

QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]) ELISA

uputstvo za upotrebu



2 x 96 (kataloški br. 0594-0201)



20 x 96 (kataloški br. 0594-0501)

IFN- γ test pune krvi koji meri odgovore na ESAT-6,

CFP-10 i TB7.7(p4) peptidne antigene



Za korišćenje u in vitro dijagnostici



0594-0201, 0594-0501



Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australija

Telefon: (Australija) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, NEMAČKA

1075115SR Rev. 01



www.QuantiFERON.com



Sadržaj

1. Predviđena upotreba	4
2. Rezime i objašnjenje testa	4
Principi testa	5
Vreme potrebno za obavljanje testa	5
3. Komponente i skladištenje	6
Potreban materijal koji se ne isporučuje	7
Skladištenje i rukovanje	7
4. Upozorenja i mere opreza	8
Za korišćenje u in vitro dijagnostici	8
Upozorenja	8
Mere opreza	9
5. Prikupljanje uzoraka i rukovanje njima	10
6. Uputstva za upotrebu	12
Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme	12
Faza 2 – humani IFN- γ ELISA	13
7. Izračunavanje i tumačenje rezultata	17
Generisanje krive standarda	17
Kontrola kvaliteta testa	17
8. Ograničenja	19
9. Karakteristike učinka	20
Kliničke studije	20
10. Tehničke informacije	22
Nejasni rezultati	22
Zgrušani uzorci plazme	22
Vodič za rešavanje problema	23
11. Bibliografija	25
12. Tehnički servis	27
13. Skraćena procedura testiranja	28
Faza 1 – inkubacija krvi	28
Faza 2 – IFN- γ ELISA	28
Važne promene	30

1. Predviđena upotreba

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) je in vitro dijagnostički test koji stimulira ćelije u hepariziranoj punoj krvi pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4). Otkrivanje proteina interferon- γ (IFN- γ) putem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testa služi za identifikaciju in vitro reakcija na ove peptidne antigene koji su povezani sa *Mycobacterium tuberculosis* infekcijom.

QFT je indirektan test za *M. tuberculosis* infekciju (uključujući oboljenje) i predviđen je za upotrebu u kombinaciji sa procenom rizika, radiografijom i drugim medicinskim i dijagnostičkim procenama.

2. Rezime i objašnjenje testa

Tuberkuloza je prenosiva bolest koju uzrokuje infekcija složenim *M. tuberculosis* organizmima (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) koja se najčešće prenosi na nove domaćine vazдушnim putem preko kapljičnih jezgara sa pacijenata obolelih od respiratorne tuberkuloze. Osoba koja je prvi put zaražena može da se razboli od tuberkuloze u roku od nekoliko nedelja ili par meseci, ali većina inficiranih osoba se ne razboli. Kod pojedinih osoba postoji latentna infekcija tuberkulozom (LTBI), asimptomatsko stanje koje se ne prenosi na druge, a te osobe mogu da se razbole od tuberkuloze mesecima ili godinama kasnije. Glavna svrha dijagnostifikovanja LTBI stanja je razmatranje lečenja kojim se sprečava oboljevanje od tuberkuloze. Do nedavno, tuberkulinski kožni test (TST) predstavljao je jedini dostupan način za dijagnostifikovanje LTBI stanja. Kožna osetljivost na tuberkulin razvija se od 2 do 10 nedelja nakon inficiranja. Međutim, pojedine inficirane osobe, uključujući osobe sa širokim opsegom oboljenja koja umanjuju imunološke funkcije, ali i osobe bez ovih oboljenja, ne reaguju na tuberkulin. Suprotno tome, pojedine osobe kod kojih postoji mala verovatnoća da su zaraženi *M. tuberculosis* infekcijom pokazuju osetljivost na tuberkulin i imaju pozitivne TST rezultate nakon vakcinacije bacilom Calmette-Guérin (BCG), infekciju mikobakterijom koja nije iz grupe *M. tuberculosis* ili druge neodređene faktore.

Mora se napraviti razlika između LTBI stanja i bolesti tuberkuloze, stanja koje se mora prijaviti i koje najčešće pogađa pluća i donje disajne puteve, iako sistemi drugih organa takođe mogu da budu zaraženi. Dijagnoza tuberkuloze se uspostavlja na osnovu istorijskih, fizičkih, radioloških, histoloških i mikrobioloških rezultata.

QFT je test za ćelijske imunske odgovore (CMI) na peptidne antigene koji simuliraju mikobakterijske proteine. Ovi proteini– ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4) ne nalaze se ni u jednoj BCG vrsti, niti u većini netuberkuloznih mikobakterija, sa izuzetkom sledećih: *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*.⁽¹⁾ Osobe inficirane složenim *M. tuberculosis* organizmima najčešće imaju limfocite u krvi koji prepoznaju ove i druge mikobakterijske antigene. Ovaj proces prepoznavanja uključuje generisanje i sekreciju citokina, IFN- γ . Otkrivanje i naknadna kvantifikacija IFN- γ proteina čine osnovu ovog testa.

Antigeni koji se koriste u QFT su peptidni kokteli koji stimuliraju proteine ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4). Veliki broj studija pokazao je da ovi peptidni antigeni stimuliraju IFN- γ odgovore u T ćelijama kod osoba zaraženih bakterijom *M. tuberculosis*, ali generalno ne kod osoba koje nisu zaražene niti kod osoba koje su primile BCG vakcinu i koje nisu obolele ili kod kojih ne postoji rizik od LTBI infekcije.^(1–32) Međutim, medicinska lečenja ili stanja koja mogu da oslabe funkcije imunološkog sistema potencijalno mogu da smanje IFN- γ odgovore. Pacijenti sa određenim mikobakterijskim infekcijama takođe mogu da budu responsivni na ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4), jer se geni koji kodiraju ove proteine nalaze u *M. kansasii*, *M. szulgai*, i *M. marinum*.^(1, 23) QFT test je test za LTBI i korisno sredstvo za dijagnostifikovanje složene *M. tuberculosis* infekcije kod bolesnih pacijenata. Pozitivan rezultat podržava dijagnostifikovanje bolesti tuberkuloze, ali i infekcije koje izaziva druga mikobakterija (npr., *M. kansasii*) takođe mogu da dovedu do pozitivnih rezultata. Druge medicinske i dijagnostičke procene neophodne su da bi se potvrdila ili isključila tuberkuloza.

Principi testa

QFT sistem koristi specijalne epruvete za prikupljanje krvi koje se koriste za prikupljanje pune krvi. Inkubacija krvi se odvija u epruvetama tokom 16 do 24 sati, nakon čega se plazma prikuplja i testira na prisustvo IFN- γ proteina dobijenog kao odgovor na peptidne antigene.

QFT test se obavlja u dve faze. Prvo se prikuplja puna krv u svaku od QFT epruveta za prikupljanje krvi, a to su: nulta epruveta, epruveta sa TB antigenom i epruveta sa mitogenom.

Epruveta sa mitogenom se koristi u QFT testu kao pozitivna kontrola. Ovo može da bude dodatna garancija u slučajevima u kojima status imuniteta osobe nije jasno potvrđen. Epruveta sa mitogenom takođe može da se koristi kao kontrola za pravilno rukovanje krvlju i za inkubaciju.

Epruvete moraju da se inkubiraju na temperaturi od 37°C u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 16 sati nakon prikupljanja. Nakon perioda inkubacije od 16 do 24 sati, epruvete se centrifugiraju, uklanja se plazma, a količina proteina IFN- γ (IU/ml) se meri ELISA testom.

Test se smatra pozitivnim na IFN- γ odgovor kada su vrednosti u epruveti sa TB antigenom znatno iznad vrednosti za IFN- γ IU/ml u nultoj epruveti. Ako se koristi, uzorak plazme iz epruvete sa mitogenom služi kao IFN- γ pozitivna kontrola za svaki testirani uzorak. Nizak odgovor na mitogen (<0,5 IU/ml) ukazuje na nejasan rezultat kada uzorak krvi ima i negativan odgovor na TB antigene. Ovaj šablon može da se pojavi u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita usled nepravilnog rukovanja uzorkom, usled nepravilnog punjenja ili mešanja epruvete sa mitogenom ili u slučaju nemogućnosti limfocita pacijenta da generišu IFN- γ . Nultim uzorkom se koriguju pozadina, heterofilna antitela ili nespecifični IFN- γ u uzorcima krvi. Nivo IFN- γ proteina u nultoj epruveti oduzima se od nivoa IFN- γ proteina za epruvetu sa TB antigenom i mitogenom (ako se koristi).

Vreme potrebno za obavljanje testa

Procene vremena potrebnog za obavljanje QFT testa date su u nastavku; navedeno je i vreme za istovremeno testiranje više uzoraka:

Inkubacija na 37 °C za epruvete sa uzorkom krvi: 16 do 24 sati

ELISA: Približno 3 sata za jednu ELISA ploču
(28 do 44 osoba)

<1 sati rada

Dodajte od 10 do 15 minuta za svaku narednu ploču

3. Komponente i skladištenje

Blood Collection Tubes (Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi)*	300 epruveta	200 epruveta	100 epruveta
Broj u katalogu	T0590-0301	0590-0201	T0593-0201
Broj priprema	100	100	100
QuantiFERON Nil Tube (nulta epruveta) (sivi poklopac, beli prsten)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON TB Antigen Tube (epruveta sa TB antigenom) (crveni poklopac, beli prsten)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON Mitogen Tube (epruveta sa mitogenom) (ljubičasti poklopac, beli prsten)	100 epruveta		100 epruveta
QFT epruvete za prikupljanje uzoraka krvi – uputstvo za upotrebu	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi na velikim visinama (HA)) (za upotrebu na visinama od 1020 do 1875 metara)*	300 epruveta	100 epruveta	100 epruveta
Broj u katalogu	T0590-0505	0590-0501	T0593-0501
QuantiFERON HA Nil Tube (nulta epruveta) (sivi poklopac, žuti prsten)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (epruveta sa TB antigenom) (crveni poklopac, žuti prsten)	100 epruveta	100 epruveta	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (epruveta sa mitogenom) (ljubičasti poklopac, žuti prsten)	100 epruveta		100 epruveta
QFT epruvete za prikupljanje uzoraka krvi – uputstvo za upotrebu	1	1	1

* Nisu sve konfiguracije proizvoda dostupne u svakoj zemlji. Posetite QIAGEN korisnički centar (više detalja na adresi www.qiagen.com) da biste pronašli informacije o tome koje konfiguracije su dostupne za poručivanje.

ELISA komponente	ELISA komplet sa 2 ploče	Referentno laboratorijsko pakovanje
Broj u katalogu	0594-0201	0594-0501
Trake za mikroploču (12 x 8 udubljenja) premazane slojem mišjeg anti-humanog IFN- γ monoklalnog antitela	2 kompleta traka za mikroploču sa udubljenjima 12 x 8	20 kompleta traka za mikroploču sa udubljenjima 12 x 8
Human IFN- γ Standard, lyophilized (humani IFN- γ standardizovani, liofilizovani) (sadrži rekombinantni humani IFN- γ , bovin kazein, 0,01% w/v timerosal)	1 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituiše)	10 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituiše)
Green Diluent (zeleni razblaživač) (sadrži bovin kazein, normalni mišji serum, 0,01% w/v timerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (koncentrovani konjugat, liofilizirani) (mišji anti-humanog IFN- γ HRP, sadrži 0,01% w/v timerosal)	1 x 0,3 ml (kada se rekonstituiše)	10 x 0,3 ml (kada se rekonstituiše)
Wash Buffer 20X Concentrate (koncentrovani bafer za ispiranje od 20X) (pH 7,2, sadrži 0,05% v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (rastvor enzimskog supstrata) (sadrži H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije) (sadrži 0,5M H ₂ SO ₄) [†]	1 x 15 ml	10 x 15 ml
QFT ELISA – uputstvo za upotrebu	1	1

[†] Sadrži sumpornu kiselinu. Pogledajte stranicu 9 da biste videli dodatne mere opreza.

Potreban materijal koji se ne isporučuje

- Inkubator od 37°C. Nije potreban CO₂
- Kalibrisane pipete sa promenljivom zapreminom koje mogu da doziraju od 10 μ l do 1000 μ l, sa vrhovima za jednokratnu upotrebu
- Kalibrisana pipeta sa više kanala koja može da dozira 50 μ l i 100 μ l, sa vrhovima za jednokratnu upotrebu
- Šejker za mikroploče
- Dejonizovana ili destilovana voda, 2 litra
- Perač mikroploče (preporučuje se automatski perač)
- Čitač mikroploče opremljen filterom od 450 nm i referentnim filterom od 620 nm do 650 nm

Skladištenje i rukovanje

Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi

- Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi čuvajte na temperaturi od 4 °C do 25 °C.

Komplet reagenasa

- Komplet reagenasa čuvajte na temperaturi od 2°C do 8°C.
- Rastvor enzimskog supstrata uvek štitite od direktne sunčeve svetlosti.

Rekonstituisani i neupotrebljeni reagensi

Uputstva o tome kako da rekonstituišete reagense potražite u odeljku 6 (stranica 13)

- Rekonstituisani standard iz kompleta može da se čuva najviše 3 meseca ako se skladišti na temperaturi od 2°C do 8°C.
Zabeležite datum kada je standard iz kompleta rekonstituisan.
- Kada se rekonstituiše, neiskorišćeni 100X koncentrovani konjugat mora da se vrati u skladište na temperaturu od 2°C do 8°C i mora da se iskoristi u roku od 3 meseca.
Zabeležite datum kada je konjugat rekonstituisan.
- Konjugat spreman za upotrebu mora da se upotrebi u roku od 6 sati od pripreme.
- Pufer za ispiranje spreman za upotrebu može da se čuva na sobnoj temperaturi najviše 2 nedelje.

4. Upozorenja i mere opreza

Za korišćenje u in vitro dijagnostici

Upozorenja

- Negativni QFT rezultat ne eliminiše mogućnost infekcije bakterijom *M. tuberculosis* ili bolest tuberkuloze: do lažno negativnih rezultata može da dođe zbog stadijuma infekcije (npr. uzorak dobijen pre razvoja ćelijskog imunološkog odgovora), komorbidnosti koja može da utiče na funkcije imuniteta, nepravilnog rukovanja epruvetama za prikupljanje uzorka krvi nakon venske punkture, nepravilne performanse testiranja ili drugih imunologičkih promenljivih.
- Pozitivan QFT rezultat ne bi trebalo da bude jedina ili definitivna osnova za utvrđivanje infekcije bakterijom *M. tuberculosis*. Netačne performanse testa mogu da dovedu do lažno pozitivnih odgovora.
- Nakon pozitivnog QFT rezultata, trebalo bi nastaviti sa daljom medicinskom procenom i dijagnostikom za aktivnu tuberkulozu (npr. AFB razmaz i kultura, rendgenski snimak grudi).
- Iako se ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4) ne nalaze u BCG vrstama niti u najpoznatijim mikobakterijama koje ne izazivaju tuberkulozu, pozitivan QFT rezultat može da se pojavi usled infekcije bakterijom *M. kansasii*, *M. szulgai* ili *M. marinum*. Ako se sumnja na takve infekcije, trebalo bi obaviti i druge testove.

Mere opreza

Samo za korišćenje u in vitro dijagnostici.

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate SDS-ove za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.



OPREZ: Rukujte humanom krvlju kao da je potencijalno zarazna.
Sledite relevantne smernice za rukovanje krvlju.

Sledeće izjave o rizicima i bezbednosti važe za komponente QuantiFERON-TB Gold ELISA testa.

QuantiFERON enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije



Xi

Sadrži sumpornu kiselinu: Može da iritira. Izjave o rizicima i bezbednosti:* R36/38, S26-36/37/39

- **Zeleni razblaživač** sadrži normalni mišji serum i kazein, koji mogu da podstaknu alergijske reakcije; izbegavajte kontakt sa kožom.

U slučaju hemijske nezgode

Prosipanje, curenje, izloženost ili nezgoda

Pozovite kompaniju CHEMTREC u bilo koje doba dana ili noći

U SAD i Kanadi: 1-800-424-9300

Izvan SAD i Kanade: +1-703-527-3887 (prihvataju se i pozivi na naš račun)

Dodatne informacije

List sa bezbednosnim podacima: www.qiagen.com/safety

- Odstupanja od *QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA uputstva za upotrebu* mogu da dovedu do pogrešnih rezultata. Pažljivo pročitajte uputstva pre upotrebe.
- Nemojte da koristite komplet ako neka od bočica sa reagensima pokazuje znake oštećenja ili curenja pre upotrebe.
- Nemojte da mešate ili da koristite trake za mikroploču, humani IFN- γ standardizovani, zeleni razblaživač ili 100X koncentrovani konjugat iz različitih QFT serija kompleta. Drugi reagensi (koncentrovani bafer za ispiranje od 20X, rastvor enzimskog supstrata i enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije) mogu da se razmenjuju između kompleta, pod uslovom da su reagensi u okviru svog roka upotrebe i da su zabeleženi detalji o seriji. Neupotrebljene reagense i biološke uzorke odložite na otpad u skladu sa lokalnim, državnim i federalnim zakonskim regulativama.
- Nemojte da koristite epruvete za prikupljanje uzoraka krvi ili ELISA komplete nakon isteka roka upotrebe.
- Uverite se da je laboratorijska oprema, kao što su uređaji za pranje ploče i čitači, kalibrirana/validirana za korišćenje.

* R36/38: Iritira oči i kožu; S26: U slučaju kontakta sa očima, odmah isperite sa mnogo vode i potražite medicinsku pomoć; S36/37/39: Nosite odgovarajuću zaštitnu odeću, rukavice i zaštitu za oči/lice.

5. Prikupljanje uzoraka i rukovanje njima

QFT koristi sledeće epruvete za prikupljanje uzoraka krvi:

1. QuantiFERON Nil tubes (nulte epruvete) (sivi poklopac sa belim prstenom; koriste se na visinama između nivoa mora i 810 m)
2. TB Antigen tubes (epruvete sa antigenom) (crveni poklopac sa belim prstenom; koriste se na visinama između nivoa mora i 810 m)
3. QuantiFERON Mitogen tubes (epruvete sa mitogenom) (ljubičasti poklopac sa belim prstenom; koriste se na visinama između nivoa mora i 810 m)

Epruvete za korišćenje na visokim nadmorskim visinama (HA):

4. QuantiFERON HA Nil tubes (nulte epruvete) (sivi poklopac sa žutim prstenom; koriste se na visinama između 1020 m i 1875 m)
5. HA TB Antigen tubes (epruvete sa antigenom) (crveni poklopac sa žutim prstenom; koriste se na visinama između 1020 m i 1875 m)
6. QuantiFERON HA Mitogen tubes (epruvete sa mitogenom) (ljubičasti poklopac sa žutim prstenom; koriste se na visinama između 1020 m i 1875 m)

Antigeni su nataloženi u suvom obliku na unutrašnji zid epruveta za prikupljanje uzoraka krvi, pa je izuzetno bitno da se sadržaj epruvete dobro promeša sa krvlju. Epruvete moraju da se prenesu u inkubator sa temperaturom od 37°C u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 16 sati nakon prikupljanja uzorka

Poštujte sledeće procedure da biste dobili optimalne rezultate:

1. **Za svakog pacijenta prikupite 1 ml venske krvi direktno u svaku QFT epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi. Ovaj postupak bi trebalo da obavlja obučeni tehničar.**
 - Standardne QFT epruvete za prikupljanje uzoraka krvi trebalo bi da se koriste do visine od 810 metara. Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi na velikim visinama (HA) trebalo bi da se koriste na visinama od 1020 do 1875 metara.
 - Ako koristite QFT epruvete za prikupljanje uzoraka krvi izvan navedenog opsega visina ili ako ne možete da prikupite dovoljnu količinu krvi, onda krv možete da prikupite pomoću šprica i da po 1 ml odmah prenesete u svaku od ove tri epruvete. Iz bezbednosnih razloga, najbolji način za to je da se skinu igla šprica uz praćenje odgovarajućih bezbednosnih procedura, da se skinu poklopci sa 3 QFT epruvete i da se doda po 1 ml krvi u svaku od njih (do crne oznake na bočnoj strani nalepnice na epruveti). Vratite poklopce epruveta i čvrsto ih zatvorite, a zatim promešajte kao što je opisano u nastavku.
 - Pošto epruvete od 1 ml relativno sporo izvlače krv, zadržite epruvetu na igli u trajanju od 2–3 sekunde nakon što se punjenje naizgled završi da biste bili sigurni da je uzeta dovoljna količina.

Crna oznaka sa strane epruveta ukazuje na zapreminu punjenja od 1 ml. QFT epruvete za prikupljanje uzoraka krvi su proverene za zapremine od 0,8 do 1,2 ml. Ako nivo krvi u nekoj od epruveta nije blizu linije indikatora, preporučuje se uzmete drugi uzorak.
 - Ako se krv prikuplja pomoću leptir igle, morate da koristite epruvetu za „pročišćavanje“ kako biste se uverili da je cev puna krvi pre upotrebe QFT epruveta za prikupljanje krvi.

- Druga mogućnost je da krv prikupite u jednu generičku epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi koja sadrži litijum heparin kao antikoagulant, a zatim da je prebacite u QFT epruvete. **Koristite samo litijum heparin** kao antikoagulant za krv jer drugi antikoagulanti ometaju analizu. Napunite epruvetu za prikupljanje uzoraka krvi (minimalna zapremina 5 ml) i lagano promešajte tako što ćete okrenuti epruvetu nekoliko puta da bi se rastvorio heparin. Krv bi trebalo da se čuva na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) pre prebacivanja u QFT epruvete za inkubaciju, a samo prebacivanje se **mora** započeti u roku od 16 sati od uzimanja uzorka.
- 2. Odmah nakon punjenja epruveta, protresite ih deset (10) puta dovoljno jako da biste se postarali da cela unutrašnja površina epruvete bude prekrivena krvlju kako bi se agensi na zidovima epruvete rastvorili.**
 - U trenutku punjenja temperatura epruveta bi trebalo da bude od 17°C do 25°C .
 - Prejako protresanje može da ošteti sloj gela i dovede do pogrešnih rezultata.
 - Ako je krv prikupljena u epruvetu sa heparinom, uzorci moraju da se ravnomerno promešaju pre raspoređivanja u QFT epruvete. Uverite se da je krv dobro promešana laganim okretanjem **neposredno pre raspoređivanja**. Rasporedite 1,0 ml (po jedan u svaku QFT epruvetu) u odgovarajuću nultu epruvetu, epruvetu sa TB antigenom i epruvetu sa mitogenom. Ovo se najbolje obavlja aseptično, prateći **odgovarajuće bezbednosne procedure**, skidanjem poklopca sa tri QFT epruvete i dodavanjem po 1 ml krvi u svaku (do crne oznake na bočnoj strani nalepnice na epruveti). Vratite poklopce epruveta i čvrsto ih zatvorite, a zatim promešajte kao što je opisano u nastavku.
 - 3. Označite epruvete na odgovarajući način.**
 - Uverite se da svaka epruveta (nulta, sa TB antigenom, sa mitogenom) posle skidanja poklopca može da se identifikuje na osnovu nalepnice ili na neki drugi način.
 - 4. Nakon punjenja, mešanja njihovog sadržaja i označavanja, epruvete moraju da se prenesu u inkubator sa temperaturom od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u najkraćem mogućem roku, a najkasnije 16 sati nakon prikupljanja uzorka. Pre inkubacije, držite epruvete na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Uzorke krvi nemojte da stavljate u frižider ili u zamrzivač.**

6. Uputstva za upotrebu

Faza 1 – Inkubacija krvi i prikupljanje plazme

Obezbeđeni materijal

- QFT epruvete za prikupljanje uzoraka krvi (pogledajte odeljak 3).

Potreban materijal (koji se ne isporučuje)

- Pogledajte odeljak 3.

Procedura

1. **Ako se krv ne inkubira odmah posle prikupljanja, neposredno pre inkubacije sadržaj epruveta se mora ponovo promešati okretanjem epruveta 10 puta.**
2. **Inkubirajte epruvete u USPRAVNOM položaju, na temperaturi od 37°C ± 1°C, u trajanju od 16 do 24 sata. Inkubator ne zahteva CO₂ ili vlaženje.**
3. **Nakon inkubacije na temperaturi od 37°C, epruvete za prikupljanje uzoraka krvi mogu da se čuvaju na temperaturi od 4°C do 27°C najviše 3 dana pre centrifugiranja.**
4. **Nakon inkubacije epruveta na temperaturi od 37°C, prikupljanje plazme se olakšava centrifugiranjem epruveta u trajanju od 15 minuta na 2000 do 3000 RCF (g). Sloj gela će odvojiti ćelije od plazme. Ukoliko ne dođe to toga, epruvete je potrebno ponovo centrifugirati na većoj brzini.**
 - Plazma može da se prikupi i bez centrifugiranja, ali je potreban dodatni oprez da bi se plazma uklonila bez remećenja ćelija.
5. **Uzorke plazme prikupljajte isključivo pomoću pipete.**
 - **Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.**
 - Uzorci plazme mogu da se ubace direktno iz centrifugiranih epruveta za prikupljanje uzoraka krvi u QFT ELISA ploču, čak i kada se koriste automatizovane ELISA radne stanice.
 - Uzorci plazme mogu da se čuvaju do 28 dana na temperaturi od 2°C do 8°C ili, ako su prikupljeni, ispod –20°C duži vremenski period.
 - Da biste dobili valjane uzorke za testiranje, prikupite najmanje 150 µl plazme.

Faza 2 – humani IFN- γ ELISA

Obezbeđeni materijal

- QFT ELISA komplet (pogledajte odeljak 3).

Potreban materijal koji se ne isporučuje

- Pogledajte odeljak 3.

Procedura

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100X koncentrovanog konjugata, moraju postići sobnu temperaturu ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) pre korišćenja. Planirajte najmanje 60 minuta za nivelisanje temperature.
2. Iz okvira uklonite suvišne trake, vratite ih u foliju, a ih zatim čuvajte u frižideru dok ne budu potrebne.

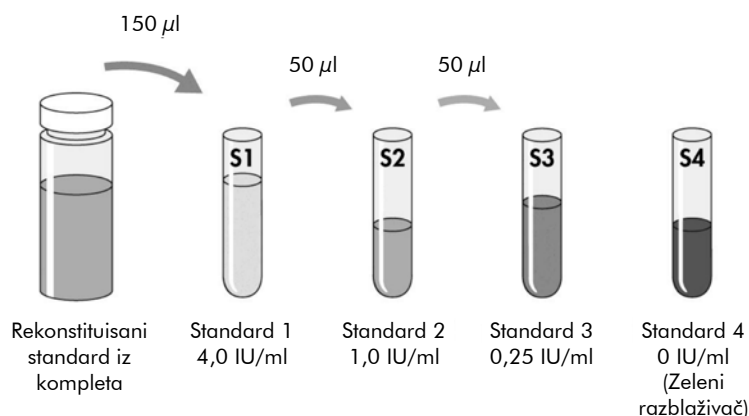
Obezbedite najmanje 1 traku za QFT standarde i dovoljno traka za broj testiranih pacijenata (pogledajte slike 2A i 2B za formate sa 3 epruvete i 2 epruvete, tim redosledom). Nakon korišćenja, sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.

3. Rekonstituišite suvo zamrznuti standard iz kompleta pomoću određene količine dejonizovane ili destilovane vode koja je naznačena na etiketi bočice standarda. Mešajte lagano da biste smanjili stvaranje pene i uverite se da je u potpunosti rastopljen. Rekonstitucija standarda na navedeni volumen proizvodi rastvor sa koncentracijom od 8,0 IU/ml.

Napomena: Rekonstitucija volumena standardnog kompleta razlikovaće se između verzija.

Koristite rekonstituisani standardni komplet da biste proizveli 1 u 4 serije razblaživača za IFN- γ u zelenom razblaživaču (GD) (pogledajte sliku 1). S1 (Standard 1) sadrži 4 IU/ml, S2 (Standard 2) sadrži 1 IU/ml, S3 (Standard 3) sadrži 0,25 IU/ml i S4 (Standard 4) sadrži 0 IU/ml (samo GD). Standardni bi trebalo da budu analizirani najmanje u dva primerka.

Preporučena procedura za standarde u dva primerka	Preporučena procedura za standarde u tri primerka
a. Označite 4 epruvete „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.	a. Označite 4 epruvete „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
b. Dodajte 150 μl zelenog razblaživača u S1, S2, S3, S4.	b. Dodajte 150 μl zelenog razblaživača u S1.
c. Dodajte 150 μl iz standardnog kompleta u S1 i dobro promešajte.	c. Dodajte 210 μl zelenog razblaživača u S2, S3, S4.
d. Prenesite 50 μl iz S1 u S2 i dobro promešajte.	d. Dodajte 150 μl iz standardnog kompleta u S1 i dobro promešajte.
e. Prenesite 50 μl iz S2 u S3 i dobro promešajte.	e. Prenesite 70 μl iz S1 u S2 i dobro promešajte.
f. Sam zeleni razblaživač služi kao nulti standard (S4).	f. Prenesite 70 μl iz S2 u S3 i dobro promešajte.
	g. Sam zeleni razblaživač služi kao nulti standard (S4).



Slika 1. Priprema krive standarda. Pripremite sveže rastvore standarda iz kompleta za svaku ELISA sesiju.

4. Rekonstituišite zamrznuti 100X koncentrovani konjugat pomoću 0,3 ml dejonizovane ili destilovane vode. Mešajte lagano da biste smanjili stvaranje pene i uverite se da je konjugat u potpunosti rastopljen.

Konjugat spreman za upotrebu priprema se razređivanjem potrebne količine rekonstituisanog 100X koncentrovanog konjugata u zelenom razblaživaču kao što je navedeno u tabeli 1 „Priprema konjugata“.

Tabela 1. Priprema konjugata

Broj traka	Zapremina 100X koncentrovanog konjugata	Zapremina zelenog razblaživača
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

- Promešajte dobro, ali pažljivo da biste izbegli stvaranje pene.
- Vratite sav neiskorišćen 100X koncentrovani konjugat na temperaturu od 2°C do 8°C odmah nakon upotrebe.
- Koristite samo zeleni razblaživač.

5. Uzorke plazme koji se prikupljaju iz epruveta za prikupljanje uzorka krvi i naknadno se zamrzavaju ili skladište duže od 24 časa pre analize, dobro promešajte pre dodavanja u ELISA udubljenje.

- Ako se uzorci plazme dodaju direktno iz centrifugiranih QFT epruveta, izbegavajte bilo kakvo mešanje plazme.

6. Dodajte 50 µl sveže pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuća ELISA udubljenja pomoću višekanalne pipete.

7. Dodajte 50 µl uzoraka plazme za testiranje u odgovarajuća udubljenja pomoću višekanalne pipete (pogledajte preporučeni izgled ploče na stranice 15, slikama 2A i 2B). Na kraju, dodajte po 50 µl standarda 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

Slika 2A. Preporučeni raspored uzoraka za nultu epruvetu, epruvetu sa TB antigenom i sa mitogenom (28 testova po ploči).

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (uzorak 1. nulta plazma), 1A (uzorak 1. TB antigen plazma), 1M (uzorak 1. Mitogen plazma)

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

Slika 2B. Preporučeni raspored uzoraka za nultu epruvetu i epruvetu sa TB antigenom (44 testova po ploči).

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (uzorak 1. nulta plazma), 1A (uzorak 1. TB antigen plazma)

8. **Dobro pomešajte rastvor i uzorke plazme/standarde koristeći šejker za mikroploče u trajanju od 1 minuta.**
9. **Stavite poklopac preko svake ploče i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 120 ± 5 minuta.**
 - Ploče ne smeju da se izlažu direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije.
10. **Tokom inkubacije, razblažite jedan deo 20X koncentrovanog pufera za ispiranje sa 19 delova dejonizovane ili destilovane vode i dobro pomešajte. Obezbeđeno je dovoljno 20X koncentrovanog pufera za ispiranje za pripremu 2 litra pufera za ispiranje spremnog za upotrebu.**

Ispirajte udubljenja sa **400 μl** pufera za ispiranje spremnog za upotrebu u najmanje 6 ciklusa. Preporučuje se upotreba automatskog uređaja za pranje ploče.

 - Detaljno pranje je veoma važno za učinak testa. Uverite se da je svako udubljenje **u potpunosti ispunjeno** puferom za ispiranje do vrha u svakom ciklusu pranja. Preporučuje se natapanje od najmanje 5 sekundi između ciklusa.
 - Potrebno je da se standardno laboratorijsko sredstvo za dezinfekciju doda u odvodni rezervoar i da se prate procedure za dekontaminaciju potencijalno zaraznog materijala.
11. **Ploče sa udubljenjima okrenite na upijajući ubrus koji ne ostavlja vlakna da biste uklonili ostatke pufera za ispiranje. Dodajte 100 μl rastvora enzimskog supstrata u svaku posudu i dobro pomešajte pomoću šejkera za mikroploče.**
12. **Stavite poklopac preko svake ploče i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 30 minuta.**
 - Ploče ne smeju da se izlažu direktnoj sunčevoj svetlosti tokom inkubacije.
13. **Nakon inkubacije od 30 minuta, dodajte 50 μl enzimskog rastvora za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje i pomešajte.**
 - Enzimski rastvor za zaustavljanje reakcije trebalo bi da se doda u udubljenja istim redosledom i istom brzinom kao i supstrat u koraku 11.
14. **Izmerite optičku gustinu (OD) svakog udubljenja u roku od 5 minuta od dodavanja rastvora za zaustavljanje reakcije pomoću čitača za mikroploče sa filterom od 450 nm i referentnim filterima od 620 nm do 650 nm. Vrednosti optičke gustine se koriste za izračunavanje rezultata.**

7. Izračunavanje i tumačenje rezultata

QFT softver za analizu se koristi za analizu neobrađenih podataka i izračunavanje rezultata. Dostupan je na adresi www.QuantiFERON.com. Uverite se da se koristi najnovija verzija softvera.

Ovaj softver obavlja procenu kontrole kvaliteta testa, generiše krivu standarda i obezbeđuje rezultate testiranja za svakog pacijenta, kao što je detaljno navedeno u odeljku „Tumačenje rezultata“.

Kao alternativno rešenje u odnosu na QFT softver za analizu, rezultati mogu da se utvrde i korišćenjem sledećeg metoda.

Generisanje krive standarda

(ako se ne koristi QFT softver za analizu)

Odredite srednju vrednost optičke gustine replikata standarda iz kompleta na svakoj ploči.

Konstruišite $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ krivu standarda tako što ćete grafički prikazati $\log_{(e)}$ srednje vrednosti optičke gustine (y-osa) u odnosu na $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IU/ml (x-osa), izuzimajući nulti standard iz ovog proračuna. Regresionom analizom izračunajte najbolju liniju krive standarda.

Pomoću krive standarda odredite IFN- γ koncentraciju (IU/ml) za svaki od uzoraka plazme za testiranje, koristeći vrednost optičke gustine svakog uzorka.

Ove proračune možete da obavite pomoću softverskih paketa koji su dostupni uz čitače za mikro-ploču i standardnih unakrsnih tabela ili programa za statistiku (kao što je Microsoft® Excel®). Preporučuje se da se ovi paketi koriste za izračunavanje regresione analize, koeficijenta varijacije (%CV) za standarde i koeficijenta korelacije (r) krive standarda.

Kontrola kvaliteta testa

Tačnost rezultata testa zavisi od pravilnog formiranja krive standarda. Zbog toga je neophodno da se ispituju rezultati dobijeni iz standarda da bi rezultati testiranja uzoraka mogli da se protumače.

ELISA test je važeći ako su ispunjeni sledeći uslovi:

- Srednja vrednost optičke gustine za standard 1 mora da bude $\geq 0,600$.
- %CV za ponovljene vrednosti optičke gustine za standard 1 i standard 2 mora da bude $\leq 15\%$.
- Ponovljene vrednosti optičke gustine za standarde 3 i 4 ne smeju da odstupaju za više od 0,040 jedinica optičke gustine od svoje srednje vrednosti.
- Koeficijent korelacije (r) izračunat iz srednjih vrednosti apsorpcije standarda mora da bude $\geq 0,98$.

QFT softver za analizu izračunava i prijavljuje ove parametre za kontrolu kvaliteta.

Ako gorenavedeni kriterijumi nisu ispunjeni, test nije važeći i mora da se ponovi.

Srednja vrednost optičke gustine nultog standarda (zeleni razblaživač) trebalo bi da bude $\leq 0,150$. Ako je srednja vrednost optičke gustine $> 0,150$, mora da se istraži procedura ispiranja ploče.

Tumačenje rezultata

QFT rezultati se tumače na osnovu sledećih kriterijuma:

Napomena: Dijagnostifikovanje ili isključivanje bolesti tuberkuloze, kao i procena mogućnosti LTBI stanja zahteva kombinaciju epidemioloških, istorijskih, medicinskih i dijagnostičkih rezultata koje bi trebalo uzeti u obzir kada se tumače QFT rezultati (tabele 2 i 3).

Tabela 2. Kada se koriste nulta epruveta, epruveta sa TB antigenom i epruveta sa mitogenom

Nulta (IU/ml)	TB antigen minus nulta (IU/ml)	Mitogen minus nulta (IU/ml)*	QFT rezultat	Izveštaj/tumačenje
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE verovatna
	≥ 0,35 i < 25% od nulte vrednosti	≥ 0,5	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE verovatna
	≥ 0,35 i ≥ 25% od nulte vrednosti	Bilo koja vrednost	Pozitivno [†]	<i>M. tuberculosis</i> infekcija jeste verovatna
	< 0,35	< 0,5	Nejasno [‡]	Rezultati su nejasni za postojanje odgovora na TB antigen
	≥ 0,35 i < 25% od nulte vrednosti	< 0,5	Nejasno [‡]	Rezultati su nejasni za postojanje odgovora na TB antigen
> 8,0 [§]	Bilo koja vrednost	Bilo koja vrednost	Nejasno [‡]	Rezultati su nejasni za postojanje odgovora na TB antigen

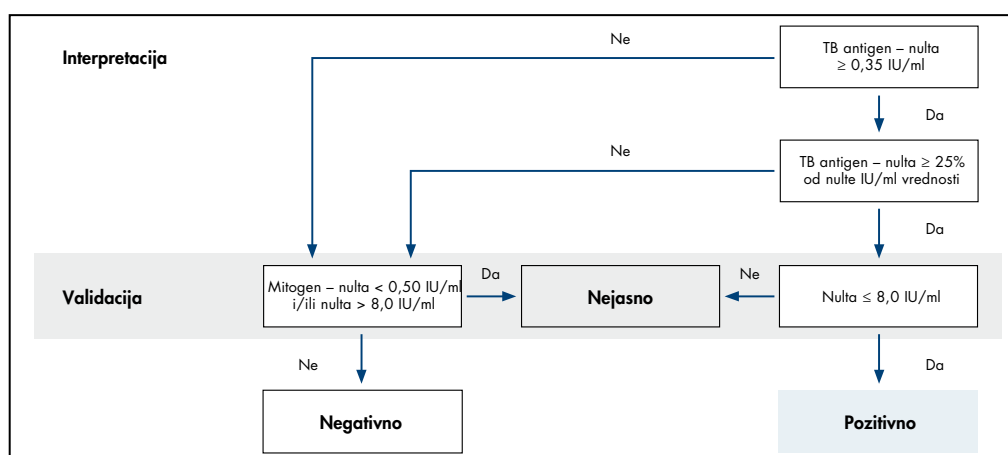
* Odgovori na Mitogen pozitivnu kontrolu (i povremeno TB antigen) često mogu da budu izvan opsega čitača mikroploče. Ovo nema uticaja na rezultate testa.

[†] U slučajevima u kojima ne postoji sumnja na infekciju bakterijom *M. tuberculosis*, prvobitno pozitivni rezultati mogu da se potvrde ako se ponovo testiraju originalni uzorci plazme u duplom QFT ELISA testu. Ako je ponovljeno testiranje jednog ili oba replikata pozitivno, smatra se da osoba ima pozitivan rezultat testa.

[‡] Pogledajte odeljak „Rešavanje problema“ da biste saznali moguće uzroke.

[§] U kliničkim studijama, manje od 0,25% pacijenata imalo je IFN- γ nivoe u vrednosti od > 8,0 IU/ml za nultu vrednost.

Magnituda izmerenog IFN- γ nivoa ne može da se poveže sa stadijumom ili stepenom infekcije, nivoom imunološkog odgovora ili mogućnosti napredovanja ka aktivnoj bolesti.



Slika 3. Grafikon sa tumačenjima gde se koriste nulta epruveta, epruveta sa TB antigenom i epruveta sa mitogenom.

Tabela 3. Kada se koriste samo QuantiFERON nulta epruveta i epruveta sa TB antigenom

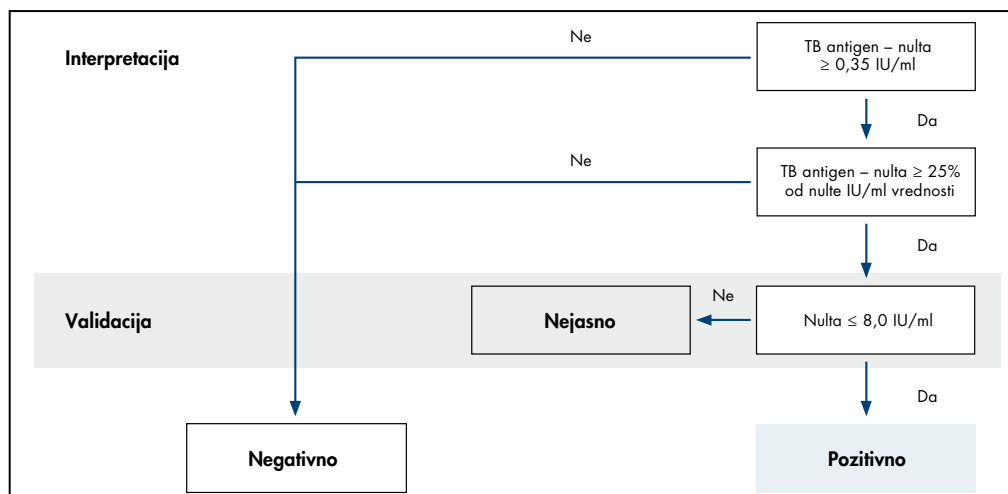
Nulta (IU/ml)	TB antigen minus nulta (IU/ml)	QFT rezultat	Izveštaj/tumačenje
≤ 8,0	< 0,35	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE verovatna
	≥ 0,35 i < 25% od nulte vrednosti	Negativno	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE verovatna
	≥ 0,35 i ≥ 25% od nulte vrednosti	Pozitivno*	<i>M. tuberculosis</i> infekcija jeste verovatna
> 8,0†	Bilo koja vrednost	Nejasno‡	Rezultati su nejasni za postojanje odgovora na TB antigen

* U slučajevima u kojima ne postoji sumnja na infekciju bakterijom *M. tuberculosis*, prvobitno pozitivni rezultati mogu da se potvrde ako se ponovo testiraju originalni uzorci plazme u duplom QFT ELISA testu. Ako je ponovljeno testiranje jednog ili oba replikata pozitivno, smatra se da osoba ima pozitivan rezultat testa.

† U kliničkim studijama, manje od 0,25% pacijenata imalo je IFN- γ nivoe u vrednosti od > 8,0 IU/ml za nultu vrednost.

‡ Pogledajte odeljak „Rešavanje problema“ da biste saznali moguće uzroke.

Magnituda izmerenog IFN- γ nivoa ne može da se poveže sa stadijumom ili stepenom infekcije, nivoom imunološkog odgovora ili mogućnosti napredovanja ka aktivnoj bolesti.



Slika 4. Grafikon tumačenja kada se koriste nulte epruvete i epruvete sa TB antigenima.

8. Ograničenja

Rezultati QFT testiranja moraju da se koriste u kombinaciji sa epidemiološkom istorijom svakog pojedinca, trenutnim medicinskim statusom i drugim dijagnostičkim procenama.

Osobe sa nultim vrednostima većim od 8 IU/ml se klasifikuju kao „nejasne“ zato što 25% veći odgovor na TB antigene može da bude izvan opsega merenja analize.

Nepouzdana ili nejasni rezultati mogu da se pojave u sledećim slučajevima:

- Odstupanja od procedura opisana su u *QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA uputstvu za upotrebu*
- Previsoki nivo cirkulacije IFN- γ proteina ili prisustvo heterofilnih antitela
- Od uzimanja uzoraka krvi do inkubacije na 37°C proteklo je više od 16 sati

9. Karakteristike učinka

Kliničke studije

Pošto ne postoje definitivni standardi za latentnu infekciju tuberkulozom (LTBI), procena osetljivosti i specifičnosti za QFT ne može praktično da se proceni. Specifičnost QFT-a je približno određena na osnovu procene stope lažno pozitivnih stopa kod osoba sa niskim rizikom (bez poznatih faktora rizika) od infekcije tuberkulozom. Osetljivost je približno određena procenom grupe pacijenata sa aktivnom TB zarazom kod kojih je potvrđena kultura.

Specifičnost

U studiji obavljenoj u SAD u kojoj je učestvovalo 866 volontera, uzimana je krv zar QFT kada je postavljen TST. Demografski podaci i faktori rizika za TB određeni su pomoću standardne ankete u vreme testiranja. Od 432 volontera bez poznatih faktora rizika za infekciju bakterijom *M. tuberculosis*, QFT i TST rezultati su bili dostupni za 391. Niko od njih nije primio BCG vakcinu. Druga specifična studija obavljena je sa QFT-om kod osoba sa niskim stepenom rizika u Japanu, od kojih je približno njih 90% primilo BCG vakcinu. Rezultati iz 2 specifične studije prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. QFT specifičnost: Rezultati za osobe bez prijavljenog rizika od infekcije bakterijom *M. tuberculosis*

Studija	BCG status (% vakcinisano)	Ukupno testirano	Br. QFT neodređenih	Br. QFT pozitivnih/br. ispravnih testova	QFT specifičnost (95% CI)	Br. TST pozitivnih/br. testiranih	TST* specifičnost (95% CI)
SAD (neobjavljeno)	0%	391	1	3/390	99,2% (98–100)	6/391	98,5% (97–99)
Japan (15)	~90%	168	6	2/162	98,8% (95–100)	–	–
Ukupno	–	559	7/559 (1,3%)	5/552	99,1% (98–100)	–	–

* Koristeći 10 mm TST graničnu vrednost kod osoba koje nisu vakcinisane BCG vakcinom. Procena TST specifičnosti je 99,1% ako se koristi granična vrednost od 15 mm.

Osetljivost za aktivni TB

Osobe za koje je postojala sumnja na TB, a koje su dolazile iz SAD, Australije i Japana i za koje je naknadno potvrđeno da su zaražene bakterijom *M. tuberculosis* na osnovu kulture, testirane su kako bi se procenila njihova osetljivost na QFT. Iako ne postoji određeni standardni test za latentnu TB infekciju (LTBI), odgovarajući surogat je mikrobilološka kultura bakterije *M. tuberculosis*, zato što su oboleli pacijenti prema definiciji već zaraženi. Pacijenti su lečeni manje od 8 dana pre prikupljanja krvi za testiranje na QFT.

Tabela 5 navodi rezime rezultata iz 3 grupe pacijenata pozitivnih na *M. tuberculosis* kulturu. Ukupna osetljivost na QFT za aktivnu TB zarazu iznosi 89% (157/177).

Tabela 5. QFT: Subjekti zaraženi bakterijom *M. tuberculosis* i sa potvrđenom kulturom

Studija	Br. QFT pozitivnih/ br. ispravnih testova	QFT osetljivost (95% CI)
TB pacijenti u Japanu (15)	86/92	93% (86–97%)
Australijski	24/27	89% (70–97%)
SAD	47/58	81% (68–90%)
Ukupno	157/177	89% (83–93%)

Dijagnostifikovanje LTBI-a

Objavljen je veliki broj studija u kojima su prikazane performanse QFT-a u različitim populacijama kod kojih postoji rizik od LTBI-a. Osnovni rezultati izabranih studija prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Izabrane objavljene studije u vezi sa QFT testom kod populacije koja ima rizik od LTBI-a

Studija	Ukupno testirano	Rezultati i otkrića
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Veoma visoki TB nalazi. 40% QFT pozitivno i 41% TST pozitivno na 10 mm. Visok stepen podudaranja sa TST-om, nema efekta BCG-a na bilo kojoj strani. Oba testa su povezana sa faktorima rizika koji se odnose na uzrast i godine rada u zdravstvu.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Ukupna prevalencija LTBI-a prema QFT-u bila je 4,6% (27/590) kod osoba sa HIV+. Pozitivni rezultati su povezani sa rizicima od nastanka TB-a. Dva QFT pozitivna pacijenta napredovala su ka aktivnom TB-u u roku od 1 godine. Neodređeni odgovori (n=20, 3,4%) u velikoj meri su bili povezivani sa CD4 vrednošću < 100/ μ l.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Deca kod kojih je postojala sumnja na TB ili kod kojih postoji istorija kontakata sa osobama sa TB-om, testirana su koristeći QFT i TST; od kojih je 10,5% QFT pozitivno i 9,5% TST pozitivno na 10 mm. Podudaranje između testova bilo je 95,2% ukupno i 100% kod dece koja nisu vakcinisana BCG vakcinom.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Testirani su bliski kontakti 15 različitih primarnih pacijenata: 51% osoba primilo je BCG vakcinu, 27% je rođeno u inostranstvu; 70% osoba koje su primile BCG vakcine i 18% osoba koje je nisu primile bile su pozitivne na TST (5 mm), gde je 9% i 11% bilo QFT pozitivno. QFT je bio povezan sa rizikom od TB-a. TST je bio povezan samo sa BCG vakcinom.

Veliki broj dodatnih publikacija opisuje performanse manje osetljive tačnosti na verziju antigena za QuantiFERON-TB Gold (prethodnik verzije QFT) i QFT test. Ove studije uključuju korišćenje testova prilikom kontakta sa aktivnim slučajevima TB-a (9, 11, 19, 25), decom (6-10, 25, 28), HIV pozitivnim pacijentima (2, 5, 20), zdravstvenim radnicima (13, 26, 32), pacijentima sa oslabljenim imunitetom (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), kao i sa osobama za koje se sumnja da imaju TB (7, 8, 10, 18) i osobama sa niskim stepenom rizika (15).

Ponavljanje i efekat TST-a na naknadno QFT testiranje

Kao deo posebne studije u SAD, grupa volontera je ponovo testirana između 4 i 5 nedelja nakon originalnog QFT testa i TST-a. QFT rezultati za 260 osoba bili su dostupni u oba vremenska perioda i nivo poklapanja bio je 99,6% (259/260). Prethodni TST neće izazvati pozitivne QFT odgovore.

10. Tehničke informacije

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati ne bi trebalo da budu česti i mogu da budu u vezi sa stanjem imunološkog sistema testiranog pojedinca, ali mogu i da budu u vezi sa nekim tehničkim faktorima:

- Od uzimanja uzoraka krvi do inkubacije na 37°C proteklo je više od 16 sati
- Krv je čuvana izvan preporučenog temperaturnog opsega (od 17°C do 27°C)
- Sadržaj u epruvetama za prikupljanje krvi nije dovoljno mešan
- Nedovršeno pranje ELISA ploče

Ako sumnjate da je došlo do tehničkih problema prilikom prikupljanja uzoraka krvi ili prilikom rukovanja njima, ponovite ceo QFT test na novim uzorcima krvi. Može da se obavi ponavljanje ELISA testiranja stimuliranih plazmi ako se sumnja na neodgovarajuće pranje ili na odstupanje od procedure za ELISA test. Nejasni rezultati dobijeni na osnovu niskih vrednosti mitogena ili visokih vrednosti u nultim epruvetama, neće se promeniti prilikom ponavljanja, osim u slučaju da je došlo do greške prilikom ELISA testiranja. Neodređene rezultate bi trebalo prijaviti. Lekari mogu da odluče da ponovo uzmu uzorak krvi ili da obave druge odgovarajuće procedure.

Zgrušani uzorci plazme

Ako dođe do zgrušavanja plazme fibrinskim vlaknima tokom njenog dugotrajnog skladištenja, centrifugirajte uzorke da biste sedimentirali zgrušani materijal i da biste olakšali prikupljanje plazme pipetom.

Vodič za rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može da bude koristan pri rešavanju svih problema do kojih može doći. Više informacija potražite u tehničkim informacijama navedenim na adresi: www.QuantiFERON.com. Kontakt informacije možete pronaći na poslednjoj strani.

Rešavanje problema sa ELISA testom

Pojavljivanje nespecifične boje

Mogući uzrok

- a) Nedovoljno pranje ploče
- b) Unakrsna kontaminacija ELISA udubljenja
- c) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti
- d) Rastvor enzimskog supstrata je kontaminiran
- e) Mešanje plazme u QFT epruветama pre prikupljanja

Rešenje

Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 μ l po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme natapanja od najmanje 5 minuta između ciklusa.

Budite pažljivi kada koristite pipetu i mešate uzorke da biste smanjili rizik.

Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100X koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od tri meseca od datuma rekonstituisanja.

Bacite supstrat ako se pojavi plava boja. Obavezno koristite čiste rezervoare za reagense.

Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.

Očitavanje niske optičke gustine za standarde

Mogući uzrok

- a) Greška u razređivanju standarda
- b) Greška pri korišćenju pipeta
- c) Temperatura inkubacije je suviše niska
- d) Vreme inkubacije je prekratko
- e) Korišćen je neodgovarajući filter za čitač ploče
- f) Reagensi su previše hladni
- g) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti

Rešenje

Uverite se da su rastvori standarda iz kompleta pravilno pripremljeni u skladu sa uputstvima za QFT ELISA paket.

Uverite se da su pipete kalibrisane i da se koriste u skladu sa uputstvima proizvođača.

Inkubacija ELISA testova mora da se obavlja na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)

Inkubacija ploče sa konjugatom, standardima i uzorcima trebalo bi da traje 120 ± 5 minuta. Rastvor enzimskog supstrata se inkubira na ploči u trajanju od 30 minuta.

Ploča se očitava pri 450 nm sa referentnim filterom između 620 i 650 nm.

Svi reagensi, osim 100X koncentrovanog konjugata, moraju da se dovedu na sobnu temperaturu pre započinjanja testa. Za to je potreban približno jedan sat.

Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100X koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od 3 meseca od datuma rekonstituisanja.

Rešavanje problema sa ELISA testom

Visoka pozadina

Mogući uzrok

a) Nedovoljno pranje ploče

Rešenje

Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 μ l po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme natapanja od najmanje 5 minuta između ciklusa.

b) Temperatura inkubacije je suviše visoka

Inkubacija ELISA testova mora da se obavlja na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).

c) Istekao je rok upotrebe kompleta/komponenti

Uverite se da se komplet upotrebljava pre roka upotrebe. Uverite da su rekonstituisani 100X koncentrovani standard i konjugat upotrebljeni u roku od 3 meseca od datuma rekonstituisanja.

d) Rastvor enzimskog supstrata je kontaminiran

Bacite supstrat ako se pojavi plava boja. Obavezno koristite čiste rezervoare za reagense.

Nelinearna standardna kriva i promenljivost duplikata

Mogući uzrok

a) Nedovoljno pranje ploče

Rešenje

Ploču operite najmanje 6 puta sa 400 μ l po udubljenju koristeći pufer za ispiranje. Možda će biti potrebno više od 6 ciklusa pranja, u zavisnosti od sredstva za čišćenje. Preporučuje se vreme natapanja od najmanje 5 minuta između ciklusa.

b) Greška u razređivanju standarda

Uverite se da su rastvori standarda pravilno pripremljeni u skladu sa uputstvima za QFT ELISA paket.

c) Nedovoljno mešanje

Dobro promešajte reagense tako što ćete ih okretati ili lagano promešati pre postavljanja na ploču.

d) Nedosledna upotreba pipete ili prekid tokom podešavanja analize

Dodavanje uzorka i standarda trebalo bi da se obavlja bez prekida. Svi reagensi bi trebalo da se pripreme pre započinjanja analize.

Video zapisi sa procedurom analize i rešenjima za većinu tehničkih problema možete pronaći na lokaciji Gnowee™ tako što ćete se registrovati direktno na lokaciji www.gnowee.net da biste dobili pristup na mreži. Informacije o proizvodu i tehnička uputstva možete dobiti besplatno od kompanije QIAGEN, od vašeg prodavca ili ih možete pronaći na lokaciji www.QuantiFERON.com.

11. Bibliografija

Detaljna lista QFT referenci se nalazi u Gnowee – QuantiFERON referentnoj laboratoriji, dostupnoj na adresi www.gnowee.net.

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur. Respir. J.* **33**, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir. Res.* **7**, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* **3**, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 322.
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* **135**, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.* **7**, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J. Infect.* **54**, 267.
13. 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. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 513.
25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 1383.
26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. *JAMA* **293**, 2746.
27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol.* **35**, 776.
28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* **32**, 524.
29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **3**, 981.
30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2799.
31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* **40**, 913.
32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 681.

12. Tehnički servis

Za tehnički servis kontaktirajte:

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

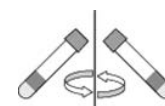
Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

13. Skraćena procedura testiranja

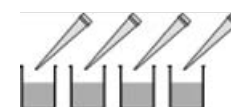
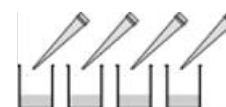
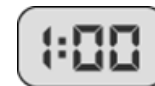
Faza 1 – inkubacija krvi

1. Prikupite krv pacijenata u epruvete i promešajte tako što ćete ih protresti (10) puta dovoljno jako da biste se postarali da cela unutrašnja površina epruvete bude prekrivena krvlju kako bi se agensi na zidovima epruvete rastvorili.
2. Inkubirajte epruvete u uspravnom položaju na $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 16 do 24 sata.
3. Nakon inkubacije centrifugirajte epruvete u trajanju od 15 minuta pri 2000 na 3000 g RCF (g) da biste razdvojili plazmu i crvena krvna zrnca.
4. Nakon centrifugiranja nemojte da pomerate pipetu gore-dole prilikom korišćenja niti da mešate plazmu na bilo koji način pre prikupljanja. U svakom trenutku pazite da ne oštetite materijal na površini gela.

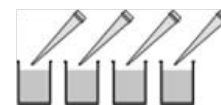
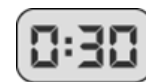
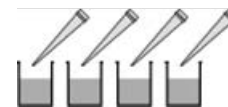


Faza 2 – IFN- γ ELISA

1. Kalibrišite ELISA komponente, sa izuzetkom 100X koncentrata konjugata, na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) u trajanju od najmanje 60 minuta.
2. Rekonstituišite standard iz kompleta na 8,0 IU/ml sa destilovanom ili dejonizovanom vodom. Pripremite četiri (4) rastvora standarda.
3. Rekonstituišite zamrznuti 100X koncentrovani konjugat pomoću destilovane ili dejonizovane vode.
4. Pripremite konjugat spreman za upotrebu u zelenom razblaživaču i dodajte 50 μl u sva udubljenja.
5. Dodajte 50 μl uzoraka plazme za testiranje i 50 μl standarda u odgovarajuća udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
6. Inkubirajte 120 ± 5 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Udubljenja operite najmanje 6 puta sa 400 μl po udubljenju koristeći pufer za ispiranje.



8. Dodajte 100 μ l rastvora enzimskog supstrata u udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.
10. Dodajte 50 μ l enzimskog rastvora za zaustavljanje reakcije u sva udubljenja. Promešajte pomoću šejkera.
11. Pročitajte rezultate na 450 nm sa referentnim filterom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



Važne promene

Značajne promene u ovom izdanju (1075115SR Rev. 01) QFT ELISA uputstvu za upotrebu rezimirane su u tabeli u nastavku:

Odeljak	Stranica	Promene
4. Upozorenja i mere opreza	8–9	Dodatak uz pravila za korišćenje određenih ELISA komponentata u različitim serijama kompleta.
12. Tehnički servis	27	Nove e-adrese za tehnički servis.

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

Ugovor o ograničenom licenciranju za QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

1. Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučenih komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu.
2. Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne garantuje da ovaj komplet i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
3. Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu upotrebu i ne smeju da se ponovo koriste, dorađuju ili ponovo prodaju, osim u slučaju da je kompanija QIAGEN drugačije navela.
4. Kompanija QIAGEN posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u prethodnom tekstu. QIAGEN može da primeni zabrane ovog Ugovora o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Ugovora o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Da biste videli ažurirane uslove licenciranja, posetite www.qiagen.com.

© 2013 Cellestis, QIAGEN Company, sva prava zadržana.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

