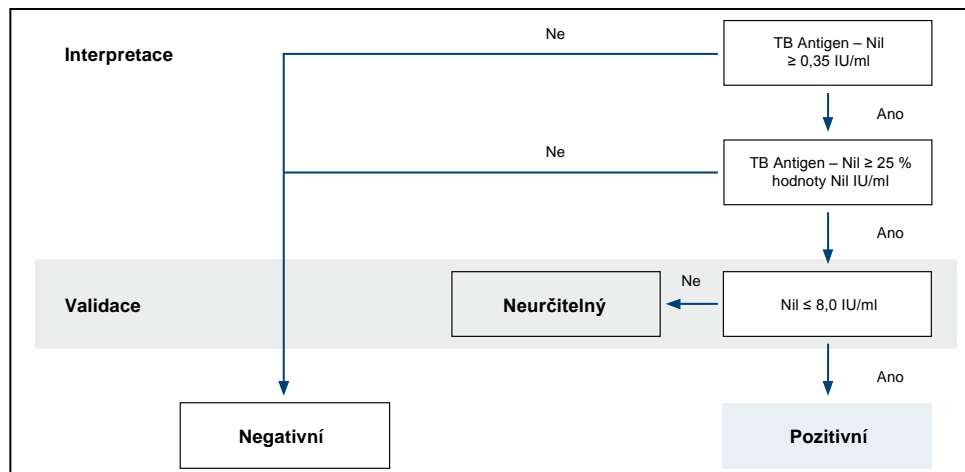
Nil (IU/ml)	TB Antigen mínus Nil (IU/ml)	Výsledek QFT	Zpráva/Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Pozitivní*	Infekce <i>M. tuberculosis</i> je pravděpodobná
> 8,0 [†]	Jakýkoliv	Nejednoznačný [‡]	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu antigenu TB

* V případech, kdy neexistuje podezření na infekci *M. tuberculosis*, mohou být původně pozitivní výsledky ověřeny opakovaným testováním původních vzorků plazmy v duplikátu testem QFT ELISA. Pokud je opakované testování jednoho nebo obou replikátů pozitivní, musí být test dané osoby považován za pozitivní.

[†] V klinických studiích mělo méně než 0,25 % subjektů hladiny IFN- γ > 8,0 IU/ml u hodnoty Nil.

[‡] Možné příčiny viz část Řešení problémů.

Magnituda měřené hladiny IFN- γ nemůže korelovat se stádiem nebo stupněm infekce, úrovní imunitní odpovědi nebo pravděpodobností progresu do aktivního onemocnění.



Obrázek 4. Schématické znázornění interpretace při použití zkumavek Nil a TB Antigen.

8. Omezení

Výsledky testů QFT musí být použity společně s epidemiologickou anamnézou každého jedince, současným zdravotním stavem a dalšími diagnostickými hodnoceními.

Výsledky osob s hodnotami Nil většími než 8 IU/ml jsou klasifikovány jako „nejednoznačné“, protože o 25 % vyšší odezva na antigeny TB může být mimo rozsah měření testu.

Nespolehlivé nebo neprůkazné výsledky se mohou objevit v důsledku:

- Odchytky od postupu popsaného v *příbalovém letáku QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*.
- Nadměrné hladiny IFN- γ v krevním oběhu nebo přítomnost heterofilních protilátek.
- Uplynutí delší doby od odběru vzorku krve do inkubace při 37 °C než 16 hodin.

9. Charakteristiky funkčních vlastností

Klinické studie

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný definitivní standard pro potvrzení nebo vyloučení latentní tuberkulózy (LTBI), nelze prakticky vyhodnotit odhad citlivosti a specifity pro QFT. Přibližná specificita testu QFT byla stanovena vyhodnocením míry falešně pozitivních výsledků u osob s nízkým rizikem (bez známých rizikových faktorů) nakažení tuberkulózou. Přibližná citlivost byla stanovena vyhodnocením skupin pacientů nemocných tuberkulózou, která byla potvrzena kultivací.

Specificita

Ve studii, která proběhla ve Spojených státech a zahrnovala 866 dobrovolníků, byla odebrána krev pro účely QFT při očkování TST. Demografické informace a rizikové faktory na TB byly stanoveny pomocí standardního dotazníku během testování. Ze 432 dobrovolníků bez známých rizikových faktorů na infekci *M. tuberculosis* byly pro 391 k dispozici výsledky QFT a TST. Žádný z nich nebyl očkovan BCG. Druhá studie specifity byla provedena u osob s nízkým rizikem pomocí QFT v Japonsku, přičemž přibližně 90 % z účastníků bylo očkováno BCG. Výsledky z těchto 2 studií specifity jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Specificita QFT: Výsledky u osob bez uváděných rizik infekce *M. tuberculosis*

Studie	Stav BCG (% očkovaných osob)	Celkem testovaných osob	Počet nejednoznačných výsledků QFT	Počet pozitivních výsledků QFT / počet platných testů	Specificita QFT (95% CI)	Počet pozitivních výsledků TST / počet platných testů	Specificita TST* (95% CI)
USA (nepublikováno)	0 %	391	1	3/390	99,2% (98–100)	6/391	98,5% (97–99)
Japonsko (15)	~90 %	168	6	2/162	98,8 % (95–100)	–	–
Celkem	–	559	7/559 (1,3 %)	5/552	99,1 % (98–100)	–	–

* S použitím mezní hodnoty 10 mm TST u osob bez očkování BCG. Odhad specifity TST je 99,1 % při použití mezní hodnoty 15 mm.

Citlivost u aktivní TB

K vyhodnocení citlivosti QFT byly testovány osoby s podezřením na TB z USA, Austrálie a Japonska, u nichž byla následně potvrzena infekce *M. tuberculosis* kultivací. Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný definitivní standardní test pro infekci latentní TB (LTBI), je vhodnou náhradou mikrobiologická kultivace *M. tuberculosis*, protože pacienti s aktivním onemocněním jsou zjevně infikovaní. Pacienti byli před odběrem krve pro účely testu QFT léčeni po dobu kratší než 8 dní.

V tabulce 5 je uvedeno shrnutí zjištění ze 3 skupin testů pacientů s pozitivní kultivací na *M. tuberculosis*. Celková citlivost QFT u osob s aktivním onemocněním TB byla 89 % (157/177).

Tabulka 5. QFT: Pacienti s infekcí *M. tuberculosis* potvrzenou kultivací

Studie	Počet pozitivních výsledků QFT / počet platných testů	Citlivost QFT (95% CI)
Pacienti s TB z Japonska (15)	86/92	93 % (86–97 %)
Austrálie	24/27	89% (70–97 %)
USA	47/58	81 % (68–90 %)
Celkem	157/177	89 % (83–93 %)

Diagnóza LTBI

Bylo publikováno množství studií, které prokazují účinnost testu QFT u různých populací s rizikem LTBI. Nejdůležitější zjištění z některých vybraných studií jsou uvedena v tabulce 6.

Tabulka 6. Vybrané publikované studie o QFT u populací s rizikem výskytu LTBI

Studie	Celkem testovaných osob	Výsledky a zjištění
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Prostředí s velmi vysokým výskytem TB. 40 % QFT pozitivních a 41 % TST pozitivních při 10 mm. Vysoká shoda s TST, žádný vliv BCG na kterékoliv straně. Oba testy byly provedeny v souvislosti s rizikovými faktory věku a doby práce ve zdravotnictví.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Celková prevalence LTBI podle QFT byla 4,6 % (27/590) u HIV+ osob. Pozitivní výsledky byly dány do souvislosti s riziky onemocnění TB. U dvou pacientů s pozitivním výsledkem QFT došlo k progresi do aktivní TB během 1 roku. Nejednoznačné odpovědi (n=20, 3,4 %) významně souvisely s počtem CD4 < 100/μl.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Děti, u nichž bylo podezření na TB nebo které měly v anamnéze kontakt s osobou nemocnou TB, byly testovány pomocí QFT a TST; 10,5 % QFT pozitivních a 9,5 % TST pozitivních výsledků při 10 mm. Shoda mezi testy byla 95,2 % celkově a 100 % u dětí neočkovaných BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Byly testovány blízké kontakty u 15 různých indexových případů: 51 % bylo očkováno BCG, 27 % bylo narozených v cizině; 70 % z osob očkovaných BCG a 18 % osob bez očkování mělo pozitivní výsledek testu TST (5 mm), přičemž 9 %, respektive 11 % mělo pozitivní výsledek testu QFT. QFT byl spojen s rizikem TB. TST byl pouze spojen s očkováním BCG.

Mnoho dalších publikací popisuje výkonnost méně citlivé kapalinové antigenové verze QuantiFERON-TB Gold (předchůdce QFT) a testu QFT. Tyto studie zahrnují použití testu(ů) u osob, které byly v kontaktu s pacienty s aktivní TB (9, 11, 19, 25), dětí (6–10, 25, 28), HIV pozitivních pacientů (2, 5, 20), pracovníků ve zdravotnictví (13, 26, 32), pacientů s oslabenou imunitou (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), a také osob s podezřením na TB (7, 8, 10, 18), a osob s nízkým rizikem nakažení (15).

Opakovatelnost a vliv TST na následné testování QFT

Jako součást studie specifity v USA byla opakovaně testována podskupina dobrovolníků 4 až 5 týdnů od provedení původního testu QFT a TST. V obou časových bodech byly k dispozici výsledky QFT pro 260 subjektů a úroveň shody byla 99,6 % (259/260). Předchozí TST nevykázal pozitivní reakce na test QFT.

10. Technické údaje

Nejednoznačné výsledky

Nejednoznačné výsledky by neměly být obvyklé a mohou souviset se stavem imunity testovaných osob, avšak mohou se také vztahovat k množství technických faktorů:

- Uplynutí delší doby od odběru vzorku krve do inkubace při 37 °C než 16 hodin.
- Skladování krve mimo doporučený rozsah teplot (17 až 27 °C).
- Nedostatečné promíchání zkumavek s odebranou krví.
- Nedokonalé promytí destičky ELISA.

Pokud existuje podezření, že došlo k technickým problémům při odběru nebo manipulaci se vzorky krve, zopakujte celý test QFT s novým vzorkem krve. Zopakování testování ELISA stimulované plazmy je možné provést, pokud je podezření na nedostatečné promytí nebo jakoukoliv jinou odchylku od postupu pro test ELISA. Nejednoznačné výsledky testů v důsledku nízkých hodnot mitogenu nebo vysokých hodnot Nil by se neměly při opakovaném testování změnit, pokud nedošlo k chybě při testování ELISA. Nejednoznačné výsledky musí být jako takové uvedeny ve zprávě. Lékaři si mohou zvolit opakovaný odběr vzorků nebo provedení jiných postupů dle potřeby.

Sražení vzorků plazmy

Pokud se při dlouhodobém skladování plazmy objeví ve vzorcích sraženiny fibrinu, odstředte vzorky, aby se sražený materiál usadil a napipetování bylo snadnější.

Návod na řešení problémů

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Více informací naleznete také v technických údajích uvedených na stránkách: www.QuantiFERON.com. Kontaktní údaje naleznete na zadní straně.

Řešení problémů s testem ELISA

Nespecifické zbarvení

Možná příčina	Řešení
a) Nedokonalé promytí destičky	Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund.
b) Křížová kontaminace jamek ELISA	Při pipetování a mísení vzorku buďte opatrní, aby se minimalizovalo riziko kontaminace.
c) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent	Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100X koncentrát použit do tří měsíců od data rekonstituce.
d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu	Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla.
e) Mísení plazmy ve zkumavkách QFT před odběrem	Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

Nízké hodnoty optické hustoty pro standardy

Možná příčina	Řešení
a) Chyba ředění standardu	Ujistěte se, že ředění standardu soupravy jsou připravena správně dle pokynů v příbalovém letáku QFT ELISA.
b) Chyba pipetování	Ujistěte se, že je zařízení kalibrováno a používáno dle pokynů výrobce.
c) Příliš nízká teplota inkubace	Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (22 °C ± 5 °C).
d) Příliš krátká doba inkubace	Inkubace destičky s konjugátem, standardy a vzorky musí trvat 120 ± 5 minut. Roztok enzymového substrátu se inkubuje na destičce po dobu 30 minut.
e) Nesprávný filtr čtečky destiček	Hodnoty destičky musí být načteny s filtrem o vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem od 620 do 650 nm.
f) Příliš chladná činidla	Všechna činidla, s výjimkou konjugátu 100X koncentráta, musí být před zahájením testu temperována na pokojovou teplotu. To může trvat přibližně jednu hodinu.
g) Prošlá doba použitelnosti soupravy/komponent	Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100X koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce.

Výrazné pozadí

Možná příčina	Řešení
a) Nedokonalé promytí destičky	Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund.
b) Příliš vysoká teplota inkubace	Inkubace při testu ELISA by měla být prováděna při pokojové teplotě (22 °C ± 5 °C).
c) Prošla doba použitelnosti soupravy/komponent	Ujistěte se, že je souprava použita do data použitelnosti. Ujistěte se, že je rekonstituovaný standard a konjugát 100X koncentrát použit do 3 měsíců od data rekonstituce.
d) Kontaminace roztoku enzymového substrátu	Pokud se objeví modré zbarvení, roztok zlikvidujte. Ujistěte se, že používáte čisté nádoby na činidla.

Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátu

Možná příčina	Řešení
a) Nedokonalé promytí destičky	Promyjte destičku alespoň 6krát pomocí 400 µl promývacího pufru na jamku. V závislosti na použitém promývacím činidle může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Jamky by se měly ponechat mezi každým cyklem namočený alespoň po dobu 5 sekund.
b) Chyba ředění standardu	Ujistěte se, že ředění standardu jsou připravena správně dle pokynů v příbalovém letáku QFT ELISA.
c) Nedostatečné promíchání	Činidla důkladně promíchejte tak, že před jejich přidáním na destičku zkumavku převrátíte nebo lehce protřepete na třepačce.
d) Nejednotná technika pipetování nebo přerušení během přípravy testu	Přidání vzorku a standardu by mělo být provedeno bez přerušení procesu. Všechna činidla musí být připravena před zahájením testu.

Video s pracovním postupem testu a řešení většiny technických problémů naleznete na Gnowee™. Po registraci přímo na stránkách www.gnowee.net získáte online přístup. Informace o výrobku a technické pokyny jsou zdarma k dispozici u společnosti QIAGEN, prostřednictvím vašeho dodavatele nebo na www.QuantiFERON.com.

11. Literatura

Vyčerpávající seznam referenční literatury QFT je umístěn na Gnowee – referenční knihovně QuantiFERON, a to na stránkách 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. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* **4**, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* **13**, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* **56**, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 33.
17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* **293**, 2756.
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 1146.
19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* **138**, 267.
20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 737.

21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* **146**, 761.
22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* **7**, 2797.
23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 84.
24. Mirskhulava, 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-gamma 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. Technická podpora

Pro získání technické podpory prosím kontaktujte:

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

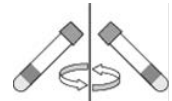
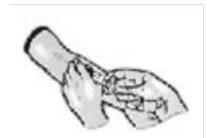
Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

13. Zkrácený postup testu

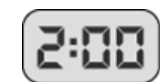
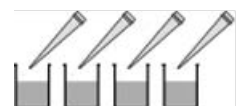
Fáze 1 – inkubace krve

1. Odeberte krev pacienta do odběrových zkumavek a poté desetkrát (10) dobře protřepejte zkumavky tak, aby došlo ke smočení celé vnitřní stěny zkumavek krví a rozpuštění antigenů na jejich stěně.
2. Zkumavky inkubujte ve vzpřímené poloze při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 16 až 24 hodin.
3. Po inkubaci odstředte zkumavky po dobu 15 minut při 2000 až 3000 RCF (g), aby se oddělila plazma a červené krvinky.
4. Po odstředění se před odběrem plazmy vyhněte pipetování nahoru a dolů nebo míchání plazmy. Vždy dbejte na to, abyste nenarušili materiál na povrchu gelu.

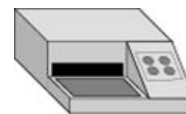
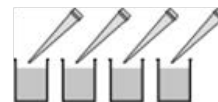
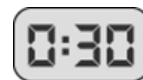


Fáze 2 – IFN- γ ELISA

1. Ponechte temperovat součásti testu ELISA, s výjimkou konjugátu 100X koncentráту, na pokojovou teplotu ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) alespoň po dobu 60 minut.
2. Rekonstituujte standard soupravy na 8,0 IU/ml pomocí deionizované nebo destilované vody. Připravte čtyři (4) standardní ředění.
3. Rekonstituujte mrazem sušený konjugát 100X koncentrát pomocí destilované nebo deionizované vody.
4. Připravte pracovní roztok konjugátu v zeleném ředícím roztoku a do všech jamek přidejte 50 μ l.
5. Do příslušných jamek přidejte 50 μ l testovaných vzorků plazmy a 50 μ l standardů. Promíchejte pomocí třepačky.
6. Inkubujte po dobu 120 ± 5 minut při pokojové teplotě.
7. Promyjte jamky alespoň 6krát pomocí 400 μ l promývacího pufru na jamku.
8. Přidejte do jamek 100 μ l roztoku enzymového substrátu. Promíchejte pomocí třepačky.



9. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
10. Přidejte do jamek 50 μ l zastavovacího roztoku enzymů. Promíchejte pomocí třepačky.
11. Zjistěte výsledné hodnoty při 450 nm pomocí referenčního filtru 620 až 650 nm.
12. Proveďte analýzu výsledků.



Významné změny

Významné změny v tomto vydání (1075115CS Rev. 01) příbalového letáku QFT ELISA jsou shrnuty v tabulce dole:

Část	Strana	Změna(y)
4. Upozornění a bezpečnostní opatření	8–9	Změna použití některých komponent ELISA mezi šaržemi soupravy.
12. Technická podpora	27	Nové e-mailové adresy technické podpory.

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

Omezená licenční smlouva pro QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a tímto příbalovým letákem a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v protokolech, které jsou dodávány s výrobkem, a tomto příbalovém letáku.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat, pokud není stanoveno jinak společností QIAGEN.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoliv jiné licence, výslovné nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

© 2013 Cellestis, QIAGEN Company, všechna práva vyhrazena.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

