

Ulotka informacyjna

QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]) ELISA



2 x 96 (nr katalogowy 0594-0201)



20 x 96 (nr katalogowy 0594-0501)

Test wydzielania IFN- γ krwi pełnej sprawdzający reakcję na antygeny peptydowe ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4)



Do celów diagnostyki in vitro



0594-0201, 0594-0501

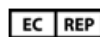


Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Telefon: (Australia) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, Niemcy

1075115PL Wersja 01



www.QuantiFERON.com



Spis treści

1. Przeznaczenie	4
2. Informacje ogólne i wyjaśnienia dotyczące testu	4
Zasady testu	5
Czas wymagany do przeprowadzenia testu	5
3. Elementy i przechowywanie	6
Materiały wymagane, ale niedostarczone	7
Przechowywanie i postępowanie	7
4. Ostrzeżenia i środki ostrożności	8
Do celów diagnostyki in vitro	8
Ostrzeżenia	8
Środki ostrożności	9
5. Pobranie i postępowanie z próbkami	11
6. Wskazówki dotyczące stosowania	13
Etap 1 — inkubacja krwi i pobranie osocza	13
Etap 2 — test ELISA ludzkiego IFN- γ	14
7. Obliczenia i interpretacja testu	18
Generowanie krzywej wzorcowej	18
Kontrola jakości testu	18
8. Ograniczenia	21
9. Charakterystyka działania testu	21
Badania kliniczne	21
10. Informacje techniczne	24
Wyniki nieokreślone	24
Próbki osocza z włóknikiem	24
Przewodnik rozwiązywania problemów	25
11. Bibliografia	27
12. Serwis	29
13. Skrócona opis procedury testowej	30
Etap 1 — inkubacja krwi	30
Etap 2 — test ELISA IFN- γ	30
Znaczące zmiany	32

1. Przeznaczenie

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) to test in vitro wykorzystujący koktajl peptydowy naśladujący działanie białek ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4) w celu stymulacji komórek heparynizowanej krwi pełnej. Wykrywanie interferonu gamma- γ (IFN- γ) przez test immunoenzymatyczny (ELISA) jest wykorzystywane do określenia w warunkach in vitro reakcji na antygeny peptydowe powiązane z zakażeniem prątkiem gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*.

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

2. Informacje ogólne i wyjaśnienia dotyczące testu

Gruźlica jest chorobą zakaźną spowodowaną przez zakażenie mikroorganizmami z kompleksu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), które typowo rozprzestrzeniają się na nowych gospodarzy przez unoszące się w powietrzu kropelki wydzielane przez pacjentów cierpiących na gruźlicę dróg oddechowych. Nowo zakażone osoby mogą zachorować na gruźlicę w ciągu kilku tygodni lub miesięcy, ale większość nie choruje. Utajone zakażenie prątkami gruźlicy (LTBI) jest stanem niezakaźnym i bezobjawowym, utrzymującym się u niektórych osób. Takie osoby mogą zapaść na chorobę gruźliczą w ciągu kolejnych miesięcy lub lat. Głównym celem diagnozowania LTBI jest rozważenie terapii mającej na celu zapobieganie rozwojowi choroby gruźliczej. Dotychczas jedyną dostępną metodą diagnozowania LTBI była skórna próba tuberkulinowa (TST). Reakcja skórna na tuberkulinę rozwija się w okresie od 2 do 10 tygodni po zakażeniu. Jednakże część zakażonych pacjentów nie wykazuje reakcji na tuberkulinę — w tym ci, u których różne schorzenia upośledzają funkcje immunologiczne, ale również osoby bez takich schorzeń. Z drugiej strony niektórzy pacjenci, u których zakażenie *M. tuberculosis* jest nieprawdopodobne, wykazują wrażliwość na tuberkulinę, co przekłada się na pozytywny wynik TST po szczepieniu BCG, infekcji mykobakteryjnej spowodowanej czynnikiem innym niż bakterie z kompleksu *M. tuberculosis* lub z powodu innych nieokreślonych czynników.

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

QFT jest testem mediowanych komórkowo odpowiedzi (CMI) na antygeny peptydowe naśladujące białka mykobakterii. Białka ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4) są nieobecne w przypadku wszystkich szczepów bakteryjnych BCG i większości prątków niegruźliczych, oprócz *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*(1). We krwi osób zakażonych mikroorganizmami z kompleksu *M. tuberculosis* zazwyczaj znajdują się limfocyty rozpoznające te i inne antygeny mykobakteryjne. Proces rozpoznawania wiąże się z produkcją i wydzielaniem cytokiny — IFN- γ . Wykrywanie i dalsze oznaczenie ilościowe IFN- γ stanowi istotę tego testu.

Antygenami używanymi w teście QFT jest koktajl peptydów naśladujących białka ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4). Liczne badania wykazały, że te antygeny peptydowe stymulują reakcję biosyntezy IFN- γ w limfocytach T pacjentów zakażonych *M. tuberculosis*, lecz ogólnie nie wywołują takiej reakcji u osób niezakażonych lub zaszczepionych szczepionką BCG, które nie są chore ani nie należą do grup ryzyka w odniesieniu do LTBI(1–32). Jednakże leczenie lub schorzenia upośledzające funkcje immunologiczne mogą osłabić reakcję IFN- γ . Pacjenci z niektórymi infekcjami mykobakteryjnymi mogą również reagować na ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4), ponieważ geny kodujące te białka są obecne w *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*(1, 23). Test QFT zarówno wykrywa LTBI, jak i jest pomocny w rozpoznawaniu infekcji kompleksem *M. tuberculosis* u chorych pacjentów. Pozytywny wynik testu potwierdza diagnozę choroby gruźliczej, ale może on być również efektem zakażenia innymi mykobakteriami (np. *M. kansasii*). W celu potwierdzenia lub wykluczenia choroby gruźliczej niezbędne są inne badania medyczne i diagnostyczne.

Zasady testu

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

Test QFT jest wykonywany w 2 etapach. W ramach pierwszego etapu krew jest pobierana do probówek na krew QFT, w tym probówki z próbką zerową, probówki z antygenami gruźliczymi oraz probówki z mitogenem.

Probówka z mitogenem jest wykorzystywana w teście QFT jako kontrola pozytywna. Jest to szczególnie uzasadnione w przypadku, gdy nie ma pewności co do stanu układu odpornościowego badanej osoby. Probówka z mitogenem może służyć również do kontrolowania prawidłowości inkubacji i obchodzenia się z krwią.

Probówki powinny być jak najszybciej poddane inkubacji w temperaturze 37°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania próbek. Po upływie okresu inkubacji trwającego od 16 do 24 godzin probówki należy odwirować, usunąć osocze i zmierzyć stężenie IFN- γ (IU/ml) z wykorzystaniem testu ELISA.

Test jest uznawany za pozytywny pod kątem odpowiedzi z udziałem IFN- γ na antygeny gruźlicze, jeśli odczyt znacznie przekracza wyrażoną w IU/ml wartość IFN- γ dla próbki zerowej. Jeśli jest używana, próbka z osoczem z próbki z mitogenem służy jako kontrola pozytywna na obecność IFN- γ dla wszystkich testowanych próbek. Słaba reakcja na mitogen (<0,5 IU/ml) wskazuje na nieokreślony wynik, gdy próbka krwi także wykazuje negatywną reakcję na antygeny gruźlicze. Taka sytuacja może występować w przypadku spadku liczby limfocytów, zmniejszonej aktywności limfocytów związanej z nieprawidłowym obchodzeniem się z próbką, nieprawidłowym napełnieniem lub mieszaniem próbki z mitogenem lub brakiem możliwości syntezy IFN- γ przez limfocyty pacjenta. Próbka zerowa jest korygowana z uwzględnieniem tła, efektów przeciwciał heterofilnych i ogólnej zawartości IFN- γ w próbkach krwi. Stężenie IFN- γ w probówce z próbką zerową odejmuje się od stężenia IFN- γ w probówce z antygenami gruźliczymi i probówce z mitogenem (jeśli jest używana).

Czas wymagany do przeprowadzenia testu

Szacunkowy czas wymagany do przeprowadzenia testu QFT został przedstawiony poniżej. Przedstawiono także czas testowania wielu próbek podzielonych na partie:

Inkubacja probówek z krwią w temperaturze 37°C: od 16 do 24 godzin

ELISA: około 3 godziny na 1 płytkę ELISA

(od 28 do 44 osób)

<1 godzina pracy

od 10 do 15 minut na każdą dodatkową płytkę

3. Elementy i przechowywanie

Blood Collection Tubes (próbówki na pobraną krew)*	300 próbek	200 próbek	100 próbek
Nr katalogowy	T0590-0301	0590-0201	T0593-0201
Liczba badań	100	100	100
QuantiFERON Nil Tube (próbówka QuantiFERON z próbką zerową — szara zatyczka, biały pierścień)	100 próbek	100 próbek	
QuantiFERON TB Antigen Tube (próbówka QuantiFERON z antygenami gruźliczymi — czerwona zatyczka, biały pierścień)	100 próbek	100 próbek	
QuantiFERON Mitogen Tube (próbówka QuantiFERON z mitogenem — fioletowa zatyczka, biały pierścień)	100 próbek		100 próbek
Ulotka informacyjna dotycząca próbek na pobraną krew QFT	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (próbówki na pobieraną krew do stosowania na dużych wysokościach od 1020 do 1875 metrów)*	300 próbek	100 próbek	100 próbek
Nr katalogowy	T0590-0505	0590-0501	T0593-0501
QuantiFERON HA Nil Tube (próbówka QuantiFERON HA z próbką zerową — szara zatyczka, żółty pierścień)	100 próbek	100 próbek	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (próbówka QuantiFERON HA z antygenami gruźliczymi — czerwona zatyczka, żółty pierścień)	100 próbek	100 próbek	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (próbówka QuantiFERON HA z mitogenem — fioletowa zatyczka, żółty pierścień)	100 próbek		100 próbek
Ulotka informacyjna dotycząca próbek na pobraną krew QFT	1	1	1

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

Składniki zestawu ELISA	2-płytkowy zestaw ELISA	Laboratoryjny pakiet referencyjny
Nr katalogowy	0594-0201	0594-0501
Paski mikropłytkowe (12 x 8 dołków) pokryte mysim przeciwciałem monoklonalnym przeciwko ludzkiemu IFN-γ	2 zestawy 12 8-dołkowych pasków mikropłytkowych	20 zestawów 12 8-dołkowych pasków mikropłytkowych
Human IFN- γ Standard, lyophilized (standardowy IFN- γ człowieka, liofilizowany) (zawiera rekombinanty IFN- γ człowieka, kazeinę bydlęcą, tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x fiolka (8 IU/ml po rekonstytucji)	10 x fiolka (8 IU/ml po rekonstytucji)
Green Diluent (zielony rozcieńczalnik) (zawiera kazeinę bydlęcą, prawidłową surowicę myszy (NMS), tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (koncentrat koniugatu 100X, liofilizowany) (mysie przeciwciała sprzężone z HRP, skierowane przeciwko ludzkiemu IFN- γ , zawiera tiomersal o stężeniu masowym 0,01%)	1 x 0,3 ml (po rekonstytucji)	10 x 0,3 ml (po rekonstytucji)
Wash Buffer 20X Concentrate (koncentrat buforu do płukania 20X) (pH 7,2, zawiera ProClin[®] 300 o stężeniu objętościowym 0,05%)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (roztwór substratu enzymu) (zawiera H₂O₂, 3,3', 5,5' tetrametylobenzodynę)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (roztwór powstrzymujący działanie enzymu) (zawiera 0,5 M H₂SO₄)[†]	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Ulotka informacyjna QFT ELISA	1	1

[†] Zawiera kwas siarkowy. Środki ostrożności — patrz strona 9.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Inkubator utrzymujący temperaturę 37°C. CO₂ nie jest wymagany
- Kalibrowane pipety o zmiennej objętości do podawania ilości wynoszącej od 10 μ l do 1000 μ l z jednorazowymi końcówkami
- Kalibrowane pipety wielokanałowe do podawania ilości wynoszącej od 50 μ l do 100 μ l z jednorazowymi końcówkami
- Wstrząsarka mikropłytkowa
- Woda dejonizowana lub destylowana, 2 litry
- Płuczka mikropłytek (zalecana płuczka automatyczna)
- Czytnik mikropłytkowy wyposażony w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm

Przechowywanie i postępowanie

Probówki na pobraną krew

- Probówki na pobraną krew przechowywać w temperaturze od 4°C do 25°C.

Odczynniki zestawu

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

Rekonstruowane i nieużywane odczynniki

Instrukcje na temat rekonstruowania odczynników — patrz sekcja 6 (strona 14)

- Rekonstruowany zestaw standardowy można przechowywać przez okres maksymalnie 3 miesięcy w przypadku przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C.
Należy zapisać datę rekonstruowania zestawu standardowego.
- Po rekonstruowaniu nieużywany koncentrat koniugatu 100X należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Musi on zostać wykorzystany w ciągu 3 miesięcy.
Należy zapisać datę rekonstruowania koniugatu.
- Koniugat w stężeniu roboczym należy wykorzystać w ciągu 6 godzin od jego przygotowania.
- Bufor do płukania w stężeniu roboczym można przechowywać w temperaturze pokojowej przez okres wynoszący do 2 tygodni.

4. Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do celów diagnostyki in vitro

Ostrzeżenia

- Negatywny wynik testu nie wyklucza możliwości zakażenia *M. tuberculosis* ani choroby gruźliczej: fałszywe wyniki negatywne mogą wystąpić ze względu na stadium zakażenia (np. próbka została pobrana przed rozwinięciem się odpowiedzi immunologicznej na poziomie komórkowym), współwystępowaniem chorób wpływających na funkcje immunologiczne, nieprawidłowym postępowaniem z próbkami na pobraną krew po nakłuciu żyły, nieprawidłowym wykonaniu próby lub innymi zmiennymi immunologicznymi.
- Pozytywny wynik testu QFT nie powinien stanowić jedynej lub rozstrzygającej podstawy orzeczenia zakażenia *M. tuberculosis*. Nieprawidłowe wykonanie próby może powodować fałszywe wyniki pozytywne.
- Pozytywny wynik testu QFT powinien pociągnąć za sobą dalsze badania medyczne i diagnostyczne pod kątem aktywnej postaci gruźlicy (np. rozmaz i posiew w kierunku prątków kwasoodpornych (AFB), badanie RTG klatki piersiowej).
- Chociaż białka ESAT-6, CFP-10, i TB7.7(p4) są nieobecne w przypadku wszystkich szczepów bakteryjnych BCG i większości znanych prątków niegruźliczych, pozytywny wynik testu QFT może być wynikiem zakażenia *M. kansasii*, *M. szulgai* lub *M. marinum*. W przypadku podejrzenia takiej infekcji należy przeprowadzić testy alternatywne.

Środki ostrożności

Wyłącznie do celów diagnostyki in vitro.

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.



OSTRZEŻENIE: Należy ostrożnie obchodzić się z ludzką krwią i traktować ją jako potencjalne źródło zakażenia.
Należy przestrzegać odpowiednich wytycznych w zakresie postępowania z krwią.

W odniesieniu do składników zestawu QuantiFERON-TB Gold ELISA mają zastosowanie następujące zwroty ryzyka i bezpieczeństwa.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (roztwór powstrzymujący działanie enzymu QuantiFERON)



Xi

Zawiera kwas siarkowy: Środek drażniący. Zwroty ryzyka i bezpieczeństwa:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zielony rozcieńczalnik** zawiera prawidłową surowicę myszy i kazeinę, które mogą wywołać reakcje alergiczne. Unikać zanieczyszczenia skóry.

W przypadku zagrożenia chemicznego,

rozlania się substancji, wycieku, narażenia na działanie lub wypadku

natychmiast skontaktować się z centrum CHEMTREC.

W Stanach Zjednoczonych i Kanadzie: 1-800-424-9300

Poza Stanami Zjednoczonymi i Kanadą: +1-703-527-3887 (dopuszczalne połączenie na koszt odbiorcy)

Dodatkowe informacje

Karty charakterystyki: www.qiagen.com/safety

- Odstępstwa od procedur opisanych w *ulotce informacyjnej QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* mogą prowadzić do błędnych wyników. Przed rozpoczęciem należy dokładnie przeczytać instrukcje.
- Nie korzystać z zestawu, jeśli przed użyciem dowolna butelka z odczynnikami nosi ślady uszkodzeń lub przecieka.
- Nie wolno mieszać pasków mikro płytkowych, standardowego IFN- γ człowieka, zielonego rozcieńczalnika lub koncentratu koniugatu 100X z różnych partii zestawów QFT. Inne odczynniki (koncentrat buforu do płukania 20x, roztwór substratu enzymu i roztwór powstrzymujący działanie enzymu można wymieniać między zestawami pod warunkiem, że nie upłynęła data ważności odczynników i zarejestrowane są szczegóły partii. Utylizować nieużywane odczynniki i próbki biologiczne zgodnie z przepisami lokalnymi i krajowymi.

* R36/38: Działa drażniąco na oczy i skórę. S26: Zanieczyszczone oczy przemyć natychmiast dużą ilością wody i zasięgnąć porady lekarza. S36/37/39: Nosić odpowiednią odzież ochronną i okulary lub ochronę twarzy.

- Nie korzystać z próbek na pobraną krew ani zestawów ELISA po upływie ich daty ważności.
- Upewnić się, że wyposażenie laboratoryjne, takie jak płuczki do płytek i czytniki, zostało skalibrowane/zatwierdzone do użycia.

5. Pobranie i postępowanie z próbkami

W teście QFT wykorzystywane są następujące próbówki na pobraną krew:

1. próbówki QuantiFERON z próbką zerową (szara zatyczka z białym pierścieniem, do stosowania na wysokościach między poziomem morza a 810 m)
2. próbówki z antygenami gruźliczymi (czerwona zatyczka z białym pierścieniem, do stosowania na wysokościach między poziomem morza a 810 m)
3. próbówki QuantiFERON z mitogenem (fioletowa zatyczka z białym pierścieniem, do stosowania na wysokościach między poziomem morza a 810 m)

Próbówki do stosowania na dużych wysokościach (HA):

4. próbówki QuantiFERON HA z próbką zerową (szara zatyczka z żółtym pierścieniem, do stosowania na wysokościach od 1020 m do 1875 m)
5. próbówki QuantiFERON HA z antygenami gruźliczymi (czerwona zatyczka z żółtym pierścieniem, do stosowania na wysokościach od 1020 m do 1875 m)
6. próbówki QuantiFERON HA z mitogenem (fioletowa zatyczka z żółtym pierścieniem, do stosowania na wysokościach od 1020 m do 1875 m)

Antygeny zostały poddane liofilizacji na wewnętrznej stronie próbek na pobraną krew, w związku z czym należy pamiętać o dokładnym wymieszaniu zawartości próbek z krwią. Probówki powinny jak najszybciej zostać poddane inkubacji w temperaturze 37°C, maksymalnie w ciągu 16 godzin od pobrania próbek.

W celu zapewnienia optymalnych wyników należy przestrzegać następującej procedury:

1. **Od każdego pacjenta należy pobrać 1 ml krwi, nakłuwając żyłę i pobierając krew bezpośrednio do poszczególnych próbek na pobraną krew QFT. Tę procedurę powinna wykonywać osoba przeszkolona w zakresie pobierania krwi z żył.**
 - Standardowe próbówki na pobraną krew QFT należy stosować na wysokościach do 810 metrów. Probówek na pobraną krew QFT do stosowania na dużych wysokościach (HA) należy używać na wysokościach od 1020 do 1875 metrów.
 - W przypadku stosowania próbek na pobraną krew QFT poza tymi zakresami wysokości lub w razie pobrania zbyt małej objętości krwi, można ją pobrać strzykawką i natychmiast przenieść ilości po 1 ml do wszystkich trzech próbek. Z przyczyn bezpieczeństwa tę czynność najlepiej jest przeprowadzić w następujący sposób: zdjąć igłę strzykawki i, zachowując odpowiednie procedury bezpieczeństwa, zdjąć zatyczki z trzech próbek QFT, a następnie przelać 1 ml krwi do każdej próbki (do poziomego czarnego znacznika po bocznej stronie etykiety). Zatkać starannie próbki za pomocą zatyczek i wymieszać zawartość w następujący sposób:
 - Ponieważ próbki o pojemności 1 ml stosunkowo wolno napęlniają się krwią, pozostawić próbkę na igle przez 2–3 sekundy po zakończeniu napęlniania próbki, aby upewnić się, że została pobrana odpowiednia ilość.

Znacznik koloru czarnego umieszczony na bokach próbek wskazuje objętość napęlnienia wynoszącą 1 ml. Walidacja próbek na pobraną krew QFT została przeprowadzona dla objętości wynoszących od 0,8 do 1,2 ml. Jeśli poziom krwi w dowolnej próbce jest poniżej poziomu linii wskazującej, zalecane jest pobranie kolejnej próbki krwi.
 - Jeśli do pobierania krwi jest stosowana igła motylkowa, należy zastosować próbkę wstępną, aby przed pobraniem krwi do próbek QFT upewnić się, że przewód jest wypełniony krwią.

- Alternatywnym sposobem postępowania jest pobranie krwi do jednej ogólnej probówki na pobraną krew zawierającej heparynę litową jako antykoagulant, a następnie przeniesienie jej do probówek QFT. Jako środka zapobiegającego koagulacji krwi **należy używać wyłącznie heparyny litowej**, ponieważ inne antykoagulanty zakłócają przebieg próby. Napełnić probówkę na pobraną krew (minimalna objętość 5 ml) i delikatnie wymieszać, obracając kilkakrotnie probówkę, aby rozpuścić heparynę. Krew należy przed przeniesieniem do probówek QFT w celu inkubacji utrzymywać w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Inkubację należy **koniecznie** rozpocząć w ciągu 16 godzin od pobrania krwi.
- 2. Natychmiast po napełnieniu probówek należy mocno nimi potrząsnąć dziesięć (10) razy, aby cała wewnętrzna powierzchnia była pokryta krwią. Ma to na celu rozpuszczenie antygenów na ściankach probówki.**
- W czasie napełniania krwią probówki powinny mieć temperaturę pomiędzy $17\text{--}25^{\circ}\text{C}$.
 - Zbyt intensywne potrząsanie może uszkodzić żel i doprowadzić do zafałszowania wyników.
 - Jeśli krew została pobrana do probówki z heparyną, próbki należy przed rozdzieleniem do probówek QFT równomiernie wymieszać. Sprawdzić, czy krew jest dokładnie wymieszana, delikatnie obracając probówkę **bezpośrednio przed rozdzieleniem**. Rozdzielić części próbki po 1,0 ml (jedna na probówkę QFT) do odpowiednich probówek z próbką zerową, z antygenami gruźliczymi i z mitogenem. Tę czynność najlepiej wykonać w sposób aseptyczny, **zapewniając stosowanie odpowiednich procedur bezpieczeństwa**, zdejmując zatyczki z trzech probówek QFT, a następnie przelewając 1 ml krwi do każdej probówki (do poziomego czarnego znacznika po bocznej stronie etykiety). Zatkać starannie probówki za pomocą zatyczek i wymieszać zawartość w opisany powyżej sposób.
- 3. Prawidłowo opisać probówki.**
- Sprawdzić, czy po zdjęciu zatyczki wszystkie probówki (z próbką zerową, z antygenami gruźliczymi i z mitogenem) można zidentyfikować na podstawie etykiety lub w inny sposób.
- 4. Po napełnieniu, wymieszaniu, wstrząśnięciu i oznaczeniu probówki powinny jak najszybciej zostać poddane inkubacji w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, maksymalnie w ciągu 16 godzin od ich pobrania. Przed inkubacją probówki należy utrzymywać w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Nie chłodzić i nie zamrażać próbek krwi.**

6. Wskazówki dotyczące stosowania

Etap 1 — inkubacja krwi i pobranie osocza

Dostarczone materiały

- Probówki na pobierają krew QFT (patrz sekcja 3).

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Patrz sekcja 3.

Procedura

1. **W przypadku braku inkubacji krwi natychmiast po jej pobraniu należy ponownie przeprowadzić mieszanie bezpośrednio przed inkubacją przez 10-krotne obrócenie probówek.**
2. **Przeprowadzić inkubację probówek przez okres od 16 do 24 godzin w pozycji PIONOWEJ w temperaturze 37°C ± 1°C. Inkubator nie wymaga CO₂ ani nawilżania.**
3. **Po zakończeniu inkubacji w temperaturze 37°C probówki na pobraną krew można przechowywać przed odwirowaniem przez maksymalnie 3 dni w temperaturze od 4°C do 27°C.**
4. **Po przeprowadzeniu inkubacji probówek w temperaturze 37°C pobieranie osocza ułatwia wirowanie probówek przez 15 minut przy względnej sile odśrodkowej (RCF) wynoszącej od 2000 do 3000 jednostek. Czop żelowy spowoduje oddzielenie komórek od osocza. Jeśli tak się nie stanie, należy ponownie przeprowadzić odwirowanie z większą prędkością obrotową.**
 - **Możliwe jest pobranie osocza bez przeprowadzenia odwirowania, jednak przy usuwaniu osocza należy przedsięwziąć szczególną ostrożność, aby nie naruszyć komórek.**
5. **Próbki osocza można pobierać jedynie za pomocą pipety.**
 - **Po odwirowaniu i przed pobraniem należy koniecznie unikać pipetowania i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać na materiał umieszczony na powierzchni żelu.**
 - **Próbki osocza można załadować bezpośrednio z probówek z odwirowaną krwią na płytkę QFT ELISA, także w przypadku wykorzystywania automatycznych stacji roboczych ELISA.**
 - **Próbki osocza można przechowywać przez maksymalnie 28 dni w temperaturze od 2°C do 8°C lub, w przypadku pobrania, w temperaturze –20°C przez dłuższy czas.**
 - **W celu zapewnienia odpowiedniej wielkości próbek testowych należy pobrać przynajmniej 150 µl osocza.**

Etap 2 — test ELISA ludzkiego IFN- γ

Dostarczone materiały

- Zestaw QFT ELISA (patrz sekcja 3).

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Patrz sekcja 3.

Procedura

1. **Wszystkie próbki osocza i odczynniki z wyjątkiem koncentratu koniugatu 100X muszą osiągnąć temperaturę pokojową ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) przed ich wykorzystaniem. Odczekać przynajmniej 60 minut w celu doprowadzenia próbek do temperatury pokojowej.**
2. **Usunąć z ramki niepotrzebne paski, zamknąć w torbie foliowej i włożyć do lodówki w celu przechowywania do momentu, gdy ponownie będą potrzebne.**

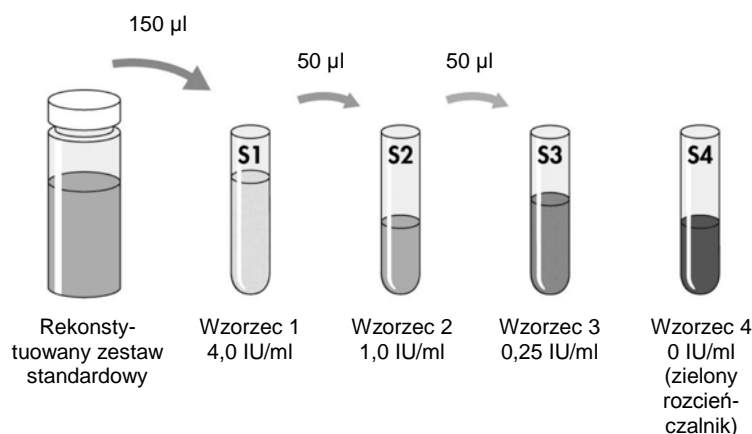
Pozostawić co najmniej jeden pasek na potrzeby wzorca QFT oraz odpowiednią liczbę pasków, w zależności od liczby pacjentów biorących udział w testach (patrz rysunki 2A i 2B dla metody 3-probówkowej i 2-probówkowej). Po użyciu należy pozostawić ramkę i pokrywę do wykorzystania z pozostałymi paskami.

3. **Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego zestawu standardowego z wykorzystaniem wody dejonizowanej lub destylowanej w ilości podanej na etykiecie fiolki wzorca. Delikatnie wymieszać zawartość, aby zminimalizować spienianie i zapewnić pełne przesycanie. Rekonstruowanie wzorca do określonej objętości spowoduje powstanie roztworu o stężeniu 8,0 IU/ml.**

Uwaga: Objętość rekonstrukcji zestawu standardowego będzie różna dla różnych partii.

Użyć zrekonstruowanego zestawu standardowego do utworzenia serii IFN- γ rozcieńczonych w stosunku 1 do 4 w zielonym rozcieńczalniku (GD) (patrz rysunek 1). S1 (wzorzec 1) zawiera 4 IU/ml, S2 (wzorzec 2) zawiera 1 IU/ml, S3 (wzorzec 3) zawiera 0,25 IU/ml i S4 (wzorzec 4) zawiera 0 IU/ml (sam GD). Wzorce należy wyznaczyć przynajmniej dwukrotnie.

Zalecana procedura dla wzorców wyznaczonych dwukrotnie	Zalecana procedura dla wzorców wyznaczonych trzykrotnie
a. Oznaczyć 4 próbki jako „S1”, „S2”, „S3” i „S4”.	a. Oznaczyć 4 próbki jako „S1”, „S2”, „S3” i „S4”.
b. Dodać 150 μl GD do próbek S1, S2, S3, S4.	b. Dodać 150 μl GD do próbki S1.
c. Dodać 150 μl zestawu standardowego do próbki S1 i dokładnie wymieszać.	c. Dodać 210 μl GD do próbek S2, S3, S4.
d. Przebrać 50 μl z próbki S1 do S2 i dokładnie wymieszać.	d. Dodać 150 μl zestawu standardowego do próbki S1 i dokładnie wymieszać.
e. Przebrać 50 μl z próbki S2 do S3 i dokładnie wymieszać.	e. Przebrać 70 μl z próbki S1 do S2 i dokładnie wymieszać.
f. Sam GD służy jako wzorzec zerowy (S4).	f. Przebrać 70 μl z próbki S2 do S3 i dokładnie wymieszać.
	g. Sam GD służy jako wzorzec zerowy (S4).



Rysunek 1. Przygotowanie krzywej wzorcowej. Przygotować nowe roztwory zestawu standardowego dla wszystkich sesji ELISA.

4. Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego koncentratu koniugatu 100X z użyciem 0,3 ml wody dejonizowanej lub destylowanej. Delikatnie wymieszać zawartość, aby zminimalizować spienianie i zapewnić pełne przesyłanie koniugatu.

Koniugat w stężeniu roboczym jest uzyskiwany poprzez rozcieńczenie wymaganej ilości rekonstruowanego koncentratu koniugatu 100X w zielonym rozcieńczalniku w sposób przedstawiony w Tabeli 1 — Przygotowanie koniugatu.

Tabela 1. Przygotowywanie koniugatu

Liczba pasków	Ilość koncentratu koniugatu 100X	Ilość zielonego rozcieńczalnika
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

- Wymieszać dokładnie, ale delikatnie w celu uniknięcia spieniania.
- Natychmiast po wykorzystaniu koncentratu koniugatu 100X schłodzić go do temperatury od 2°C do 8°C.
- Stosować wyłącznie zielony rozcieńczalnik.

5. W przypadku próbek osocza pobranych z probówek na pobraną krew i następnie zamrożonych lub przechowywanych przed przeprowadzeniem testu przez więcej niż 24 godziny należy je dokładnie wymieszać przed dodaniem do dołka ELISA.
- W przypadku dodawania próbek osocza bezpośrednio z odwirowanych probówek QFT należy unikać mieszania osocza.
6. Za pomocą pipety wielokanałowej dodać 50 µl świeżo przygotowanego koniugatu w stężeniu roboczym do odpowiednich dołków ELISA.
7. Za pomocą pipety wielokanałowej dodać 50 µl testowych próbek osocza do odpowiednich dołków (patrz zalecany układ płytki na stronie 16, rysunki 2A i 2B). Na końcu dodać 50 µl mieszanin od wzorców od 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

Rysunek 2A. Zalecany układ próbek dla probówek z próbką zerową, z antygenami gruźliczymi i z mitogenem (28 testów na płytkę).

- S1 (wzorzec 1), S2 (wzorzec 2), S3 (wzorzec 3), S4 (wzorzec 4)
- 1N (próbka 1. próbka zerowa osocza), 1A (próbka 1. osocze — antygeny gruźlicze), 1M (próbka 1. osocze — 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

Rysunek 2B. Zalecany układ próbek dla probówek z próbką zerową i antygenami gruźliczymi (44 testy na płytkę).

- S1 (wzorzec 1), S2 (wzorzec 2), S3 (wzorzec 3), S4 (wzorzec 4)
- 1N (próbka 1. próbka zerowa osocza), 1A (próbka 1. osocze — antygeny gruźlicze)

8. **Dokładnie wymieszać koniugat i próbki osocza/wzorce, korzystając z wstrząsarki mikroplytkowej przez minutę.**
9. **Przykryć wszystkie płytki wieczkiem i przeprowadzić inkubację w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) przez 120 ± 5 minut.**
 - Podczas inkubacji nie należy wystawiać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego.
10. **W czasie inkubacji rozcieńczyć jedną część koncentratu 20X buforu do płukania z 19 częściami wody dejonizowanej lub destylowanej i dokładnie wymieszać. Dostarczona ilość koncentratu 20X buforu do płukania jest wystarczająca do przygotowania 2 litrów buforu do płukania w stężeniu roboczym.**

Przemyć dołki za pomocą **400 μl** buforu do płukania w stężeniu roboczym co najmniej raz na 6 cykli. Zalecane jest stosowanie płuczki automatycznej.

 - Dokładne mycie jest bardzo ważnym czynnikiem działania testu. Podczas każdego cyklu przemywania wszystkie dołki powinny być **całkowicie wypełnione** buforem do płukania. Zalecany jest czas absorpcji wynoszący co najmniej 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami.
 - Do zbiornika na wodę zużytą do mycia należy dodać standardowy laboratoryjny środek dezynfekujący. Należy też przestrzegać obowiązujących procedur w zakresie odkażania potencjalnie zakaźnego materiału.
11. **Płytki ochronne powinny być skierowane w dół ku niepozostawiającemu włókien ręcznikowi absorpcyjnemu w celu usunięcia pozostałości buforu do płukania. Dodać 100 μl roztworu substratu enzymu do poszczególnych dołków i starannie wymieszać za pomocą wstrząsarki mikroplytkowej.**
12. **Przykryć wszystkie płytki za pomocą pokryw i przeprowadzić 30-minutową inkubację w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).**
 - Podczas inkubacji nie należy wystawiać płytek na bezpośrednie działanie światła słonecznego.
13. **Po zakończeniu 30-minutowej inkubacji dodać 50 μl roztworu powstrzymującego działanie enzymu do poszczególnych dołków i wymieszać.**
 - Roztwór powstrzymujący działanie enzymu należy dodawać do poszczególnych dołków zgodnie z kolejnością i szybkością zastosowaną w przypadku substratu w kroku 11.
14. **W ciągu 5 minut od zatrzymania reakcji przeprowadzić pomiar gęstości optycznej poszczególnych dołków za pomocą czytnika mikroplytkowego wyposażonego w filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620–650 nm. Wartości gęstości optycznej są używane do obliczenia wyników.**

7. Obliczenia i interpretacja testu

Oprogramowanie do analizy QFT jest używane w celu analizowania danych i obliczania wyników. Jest dostępne na stronie www.QuantiFERON.com. Należy upewnić się, że używana jest najnowsza wersja oprogramowania.

Oprogramowanie przeprowadza ocenę próby w zakresie kontroli jakości, tworzy krzywą wzorcową i zapewnia wyniki testów dla poszczególnych pacjentów w sposób opisany w sekcji Interpretacja wyników.

Oprócz zastosowania oprogramowania do analizy QFT wyniki można uzyskać z wykorzystaniem jednej z następujących metod.

Generowanie krzywej wzorcowej

(jeśli nie jest używane oprogramowanie do analizy QFT)

Określić średnie wartości gęstości optycznej zestawów standardowych zawartych na poszczególnych płytkach.

Wyznaczyć krzywą wzorcową $\log_{(e)} - \log_{(e)}$, sporządzając wykres funkcji $\log_{(e)}$ średniej gęstości optycznej (oś y) względem $\log_{(e)}$ stężenia wzorców IFN- γ wyrażonego w IU/ml (oś x), pomijając wzorec zerowy w obliczeniach. Obliczyć parametry prostej o najlepszym dopasowaniu do krzywej wzorcowej, stosując analizę metodą regresji.

Użyć krzywej wzorcowej do określenia stężenia IFN- γ (IU/ml) we wszystkich testowych próbkach osocza, wykorzystując wartości gęstości optycznej dla poszczególnych próbek.

Obliczenia można wykonać za pomocą pakietów oprogramowania dostępnych w czytnikach mikro-płytkowych oraz standardowych arkuszy kalkulacyjnych lub oprogramowania statystycznego (np. Microsoft® Excel®). Zaleca się korzystanie z tych pakietów do wyznaczenia parametrów regresji, współczynnika zmienności wzorców (CV, wyrażona w %) oraz współczynnika korelacji (r) krzywej wzorcowej.

Kontrola jakości testu

Dokładność wyników testu jest zależna od wygenerowania odpowiedniej krzywej wzorcowej. W związku z tym przed dokonaniem interpretacji wyników próbki testowej należy sprawdzić wyniki uzyskane na podstawie wzorców.

Poprawny test ELISA odznacza się następującymi cechami:

- średnia wartość gęstości optycznej wzorca 1 musi być większa lub równa 0,600;
- wyrażony procentowo współczynnik zmienności wzorca 1 i 2, odzwierciedlający wartości gęstości optycznej, musi być mniejszy lub równy 15%;
- wartości gęstości optycznej odzwierciedlone dla wzorca 3 i 4 nie mogą różnić się od ich średniej wartości o więcej niż 0,040 jednostki gęstości optycznej;
- współczynnik korelacji (r) obliczony na podstawie średnich wartości absorbancji wzorców musi być większy lub równy 0,98.

Oprogramowanie do analizy QFT oblicza i raportuje te parametry kontroli jakości.

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

Średnia wartość gęstości optycznej wzorca zerowego (zielony rozcieńczalnik) powinna być mniejsza lub równa 0,150. Jeśli średnia wartość gęstości optycznej jest większa od 0,150, należy sprawdzić procedurę mycia płytki.

Interpretacja wyników

Wyniki QFT są interpretowane z wykorzystaniem następujących kryteriów:

Uwaga: Diagnozowanie lub wykluczanie choroby gruźliczej oraz ocena prawdopodobieństwa wystąpienia LTBI wymaga przeanalizowania wyników badań epidemiologicznych, medycznych i diagnostycznych oraz wywiadu z pacjentem, które należy uwzględnić, interpretując wyniki testów QFT (tabele 2 i 3).

Tabela 2. Jeśli używane są próbki z próbką zerową, antygenami gruźliczymi i mitogenem.

Próbka zerowa (IU/ml)	Próbka z antygenami gruźliczymi minus próbka zerowa (IU/ml)	Próbka z mitogenem minus próbka zerowa (IU/ml)*	Wynik testu QFT	Raport/interpretacja
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negatywny	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> NIE jest prawdopodobne
	≥ 0,35 i < 25% wartości próbki zerowej	≥ 0,5	Negatywny	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> NIE jest prawdopodobne
	≥ 0,35 i ≥ 25% wartości próbki zerowej	Dowolne	Pozytywny [†]	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> jest prawdopodobne
	< 0,35	< 0,5	Wynik nieokreślony [‡]	Wyniki w zakresie reakcji na antygeny gruźlicze są nieokreślone
	≥ 0,35 i < 25% wartości próbki zerowej	< 0,5	Wynik nieokreślony [‡]	Wyniki w zakresie reakcji na antygeny gruźlicze są nieokreślone
> 8,0 [§]	Dowolne	Dowolne	Wynik nieokreślony [‡]	Wyniki w zakresie reakcji na antygeny gruźlicze są nieokreślone

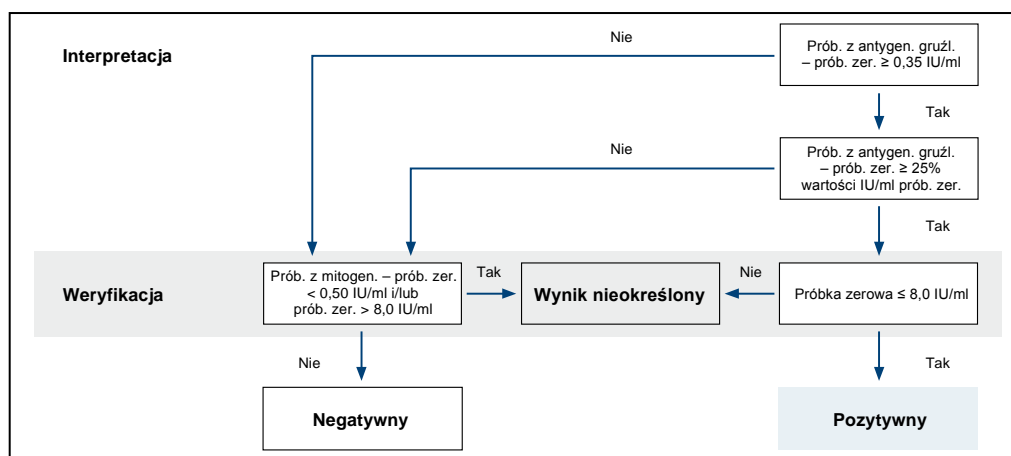
* Wyniki odpowiedzi na kontrolę pozytywną zawierającą mitogen (i czasem na próbkę z antygenami gruźliczymi) może wykraczać poza zakres odczytu czynnika mikroptytkowego. Nie ma to wpływu na wyniki testu.

[†] Gdy zakażenie *M. tuberculosis* nie jest podejrzewane, początkowe wyniki pozytywne można potwierdzić, ponownie poddając oryginalne próbki osocza dwukrotnym testom QFT ELISA. Jeśli wynik jednego lub obu powtórzonych testów jest pozytywny, wynik dla pacjenta należy uznawać za pozytywny.

[‡] Informacje na temat możliwych przyczyn zostały zamieszczone w sekcji Rozwiązywanie problemów.

[§] W badaniach klinicznych mniej niż 0,25% pacjentów ma poziomy IFN-γ większe niż 8,0 IU/ml dla wartości próbki zerowej.

Wielkości zmierzonego poziomu IFN-γ nie można skorelować z etapem (stadium) infekcji, poziomem reaktywności immunologicznej ani prawdopodobieństwem rozwoju aktywnej postaci choroby.



Rysunek 3. Schemat interpretacji, jeśli używane są próbki z próbką zerową, antygenami gruźliczymi i mitogenem.

Tabela 3. Jeśli używane są wyłącznie próbówki QuantiFERON z próbką zerową i z antygenami gruźliczymi

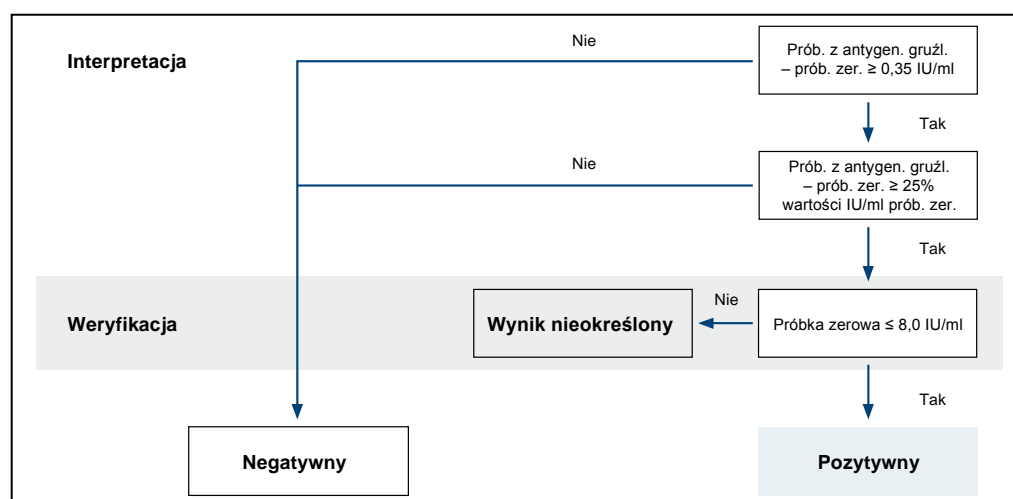
Próbka zerowa (IU/ml)	Próbka z antygenami gruźliczymi minus próbka zerowa (IU/ml)	Wynik testu QFT	Raport/interpretacja
≤ 8,0	< 0,35	Negatywny	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> NIE jest prawdopodobne
	≥ 0,35 i < 25% wartości próbki zerowej	Negatywny	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> NIE jest prawdopodobne
	≥ 0,35 i ≥ 25% wartości próbki zerowej	Pozytywny*	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> jest prawdopodobne
> 8,0 [†]	Dowolne	Wynik nieokreślony [‡]	Wyniki w zakresie reakcji na antygeny gruźlicze są nieokreślone

* Gdy zakażenie *M. tuberculosis* nie jest podejrzewane, początkowe wyniki pozytywne można potwierdzić, ponownie poddając oryginalne próbki osocza dwukrotnym testom QFT ELISA. Jeśli wynik jednego lub obu powtórzonych testów jest pozytywny, wynik dla pacjenta należy uznawać za pozytywny.

[†] W badaniach klinicznych mniej niż 0,25% pacjentów ma poziomy IFN- γ większe niż 8,0 IU/ml dla wartości próbki zerowej.

[‡] Informacje na temat możliwych przyczyn zostały zamieszczone w sekcji Rozwiązywanie problemów.

Wielkości zmierzonego poziomu IFN- γ nie można skorelować z etapem (stadium) infekcji, poziomem reaktywności immunologicznej ani prawdopodobieństwem rozwoju aktywnej postaci choroby.



Rysunek 4. Schemat interpretacji, jeśli używane są próbówki z próbką zerową i antygenami gruźliczymi.

8. Ograniczenia

Wyniki testów QFT należy wykorzystywać w kontekście historii epidemiologicznej poszczególnych osób, obecnego stanu medycznego i innych ocen diagnostycznych.

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

Niepewne lub nieokreślone wyniki mogą występować ze względu na:

- odstępstwa od procedury opisanej w ulotce informacyjnej *QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*
- zbyt wysokie poziomy krążącego we krwi IFN- γ lub obecność przeciwciał heterofilnych
- wynoszący więcej niż 16 godzin odstęp czasowy pomiędzy pobraniem próbki krwi a inkubacją w temperaturze 37°C.

9. Charakterystyka działania testu

Badania kliniczne

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

Swoistość

W prowadzonym w Stanach Zjednoczonych badaniu obejmującym 866 ochotników krew do testu QFT pobierano podczas wykonywania próby tuberkulinowej. Informacje demograficzne i czynniki ryzyka zakażenia gruźlicą określono przy użyciu standardowej ankiety przeprowadzanej podczas badania. Spośród 432 ochotników bez znanych czynników ryzyka zakażenia *M. tuberculosis* wyniki testów QFT i TST otrzymano dla 391. Żaden pacjent nie był zaszczepiony szczepionką BCG. Drugie badanie swoistości testu QFT wykonano w Japonii na pacjentach o niskim poziomie ryzyka, spośród których 90% było szczepionych szczepionką BCG. Wyniki 2 badań swoistości przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Swoistość testu QFT: Wyniki dla osób bez stwierdzonego ryzyka zakażenia *M. tuberculosis*

Badanie	% zaszczepionych szczepionką BCG	Łączna liczba badanych	Liczba wyników nieokreślonych testu QFT	Liczba wyników pozytywnych testu QFT/liczba prawidłowych testów	Swoistość QFT (95% przedział ufności)	Liczba wyników pozytywnych TST/liczba badanych	Swoistość TST* (95% przedział ufności)
Stany Zjednoczone (dane nieopublikowane)	0%	391	1	3/390	99,2% (98–100)	6/391	98,5% (97–99)
Japonia (15)	~90%	168	6	2/162	98,8% (95–100)	–	–
Łącznie	–	559	7/559 (1,3%)	5/552	99,1% (98–100)	–	–

* Biorąc za kryterium 10 mm średnicę odczynu dla TST u osób nieszczepionych szczepionką BCG. W przypadku średnicy odczynu 15 mm ocena swoistości TST wynosi 99,1%.

Czułość wykrywania aktywnej postaci gruźlicy

Pacjenci z podejrzeniem gruźlicy ze Stanów Zjednoczonych, Australii i Japonii, u których następnie przez posiew potwierdzono zakażenie *M. tuberculosis*, zostali przebadani w celu oceny czułości testu QFT. W związku z brakiem rozstrzygającego testu na utajone zakażenie prątkami gruźlicy (LTBI), odpowiednim narzędziem zastępczym jest posiew mikrobiologiczny *M. tuberculosis*, ponieważ pacjenci chorzy są z definicji zakażeni. Pacjenci przed pobraniem krwi do testów QFT zostali poddani leczeniu trwającemu krócej niż 8 dni.

W tabeli 5 podsumowano wnioski dotyczące 3 grup pacjentów o dodatnim posiewie *M. tuberculosis*. Całkowita czułość testu QFT w zakresie aktywnej postaci gruźlicy wyniosła 89% (157/177).

Tabela 5. QFT: Pacjenci z zakażeniem *M. tuberculosis* potwierdzonym przez posiew

Badanie	Liczba wyników pozytywnych testu QFT/liczba prawidłowych testów	Czułość testu QFT (95% przedział ufności)
Japońscy pacjenci z gruźlicą (15)	86/92	93% (86–97%)
Australijczycy	24/27	89% (70–97%)
Amerykanie	47/58	81% (68–90%)
Łącznie	157/177	89% (83–93%)

Diagnoza LTBI

Opublikowano wyniki wielu badań, wykazujących skuteczność testu QFT w różnych populacjach zagrożonych LTBI. Kluczowe wyniki wybranych badań przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Wybrane opublikowane badania dotyczące testów QFT w populacjach zagrożonych LTBI

Badanie	Łączna liczba badanych	Wyniki i wnioski
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Grupa o bardzo wysokich wskaźnikach zapadalności na gruźlicę. 40% pozytywnych wyników testu QFT i 41% pozytywnych wyników próby TST przy wielkości odczynu 10 mm. Wysoka zgodność z TST, brak wpływu szczepienia BCG na którąkolwiek z grup. W obu testach powiązано czynniki ryzyka, którymi są wiek i czas przepracowany w ochronie zdrowia.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Ogólne rozpowszechnienie LTBI według testu QFT u osób seropozytywnych wyniosło 4,6% (27/590). Wyniki pozytywne były powiązane z zagrożeniem gruźlicą. U dwu pacjentów z pozytywnym wynikiem testu QFT w ciągu 1 roku rozwinęła się aktywna postać gruźlicy. Wyniki nieokreślone (n = 20, 3,4%) były w istotny sposób skorelowane z liczebnością antygenów CD4 < 100/μl.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Dzieci z podejrzeniem gruźlicy lub historią kontaktów z gruźlicą poddano testom QFT i TST; pozytywne wyniki miało 10,5% testów QFT i 9,5% prób TST przy wielkości odczynu 10 mm. Zgodność między testami wyniosła 95,2% ogólnie i 100% u pacjentów nieszczepionych przeciwko BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Testowano osoby pozostające w bliskim kontakcie z 15 różnymi pacjentami: 51% było szczepionych szczepionką BCG, 27% urodziło się za granicą; u 70% pacjentów szczepionych szczepionką BCG i 18% nieszczepionych próba TST (5 mm) dała wynik pozytywny, podczas gdy test QFT dał wynik pozytywny u odpowiednio 9% i 11%. QFT był powiązany z zagrożeniem gruźlicą. TST był powiązany wyłącznie ze szczepieniem szczepionką BCG.

Znacznie więcej publikacji opisuje działanie mniej czulej wersji testu QuantiFERON-TB Gold, opartej na antygenie w postaci ciekłej (prekursor dla testu QFT), oraz samego testu QFT. Badania te obejmują zastosowanie testów u osób mających kontakt z osobami chorymi na gruźlicę (9, 11, 19, 25), dziećmi (6–10, 25, 28), pacjentami seropozytywnymi (2, 5, 20), pracownikami ochrony zdrowia (13, 26, 32), pacjentami z obniżoną odpornością (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), a także osobami z podejrzeniem gruźlicy (7, 8, 10, 18) oraz osobami o niskim poziomie ryzyka (15).

Powtarzalność i wpływ TST na późniejszy test QFT

W ramach prowadzonego w Stanach Zjednoczonych badania swoistości podgrupę ochotników poddano ponownemu testowi od 4 do 5 tygodni po terminie pierwszego testu QFT i próby TST. Wyniki testu QFT dla 260 osób zaangażowanych były dostępne w obu tych terminach, a poziom zgodności wynosił 99,6% (259/260). Poprzednia próba TST nie miała wpływu na pozytywne wyniki w teście QFT.

10. Informacje techniczne

Wyniki nieokreślone

Wyniki nieokreślone powinny stanowić rzadkość i mogą być związane z testowaniem statusu immunologicznego danej osoby, ale mogą być także spowodowane szeregiem czynników technicznych:

- wynoszący więcej niż 16 godzin odstęp czasowy pomiędzy pobraniem próbki krwi a inkubacją w temperaturze 37°C
- przechowywanie krwi w temperaturze wykraczającej poza zalecany zakres (od 17°C to 27°C)
- niewystarczające wymieszanie zawartości probówek z pobraną krwią
- niedokładne wymycie płytki ELISA

W przypadku podejrzenia problemów technicznych z pobraniem lub obsługą próbek należy powtórzyć cały test QFT z wykorzystaniem nowych próbek krwi. Powtórzenie testu ELISA osocza po stymulacji można wykonać w przypadku podejrzenia niedokładnego wymycia lub naruszenia procedur testu ELISA. Nieokreślone wyniki testów wynikające z niskiego poziomu mitogenu lub wysokich wartości próbki zerowej nie ulegną zmianie, chyba że popełniono błąd podczas testu ELISA. Wyniki nieokreślone należy raportować jako takie. Lekarz może zdecydować o ponownym pobraniu próbki lub wykonaniu w odpowiedni sposób innych procedur.

Próbki osocza z włóknikiem

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

Przewodnik rozwiązywania problemów

Przewodnik może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Więcej informacji zamieszczono w sekcji Informacje techniczne, dostępnej pod adresem: www.QuantiFERON.com. Informacje kontaktowe znajdują się na tylnej stronie okładki.

Rozwiązywanie problemów z testem ELISA

Nieswoiste wywoływanie kolorów

Możliwa przyczyna

a) Niedokładne wymycie płytki

Rozwiązanie

Wymyć płytkę co najmniej 6 razy z wykorzystaniem 400 µl buforu do płukania na jeden dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może zachodzić konieczność wykonania więcej niż 6 cykli mycia. Zalecany jest czas absorpcji wynoszący co najmniej 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami.

b) Krzyżowe zanieczyszczenie dołków ELISA

Aby zminimalizować ryzyko, należy uważać podczas pipetowania i mieszania próbek.

c) Przeterminowany zestaw/składniki

Sprawdzić, czy nie minęła data ważności zestawu. Sprawdzić, czy rekonstruowany wzorzec i koncentrat koniugatu 100X są wykorzystywane w ciągu trzech miesięcy od daty rekonstruowania.

d) Skażony roztwór substratu enzymu

W przypadku niebieskiego koloru substratu wyłączyć substrat. Sprawdzić, czy wykorzystywane zbiorniki z odczynnikami są czyste.

e) Mieszanie osocza w probówkach QFT przed pobraniem

Po odwirowaniu i przed pobraniem należy koniecznie unikać pipetowania i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać na materiał umieszczony na powierzchni żelu.

Niska gęstość optyczna odczytów wzorców

Możliwa przyczyna

a) Standardowy błąd rozcieńczania

Rozwiązanie

Sprawdzić, czy rozcieńczenia zestawu standardowego zostały przygotowane zgodnie z ulotką informacyjną QFT ELISA.

b) Błąd pipetowania

Pipety należy kalibrować i wykorzystywać zgodnie z zaleceniami producenta.

c) Zbyt niska temperatura inkubacji

Inkubacja ELISA powinna być przeprowadzana w temperaturze pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).

d) Zbyt krótki czas inkubacji

Inkubacja płytki z koniugatem, wzorcami i próbkami powinna trwać 120 ± 5 minut. Inkubacja roztworu substratu enzymu na płytce trwa 30 minut.

e) Zastosowano nieprawidłowy filtr płytki

Pomiar za pomocą płytki powinien być przeprowadzany przy filtrze 450 nm oraz filtrze referencyjnym 620–650 nm.

f) Zbyt niska temperatura odczynników

Przed wykonaniem testu wszystkie odczynniki, z wyjątkiem koncentratu koniugatu 100X, muszą osiągnąć temperaturę pokojową. Zajmuje to około godziny.

g) Przeterminowany zestaw/składniki

Sprawdzić, czy nie minęła data ważności zestawu. Sprawdzić, czy rekonstruowany wzorzec i koncentrat koniugatu 100X są wykorzystywane w ciągu 3 miesięcy od daty rekonstruowania.

Rozwiązywanie problemów z testem ELISA

Duży szum tła

Możliwa przyczyna

- a) Niedokładne wymycie płytki
- b) Zbyt wysoka temperatura inkubacji
- c) Przeterminowany zestaw/składniki
- d) Skażony roztwór substratu enzymu

Rozwiązanie

Wymyć płytkę co najmniej 6 razy z wykorzystaniem 400 µl buforu do płukania na jeden dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może zachodzić konieczność wykonania więcej niż 6 cykli mycia. Zalecany jest czas absorpcji wynoszący co najmniej 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami.

Inkubacja ELISA powinna być przeprowadzana w temperaturze pokojowej (22°C ± 5°C).

Sprawdzić, czy nie minęła data ważności zestawu. Sprawdzić, czy rekonstruowany wzorzec i koncentrat koniugatu 100X są wykorzystywane w ciągu 3 miesięcy od daty rekonstruowania.

W przypadku niebieskiego koloru substratu wylać substrat. Sprawdzić, czy wykorzystywane zbiorniki z odczynnikami są czyste.

Nieliniowa krzywa wzorcowa i zróżnicowanie wyników ponownych testów

Możliwa przyczyna

- a) Niedokładne wymycie płytki
- b) Standardowy błąd rozcieńczania
- c) Słabe wymieszanie
- d) Niespójna technika pipetowania lub przerwa podczas przeprowadzania testu

Rozwiązanie

Wymyć płytkę co najmniej 6 razy z wykorzystaniem 400 µl buforu do płukania na jeden dołek. W zależności od wykorzystywanej płuczki może zachodzić konieczność wykonania więcej niż 6 cykli mycia. Zalecany jest czas absorpcji wynoszący co najmniej 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami.

Sprawdzić, czy rozcieńczenia wzorca zostały przygotowane zgodnie z ulotką informacyjną QFT ELISA.

Zmieszać dokładnie odczynniki poprzez odwracanie lub łagodne wytrząsanie przed umieszczeniem na płytce.

Wprowadzanie próbki i wzorca powinno być wykonywane w sposób ciągły. Wszystkie odczynniki należy przygotować przed wykonaniem testu.

Nagranie wideo przedstawiające procedurę testową i rozwiązania najczęściej występujących problemów technicznych można znaleźć w serwisie Gnowee™, rejestrując się bezpośrednio na stronie www.gnowee.net, aby uzyskać dostęp online. Informacje na temat produktu i wytyczne techniczne można otrzymać bezpłatnie od firmy QIAGEN za pośrednictwem dystrybutora lub odwiedzając stronę www.QuantiFERON.com.

11. Bibliografia

Obszerna lista odnośników dotyczących testów QFT znajduje się w serwisie Gnowee — biblioteka odnośników QuantiFERON, dostępna na stronie 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. Serwis

W celu uzyskania pomocy technicznej należy skontaktować się z:

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. Skrócony opis procedury testowej

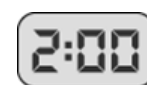
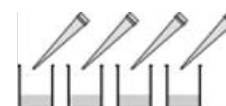
Etap 1 — inkubacja krwi

1. Pobrać krew pacjenta do probówek na pobraną krew i potrząsnąć nimi dziesięć (10) razy tak mocno, aby cała wewnętrzna powierzchnia była pokryta krwią, w celu rozpuszczenia antygenów na ściankach probówki.
2. Przeprowadzić inkubację probówek przez okres od 16 do 24 godzin w pozycji pionowej w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Po inkubacji wirować probówki przez 15 minut przy względnej sile odśrodkowej (RCF) wynoszącej od 2000 do 3000 jednostek w celu oddzielenia osocza od czerwonych krwinek.
4. Po odwirowaniu i przed pobraniem należy koniecznie unikać pipetowania i mieszania osocza. Przez cały czas należy uważać na materiał umieszczony na powierzchni żelu.

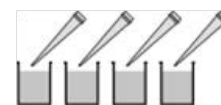
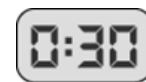
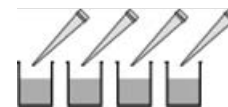


Etap 2 — test ELISA IFN- γ

1. Zrównoważyć składniki testu ELISA, z wyjątkiem koncentratu koniugatu 100X, przenosząc je do temperatury pokojowej ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) na co najmniej 60 minut.
2. Z wykorzystaniem wody destylowanej lub dejonizowanej przeprowadzić rekonstruowanie zestawu standardowego do stężenia 8,0 IU/ml. Przygotować cztery (4) wzorcowe rozcieńczenia.
3. Przeprowadzić rekonstruowanie liofilizowanego koncentratu koniugatu 100X z wykorzystaniem wody destylowanej lub dejonizowanej.
4. Przygotować koniugat w stężeniu roboczym przy zastosowaniu zielonego rozcieńczalnika i dolać 50 μl roztworu do każdego dołka.
5. Dolać 50 μl testowych próbek osocza i 50 μl wzorca do odpowiednich dołków. Wymieszać za pomocą wstrząsarki.
6. Przeprowadzić inkubację przez 120 ± 5 minut w temperaturze pokojowej.
7. Wymyć dołki co najmniej 6 razy z wykorzystaniem 400 μl buforu do płukania na jeden dołek.



8. Dolać 100 μ l roztworu substratu enzymu do dołków. Wymieszać za pomocą wstrząsarki.
9. Przeprowadzić 30-minutową inkubację w temperaturze pokojowej.
10. Dolać 50 μ l roztworu powstrzymującego działanie enzymu do dołków. Wymieszać za pomocą wstrząsarki.
11. Dokonać odczytu wyników przy filtrze 450 nm oraz filtrze referencyjnym 620–650 nm.
12. Przeprowadzić analizę wyników.



Znaczące zmiany

Znaczące zmiany wprowadzone w niniejszym wydaniu (1075115PL Wersja 01) ulotki informacyjnej QFT ELISA podsumowano w tabeli poniżej:

Sekcja	Strona	Zmiany
4. Ostrzeżenia i środki ostrożności	8–10	Zmiana dotyczące stosowania pewnych elementów ELISA między partiami zestawów.
12. Serwis	29	Nowe adresy e-mail serwisu.

Uwagi

Uwagi

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

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

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

1. Ten produkt może być stosowany wyłącznie zgodnie z wytycznymi dołączonymi do produktu oraz niniejszą ulotką informacyjną i wyłącznie z elementami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu z elementami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem elementów opisanych w wytycznych dołączonych do produktu oraz niniejszej ulotki informacyjnej.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. O ile firma QIAGEN nie podała inaczej, zestaw oraz jego elementy są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie są przeznaczone do ponownego użycia, regeneracji ani odsprzedaży.
4. Poza wyraźnie określonymi licencjami firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyraźnych ani dorozumianych.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań mogących doprowadzić do opisanych wyżej czynności zabronionych lub ich umożliwienia. Firma QIAGEN może wnosić roszczenia wynikające z niniejszej Umowy ograniczonej licencji do dowolnego sądu i będzie rościć prawa do zwrotu wszelkich kosztów postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub praw własności intelektualnej w zakresie zestawu i/lub jego elementów.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są w witrynie www.qiagen.com.

© 2013 Cellestis, QIAGEN Company. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

