

QuantiFERON[®]-TB Gold

(in vitro-meetod)

**Gamma-interferooni (IFN- γ) test
peptiidi antigeenide ESAT-6, CFP-10 ja TB7.7(p.4)
mõõtmiseks täisveres**

INFOLEHT

In vitro-diagnostikum



SISUKORD

1. KASUTUSALA	3
2. KOKKUVÕTE JA TESTI KIRJELDUS	3
Testi põhimõte	4
Testi kestus	4
3. REAKTIIVID JA SÄILITAMINE	5
Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid	6
Säilitamine	6
Katsutid	6
Reaktiivid	6
Rekonstitueeritud ja ülejäänud reaktiivid	6
4. HOIATUSED JA ETTEVAATUSABINÕUD	7
Hoiatused	7
Ettevaatusabinõud	7
5. PROOVIDE VÕTMINE JA KÄSITSEMINE	8
6. KASUTUSJUHEND	9
1. samm: vereproovi inkubeerimine ja plasma eraldamine	9
2. samm: ELISA humaan-gammainterferoon	10
7. TULEMUSTE LEIDMINE JA TÕLGENDAMINE	13
Standardkõvera moodustamine	13
Kvaliteedikontroll	14
Tulemuste tõlgendamine	15
8. MEETODI PIIRANGUD	19
9. TULEMUSTE KARAKTERISTIKUD	20
10. TEHNILINE INFO	22
Määratlematud tulemused	
Plasmaproovide hüübimine	
ELISA-testiga seonduvate probleemide lahendamine	23
Mittespetsiifiline värvireaktsioon	23
Standardite madalad OT-väärtused	23
Tausta tugev värvumus	24
Mittelineaarne standardkõver ja topelttestide vahelised hälbed	24
11. KIRJANDUS	25
12. KLIENDITEENINDUS	26
13. TESTI LÜHIKIRJELDUS	27

1. KASUTUSALA

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) on *in vitro*-diagnostikum, mis sisaldab proteiine ESAT-6, CFP-10 ja TB7.7(p4) simuleerivate ning hepariniseeritud täisveres rakke stimuleerivate peptiidide segu. ELISA-testiga (*enzyme-linked immunosorbent assay*) tuvastatud gamma-interferoon (IFN- γ) võimaldab identifitseerida *in vitro*-reaktsioone nende peptiidi antigeenide suhtes, mis kaasnevad *Mycobacterium tuberculosis* nakkusega.

QuantiFERON®-TB Gold IT on *M. tuberculosis* nakkuse tuvastamise (sh. aktiivse haigestumise) kaudne test. Testi tulemusi tuleb vaadelda koos riskitaseme hindamise, röntgeniuuringute ning muude meditsiiniliste ja diagnostiliste uuringutega.

2. KOKKUVÕTE JA TESTI KIRJELDUS

Tuberkuloos (TBC) on nakkushaigus, mis tekib nakatumisel *M. tuberculosis* kompleksi organismidega (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Haigus levib hingamisteede TBC-d põdevalt isikult reeglina piisknakkuse teel. Esmase nakkusega patsientidel võib TBC-sse haigestumine avalduda nädalate või kuude jooksul, kuid suuremal osal nakatunust ei teki mingeid kaebusi. Mõnedel isikutel tekib püsiv latentne tuberkuloosne infektsioon (LTBI), mittenaakkav asümptomaatiline haigestumine, mis võib vallanduda alles kuude või aastate pärast. LTBI tuvastamise peamine eesmärk on kaaluda TBC-sse haigestumist ennetava ravi kohaldamist. Kuni viimase ajani oli LTBI diagnoosimise ainukeseks meetodiks tuberkuliini nahatest ehk Mantoux´ test (*tuberculin skin test*, TST). Tuberkuliini kutaanne tundlikkus tekib 2-10 nädalat pärast nakatumist. Paraku leidub nakatunuid, kes tuberkuliinile ei reageeri, nende hulgas näiteks patsiendid, kelle immuunreaktsioon on teiste haiguste tõttu pärssitud, aga ka ilma selliste pärssumusteta patsiendid. Ning, vastupidi, võib mõnedel isikutel, kes suure tõenäosusega ei põe *M. tuberculosis* nakkust, pärast *bacillus Calmette-Guérini* (BCG) süstimist või pärast teiste, *M. tuberculosis* kompleksi mittekuuluvate mükobakteritega nakatumist või muude, tundmatute tegurite tõttu ilmned tuberkuliinitundlikkus, ning tuberkuliinist võib anda positiivse tulemuse.

LTBI-d tuleb eristada TBC-sse haigestumisest, mille peab kohustuslikus korras registreerima ning mis haarab reeglina kopsu ja alumisi hingamisteid, kuid millesse võivad olla nakatunud ka teised organisüsteemid. TBC-d diagnoositakse anamnestiliste, füüsiliste, radioloogiliste, histoloogiliste ja mükobakterioloogiliste uuringute tulemuste põhjal.

QuantiFERON®-TB Gold IT-test mõõdab rakuvahendatud immuunreaktsioone (CMI) peptiidi antigeenidele, mis simuleerivad mükobakteriaalseid proteiine. Nimetatud proteiine (ESAT-6, CFP-10 ja TB7.7(p4)) ei leidu üheski BCG-tüves ning enamikes mittetuberkuloossetes mükobakterites, välja arvatud *M. kansasii*, *M. szulgai* ja *M. marinum*.¹ *M. tuberculosis* kompleksi organismidega (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) nakatunud isikute veres leidub tavaliselt lümfotsüüte, mis identifitseerivad nimetatud organisme ja teisi mükobakteriaalseid antigeene. Sellise identifitseerimisprotsessi käigus toodab ja vallandab organism tsütokiini gamma-interferooni ehk IFN- γ . Antud testi aluseks ongi IFN- γ identifitseerimine ja hilisem kvantifitseerimine.

QuantiFERON®-TB Gold IT-testis kasutatavad antigeenid kujutavad endast peptiidide segu, mis simuleerib proteiine ESAT-6, CFP-10 ja TB7.7(p4). Arvukad uurimused on näidanud, et need peptiidi antigeenid stimuleerivad *M. tuberculosis*ga nakatunute T-rakkudes IFN- γ -reaktsiooni, mittenaakatunute või BCG-ga vaksineeritud ja TBC-d mittepõdevate või LTBI-riskita isikute T-rakkudes aga mitte.¹⁻³² Siiski võivad meditsiinilised manipulatsioonid või immuunfunktsioone pärssivad haigused IFN- γ reaktsiooni potentsiaalselt vähendada. Proteiinidele ESAT-6, CFP-10 ja TB7.7(p4) võivad reageerida ka teatud muude mükobakteriaalsete infektsioonidega patsiendid, kuna neid proteiine kodeerivad geene leidub ka sellistes mükobakterites, nagu *M. kansasii*, *M. szulgai* ja *M. marinum*.^{1,23} Sellepärast on QuantiFERON®-TB Gold IT-testist *M. tuberculosis* kompleksi kuuluvate organismidega nakatunud patsientide diagnoosimisel suur abi. Positiivne testitulemus kinnitab TBC-diagnoosi, kuigi positiivse tulemuse võivad anda ka muud mükobakterid (nt. *M. kansasii*). Sellepärast tuleb TBC diagnoosi kinnitamiseks või välistamiseks teha ka muid meditsiinilisi ja diagnostilisi uuringuid.

Testi põhimõte

QuantiFERON®-TB Gold IT-süsteem koosneb spetsiaalsetest verevõtukatsutitest, millesse võetakse täisveri. Katsutitega vereproove inkubeeritakse 16-24 tundi. Seejärel eraldatakse verest plasma ning uuritakse, kas selles leidub IFN- γ , mis moodustus peptiidi antigeenidele reageerimisel.

QuantiFERON®-TB Gold IT-test koosneb kahest järgust. 1. sammuna võetakse täisveri kolme QuantiFERON®-TB Gold-katsutisse: lisanditeta katsutisse, TBC-antigeeniga katsutisse ja vabal valikul ka mitogeeniga katsutisse.

Mitogeeniga katsutit võib QuantiFERON®-TB Gold IT-testi juures kasutada positiivsuse kontrollina. See võib olla näidustatud eriti siis, kui patsiendi immuunstaatus on küsitav. Mitogeeniga katsutit võib kasutada ka selleks, et kontrollida vereproovi nõuetekohast läbiviimist ja inkubeerimist.

Katsuti tuleb inkubeerida 37 °C juures nii ruttu kui võimalik, kuid mitte hiljem, kui 16 tunni jooksul pärast vere võtmist. Pärast 16-24 tundi kestvat inkubatsiooniaega katsutid tsentrifugeeritakse. Seejärel eraldatakse verest plasma ning määratakse ELISA-testi abil kindlaks IFN- γ hulk (RÜ/ml).

Testi loetakse IFN- γ reaktsiooni suhtes TBC-antigeeniga katsutis positiivseks, kui selle väärtus on lisanditeta testi (IFN- γ – RÜ/ml) väärtusest märgatavalt kõrgem. Mitogeeniga katsuti kasutamise korral kontrollitakse mitogeenstimuleeritud plasmaprooviga iga testitava proovi IFN- γ -positiivsust. Kui reaktsioon mitogeenile on madal (< 0,5 RÜ/ml), loetakse tulemust määratlematuks, kui ka vereproovi reaktsioon TBC-antigeenidele on negatiivne. Selline kombinatsioon võib tekkida siis, kui lümfotsüütide hulk on ebapiisav või nende aktiivsus langenud, kuna proovi käsitseti nõuetele mittevastavalt, mitogeeniga katsuteid täideti või segati valesi, või siis, kui patsiendi lümfotsüüdid ei ole suutelised gamma-interferooni tootma. Lisanditeta test kujutab endast vereproovis leiduvate mittespetsiifiliste taustareaktsioonide, heterofiilsete antikeha-efektide⁷ ning mittespetsiifilise IFN- γ korrigeerimist. Lisanditeta katsuti IFN- γ väärtus lahutatakse TBC-antigeeniga katsuti ja mitogeeniga katsuti (juhul, kui viimast kasutati) IFN- γ väärtusest.

Testi kestus

Järgnevalt on toodud QuantiFERON®-TB Gold IT-testi hinnanguline kestus ning aeg, mis kulub mitme proovi üheaegseks testimiseks, kui see on näidustatud.

Vereproovikatsutite inkubeerimine 37 °C juures:	16-24 tundi
ELISA-test:	ca 3 tundi ühe ELISA-plaadi kohta
	<ul style="list-style-type: none">• < 1 tund tööaega• pluss 10-15 min. lisaplaadi kohta

3. REAKTIIVID JA SÄILITAMINE

Tuberkuloosi- ja kontrollantigeeni verevõtukatsutid

Tellimisnr. 0590 0301

- | | |
|---|--------------|
| 1. Lisanditeta katsuti (halli korgiga) | 100 katsutit |
| 2. TBC-antigeeniga katsuti (punase korgiga) | 100 katsutit |
| 3. Mitogeeniga katsuti (violetse korgiga) | 100 katsutit |

Märkus. Katsutid on saadaval ka järgmistes konfiguratsioonides:

Tellimisnr. 0590 0201: 100 lisanditeta katsutit + 100 TBC-antigeeniga katsutit.

Tellimisnr. 0593 0201: 100 mitogeeniga katsutit.

High Altitude-katsutid (vaadake 5. peatükki)

Tellimisnr. 0590-0501: (suurtel kõrgustel ümp) 100 lisanditeta katsutit, 100 TBC-antigeeniga katsutit.

Tellimisnr. 0590-0505: (suurtel kõrgustel ümp) 100 lisanditeta katsutit, 100 TBC-antigeeniga katsutit ja 100 mitogeeniga katsutit.

Tellimisnr. T0593 0501: (suurtel kõrgustel ümp) 100 mitogeeniga katsutit.

ELISA komponendid

Tellimisnr. 0594 0201

- | | |
|---|------------------|
| 1. Mikroplaadi ribad | 24 x 8 süvendiga |
| 2. Humaan-gammainterferoon, standardkontsentratsioon, lüofiliseeritud | 1 pudel |
| 3. Roheline lahjendi | 1 x 30 ml |
| 4. Konjugaadikontsentraat (100-kordne), lüofiliseeritud | 1 x 0,3 ml |
| 5. Pesupuhvri kontsentraat (20-kordne) | 1 x 100 ml |
| 6. Ensüümsubstraadilahus | 1 x 30 ml |
| 7. Ensüümi deaktiveerimislahus | 1 x 15 ml |

Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid

- 37 °C inkubaator. Ei vaja CO₂.
- Kalibreeritud, eri suurusega pipetid (10-1000 µL, ühekordse otsaga).
- Kalibreeritud, mitme kanaliga pipetid (50 ja 100 µl, ühekordse otsaga).
- Mikroplaadi raputid.
- Deioniseeritud või destilleeritud vesi (2 l).
- Mikroplaatide pesuseade (soovitavalt automaatne).
- Mikroplaadi-lugeja, 450 nm filtri ning 620-650 nm referentsfiltriga.

Säilitamine

Katsutid

- Säilitage verevõtukatsuteid temperatuuril 4-25 °C.
- QuantiFERON[®]-TB Gold verevõtukatsutite säilivusaeg on 15 kuud, alates valmistamise kuupäevast (säilitamisel temperatuuril 4-25 °C).

ELISA reaktiivid

- Säilitage reaktiive temperatuuril 2-8 °C.
- Kaitske ensüümsubstraadi lahust otsese päikese eest.
- QuantiFERON[®]-TB Gold IT ELISA reaktiivide säilivusaeg on 3 aastat, alates valmistamise kuupäevast (säilitamisel temperatuuril 2-8 °C).

Rekonstitueeritud ja ülejäänud reaktiivid

ELISA-testi reaktiivide rekonstitueerimise kohta vt. 6. peatüki lõiku „Reaktiivide ettevalmistamine“.

- Rekonstitueeritud reaktiivikomplekt säilib temperatuuril 2-8 °C kolm kuud.
 - Märkige üles reaktiivikomplekti rekonstitueerimise kuupäev.
- Ülejäänud kontsentrati (100-kordset) tuleb pärast rekonstitueerimist säilitada temperatuuril 2-8 °C ning see tuleb kasutada ära samuti kolme kuu jooksul.
 - Märkige üles konjugaadi rekonstitueerimise kuupäev.
- Kasutusvalmis konjugaat tuleb tarvitada ära 6 tunni jooksul pärast valmistamist.
- Kasutusvalmis pesupuhver säilib toatemperatuuril kuni kaks nädalat.

4. HOIATUSED JA ETTEVAATUSABINÕUD

Hoiatused

- QuantiFERON®-TB Gold IT-testi negatiivne tulemus ei välista *M. tuberculosis*ga nakatumise või TBC-sse haigestumise võimalust; valenegatiivsed tulemused võivad olla tingitud nakatumisfaasist (kui nt. vereproov võeti enne rakulise immuunreaktsiooni väljakujunemist), immuunfunktsiooni häiretest, mida põhjustavad teised haigused, katsutite nõuetevastasest käsitlemisest vere võtmisel, testi ebaõigest läbiviimisest või muudest immunoloogilistest muutujatest.
- QuantiFERON®-TB Gold IT-testi positiivset tulemust ei tohiks võtta ainsaks aluseks *M. tuberculosis*ga nakatumise üle otsustamisel; testi ebaõige läbiviimine võib anda ka valepositiivseid tulemusi.
- QuantiFERON®-TB Gold IT-testi positiivset tulemust tuleks kinnitada ka teiste meditsiiniliste ja diagnostiliste uuringutega; üksnes nii on võimalik välja selgitada, kas tegemist on aktiivse TBC-sse haigestumisega (nt. AFB-äge ja kultuuri ning rindkere röntgenuuringutega).
- Kuigi BCG-tüvedes ja enamikes teadaolevates mittetuberkuloossetes mükobakterites ei leidu proteiine ESAT-6, CFP-10 ja TB7.7(p4), võivad QuantiFERON®-TB Gold IT-testi positiivse tulemuse anda ka *M. kansasii*, *M. szulgai* või *M. marinum*. Kui võib oletada, et tegemist on nimetatud nakkustega, tuleb rakendada alternatiivseid testimismeetodeid.

Ettevaatusabinõud

- **QuantiFERON®-TB Gold IT-test on nähtud ette üksnes *in vitro*-meetodil diagnoosimiseks.**
- **Ettevaatust! Ensüümsubstraadi lahus** sisaldab 3,3',5,5'-tetrametüülbensidiini, mis on allaneelamisel, sissehingamisel ja nahaga kokkupuutel ohtlik. Ärritab nahka ja silmi. Toimib mutageenselt. Kasutage kaitseprille ja laborikindaid ning käideldes seda lahust kui potentsiaalselt kartsinogeenset lahust.
- **Ettevaatust! Ensüümi deaktiveerimislahus** sisaldab H₂SO₄, mis on allaneelamisel, sissehingamisel, silmade ja nahaga kokkupuutel ohtlik. Kasutage kaitseprille, laborikindaid ja laboris kantavat kaitseriietust. Juhuslikul silma või nahale sattumisel loputage lahust rohke veega maha ja pöörduge arsti poole.
- **Ettevaatust! IFN-γ standardkontsentraat ja konjugaadi 100-kordne kontsentraat** võivad põhjustada allaneelamisel vaevusi ning nahaga kokkupuutel nahaärritust. Kasutage laborikindaid ja laboris kantavat kaitseriietust.
- **Arvestage, et vereproovide võtmisega kaasneb alati potentsiaalne nakatumisoht!** Järgige asjakohaseid vere käitlemise juhiseid.
- Mõned reaktiivid sisaldavad konservandina **timerosaali**. Timerosaal võib allaneelamisel, sissehingamisel ja nahaga kokkupuutel olla toksiline.
- **Roheline lahjendi** sisaldab tavalist hiireseerumit ja kaseiini; nimetatud ained võivad põhjustada allergilisi reaktsioone. Sellepärast tuleks vältida nende nahale sattumist.
- Infolahel kirjeldatud meetoditest ja juhustest kõrvalekaldumine võib tingida valede tulemuste saamise. Palun lugege testi läbiviimise juhised eelnevalt tähelepanelikult läbi.
- Ärge kasutage QuantiFERON®-TB Gold IT-kiti, kui üks või mitu reaktiivipudelit on enne kasutamist vigastatud või lekivad.
- Ärge kasutage koos antud pakendi komponentidega teiste QuantiFERON®-TB Gold IT-kitide ELISA-testi reaktiive.
- Kõrvaldage ülejäänud reaktiivid ja bioloogilised proovid kohalike ja riiklike ettekirjutuste kohaselt.
- Katsuteid ja ELISA-testi komponente ei tohi pärast kõlblikkusaja möödumist kasutada.

5. PROOVIDE VÕTMINE JA KÄSITSEMINE

Verevõtmine

QuantiFERON®-TB Gold IT-test sisaldab järgmisi katsuteid:

1. Lisanditeta katsuti (hall, valge rõngaga kork) (kasutada kõrgusel 0-810 m ümp)
2. TBC-spetsiifiliste antigeenidega katsuti (punane, valge rõngaga kork) (kasutada kõrgusel 0-810 m ümp)
3. Mitogeeniga katsuti (violetne, valge rõngaga kork) (kasutada kõrgusel 0-810 m ümp)
4. Lisanditeta katsuti (hall, kollase rõngaga kork) (kasutada kõrgusel 1020-1875 m ümp)
5. TBC-spetsiifiliste antigeenidega katsuti (punane, kollase rõngaga kork) (kasutada kõrgusel 1020-1875 m ümp)
6. Mitogeeniga katsuti (violetne, kollase rõngaga kork) (kasutada kõrgusel 1020-1875 m ümp)

Antigeenid katavad kuivatatud kihina katsutite siseseina. Sellepärast tuleb vereproovid hoolikalt katsuti sisuga segada. Seejärel peab katsutid võimalikult kiiresti, kuid mitte hiljem kui 16 tundi pärast vere võtmist, toimetama inkubaatorisse (37 °C).

Optimaalsete testitulemuste saamiseks tuleb pidada kinni järgmistest juhistest:

1. Võtke igalt patsiendilt igasse QuantiFERON®-TB Gold IT-katsutisse 1 ml veeniverd.
 - Piirkondades, mis asuvad kõrgusel 0-810 m ümp, tuleb kasutada standardseid QuantiFERON®-katsuteid. Alates kõrgusest 1020 m ümp, tuleb kasutada spetsiaalseid QuantiFERON® HA-katsuteid (nn. *high altitude*-katsuteid).
 - Kui QuantiFERON®-katsuteid kasutatakse väljaspool nimetatud kõrguspiire või kui veri voolab liiga aeglaselt, võib verevõtmiseks kasutada ka süstalt ning viia sellega igasse katsutisse 1 ml verd. Et seda oleks turvaline ja mugav teha, tuleb süstlanõel nõuetekohaselt eemaldada, võtta kõigilt kolmelt QuantiFERON®-katsutilt korgid ära ning viia süstlaga igasse katsutisse 1 ml verd (kuni musta märgistuseni katsuti küljel). Pange katsutid oma kohale ja segage, nagu järgnevas osas kirjeldatud.*
 - Kuna veri voolab 1 ml katsutitesse suhteliselt aeglaselt, jätke katsuti pärast näilise täituvustaseme saavutamist veel 2-3 sekundiks nõela otsa. Sellega on tagatud vajaliku verekoguse saamine.
 - Katsuti küljel olev must märgistus tähistab 1 ml täituvustaset. QuantiFERON®-TB Gold-katsutid on nähtud ette 0,8-1,2 ml vere jaoks. Kui vere võtmisel ei õnnestu seda indikaatorjoont saavutada, on soovitatav teha uus vereproov.*
 - Kui vere võtmisel kasutatakse libliknõela, tuleb tühja katsuti abil veenduda, et toru oleks enne QuantiFERON®-TB Gold-katsuti otsapanekut täidetud.
2. Segage katsutite sisu, raputades katsutit **5 sekundit** (või 10 x) **tugevasti**. Veenduge, et **kogu katsuti sisesein** oleks verega kaetud.
 - Hoolikas segamine on oluline, et katsuti sisu seguneks täielikult vereprooviga.
 - Katsuti raputamisel võib katsuti sisu hakata kergelt vahutama. See on täiesti normaalne ja ei mõjuta testi tulemusi.
3. Varustage katsutid siltidega.
 - Kontrollige, et iga katsuti (lisanditeta, TBC-antigeeniga ja mitogeeniga katsuti) oleks selgelt tähistatud asjakohase etiketiga või muul viisil märgistatud, et see oleks äratuntav ka siis, kui katsuti kork on pealt ära võetud.

4. Katsutid tuleb võimalikult kiiresti, kuid mitte hiljem, kui 16 tundi pärast vere võtmist, toimetada inkubaatorisse (37 °C). Enne inkubeerimist peab katsuteid hoidma toatemperatuuril (22 ± 5 °C). Ärge säilitage vereproove külmikus või jääkapis.

6. KASUTUSJUHEND

1. samm: vereproovi inkubeerimine ja plasma eraldamine

Kaasolevad materjalid

QuantiFERON®-TB Gold IT-katsutid (vaadake 3. peatükki).

Vajalikud, kuid kaasas mitteolevad materjalid

Vaadake 3. peatükki.

Menetlus

1. Kui vereproove ei inkubeerita kohe pärast vere võtmist, tuleb katsuteid **vahetult enne inkubeerimist uuesti segada või loksutada**, nagu kirjeldatud 5. peatükis.
2. Inkubeerige katsuteid **PÜSTIASENDIS** 16-24 tundi 37 °C juures. CO₂ või niisutamine ei ole seejuures vajalikud.
3. Katsuteid võib enne tsentrifugeerimist säilitada kuni 3 päeva temperatuuril 2-27 °C.
4. Pärast katsutite inkubeerimist 37 °C juures tsentrifugeeritakse neid 5-15 minutit 1500-2200 g (RCF) juures, et plasmata oleks hõlpsam kätte saada. Moodustuv hüüvis eraldab rakud plasmast. Kui seda ei juhtu, tuleb katsuteid suuremal kiirusel uuesti tsentrifugeerida.
 - Plasmata on võimalik eraldada ka tsentrifugeerimata, kuid seejuures peab toimima äärmise ettevaatusega, et plasma võtmisel rakke mitte kaasa haarata.
5. Plasmaproovid saab katsutitest otse QuantiFERON®-TB Gold ELISA plaadile üle kanda, eriti siis, kui kasutatakse ELISA automaati.
6. Alternatiivse võimalusena võib plasmaproovid enne ELISA-testi tegemist panna hoiule kas otse tsentrifugeeritud katsutitesse või plasma säilitusnõudesse (nt. mikroplaadi >150 µl süvenditesse või 96-süvendiga raami mikrokatsutitesse. Proovide säilitamise ajaks tuleb plaadid kinni katta, et vältida proovimaterjali mahaminekut ja aurumisel tekkivaid kadusid.
 - Plasmaproove võib temperatuuril 2-8 °C säilitada kuni 4 nädalat; temperatuuril alla -20 °C (eelistatult mitte alla -70 °C) võib säilitusaeg olla veelgi pikem.

2. samm: ELISA humaan-gammainterferoon

Kaasasolevad materjalid

QuantiFERON®-TB Gold ELISA-komplekt (vaadake 3. peatükki).

Vajalikud, kuid kaasas mitteolevad materjalid

Vaadake 3. peatükki.

Menetlus

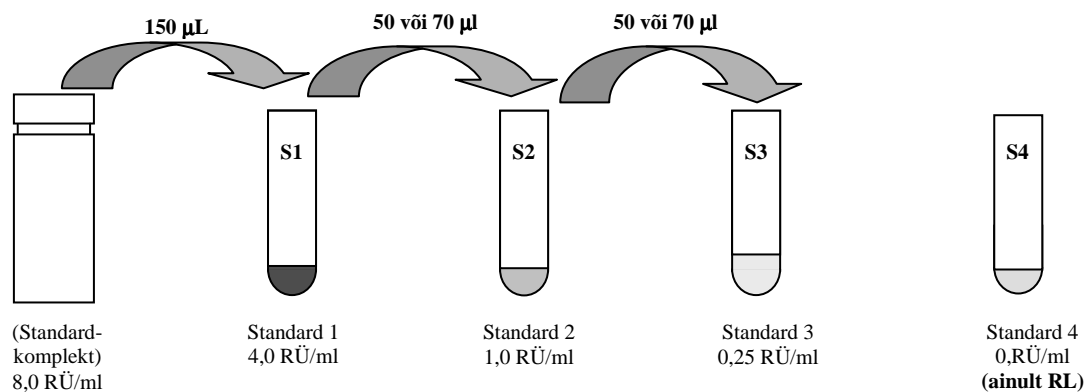
1. Kõik plasmaproovid ja reaktiivid, välja arvatud 100-kordne konjugaadikontsentraat, peavad olema enne kasutamist saavutanud toatemperatuuri (22 ± 5 °C). Kavandage selleks vähemalt 60 minutit.
2. Võtke kasutamata ribad raamist välja, pange kilepakendisse tagasi ja säilitage kuni kasutamiseni külmikus. Varuge QuantiFERON®-TB Gold standarditele vähemalt üks riba ja testitavatele isikutele piisav arv ribasid (vt. jooniseid 2A ja 2B kahe või kolme katsuti kasutamiseks). Hoidke raam ja kaas pärast kasutamist ülejäänud ribade jaoks alles.
3. Rekonstitueerige lüofiliseeritud standardkit standardipudeli etiketile märgitud koguse deioniseeritud või destilleeritud veega. Segage pudeli sisu ettevaatlikult (et tekiks võimalikult vähe vahtu) ning veenduge, et sisu oleks täielikult lahustunud. Standardi rekonstitueerimine ettenähtud mahuni annab tulemuseks 8,0 RÜ/ml kontsentratsiooniga lahuse.

Märkus. Standardkiti rekonstitueerimise maht on partiist sõltuvalt erinev!

Kasutage rekonstitueeritud standardkiti IFN- γ ja rohelist lahjendit (RL) lahuste valmistamiseks vahekorras 1:4 (vt. joon. 1). S1 (standard 1) sisaldab 4 RÜ/ml, S2 (standard 2) sisaldab 1 RÜ/ml, S3 (standard 3) sisaldab 0,25 RÜ/ml ja S4 (standard 4) sisaldab 0 RÜ/ml (ainult GV). Standardeid tuleb testida vähemalt kahekordselt.

SOOVITUSLIK KAHEKORDNE MENETLUS	SOOVITUSLIK KOLMEKORDNE MENETLUS
<p>a. Pange neljale katsutile sildid „S1“, „S2“, „S3“ ja „S4“.</p> <p>b. Valage katsutitesse S1, S2, S3 ja S4 150 μl RL-i.</p> <p>c. Valage katsutisse S1 150 μl standardkiti ja segage korralikult.</p> <p>d. Valage 50 μl standardkiti katsutist S1 katsutisse S2 ja segage korralikult.</p> <p>e. Valage 50 μl standardkiti katsutist S2 katsutisse S3 ja segage korralikult.</p> <p>f. „Ainult RL“ on nullstandard (S4).</p>	<p>a. Pange neljale katsutile sildid „S1“, „S2“, „S3“ ja „S4“.</p> <p>b. Valage katsutisse S1 150 μl RL-i.</p> <p>c. Valage katsutitesse S2, S3 ja S4 210 μl RL-i.</p> <p>d. Valage katsutisse S1 150 μl standardkiti ja segage korralikult.</p> <p>e. Valage 70 μl standardkiti katsutist S1 katsutisse S2 ja segage korralikult.</p> <p>f. Valage 70 μl standardkiti katsutist S2 katsutisse S3 ja segage korralikult.</p> <p>g. „Ainult RL“ on nullstandard (S4).</p>

Joonis 1. Standardkõvera moodustamine



- Valmistage ELISA iga sessiooni jaoks uus standardkiti lahus.
4. Rekonstitueerige lüofiliseeritud 100-kordne konjugaadikontsentraat 0,3 ml deioniseeritud või destilleeritud veega. Segage pudeli sisu ettevaatlikult (et tekiks võimalikult vähe vahtu) ning veenduge, et sisu oleks täielikult lahustunud.

Kasutusvalmis konjugaadi valmistamiseks lahjendatakse vajalik kogus rekonstitueeritud 100-kordset konjugaadikontsentraati rohelises lahjendis, nagu näidatud tabelis 1 (Konjugaadi ettevalmistamine).

TABEL 1. Konjugaadi ettevalmistamine

Ribade arv	100-kordse konjugaadi-kontsentraadi kogus	Rohelise lahjendi kogus
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

- Segage korralikult, aga ettevaatlikult, et vältida vahu tekkimist.
 - Pange ülejäänud 100-kordne konjugaadikontsentraat kohe pärast kasutamist jälle hoiule temperatuurile 2-8 °C.
 - Kasutage lahjendamiseks üksnes rohelist lahjendit.
5. Enne testi tegemist tuleb plasmat segada, et IFN-γ seguneks prooviga ühtlaselt.
 6. Tilgutage mitmekanalilise pipetiga igasse ELISA-süvendisse 50 µl valmis konjugaati.
 7. Viige mitmekanalilise pipetiga igasse süvendisse 50 µl plasmaproovi (vt. plaadi soovituslikku paigutust joonistelt 2A ja 2B). Lõpuks lisage igasse süvendisse 50 µl standardeid 1-4.

Joonis 2A. Null- ja TBC-antigeeniga katsutite soovituslik paigutus plaadil (44 testi plaadil)

Rida	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

- S1 (standard 1), S2 (standard 2), S3 (standard 3), S4 (standard 4).
- 1N (proov 1, lisanditeta plasma); 1A (proov 1, TBC-antigeeniga plasma).

Joonis 2B. Null-, TBC-antigeeniga ja mitogeeniga katsutite soovituslik paigutus plaadil (28 testi plaadil)

Rida	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

- S1 (standard 1), S2 (standard 2), S3 (standard 3), S4 (standard 4).
- 1N (proov 1, lisanditeta plasma); 1A (proov 1, TBC-antigeeniga plasma); 1M (proov 1, mitogeeni plasma).

8. Segage konjugaati ja plasmaproove/standardeid korralikult 1 minuti vältel mikroplaatide raputis.

9. Katke kõik plaadid kaanega ja inkubeerige neid 120 ± 5 minutit toatemperatuuril (22 ± 5 °C).

- Inkubeerimise ajal tuleb plaate kaitsta otsese päikese kiirguse eest.

10. Lahjendage inkubeerimise ajal 1 osa 20-kordset pesupuhvrikontsentraati 19 osa deioniseeritud või destilleeritud veega ja segage korralikult läbi. Testiga on kaasas piisav kogus 20-kordset pesupuhvrikontsentraati, millest piisab 2 liitri kasutusvalmis pesupuhvri valmistamiseks.

Peske iga süvend vähemalt 6 korda 400 µl kasutusvalmis pesupuhvriga läbi. Soovitame kasutada mikroplaatide pesemiseks automaatset pesemisseadet.

- Korralik pesemine on testi tulemuste seisukohast väga tähtis. Kontrollige iga pesutsükli juures, et kõik süvendid oleksid täielikult kuni ülemise servani pesupuhvriga täidetud. Soovitame jätta iga pesutsükli vahele vähemalt 5 sekundi pikkuse leotusaja.
- Kasutatud pesuvee kogumisenõusse tuleb lisada laborites kasutatavat desinfitseerimisvahendit. Pidage lisaks sellele kinni teie laboris kehtivatest potentsiaalselt nakkava materjali dekontamineerimise eeskirjadest.

11. Koputage plaate, süvendid allpool, paberrätiku peale, et eemaldada nendes jäänud pesupuhvri jäägid. Seejärel tilgutage igasse süvendisse 100 µl ensüümsubstraadi lahust ja segage plaadid raputis.

12. Katke kõik plaadid kaanega ja inkubeerige neid 30 minutit toatemperatuuril (22 ± 5 °C).
 - Inkubeerimise ajal tuleb plaate kaitsta otsese päikesekiirguse eest.
13. Pärast 30 minutit kestnud inkubeerimist tilgutage igasse süvendisse 50 µl ensüümi deaktiveerimislahust ja segage läbi.
 - Ensüümi deaktiveerimislahus tuleb viia süvenditesse samas järjekorras ja umbes samas tempos kui substraat (vt. 11. punkti).
14. Mõõtke iga süvendi optilist tihedust (OT) 5 minuti jooksul pärast deaktivaatori lisamist mikroplaatide lugejaga ja kasutage selleks 450 nm filtrit ning 620-650 nm referentsfiltrit. OT-väärtusi on hiljem vaja tulemuste arvutamiseks.

7. TULEMUSTE LEIDMINE JA TÕLGENDAMINE

Cellestis pakub Teile QuantiFERON[®]-TB Gold IT analüüsimise tarkvara, mis aitab analüüsida lähteandmeid ja arvutada välja tulemusi.

Tarkvara viib läbi kvaliteedikontrolli, hinnates testi tulemusi, koostab standardkõvera ja väljastab iga testitud patsiendi kohta tulemuse, mis tugineb järgnevalt kirjeldatud tõlgendusmeetodile.

QuantiFERON[®]-TB Gold IT analüüsimise tarkvara kasutamise alternatiivina on võimalik tulemusi kindlaks teha ka järgnevalt kirjeldatud meetoodika abil:

Standardkõvera moodustamine

(QuantiFERON[®]-TB Gold IT tarkvara mittekasutamise korral)

Leidke igal plaadil standardkiti korduste keskmised OT-väärtused.

Moodustage $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ graafiline standardkõver, kandes y-teljele keskmise OT-väärtuse $\log_{(e)}$ ja x-teljele standardi IFN- γ -kontsentratsiooni RÜ/ml $\log_{(e)}$. Seejuures jääb sellest arvutusest välja nullstandard. Leidke regressioonianalüüsi kaudu standardkõvera parim kontuur.

Kasutage standardkõverat, et leida kõikide testitud plasmaproovide IFN- γ -kontsentratsioon (RÜ/ml), kasutades iga proovi OT-väärtust.

Nendeks arvutusteks võib kasutada mikroplaatide lugemisseadmete pakutavaid tarkvarapakette ning standardseid arvutustabeleid või statistikaprogramme (nt. Microsoft Excel). Soovitame selliseid tarkvarapakette kasutada regressioonianalüüsi tegemiseks, standardi variatsioonikoefitsiendi (%VK) ja standardkõvera korrelatsioonikoefitsiendi (r) leidmiseks.

Kvaliteedikontroll

Testi tulemuste õigsus sõltub korrektse standardkõvera moodustamisest. Sellepärast tuleb enne testi tulemuste tõlgendamist kontrollida standardist tuletatud tulemusi.

ELISA-testi tulemus kehtib, kui on täidetud kõik järgnevad kriteeriumid:

- **Standardi 1 keskmine OT-väärtus peab olema $\geq 0,600$.**
- **VK peab standardi 1 ja standardi 2 replitseeritud OT-väärtuste protsendis olema $\leq 15\%$.**
- **Standardi 3 ja standardi 4 replitseeritud OT-väärtused ei tohi hälbida konkreetsest keskmisest väärtusest rohkem kui 0,040 OT-ühikut.**
- **Standardite keskmiste ekstinktsiooniväärtuste põhjal välja arvatud korrelatsioonikoefitsient (r) peab olema $\geq 0,98$.**

See QuantiFERON®-TB Gold IT analüüsimise tarkvara arvutab välja kvaliteedikontrolli parameetrid.

Kui nimetatud kriteeriumid ei ole täidetud, on test kehtetu ja seda tuleb korrata.

- **Nullstandardi (roheline lahjendi) keskmine OT-väärtus peab olema $\leq 0,150$. Kui keskmine OT-väärtus on $> 0,150$, soovitage kontrollida üle, kuidas toimub plaatide pesemine.**

Tulemuste tõlgendamine

QuantiFERON®-TB Gold IT-testi tulemusi tuleb tõlgendada järgmiste kriteeriumide alusel:

MÄRKUS. TBC diagnoosimine või selle välistamine, samuti LTBI tõenäosuse üle otsustamine nõuab epidemioloogiliste, anamnestiliste, meditsiiniliste ja diagnostiliste tulemuste kombineerimist; kõiki neid tulemusi tuleb arvestada QuantiFERON®-TB Gold IT-testi tulemuste tõlgendamisel.

NULL- JA TBC-ANTIGEENIGA KATSUTITE KASUTAMISE KORRAL

Null [RÜ/ml]	TBC-antigeen miinus null [RÜ/ml]	QuantiFERON®-TB Gold IT-testi tulemus	Rapo/Tõlgendus
≤ 8,0	< 0,35	negatiivne	<i>M. tuberculosis</i> nakkus EI OLE tõenäoline
	≥ 0,35 ja < 25% nulltesti väärtusest		
	≥ 0,35 ja ≥ 25% nulltesti väärtusest	positiivne¹	<i>M. tuberculosis</i> nakkus ON tõenäoline
> 8,0 ²	suvaline	määratlematu³	TBC-antigeenile reageerimise tulemused määratlematud

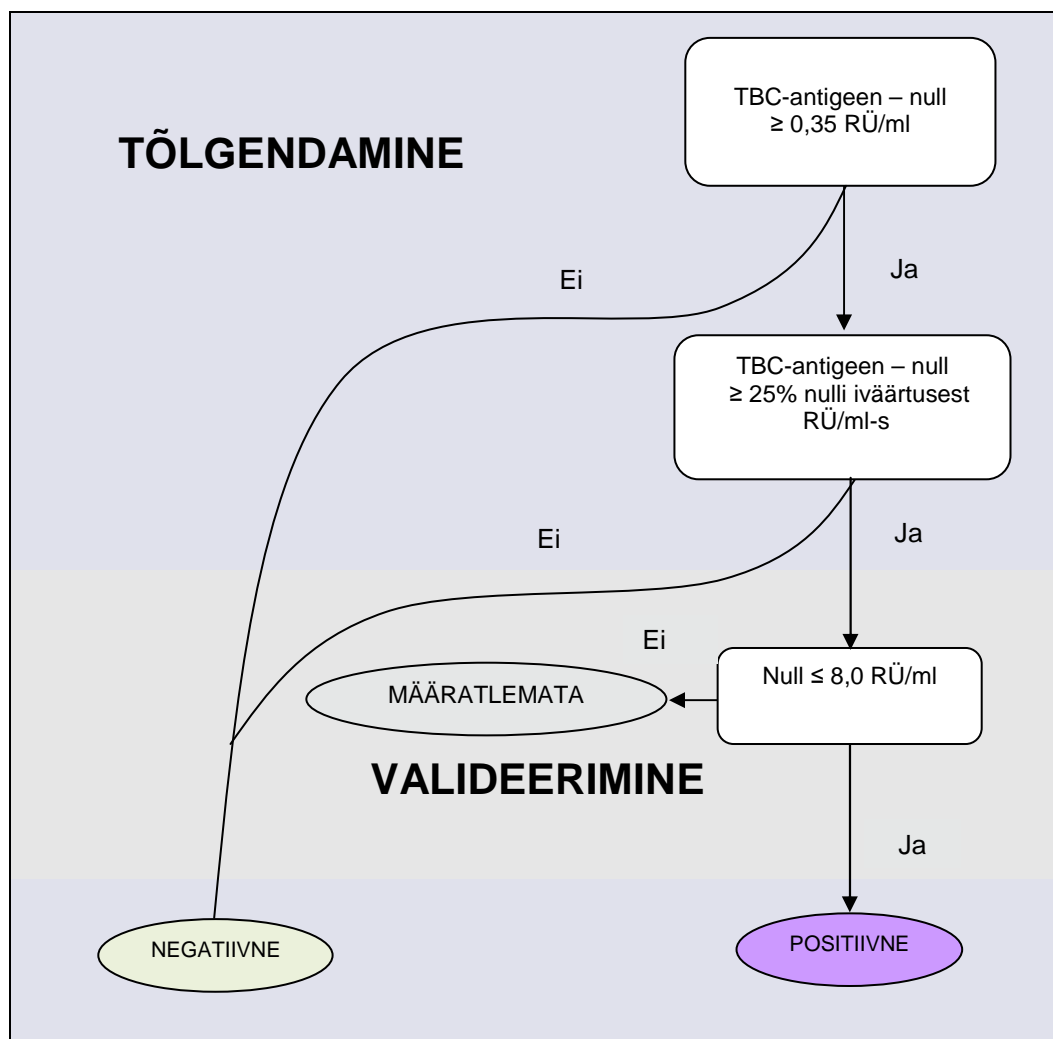
¹ Neil juhtudel, kui *M. tuberculosis* nakkust ei oletata, võib algsete plasmaproovide uus kahekordne testimine QuantiFERON®-TB Gold ELISA-testiga esialgseid positiivseid tulemusi kinnitada. Kui testi kordamisel on 1. või 2. proovi tulemus positiivne, tuleb testi üldtulemus hinnata positiivseks.

² Kliiniliste uuringute käigus ilmnes vähem kui 0,25% uuringutel osalenute juures nulltesti IFN- γ -kontsentratsioon > 8,0 RÜ/ml.

³ Võimalike põhjuste kohta vaadake peatükki „Probleemide lahendamine“.

Mõõdetud IFN- γ -kontsentratsiooni suuruse põhjal võib teha järeldusi nakkuse staadiumi või astme, immuunreaktiivsuse ulatuse ning aktiivse haigestumise korral progressiooni tekkimise tõenäosuse kohta.

Joonis 3. TULEMUSTE TÕLGENDAMISE VOODIAGRAMM (NULL- JA TBC-ANTIGEEENIGA KATSUTITE KASUTAMISEL)



NULL-, TBC-ANTIGEENIDEGA JA MITOGEENIDEGA KATSUTITE KASUTAMISE KORRAL

<u>Null</u> [RÜ/ml]	<u>TBC-antigeen miinus null</u> [RÜ/ml]	<u>Mitogeen miinus null</u> [RÜ/ ml] ¹	QuantiFERON®-Tb Gold IT-testi tulemus	Raport/Tõlgendus
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	negatiivne	<i>M. tuberculosis</i> nakkus EI OLE tõenäoline
	≥ 0,35 ja < 25% nulltesti väärtusest	≥ 0,5		
	≥ 0,35 ja ≥ 25% nulltesti väärtusest	suvaline	positiivne ²	<i>M. tuberculosis</i> nakkus ON tõenäoline
	< 0,35	< 0,5	määratlematu ³	TBC-antigeenile reageerimise tulemused määratlematud
≥ 0,35 und < 25% nulltesti väärtusest	< 0,5			
> 8,0 ⁴	suvaline	suvaline		

¹ Mitogeeni (ja teatud juhtudel ka TBC-antigeeni) suhtes positiivne reaktsioon jääb sageli väljapoole mikroplaadi lugemisseadme mõõteulatust. See ei mõjuta mingil viisil testi tulemusi.

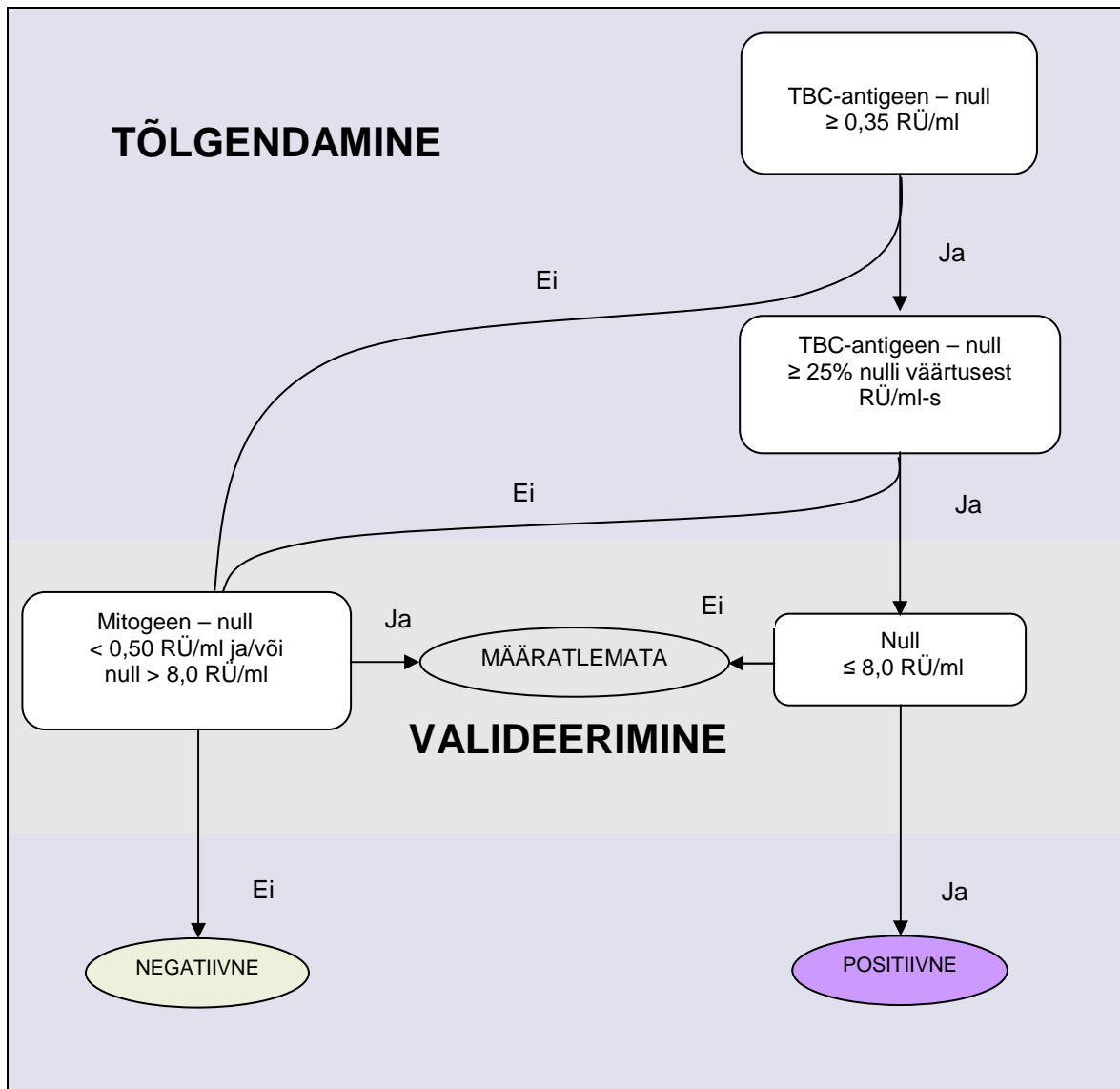
² Neil juhtudel, kui *M. tuberculosis* nakkust ei oletata, võib algsete plasmaproovide uus kahekordne testimine QuantiFERON®-TB Gold ELISA-testiga esialgseid positiivseid tulemusi kinnitada. Kui testi kordamisel on 1. või 2. proovi tulemus positiivne, tuleb testi üldtulemus hinnata positiivseks.

³ Võimalike põhjuste kohta vaadake peatükki „Probleemide lahendamine“.

⁴ Kliiniliste uuringute käigus ilmnes vähem kui 0,25% uuringutel osalenute juures nulltesti IFN-γ-kontsentratsioon > 8,0 RÜ/ml.

Mõõdetud IFN-γ-kontsentratsiooni suuruse põhjal ei saa teha järeldusi nakkuse staadiumi või astme, immuunreaktiivsuse ulatuse ning aktiivse haigestumise korral progressiooni tekkimise tõenäosuse kohta.

Joonis 4. TULEMUSTE TÕLGENDAMISE VOODIAGRAMM (NULL-, TBC-ANTIGEENIGA ja MITOGEENIGA KATSUTITE KASUTAMISEL)



8. MEETODI PIIRANGUD

QuantiFERON®-TB Gold IT-testi tulemusi tuleb vaadelda koos iga patsiendi epidemioloogilise ajaloo, tema aktuaalse tervisliku seisundi ja muude diagnostiliste uuringutega.

Nullväärtusega tulemusi üle 8 RÜ/ml tuleb hinnata kui „määratlematuid“, sest 25% võrra kõrgem TBC-antigeeni reaktsioon võib olla väljapool testi mõõteulatust.

Mitteusaldusväärsed või määratlematud tulemused võidakse saada järgmistel põhjustel:

- kõrvalekaldumine infolehel kirjeldatud menetlusjuhistest;
- tsirkuleeriva gammainterferooni ekstreemselt kõrge kontsentratsioon või heterofiilsete antikehade esinemine;
- verevõtmise ja 37 °C juures inkubeerimise liiga pikk vahe (üle 16 tunni).

9. TULEMUSTE KARAKTERISTIKUD

Kliinilised uuringud

Kuivõrd latentse tuberkuloosiinfektsiooni (LTBI) kohta ei eksisteeri kindlat standardit, pole praktiliselt võimalik hinnata QuantiFERON®-TB Gold IT-testi sensitiivsust ja spetsiifilisust. QuantiFERON®-TB Gold IT-testi ligikaudne spetsiifilisus leiti madala riskitasemega isikute (kellel riskifaktorid teadaolevalt puudusid) valepositiivsete tulemuste määra hindamise teel. Ligikaudne sensitiivsus saadi, hinnates patsiendirühmi, kellel oli kindlalt diagnoositud aktiivne tuberkuloos, mis leidis kinnitust kultuuri abil tehtud täiendava testiga.

QuantiFERON®-TB Gold IT-testi spetsiifilisus

USA-s läbi viidud uuringus osales 866 vabatahtlikku, kellelt võeti QuantiFERON®-TB Gold IT-testiga verd pärast tuberkuliini nahatesti (TST) tegemist. Testimise ajal fikseeriti standardküsitleuse abil antud hetkel teadaolev demograafiline olukord ja tuberkuloosi riskifaktorid. 432-st vabatahtlikust, kellel puudusid teadaolevalt *M. tuberculosis*ega nakatumise riskitegurid, saadi 391 vabatahtliku puhul QuantiFERON®-TB Gold IT-testi ja tuberkuliini nahatesti (TST) tulemused. Ükski nendest vabatahtlikest ei olnud vaktsineeritud *bacillus Calmette-Guérini* (BCG) vastu. Teine QuantiFERON®-TB Gold IT-testi spetsiifilisuse uuring viidi läbi Jaapanis madala riskitasemega isikute seas, kellest umbes 90% olid BCG vastu vaktsineeritud. Mõlema uuringu tulemused on toodud tabelis 2.

Tabel 2. QuantiFERON®-TB Gold IT-testi spetsiifilisus isikute puhul, kellel puudub teadaolevalt *M. tuberculosis*ega nakatumise risk.

UURING	BCG staatus (vaktsineeritute %)	Testituid kokku	QFT-G arv määramata	QFT-G positiivne arv/ tõeste testide arv	QFT-G spetsiifil. (95% CI)	TST-positiivsete arv/ testide arv	TST* spetsiifil. (95% CI**)
USA (avaldamata)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (97,6-99,8)	6 / 391	98,5% (96,5-99,4)
Jaapan (avaldamata)	~90%	190	4	3 / 186	98,4% (95-99,6)	-	-
KOKKU		581	5/584 (0,9%)	6 / 576	99,0%	-	-

*Kui TST-paapul on 10 mm. 15 mm paapuli korral on TST spetsiifilisus hinnanguliselt 99,1%.

** CI = usaldusväärse vahemik (*confidence interval*)

QuantiFERON®-TB Gold IT-testi sensitiivsus aktiivse TBC korral

Austraalias ja Jaapanis testiti QuantiFERON®-TB Gold IT-testi sensitiivsuse hindamiseks tuberkuloosikahtlusega isikuid, kelle puhul tuvastati hiljem *M. tuberculosis*ega nakatumine. Kuivõrd latentse tuberkuloosiinfektsiooni (LTBI) hindamiseks ei ole olemas kindlalt defineeritud standardtesti, on sobivaks surrogaadiks *M. tuberculosis* mikrobioloogiline kultuur, kuivõrd haigust kandvad patsiendid on *per definitionem* nakatunud. Enne QuantiFERON®-TB Gold IT-testi jaoks vere võtmist olid patsiendid saanud ravi vähem kui 8 päeva.

Tabelis 3 on kokku võetud kahe patsiendirühma tulemused, kes olid *M. tuberculosis* kultuuri suhtes positiivsed. QuantiFERON®-TB Gold IT-testi üldine sensitiivsus aktiivse tuberkuloosi korral oli 89% (48/54).

Tabel 3. QuantiFERON®-TB Gold IT-test isikute puhul, kellel on kinnitatud *M. tuberculosis* infektsiooni olemasolu.

UURING	Haigus kinnitatud	QFT-Gold positiivsete arv/ Tõeste testide arv	QFT-Gold sensitiivsus (95% CI*)
Jaapani tuberkuloosikahtlusega valideerimise uuring	Kultuuriga	24 / 27	89% (72-96%)
Austraalia tuberkuloosikahtlusega valideerimise uuring	Pulmonaalne	7 / 10	70% (40-89%)
	Ekstrapulmonaalne	17 / 17	100% (82-100%)
KOKKU		48 / 54	89% (78-95%)

* CI = usaldusväärse vahemik (*confidence interval*)

Latentse tuberkuloosiinfektsiooni (LTBI) diagnoos

On avaldatud mitme uuringu tulemusi, mis näitavad QuantiFERON®-TB Gold IT-testi spetsiifilisust erinevates LTBI riskiga elanikkonnarühmades. Mõnede uuringute peamised tulemused on esitatud tabelis 4.

Tabel 4. Valik QuantiFERON®-TB Gold IT-testi avaldatud uurimistulemusi LTBI riskiga rühmades.

UURING	Testitud kokku	Tulemused ja järeldused
India, tervishoiutöötajad (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁷	726	Väga kõrge TBC-määruga keskkond: 40% QFT-Gold IT pos./41% TST pos. (10 mm paapul). Suur kokkulangevus TST-ga, BCG vastu vaksineerimine teste ei mõjuta. Mõlemad testid kinnitavad TBC seotust vanuse ja tervishoiusüsteemis töötatud ajaga.
Taani, HIV-positiivsed (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	HIV-positiivsetel LTBI prevalents QFT-Gold IT-testiga 4,6% (27/590). Positiivsed tulemused olid seotud TBC-riskiga. Kahel QFT-Gold IT-positiivsel isikul arenes ühe aasta jooksul välja aktiivne TBC. Mittemääratavate tulemustega (n = 20, 3,4%) kaasnes selgelt CD4 <100/µl.
Hospitaliseeritud lapsed (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	TBC kahtluse või eelneva TBC-kontaktiga lapsi testiti nii QFT-Gold IT kui ka TST-ga. 10,5% QFT-Gold IT pos./9,5% TST pos. (10 mm paapul). Testide tulemuste kokkulangevus oli keskmiselt 95,2% ja BCG vastu vaksineerimata lastel 100%.
Saksa, kontaktid (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Testiti 15 erineva indekseeritud juhu kontaktisikuid. 51% oli BCG vastu vaksineeritud, 27% välismaal sündinud. 70% BCG vastu vaksineeritustest ja 18% mittevaksineeritustest olid TST-positiivsed (5 mm paapul), samal ajal oli nende seas QFT-Gold IT-positiivseid vastavalt 9% ja 11%. QFT-Gold IT oli seotud TBC-riskiga. TST tulemused olid seotud üksnes BCG vastu vaksineerimisega.

Paljudes teistes publikatsioonides kirjeldatakse QuantiFERON®-TB Gold-testi vähemsensitiivse vedela antigeeni (QuantiFERON®-TB Gold IT-testi eelkäija) spetsiifilisust ja QuantiFERON®-TB Gold IT-teste. Need uuringud hõlmavad testide tegemist aktiivset tuberkuloosi põdevatel patsientidel^{9,11, 19, 25}, lastel^{6-10, 25, 28}, HIV-positiivsetel^{2, 5, 20}, tervishoiutöötajatel^{13, 26, 32}, immuunsupressiooniga isikutel^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, samuti tuberkuloosikahtlusega isikutel^{7, 8, 10, 18} ning madala riskitasemega isikutel¹⁵.

Tuberkuliini nahatesti (TST) korratavus ja reprodutseeritavus korduva QuantiFERON®-TB Gold-testi korral.

USA-s läbi viidud spetsiifilisuse uuringu raames testiti ühte vabatahtlike rühma 4-5 nädalat pärast esialgset QuantiFERON®-TB Gold IT-testi ja TST-d. Seega saadi võrdluseks 260 isiku testitulemusi kahel testimishetkel. Kokkulangevus moodustas 99,6% (259/260). Varasem TST ei põhjustanud QuantiFERON®-TB Gold IT-testi positiivsete tulemuste hulga suurenemist.

10. TEHNILINE INFO

Määratlematud tulemused

Määratlematud tulemusi esineb harva ning nende põhjus võib olla järgmistes tehnilistes tegurites:

- verevõtmise ja 37 °C juures inkubeerimise vahe oli üle 16 tunni;
- vereproove hoiti väljaspool soovitatud temperatuurivahemikku (22 ± 5 °C);
- verevõtukatsuteid ei segatud piisavalt;
- ELISA-plaadid olid puudulikult pestud.

Kui Te peate võimalikuks, et verevõtmise või vereproovide käsitlemise juures võis tekkida tehnilisi probleeme, tuleb tervet QuantiFERON®-TB Gold IT-testi uue vereprooviga korrata. Stimuleeritud plasmaproovide ELISA-testi võib korrata, kui on alust oletada, et ELISA-plaate ei pestud piisavalt või esines muid ELISA-testimeetodi nõuete eiramisi. Määratlematud tulemused, mille põhjuseks võivad olla liiga madalad mitogeenide või liiga kõrged nullväärtused, ei tohiks testi kordamisel muutuda, välja arvatud juhul, kui ELISA-testi käigus tehti viga. Määratlematud tulemused tuleb sellistena edastada. Arstil on siis võimalik lasta võtta uus vereproov või määrata vajaduse korral muid uuringuid.

Plasmaproovide hüübimine

Kui plasmaproovide pikemaajalisel säilitamisel tekib nendes fibrinide hüübimine, tuleb proove tsentrifuugida, kuni tekib sete; see hõlbustab plasma pipeteerimist.

ELISA-testiga seonduvate probleemide lahendamine

Mittespetsiifiline värvireaktsioon

VÕIMALIK PÕHJUS	LAHENDUS
Plaadid ei ole piisavalt puhtad.	Peske plaati vähemalt 6x, kasutades iga süvendi kohta 400 µl pesemispuhvrit. Sõltuvalt kasutatavast pesuseadmest võib osutada vajalikuks üle 6 pesutsükli. Soovitame jätta iga pesutsükli vahele 5 sekundi pikkuse leotusaja.
ELISA-süvendite ristasaastumine.	Proovide hoolikas pipeteerimine ja segamine viib saastumisohtu miinimumi.
Kiti või selle komponentide kehtivusaeg on ületatud.	Kontrollige, et kiti säilivusaeg ei oleks möödas. Arvestage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentratsioon tuleb ära kasutada 3 kuu jooksul pärast rekonstitueerimist.
Ensüümsubstraadi lahus on saastunud.	Kui substraat muutub sinakaks, tuleb see kõrvaldada. Kontrollige, et kasutatavad reaktiivimahutid oleksid puhtad.

Standardite madalad OT-väärtused

VÕIMALIK PÕHJUS	LAHENDUS
Viga standardkiti lahuste tegemisel.	Valmistage standardkiti lahused täpselt pakendil olevate juhiste järgi.
Pipeteerimisviga.	Kontrollige, et pipetid oleksid täpselt tootja juhiste kohaselt kalibreeritud ja et neid kasutataks nõuetekohaselt.
Liiga madal inkubeerimistemperatuur.	ELISA-inkubatsioon peab toimuma toatemperatuuril (17-27 °C).
Liiga lühike inkubeerimisaeg.	Konjugaadi, standardite ja proovidega plaadi inkubeerimisaeg peab olema 120 ± 5 minutit. Ensüümsubstraadi lahust inkubeeritakse mikroplaadil 30 minutit.
Mikroplaadil oli vale filter.	Mikroplaati tuleb lugeda 450 nm filtri ja 620-650 nm referentsfiltri abil.
Reaktiivid olid liiga külmad.	Kõik reaktiivid (välja arvatud 100-kordne konjugaadikontsentratsioon) peavad enne testi tegemist olema saavutanud toatemperatuuri. See kestab umbes 60 minutit.
Kiti või selle komponentide kehtivusaeg on ületatud.	Kontrollige, et kiti säilivusaeg ei oleks möödas. Arvestage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentratsioon tuleb ära kasutada 3 kuu jooksul pärast rekonstitueerimist.

Tausta tugev värvumus

VÕIMALIK PÕHJUS	LAHENDUS
Plaadid ei ole piisavalt puhtad.	Peske plaati vähemalt 6x, kasutades iga süvendi kohta 400 µl pesemispuhvit. Sõltuvalt kasutatavast pesuseadmest võib osutada vajalikuks üle 6 pesutsükli. Soovitame jätta iga pesutsükli vahele 5 sekundi pikkuse leotusaja.
Inkubeerimistemperatuur on liiga kõrge.	ELISA-inkubatsioon peab toimuma toatemperatuuril (17-27 °C).
Kiti või selle komponentide kehtivusaeg on ületatud.	Kontrollige, et kiti säilivusaeg ei oleks möödas. Arvestage, et standard ja 100-kordne konjugatsioonikontsentraat tuleb ära kasutada 3 kuu jooksul pärast rekonstitueerimist.
Ensüümsubstraadi lahus on saastunud.	Kui substraat muutub sinakaks, tuleb see kõrvaldada. Kontrollige, et kasutatavad reaktiivimahutid oleksid puhtad.

Mittelineaarne standardkõver ja kahekordsete testide vahelised hälbed

VÕIMALIK PÕHJUS	LAHENDUS
Plaadid ei ole piisavalt puhtad.	Peske plaati vähemalt 6x, kasutades iga süvendi kohta 400 µl pesemispuhvit. Sõltuvalt kasutatavast pesuseadmest võib osutada vajalikuks üle 6 pesutsükli. Soovitame jätta iga pesutsükli vahele 5 sekundi pikkuse leotusaja.
Viga standardkiti lahuste tegemisel.	Valmistage standardkiti lahused täpselt pakendil olevate juhiste järgi.
Reaktiivid ei ole läbi segatud.	Segage reaktiive enne süvenditesse jaotamist kergelt või loksutage nende anumaid.
Ebauhtlane pipeteerimine või katkestused testi läbiviimisel.	Proovide ja standardite jaotamine peab toimuma katkestusteta. Kõik reaktiivid peavad olema enne testi algust kasutamiseks ette valmistatud.

Testimise käiku ning enamiku tehniliste probleemide lahendusi demonstreeriv video on koos tooteinfo ja tehnilise juhendiga CD-ROMil. CD-ROM on saadaval Cellestise firmas või toote müüja juures.

11. KIRJANDUS

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2008. [Epub ahead of print].
4. **Bocchino, M., et al.** 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.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** 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.* 2008. [Epub ahead of print].
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** 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.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** 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.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].
17. **Kang, Y.A., et al.** 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.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.

13. TESTI LÜHIKIRJELDUS

1. SAMM: VEREPROOVI INKUBEERIMINE

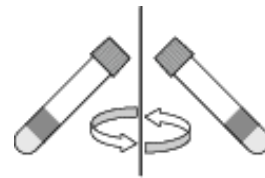
1. Võtta patsiendilt katsuti abil vereproov ja segada see katsutit **5 sekundi jooksul** (või 10 x) tugevasti loksutades korralikult ära. **Kogu katsuti sisesein** peab olema verrega kaetud.



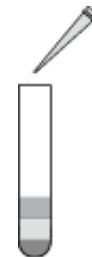
2. Inkubeerida katsuteid 16 - 24 tundi 37 °C juures **püstiasendis**.



3. Tsentrifugeerida katsuteid pärast inkubeerimist 5-15 minutit 1500-2200 g (RCF) juures, et plasma punalibled eraldada.

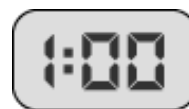


4. Pärast tsentrifugeerimist võtta igast katsutist plasmaproov IFN- γ kvantifitseerimiseks.



2. SAMM: IFN- γ -ELISA

1. ELISA-komponentidel (välja arvatud 100-kordne konjugaadikontsentraat) tuleb lasta vähemalt 60 minutit toatemperatuuril stabiliseeruda.

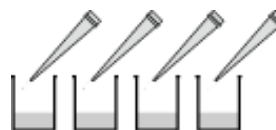


2. Rekonstitueerida rekombinantne humaan-gammainterferoon destilleeritud või deioniseeritud veega 8,0 RÜ/ml peale. Valmistada neli standardlahust.

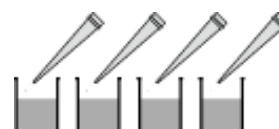


3. Rekonstitueerida lüofiliseeritud 100-kordne konjugaadikontsentraat destilleeritud või deioniseeritud veega.

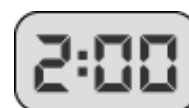
4. Valmistada rohelise lahjendiga konjugaat ja valada igasse süvendisse 50 μ l.



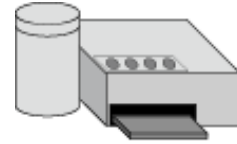
5. Lisada igasse süvendisse 50 μ l plasmaproovi ja 50 μ l standardeid. Segada raputis korralikult.



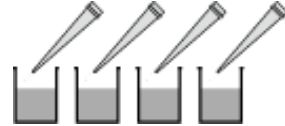
6. Inkubeerida 120 minutit toatemperatuuril.



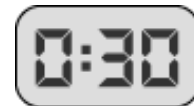
7. Pesta süvendid vähemalt 6 x läbi, kasutades iga süvendi jaoks 400 μ l pesemispuhvrit.



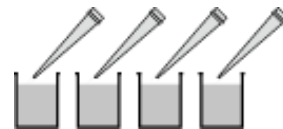
8. Tilgutada igasse süvendisse 100 μ l ensüümsubstraadi lahust.



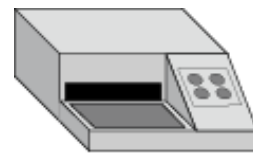
9. Inkubeerida 30 minutit toatemperatuuril.



10. Tilgutada igasse süvendisse 50 μ l deaktivaatorit. Segada raputiga korralikult.



11. Mõõta tulemusi 450 nm filtri ja 620-650 nm referentsfiltriga.



12. Analüüsida testi tulemusi.





Toodetud firmadele:

Cellestis Limited (Austraalia) ja Cellestis GmbH (Euroopa)

1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Austraalia

Tel. (Austraalia) +61 3 9571 3500, (USA) 800 519 4627, (Euroopa) +49 6151 428-59-0

E-post: quantiferon@cellestis.com

www.cellestis.com

Dok. nr. 05990301C

August 2009

EC	REP
----	-----

Volitatud esindaja:

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover

Germany

